

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris  
CZU: 616.611.-002-053.2

**Ciuntu Angela**

**GLOMERULONEFRITA PRIMARĂ LA COPII: MECANISME  
ETIOPATOGENICE, CLINICA, PROGNOSTIC**

**322.01 – PEDIATRIE ȘI NEONATOLOGIE**

Teză de doctor habilitat în științe medicale

**Consultant științific:**

**Revenco Ninel,**  
doctor habilitat în științe medicale,  
profesor universitar  
(322.01 – pediatrie și neonatologie)

**Autor:**

**Ciuntu Angela,**  
doctor în științe medicale,  
conferențiar universitar

**Chișinău, 2017**

**©Ciuntu Angela, 2017**

|       | <b>Cuprins:</b>                                                                                                                                                      |     |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|       | <b>ADNOTARE (în limbile română, rusă, engleză).....</b>                                                                                                              | 5   |
|       | <b>LISTA ABREVIERILOR.....</b>                                                                                                                                       | 8   |
|       | <b>ÎNTRUDUCERE.....</b>                                                                                                                                              | 9   |
| 1.    | <b>GLOMERULONEFRITA PRIMARĂ LA COPII: MECANISME PATOGENICE, CLINICE, EVOLUTIVE.....</b>                                                                              | 22  |
| 1.1.  | Mecanisme patogene și fiziopatologice ale glomerulonefritei primare la copii.....                                                                                    | 22  |
| 1.2.  | Rolul modificărilor histologice și corelațiile cu markerii biochimici în glomerulonefrită la copii.....                                                              | 33  |
| 1.3.  | Importanța factorilor de risc și mecanisme de progresie ale glomerulonefritei la copii.                                                                              | 41  |
| 1.4.  | Semnificația modificărilor moleculelor de semnalizare celulară și a sistemelor enzimatică în ser și urină în progresarea glomerulonefritei.....                      | 50  |
| 1.5.  | Concluzii la capitolul 1.....                                                                                                                                        | 63  |
| 2.    | <b>MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....</b>                                                                                                                         | 66  |
| 2.1.  | Caracteristica generală a studiului: grupul de cercetare, etapele și design-ul studiului.....                                                                        | 66  |
| 2.2.  | Metodele de evaluare utilizate în studiu.....                                                                                                                        | 73  |
| 2.3.  | Explorările imunoenzimatică și biochimice utilizate în studiu.....                                                                                                   | 75  |
| 2.3.1 | Metodele de investigare imunoenzimatică.....                                                                                                                         | 76  |
| 2.3.2 | Metodele de evaluare a indicilor stresului oxidativ și protecției antioxidante.....                                                                                  | 78  |
| 2.4.  | Metodele de evaluare statistică.....                                                                                                                                 | 86  |
| 2.5.  | Concluzii la capitolul 2.....                                                                                                                                        | 89  |
| 3.    | <b>PROFILUL CLINICO – PARACLINIC AL COPIILOR CU GLOMERULONEFRITĂ PRIMARĂ.....</b>                                                                                    | 91  |
| 3.1.  | Evaluarea parametrilor clinici și paraclinici ale copiilor cu glomerulonefrită acută..                                                                               | 91  |
| 3.2.  | Aprecierea statutului clinic și ale parametrilor paraclinici la copiii cu glomerulonefrită cronică.....                                                              | 107 |
| 3.3.  | Factorii de risc în dezvoltarea injuriei renale la copiii cu glomerulonefrită.....                                                                                   | 112 |
| 3.4.  | Concluzii la capitolul 3.....                                                                                                                                        | 117 |
| 4.    | <b>PARTICULARITĂȚILE MODIFICĂRILOR MOLECULELOR DE SEMNALIZARE CELULARĂ ȘI ALE PROCESELOR DE OXIDARE CU RADICALI LIBERI LA COPII CU GLOMERULONEFRITĂ PRIMARĂ.....</b> | 118 |
| 4.1.  | Estimarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară (interleukinelor și chemokinelor) în urină la copiii cu glomerulonefrită.....                                | 118 |
| 4.2.  | Valoarea diagnostică a factorilor de creștere în patogenia glomerulonefritei la copii.....                                                                           | 132 |
| 4.3.  | Semnificația clinică a markerilor stresului oxidativ în evoluția clinică a glomerulonefritei la copii.....                                                           | 139 |
| 4.4.  | Importanța diagnostică a sistemului antioxidant în evoluția clinică a glomerulonefritei la copii.....                                                                | 149 |
| 4.5.  | Concluzii la capitolul 4.....                                                                                                                                        | 156 |

|      |                                                                                                                                              |     |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.   | <b>PARTICULARITĂȚILE MODIFICĂRILOR UNOR INDICI AI HOMEOSTAZEI BIOCHIMICE LA COPIII CU GLOMERULONEFRITĂ PRIMARĂ.....</b>                      | 158 |
| 5.1. | Dinamica și activitatea enzimelor ciclului adenilic și arginazei în evoluția clinică ale glomerulonefritei la copii.....                     | 158 |
| 5.2. | Rolul modificărilor pseudocolinesterazei în evoluția clinică, prognozarea complicațiilor glomerulonefritei la copii.....                     | 165 |
| 5.3. | Importanța diagnostică a enzimelor plasmatice, proteolitice, lizozomale în patogenia glomerulonefritei la copii.....                         | 168 |
| 5.4. | Concluzii la capitolul 5.....                                                                                                                | 193 |
| 6.   | <b>MODIFICĂRILE HISTOLOGICE ȘI CARACTERISTICA UNOR CORELAȚII CLINICO-PARACLINICE, BIOCHIMICE ÎN EVOLUȚIA GLOMERULONEFRITEI LA COPII.....</b> | 196 |
| 6.1. | Caracteristica clinico-paraclinică a modificărilor histopatologice la copiii cu glomerulonefrită primară.....                                | 196 |
| 6.2. | Modificările histologice la copiii cu glomerulonefrită.....                                                                                  | 199 |
| 6.3. | Corelații histopatologice și biochimice în evoluția glomerulonefritei la copii.....                                                          | 212 |
| 6.4. | Concluzii la capitolul 6.....                                                                                                                | 216 |
|      | <b>CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE.....</b>                                                                                       | 217 |
|      | <b>BIBLIOGRAFIE.....</b>                                                                                                                     | 221 |
|      | <b>ANEXE.....</b>                                                                                                                            | 244 |
|      | Anexa 1. Algoritm de diagnostic în glomerulonefrită.....                                                                                     | 245 |
|      | Anexa 2. Schema patogenică a glomerulonefritei la copii.....                                                                                 | 246 |
|      | Anexa 3. Certificate de inovator.....                                                                                                        | 247 |
|      | Anexa 4. Acte despre implementare inovațională.....                                                                                          | 257 |
|      | <b>DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....</b>                                                                                          | 272 |
|      | <b>CV al autorului.....</b>                                                                                                                  | 273 |



## ADNOTARE

Ciuntu Angela „**Glomerulonefrita primară la copii: mecanisme etiopatogenice, clinica, prognostic**”. Teză pentru obținerea gradului științific de doctor habilitat în științe medicale, Chișinău, 2017. Teza este expusă pe 275 pagini și constă din introducere, 6 capitole, concluzii generale și recomandări practice, 93 tabele, 43 figuri, anexe. Bibliografia include 394 surse. La tema tezei au fost publicate 64 lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** glomerulonefrită, citokine, factori de creștere, enzime proteolitice, plasmatică, lizosomale.

**Domeniul de studiu:** pediatrie.

**Scopul studiului:** Elucidarea mecanismelor etiopatogenice prin estimarea particularităților fiziopatologice, clinico-evolutive, de progresare a diferitor variante ale glomerulonefritei (GN) pentru optimizarea diagnosticului clinic, prognosticului și elaborarea algoritmilor diferențiate de diagnostic, tratament, profilaxie, reducerea recidivelor și riscului dezvoltării bolii renale cronice (BRC).

**Obiectivele studiului:** Studiarea particularităților clinico-evolutive, factorilor de risc ai diferitor variante ale GN primare la copii; estimarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară și aprecierea rolului lor; stabilirea markerilor biochimici de progresare a nefrosclerozei; indentificarea rolului stresului oxidativ și al sistemului antioxidant; evaluarea informativității diagnostice ale sistemelor enzimatică în sânge și urină; studiul modificărilor histopatologice și corelarea lor cu modificările clinico-paraclinice, biochimice și determinarea variabilelor de prognostic nefavorabil precoce și a riscului dezvoltării BRC; elaborarea schemei patogenice a GN; elaborarea algoritmului de diagnostic, tratament diferențiat în aprecierea evoluției, variabilelor de risc ale injuriei cronice renale în GN la copii.

**Metodologia cercetării științifice:** Studiul a fost realizat pe un lot de 289 copii cu GN primară. Au fost utilizate: metode clinice, paraclinice, metode special selectate (molecule de semnalizare celulară – citokine, chemokine, factori de creștere, de apreciere a sistemului pro-antioxidant, sistemelor enzimatică în sânge și urină ș. a.) și metode morfologice. Rezultatele obținute au fost supuse analizei statistice computerizate și prezentate prin procedee tabelare și grafice.

**Noutatea și originalitatea științifică:** A fost realizat un studiu complex clinico-paraclinic, histologic prospectiv cu estimări biochimice la copii cu diferite variante ale GN în dinamica maladiei. A fost studiat rolul moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere, sistemului pro-antioxidant, oligoelementelor, sistemelor enzimatică în sânge și urină la diferite etape clinico-evolutive ale GN la copii.

**Problema științifică aplicativă de importanță majoră soluționată** constă în elaborarea unei metodologii de format propriu pentru aprecierea variantelor clinice ale GN, unei scheme patogenice de lucru pentru care au fost definite abordări optime de diagnostic, diagnostic diferențial, de corecție medicală individualizată direcționate spre restabilirea maximală a funcției renale și calității vieții viitorului adult.

**Semnificația teoretică:** în premieră a fost apreciat rolul markerilor biochimici în ser și urină asupra mecanismelor patogenice ale GN, diagnosticului evolutiv și prognosticului bolii.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** a fost structurată sindromologia și evoluția GN prin investigații biochimice în sânge și urină ce ar permite de a stabili factorii predictivi în progresarea GN, dar și ai prognosticului acesteia.

**Implementarea rezultatelor științifice:** În baza studiului prezent au fost implementate noi metode de diagnostic al pacienților cu GN primară în secția nefrologie a IMSP IM și C, IMSP SCM nr.1 ”V.Ignatenco” și în procesul didactic al Departamentului Pediatrie IP USMF „Nicolae Testemițanu”, cu scop de ameliorare a asistenței medicale acordată copiilor cu glomerulonefrită.

## РЕЗЮМЕ

**Чунту Анжела. Первичный гломерулонефрит у детей: патогенетические механизмы, клиника, прогноз.** Диссертация доктора хабилитат медицинских наук. Кишинев, 2017. Структура диссертации: введение, 6 глав, общие выводы и рекомендации, библиография включает 394 источников, 275 страниц основного текста, 93 таблиц, 43 рисунков, приложения. Результаты исследования опубликованы в 64 научных работах.

**Ключевые слова:** гломерулонефрит, дети, цитокины, факторы роста, протеолитические, плазматические, лизосомальные ферменты.

**Область исследования:** педиатрия. **Цель исследования:** выяснение этио-патогенетических механизмов путем оценки патофизиологических, клинико-эволютивных особенностей течения и прогрессирования различных вариантов гломерулонефрита (ГН) для оптимизации клинической диагностики, прогноза и разработки дифференцированных алгоритмов диагностики, лечения, профилактики и снижения рецидивов и осложнений (ХПН).

**Задачи исследования:** Изучить клинико-эволютивные особенности, факторы риска различных вариантов первичного ГН у детей; оценить уровень клеточных сигнальных молекул и их роль в патогенезе ГН у детей; определить биохимические маркеры прогрессирования нефросклероза при ГН; выяснить роль окислительного стресса и антиоксидантной системы; оценить диагностическую информативность ферментных систем крови и мочи; исследовать морфологические изменения и их корреляция с клинико-параклиническими, биохимическими изменениями и выявить показатели неблагоприятного прогноза и риска раннего развития ХПН; разработка патогенетической схемы развития ГН у детей; разработка алгоритма диагностики, дифференцированного лечения и оценки течения, показателей риска хронического поражения почек при ГН у детей.

**Методология исследования:** Исследование проводилось на 289 детей с первичным ГН. Были использованы: клинические и лабораторные методы, в том числе определение клеточных сигнальных молекул - цитокинов, хемокинов, факторов роста, оценка про- и антиоксидантной системы, исследование ферментов в крови и моче и морфологические методы. Полученные результаты были подвергнуты статистическому анализу с использованием компьютерных программ.

**Научная новизна и оригинальность:** Было проведено комплексное клинико-параклиническое, гистологическое, биохимическое исследование у детей с различными вариантами ГН в динамике для последующей оценки этио-патогенетических аспектов болезни и улучшения ее лечения. Были изучены роль сигнальных молекул, факторов роста, про- и антиоксидантной системы, ферментных систем крови и мочи на различных этапах развития ГН у детей.

**Решенная научная проблема:** разработка методологии собственного формата для оценки клинических вариантов ГН для которых были определены оптимальные подходы для дифференциальной диагностики и индивидуализированной медикаментозной коррекции, направленные на максимальное восстановление функции почек и качества жизни пациента.

**Теоретическая значимость:** впервые была оценена роль биохимических маркеров крови и мочи в патогенетических механизмах развития ГН, а также для диагностики и прогнозирования эволюции заболевания.

**Практическая значимость:** Была структурирована синдромология и эволюция ГН посредством биохимических исследований в крови и моче, что позволило определить прогностические факторы прогрессирования и течения ГН.

**Внедрение результатов:** были внедрены в клиническую практику Центра Охраны Матери и Ребенка, нефрологическое отделение муниципальной клинической детской больницы им. В.Игнатенко, а также в учебном процессе Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета им. Николае Тестемицану.

## SUMMARY

**Ciuntu Angela. Primary glomerulonephritis in children: pathogenic mechanism, clinics, prognosis**, Ph.D. thesis in medicine. Chisinau, 2017. The book contains 275 pages of main text, it is divided into: introduction, 6 chapters, conclusions and recommendations, bibliography composed of 394 titles, 93 tables, 43 figures, and appendices. The results are published in 64 scientific papers.

**Keywords:** glomerulonephritis, cytokines, growth factors, proteolytic, plasmatic and lysosomal enzymes.

**Purpose of the study:** To elucidate the etiopathogenetic mechanisms by estimating the pathophysiological and clinical peculiarities of the progression of various forms of glomerulonephritis (GN). All these are aimed to optimize the clinical diagnosis, prognosis, and developing of differential diagnostic algorithms, treatment, prophylaxis to reduce recurrence and exacerbations (CKD).

**Study objectives:** to study the clinical-evolutionary peculiarities, the risk factors of various variants of primary GN in children; to estimate the level of cell signaling molecules and assessing their role; to establish the biochemical markers of progression of nephrosclerosis; to identify the role of oxidative stress and antioxidant system; to assess the diagnostic informativeness of enzyme systems in the blood and urine; to study the histopathological changes and their correlation with clinical and biochemical changes and to determinate the early unfavorable prognostic variables and the risk of CKD development; to elaborate the pathogenic scheme of GN; to elaborate the diagnostic algorithm, differential treatment in the assessment of the evolution, risk variables of chronic kidney injury in GN in children.

**Methodology of scientific research:** The study was conducted on 289 children with primary GN. Clinical, paraclinical and specially selected methods (cell signaling molecules - cytokines, chemokines, growth factors, pro-antioxidant system, enzymatic systems in the blood and urine, etc.) and morphological methods have been used. The obtained results were subjected to the statistical analysis and presented by tabular and graphical procedures.

**Scientific novelty and originality:** The work comes along with a range of complex clinical and laboratory studies, histology prospective study with biochemical estimation in different forms of GN in children. The role of cellular signaling molecules, growth factors, pro-antioxidant system, oligoelements, enzymatic systems in the blood and urine at different clinical and evolutionary stages of GN in children was established.

**Scientific issue** treated in this thesis is to develop a methodology for proper assessing of different clinical forms of glomerulonephritis. Here are emphasized optimal approaches of differential diagnosis and individualized medical correction, aimed to restore maximal renal function and quality of life of future adult.

**Theoretical significance:** For the first is appreciated the action of biochemical markers in serum and urine on pathogenetic mechanisms of GN, diagnosis and prognosis of disease evolution.

**Practical significance:** This research structures the syndromology and evolution of GN through biochemical investigations in serum and urine that would allow determining predictive factors in the progression of GN, along with its prognosis.

**Implementation of results** was achieved due to clinical activity of IM and C, Municipal clinical pediatric hospital "V. Ignatenco" and didactic activity of State Medical and Pharmaceutical University "Nicolae Testemitanu" of Republic of Moldova, with the aim of improving the healthcare of children with glomerulonephritis.

## LISTA ABREVIERILOR

|                                                          |                                                              |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| AAT – activitate antioxidantă totală                     | IL-6 – interleukina-6                                        |
| Ac – anticorpi                                           | IL-8 – interleukina-8                                        |
| ARC – afecțiuni renale cronice                           | ITU – infecția tractului urinar                              |
| ADA-aza – adenozindezaminaza                             | LAP – leucinaminopeptidaza                                   |
| Adgptl 4 – angiopoietin-like 4                           | LDH – lactatdehidrogenaza                                    |
| Ag – antigen                                             | LES – lupus eritematos sistemic                              |
| AGE – produși finali de glicare avansată                 | LRA – leziune renală acută                                   |
| AgHBs – antigen HBs                                      | MBG – membrană bazală glomerulară                            |
| AMP-aza – adenozinmonofosfat–dezaminaza                  | MCP-1 – proteina chemoatractantă monocitară-1                |
| ANCA – anticorpi antineutrofili citoplasmatici           | MEC – matrice extracelulară                                  |
| ART – afecțiune renală terminală                         | MIP-1 $\alpha$ – proteina monocitară inflamatorie 1 $\alpha$ |
| ASG – antihiyaluronidază                                 | MPO – mieloperoxidază                                        |
| ASLO – antistreptolizină                                 | NAG- $\beta$ – N-acetyl- $\beta$ -glucozaminidaza            |
| AUC – Area Under Curve                                   | ND – nefropatie diabetică                                    |
| BRA – blocatorii receptorilor angiotensinei              | NF-kB – factorul nuclear kappa B                             |
| BRC – boală renală cronică                               | NO – oxid de azot                                            |
| C <sub>3</sub> – fracția C <sub>3</sub> a complementului | PAI-1 – inhibitorul 1 al activatorului plasminogenului       |
| SDF-1 – factorul stromal derivat -1                      | PBR – puncție biopsie renală                                 |
| CIC – complexe imune circulante                          | PCE – pseudocolinesteraza                                    |
| CM – celule mezenchimale                                 | PDGF-B – factorul de creștere derivat plachetar              |
| CTGF – factorul de creștere a țesutului conjunctiv       | PHis – peptide histidinice                                   |
| DA – dermatita atopică                                   | PPOA – produșii proteici de oxidare avansată                 |
| ET-1 – endotelina - 1                                    | RFG – rata filtrației glomerulare                            |
| FAP – factor de activare plachetar                       | RLO – radicali liberi oxigen                                 |
| FGF- $\beta$ – factorul de creștere fibroblastic-beta    | ROC – receiver operator characteristic                       |
| G-6-PDH– glucoza-6-fosfat dehidrogenaza                  | SD – steroiddependență                                       |
| GN – glomerulonefrită                                    | SHU – sindrom hemolitic uremic                               |
| GNA – glomerulonefrită acută                             | SKK – sistemul kalikrein-kininic                             |
| GNAPS – glomerulonefrita acută poststreptococcică        | SN – sindrom nefrotic                                        |
| GNC – glomerulonefrită cronică                           | SNI – sindrom nefrotic idiopatic                             |
| GNM – glomerulonefrită membranoasă                       | SNISR – sindrom nefrotic idiopatic steroid-rezistent         |
| GNMP – glomerulonefrită membrano-proliferativă           | SNSD – sindrom nefrotic steroid-dependent                    |
| GNMzP – glomerulonefrită mezangial-proliferativă         | SNSM – sindrom nefrotic cu schimbări minimale                |
| GNP – glomerulonefrită primară                           | SNSR – sindrom nefrotic steroid-rezistent                    |
| GNRP – glomerulonefrită rapid progresivă                 | SNSS – sindrom nefrotic steroid-sensibil                     |
| GSFS – glomeruloscleroză focal-segmentară                | SRAA – sistemul renin-angiotensină-aldosteron                |
| HTA – hipertensiune arterială                            | SRO – specii reactive de oxigen                              |
| IECA – inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei  | TNF- $\alpha$ – factorul necrozei tumorale $\alpha$          |
| IL-1 $\beta$ – interleukina 1 $\beta$                    | VEGF – factorul de creștere vascular endotelial              |
|                                                          | $\gamma$ -GTP – $\gamma$ -glutamyltransferază                |

## INTRODUCERE

**Actualitatea și importanța problemei abordate.** Datele epidemiologice denotă că în structura patologiei renourinare la copii, în ultimele decenii, a crescut cu mult frecvența glomerulonefritei (GN). Marea majoritate a autorilor constată că GN reprezintă o problemă de sănătate publică cu impact major asupra morbidității și letalității copiilor. Conform statisticilor moderne, afecțiunea dată ocupă o poziție specială în patologia renourinară, nu numai datorită creșterii continue a morbidității, dar și evoluției clinice dominate de severitatea sindromului nefrotic (SN), modificărilor funcționale, morfologice, biochimice, tendinței de recidivare, procentului înalt de cronicizare și invalidizare, dificultăților în tratament, profilaxie [39, 105, 124, 161, 164, 216]. Conform studiilor North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS), incidența GN la copii este în continuă creștere și constituie 14,0% [33].

Astfel, marele interes ce se acordă acestei probleme este justificat și prin faptul că, în prezent, GN se plasează pe locul al doilea după maladiile congenitale sau ereditare ale rinichilor în structura factorilor cauzali ai bolii renale cronice (BRC) la copii.

Studii efectuate la nivel global au raportat recent că glomerulonefrita cronică (GNC) ca cauză a BRC are o prevalență de la 30-60% [24, 344]. După datele registrului ESPN/ERA-EDTA, BRC terminală cauzată de glomerulonefrită în Europa constituie 15%, [124], comparativ cu cercetările efectuate în Japonia (22%) [154], în Australia și Noua Zeelandă – 29%, conform datelor registrului de Dializă și Transplant (ANZDATA) [217], registrul UK – 18% [190], registrul Italian – 5% [35], registrul Belgian – 7% [229].

Datele studiului PodoNet Consortium efectuat pe un lot de 1655 copii din 67 centre nefrologice din 21 țări, au demonstrat că GN ca factor cauzal al BRC la copii, constituie de la 5-29 % în cazul BRC terminale, dintre care 64 % copii au prezentat sindrom nefrotic steroid-rezistent (SNSR) în primii 5 ani de viață, 6 % – sindrom nefrotic congenital, iar 17 % copii au avut și modificări extrarenale. Conform rezultatelor cercetării date, cea mai frecventă cauză de SNSR a fost glomeruloscleroza focal segmentară (GSFS) – 56%, SN cu schimbări minimale în glomeruli (SNSM) – 21% și glomerulonefrita mezangioproliferativă (GNMzP) – 12% [338].

În ultimele decenii incidența glomerulonefritei acute poststreptococe (GNAPS) a scăzut în Statele Unite și în alte țări dezvoltate, în timp ce frecvența GN postinfecțioase provocată de infecția stafilococică a crescut [343]. Cercetătorii japonezi au raportat că incidența GN postinfecțioasă a atins punctul culminant în anii 1990 și că GNAPS, care a reprezentat aproape toate cazurile de GN postinfecțioasă în anii 1970, a scăzut la aproximativ 40-50%, începând cu anii 1990, în timp ce proporția nefritei determinată de infecția cu *Staphylococcus aureus* a crescut până la 30% [343].

Incidența globală a GNAPS la copii cu vârsta cuprinsă între 3-16 ani constituie 15,5 cazuri pe an [32]. Datele literaturii de specialitate bazate pe un vast material clinic denotă, că în prezent incidența anuală a sindromului nefrotic idiopatic (SNI) la copii în vârstă până la 16 ani constituie în Europa, Statele Unite 3-7 cazuri la 100 000, iar prevalența cumulativă – 16/100000 copii [45, 115]. Incidența SNI a fost raportată ca fiind de 2,0 /100 000/an la copiii caucazieni, cu rate mai mari la copiii arabi (9,2 /100 000/an) și copii din Asia (6.2-15.6 / 100 000 /an) [39, 105, 215].

Incidența SN în Noua Zeelandă este aproximativ de 20 cazuri la 1 mln copii sub vârsta de 15 ani [365]. Incidența SN variază în funcție de etnie, rasă, zona geografică. Aceste variații în distribuția etnică și geografică a SNI demonstrează influențele genetice și de mediu în dezvoltarea SNI [30, 119, 382]. La copiii cu vârsta mai mică de 8 ani în debut, raportul dintre băieți și fete variază de la 2:1 până la 3:2 în diferite studii [39]. La copiii mai mari, la adolescenți și adulți, prevalența de sex masculin-feminin este aproximativ egală. Datele Studiului International Study of Kidney Disease in Children Nephrotic syndrome in children (ISKDC) indică faptul că 66% dintre pacienți cu SNSM sau GSFS sunt de sex masculin, în timp ce 65% dintre copii cu GNMP sunt fete, 70% din copii cu SNSM au vârsta sub 5 ani [162, 242].

S-a demonstrat că aproximativ 80% din toate formele de SN la copil au aspect de modificări minimale în glomeruli, iar 20% reprezintă glomerulonefritele cronice și afecțiunile renale dobândite de etiologie deseori necunoscută [162].

Aproximativ 90% copii cu SN sunt steroid-senzitivi (SNSS), obțin remisiunea la terapia corticosteroidă zilnică și au o funcție renală păstrată de durată [162]. Statisticile denotă că aproximativ 20% din copii manifestă o rezistență la steroizi și un eșec la terapia cu prednizolon, iar 3% cazuri prezintă rezistență steroidă tardivă [163].

Conform unor cercetări recente, GSFS primară – entitate clinico-paraclinică asociată cu proteinurie și BRC la copii și adulții tineri – însumează 31-60% din toate cazurile de SNI. Bonilla-Felix și coautorii au raportat o creștere semnificativă (de la 22% la 47%) a incidenței GSFS în biopsiile renale efectuate la copiii cu SNI pe o perioadă de 20 de ani [56].

Estimarea incidenței și prevalenței GSFS la copii, conform rapoartelor clinice, registrelor și biopsiilor renale, este dificilă prin faptul că, spre deosebire de adulți, copiii nu sunt supuși examenului prin biopsie renală. Rapoartele clinice ne indică frecvent că diagnosticul de SNSM este bazat pe răspunsul la steroizi, ceea ce duce la subestimarea diagnosticului de GSFS [65]. Actualmente, cel mai amplu registru pediatric este NAPRTCS care colectează date despre afecțiunile renale cronice (ARC), pacienții cu transplant renal și cei care beneficiază de dializă. În baza unui studiu pe un lot de 6000 copii cu ARC și cu rata de filtrare glomerulară (RFG) mai mică de 75 ml/min / 1,73m<sup>2</sup>, s-a demonstrat că GSFS are cea mai mare tendință de a progresa

spre o afecțiune renală terminală (ART), ce depășește semnificativ afecțiunile malformative renale, ca hidronefroza, uropatiile obstructive și cele de reflux. La 70-75 % pacienți diagnosticați cu GSFS primară a fost prezentă rezistența la terapia cu glucocorticoizi [246]. Potrivit statisticii NAPRTCS, la aproximativ 60% din copiii cu GSFS, în pofida tratamentului medical, pe parcursul a 24 luni de la introducerea lor în registrul dat, boala se complică, ei având nevoie de dializă sau transplant renal [246]. Cercetările au demonstrat că GSFS progresează spre BRC terminală în 50 % din cazuri în primii ani de la stabilirea diagnosticului, în special la copiii cu creșterea clearance-ului creatininei serice, persistența proteinuriei din perioada debutului maladiei, cu rezistență la tratamentul convențional. Aproximativ în 30-40% cazuri GSFS recidivează după transplantul renal. Odată cu avansarea în vârstă, frecvența GSFS la copiii cu SN în vârstă de 0-6 ani nu depășește 10%, și constituie 20-50% la adolescenți [58].

Experiența acumulată referitoare la evoluția SN a arătat că în 80-90% din cazuri copiii dezvoltă una sau mai multe recidive, pe când în 30-50% din cazuri recidivele sunt frecvente și prezintă steroiddependență [34, 188, 327], în 34-64% cazuri SNSR progresează spre BRC terminală pe parcursul a 10 de ani de la diagnosticare [219, 377, 378].

#### **Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare.**

Prevalența înaltă a glomerulonefritei ca factor cauzal al BRC la copii, tendința spre recidivare, asocierea complicațiilor grave, dificultățile de diagnostic, inexistența metodelor selective optime și inofensive de tratament și/sau profilaxie constituie unele din multiplele probleme actuale ale nefrologiei clinice contemporane. Studiile efectuate în ultimii ani de către cercetători din lumea întreagă arată că rezultatele tratamentului pe termen lung al pacienților cu GN rămân incerte, multe din problemele practice urmează a fi soluționate în special aspectele legate de dereglările homeostaziei și rolul ei în evoluția bolii. Cercetările sporadice, informațiile contradictorii ne-au determinat să efectuăm un studiu multimodal în GN la copii.

Discutabile rămân multe probleme de etiopatogenie, privind factorii de risc, activitatea procesului inflamator, de profilaxie a complicațiilor. Conform studiilor recente cel puțin 50% din recidive sunt declanșate de infecții virale ale tractului respirator superior, ca rezultat al eliberării de citokine [231, 286]. Astfel, alte infecții, cum ar fi infecții ale tractului urinar (ITU), diareea, peritonita, reprezintă triggeri ai recăderilor în SN la copii [231]. Există cercetări cu referire la rolul ITU în recidiva SN, precum și cauză a răspunsului slab la terapia cu steroizi [19].

Printre factorii de risc în progresia BRC terminale este raportată proteinuria, vârsta mică la debutul bolii, insuficiența renală acută, scleroza focală extinsă prezentă al biopsia renală [219]. Factorii de prognostic pe termen lung în SNI constituie prezența infecțiilor intercurrente și răspunsul la tratamentul cu steroizi [257]. Studii recente indică faptul că remisiunea inițială la un

termen  $\geq 9$  zile și prima recidivă în termen de 6 luni au fost printre riscurile semnificative pentru dezvoltarea SN frecvent recidivant [234].

Factorii genetici reprezintă predictorii în evoluția bolii. Unul dintre cele mai mari studii efectuate de către Buscher și coautorii a examinat rezultatele evoluției bolii pe o perioadă de supraveghere timp de 10 ani a 231 de copii într-o cohortă europeană cu SNSR. Pentru cei care prezintă SN după vârsta de 3 luni, la 58% copii cu SNSR asociat cu mutații genetice, boala a progresat spre BRC terminală, comparativ cu 29% cu SNSR fără mutații genetice identificate [63].

Riscul pentru rezistența hormonală primară este în funcție de modificările histopatologice inițiale. Cercetările efectuate de ISKDC au arătat că 70%, 44% și 7 % de copii cu GSFS, GNMzP și SNSM au prezentat rezistență primară la steroizi [162].

În ciuda ratei inițiale de răspuns favorabil de 90% până la 95% și prognostic favorabil al copiilor cu SNSS, recidivele apar de la 60% până la 90% din cei care au răspuns inițial, care pot duce la creșterea morbidității, complicații și scăderea calității vieții [168]. Boala progresează, se atestă recăderi frecvente, fiind adesea însoțită de dependența de steroizi la aproximativ 20% până la 60% dintre pacienți [329].

Gipson D. S. și coautorii au raportat un risc de 90% mai mic de progresie spre BRC terminal la pacienții cu SNI care au obținut remisiune [139]. Studii efectuate de Abeyagunawardena A. S. și coautorii au examinat rezultatele tratamentului a 66 copii cu SNSR pe parcursul a 10 ani [15]. Astfel, în urma tratamentului efectuat supraviețuirea renală a fost de 90%, în timp ce aproape 50% din numărul celor care nu au răspuns la tratament au progresat spre BRC terminală [377].

Răspunsul la terapia cu imunosupresoare de a doua linie și riscul de progresie poate fi diferit la copiii care au răspuns inițial la tratament, dar care apoi au devenit nonsensibili (nonsensibili tardiv). Într-un studiu multicentric efectuat de Straatmann C. și coautorii au demonstrat, că până la 87% copii din cei nonsensibili tardivi au răspuns inițial la un inhibitor de calcineurină. Totuși, pe termen lung, 31% copii din cohortă au devenit nonreceptivi, cu scăderea funcției renale și creșterea progresivă a BRC terminale, comparativ cu cei care au răspuns la tratament [319]. Esfahani S. T. și coautorii examinând evoluția SN la peste 200 de copii, cu o supraveghere de la 5 până la 20 de ani, a constatat că, 83% cazuri au prezentat recidive în copilărie și peste 50% au necesitat tratament imunosupresor suplimentar indicând probabil prezența SN frecvent recidivant. La mai puțin de jumătate din cohortă s-au atestat remisiune cu o durată mai mare de 3 ani [123].

În mod similar, Ishikura K și coautorii, într-un studiu randomizat, controlat efectuat în Japonia, a supravegheat pe parcursul a 10 ani eficacitatea tratamentului cu ciclosporină la copii cu SN frecvent recidivant menționând că 50 la sută au continuat să prezinte recăderi și să urmeze



tratament cu imunosupresoare și în perioada adultului. Numărul mare de recăderi în copilărie prezintă un factor de risc pentru dezvoltarea recurențelor în perioada adultului [164].

Unul dintre cele mai mari studii a fost efectuat de Ruth E. M. și coautorii pe un lot de 42 de copii cu SN cu o medie de supraveghere de 22 de ani. 33% din pacienți au avut recurențe și în perioada adultului. Numărul de recurențe în timpul copilăriei și adolescenței și necesitatea terapiei de linia a doua au fost riscuri pentru recidive în perioada adultului [281]. Complicații pe termen lung ale SNSS au fost recidivele în perioada adultului ce au constituit – 5 - 40 % [125], hipertensiunea arterială – 6-46 % [164], reducerea RFG și BRC terminală <1 % cazuri pe parcursul a 20 ani de supraveghere [125]. Mortalitatea în glomerulonefrită acută (GNA) în grupele de vârstă cel mai frecvent afectate, la copii și adolescenți, a fost raportată la 0-7% pacienți [206].

Studiile recente relevă rolul diferitor factori (umoral și celulari) asupra proceselor de fibrogenză. Citokinele și factorii de creștere sunt mediatori care, în coroborare cu alți markeri, prin mecanisme paracrine și autocrine, contribuie la progresarea leziunilor renale în GN [36, 46, 73]. Studii experimentale au demonstrat că scleroza glomerulară se asociază cu hipertrofia glomerulară. Deci aceste două fenomene sunt rezultatul acțiunii unor stimuli comuni. Există dovezi in vivo și experimentale care sugerează că unele citokine sunt responsabile atât de hipertrofia cât și de hiperplazia glomerulilor [74].

Problema progresării GN este determinată nu numai de mecanismele imune, dar și de cele neimune ca rezultat al dereglărilor homeostaziei, celor metabolice, ale cascadei de coagulare ș. a. care contribuie la evoluția trenantă a GN, la asocierea complicațiilor, în special a BRC.

Conform cercetărilor din literatură de specialitate, progresarea GN este rezultatul proliferării celulare cu acumularea de matrice celulară și scleroză glomerulară. Ca urmare, nefroscleroza și fibroza interstițială sunt factorii de risc de bază în dezvoltarea BRC terminale [117, 304]. Ca răspuns la lezarea celulei (factori mecanici, infecțioși) are loc eliberarea diferitor substanțe vasoactive, proinflamatorii, prosclerotice, mediatori ai proapoptozei etc. Există studii limitate privind corelațiile clinico-patologice și biochimice ale GN la copii [366, 373].

Actualmente, rămân insuficient studiați un șir de factorii de risc, suportul lor etiopatogenic ce ar permite de a ameliora diagnosticul, tratamentul și de a diminua asocierea unei complicații grave ca BRC la copiii cu GNC. Un alt aspect ce merită de a fi studiat sunt criteriile de prognozare precoce a evoluției nefavorabile a GNC la copii. În acest context, este logică necesitatea de a elucida factorii de evoluție, progresare ai glomerulonefritelor la copii.

Tulburările hemodinamice în GN au un impact nefavorabil asupra funcției renale. Datele experimentale vin să completeze și informația privind rolul proceselor metabolice, moleculare la nivel celular, tubulare renale și consecințele lor glomerulare. Menționăm că în genere se discută

în fiziopatologie cu privire la patogeniza manifestărilor clinice ale GN și se acceptă două concepții: conceptul toxic și cel de ischemie – perfuzie la nivelul rinichilor [265].

Statisticile contemporane atestă că în GN la copil sunt departe de a fi soluționate problemele de diagnostic complex al modificărilor homeostaziei, al gravității, activității procesului inflamator, de profilaxie a complicațiilor etc.

În prezent, nu există studii complexe ce ar permite elaborarea unui algoritm de diagnostic precoce pentru estimarea factorilor de risc nespecifici, a markerilor fibrozei renale, progresării GN, precum și pentru aprecierea rolului lor în evoluția GN în funcție de activitatea procesului patologic, prognozarea imediată și la distanță. Mecanismele patogenice multifactoriale care stau la baza dezvoltării GN la copii, factorii de risc ce conduc la progresarea maladiei, lipsa criteriilor clinico-funcționale, biochimice de apreciere a variantelor clinico-evolutive, criteriilor, de prognozare și profilaxie a BRC au determinat necesitatea și actualitatea studiului dat.

**Scopul studiului:** evaluarea mecanismelor etiopatogenice prin estimarea particularităților fiziopatologice, clinico-evolutive, de progresare a diferitor variante ale glomerulonefritei pentru optimizarea diagnosticului clinic, prognosticului și elaborarea algoritmilor de diagnostic, tratament, profilaxie, reducerea recidivelor și riscului dezvoltării bolii renale cronice.

**Obiectivele studiului:**

1. Studiarea particularităților clinico-evolutive, factorilor de risc a diferitor variante ale glomerulonefritei primare la copii.
2. Estimarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP- $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , CD40) și a rolului lor în patogenia glomerulonefritei la copii.
3. Stabilirea suportului markerilor biochimici de progresare a nefrosclerozei (VEGF, PDGF-BB, CTGF, FGF- $\beta$ ) în glomerulonefrită la copii.
4. Evaluarea rolului stresului oxidativ și a sistemului antioxidant în fiziopatologia glomerulonefritei la copii.
5. Aprecierea informativității diagnostice a enzimelor plasmatice, proteolitice, lizozomale în fiziopatologia glomerulonefritei la copii.
6. Studiul modificărilor histopatologice și corelarea cu modificările clinico-paraclinice, biochimice și determinarea variabilelor de prognostic nefavorabil precoce și a riscului dezvoltării bolii renale cronice la copii cu glomerulonefrită.
7. Elaborarea schemei patogenice de lucru ale glomerulonefritei la copii în funcție de evoluția clinico-paraclinică, factorii de risc, modificările biochimice și histologice.
8. Elaborarea algoritmului de diagnostic, tratament diferențiat în aprecierea evoluției, variabilelor de risc ale injuriei cronice renale în glomerulonefrita la copii.

**Metodologia cercetării științifice.** Studiul retrospectiv-prospectiv a fost realizat pe un lot de 289 copii cu glomerulonefrită în perioada anilor 2002-2014. În calitate de metode de cercetare au fost utilizate: metoda de anchetare, metode clinice, paraclinice, metode special selectate (molecule de semnalizare celulară - interleukine, chemokine, factori de creștere, oxidul nitric, sistemul pro-antioxidant, sisteme enzimatică în sânge și urină, peptide histidinice, acizi uronici, ș. a.), metode morfologice. Rezultatele obținute au fost supuse analizei statistice cu aplicarea programelor Statistica 7.0 și EXCEL și prezentate prin procedee tabelare și grafice. Pentru prelucrarea statistică a datelor au fost utilizate metodele: coeficientul de corelație Pearson, testele Student, Mann-Whitney "U", ANOVA, regresia logistică, curba ROC, precum și metoda Kaplan –Meier.

**Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute.** A fost realizat un studiu complex clinico-paraclinic, prospectiv cu estimări biochimice, histologice la copii cu diferite variante ale glomerulonefritei în dinamica maladiei cu scopul elucidării mecanismelor etiopatogenice prin estimarea particularităților clinico-evolutive, de progresare ale diferitor variante a glomerulonefritei. Studiul dat a furnizat noi dovezi suplimentare în principalele verigi patogenice ale GN și influența lor asupra etapelor clinico-evolutive ale GN. Studiul complex efectuat a relevat particularitățile clinico-evolutive ale glomerulonefritei primare (GNP) la copii. În premieră în Republica Moldova au fost apreciați biomarkerii serici și urinari în dependență de varianta clinică a maladiei.

A fost confirmat rolul chemokinelor (MCP-1, MIP- $\alpha$ ) și citokinelor inflamatorii – IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) – *markeri sensibili ai răspunsului imun, severității, activității procesului patologic renal*. A fost demonstrată importanța diagnostică a *markerilor injuriei tubulointerstițiale* – glutathion S-transferaza (GST) și a *fibrozei renale* (CTGF, FGF- $\beta$ , VEGF, PDGF-BB) la pacienții cu glomerulonefrită în detectarea precoce a BRC.

A fost demonstrat rolul biomarkerilor *stresului oxidativ* (PPOA, AGE, isoprostanul-8, activitatea antioxidantă totală, glutathion peroxidaza, tiolii) în progresia GN.

S-a confirmat rolul factorilor nespecifici ai homeostazei enzimatică în serul sangvin și urină în patogenia, diagnosticul, tratamentul complicațiilor glomerulonefritei primare (GNP) la copii. S-a elaborat un program sigur și accesibil de explorări clinico-biochimice, histologice prin care s-a facilitat diagnosticul precoce și diferențial al GNP la copii. Au fost elucidate paralele clinico-evolutive ale diferitor variante a glomerulonefritei în dependență de stadiu, activitatea procesului patologic în rinichi. S-a stabilit cel mai informativ spectru de enzime în serul sangvin și urină în diagnosticul diferențial și evaluarea complicațiilor glomerulonefritei la copii. De asemenea, originalitatea științifică constă în găsirea unor corelații între valorile serice și urinare și specificul

manifestărilor clinice, paraclinice, histologice la copii cu GN. Analiza matematică a factorilor de risc în baza calculelor integrative individualizate a permis aprecierea variabilelor responsabile de probabilitatea maladiei. S-au adus dovezi coerente și originale privind aspectele patogenice ale leziunilor renale, rolul moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere în susținerea proceselor de injurie renală și a biomarkerilor leziunii renale.

Rezultatele studiului oferă un potențial de înțelegere a aspectelor fiziopatologice ale GN și date noi privind rolul chemokinelor, citokinelor inflamatorii, factorilor de creștere biomarkerilor stresului oxidativ, antioxidant în evoluția clinică, complinirea prognosticului maladiei.

**Direcțiile noi de cercetare în știință și practică** obținute în cadrul studiului actual constă în abordarea aspectelor patogenice ale GN prin aprecierea nivelurilor serice și urinare ale moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere, sistemului oxidant, antioxidant, oxidului nitric, arginazei, enzimelor proteolitice, plasmatice, lizozomale, enzimelor ciclului glutationic, aprecierea rolului biomarkerilor noninvazivi precoce ai fibrozei renale, injuriei tubulointerstițiale, disfuncției endoteliale, răspunsului imun la copii cu GN.

*Au fost stabilite criteriile principale de diagnostic diferențiat* în diferite variante ale glomerulonefritei. *Au fost elaborate metode originale de diagnostic timpuriu* în glomerulonefrită primară la copii. *A fost elucidat rolul major* ale moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere, sistemului oxidant, antioxidant, în evoluția, progresia glomerulonefritei. Datele obținute în cadrul cercetării științifice actuale constau în determinarea ponderii factorilor de risc implicați în progresia GN prin analizarea variabilelor folosind metoda regresiei logistice, cu scopul calculării individualizate a riscului de dezvoltare a bolii.

*S-a abordat aspecte patogenice* ale injuriei renale prin aprecierea nivelurilor moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere în susținerea proceselor de injurie renală acestea fiind corelate cu varianta clinică, severitatea SN, specificul modificărilor paraclinice (proteinurie, hipoproteinemie, metabolismul lipidic crescut), histologice; implementarea metodelor de diagnostic precoce neinvaziv, ceea ce a permis precizarea simptomatologiei clinice timpurii și găsirea unor verigi patogenice importante în aprecierea și în formarea noilor viziuni privind optimizarea diagnosticului, prognosticului glomerulonefritei primare.

*A fost creat un algoritm al diagnosticului diferențiat* ale glomerulonefritei în funcție de varianta și activitatea bolii, conform utilizării markerilor serici și urinari. Pe parcursul studiului *a fost fundamentată științific o nouă platformă* de direcție în nefrologie.

**Problema științifică importantă soluționată în teză.** Problemele aplicative soluționate în cadrul studiului prezentat constă în elaborarea unei metodologii de format propriu pentru aprecierea variantelor clinice ale glomerulonefritei pentru care au fost definite abordări optime de diagnostic

diferențial și de corecție medicală diferențiată, direcționate spre reducerea complicațiilor, recidivelor, restabilirea maximală a funcției renale și calității vieții viitorului adult.

**Semnificația teoretică a lucrării** constă în fundamentarea cunoștințelor noi privind rolul moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere, sistemului oxidant, antioxidant, enzimelor proteolitice, plasmatiche, lizozomale, enzimelor ciclului glutatonic, adenilic, PCE în ser și urină la diferite etape clinico-evolutive a glomerulonefritei la copii.

S-au obținut date noi despre rolul factorilor etiologici, corelațiile biochimice în ser și urină cu modificările paraclinice, histologice, precum și date despre contribuția examinărilor paraclinice în etapele timpurii ale bolii la stabilirea diagnosticului.

A fost confirmată valoarea predictivă a acestor factori în prognosticul la distanță al GN, fiind un argument în favoarea elaborării strategiilor de prevenție a GN la etapele timpurii și tardive ale bolii. A fost apreciat nivelul funcțional enzimatic la etapele procesului patologic care reflectă obiectiv gradul de afectare al structurilor celulare renale, topografia leziunilor, intensitatea procesului inflamator, complicațiilor supraadăugate.

A fost confirmat rolul markerilor enzimatici în serul sangvin și urină care permit completarea criteriilor prognostice de apreciere a gravității maladiei, dezvoltării precoce și evoluției complicațiilor, cât și diferențierea diagnostică a diferitor variante ale glomerulonefritei primare la copil.

Modificările funcțional-biochimice depistate pot servi drept bază pentru elaborarea unor algoritme de diagnostic, tratament în scopul restabilirii sistemelor alterate la etapele clinico-evolutive, precum și pentru prognozarea și prevenirea complicațiilor reno-urinare.

Datele studiului realizat au permis de a demonstra mecanismele fiziopatologice a GN și relaționate cu gradul de severitate, ca și suport patogenetic cu rol în stabilirea prognosticului. Rezultatele obținute au permis completarea datelor privind fiziopatologia GN, date importante pentru optimizarea diagnosticului evolutiv și profilaxia complicațiilor.

**Valoarea aplicativă a lucrării.** Au fost structurate particularitățile diagnosticului etiologic, evolutive ale glomerulonefritei la copii.

S-au elaborat algoritme de diagnostic privind aspectele etiopatogenice, optimizarea diagnosticului.

S-au apreciat biomarkerii urinari și serici, semnificația lor patogenică, clinică, diagnostică cât și prognostic.

S-a demonstrat rolul biomarkerilor răspunsului imun (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , CD-40), fibrozei tubulointerstițiale precoce – glutatone-S-transferaza (GST), în diagnosticul și progresia GN cât și injuriei celulare: (rata filtrației glomerulare (RFG),

proteinuria, NAG- $\beta$ ), disfuncției endoteliale – endotelina-1, biomarkerilor stresului oxidativ – (PPOA, AGE, isoprostan-8), biomarkerilor de diferențiere diagnostică a SNSS și SNSR – NAG- $\beta$ ,  $\gamma$ -GTP, biomarkerilor de prognostic – (MCP-1, PPOA, isoprostanului-8, AGE), markerilor histologici în diagnosticul și prognozarea complicațiilor.

#### **Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:**

1. Cunoașterea aspectelor fiziopatologice complexe ale glomerulonefritei primare la copii ce reflectă influența factorilor de risc (vârsta, hematuria, hipertensiunea arterială, scăderea clearance-ului creatininei endogene, persistența proteinuriei, rezistența tardivă la steroizi în debut și pattern-ul histologic) asupra progresiei GN la copil.
2. Importanța diagnostică a unor biomarkeri în ser și urină în cunoașterea aspectelor patogenice, diagnosticul diferențiat, evolutiv și prognosticului copiilor cu diferite variante ale GN cu scopul prevenirii complicațiilor.
3. Evaluarea nivelului enzimatic în dinamica procesului patologic reflectă obiectiv gradul de alterare al structurilor celulare renale, topografia leziunilor, intensitatea procesului inflamator, și complicațiilor.
4. Modificările histologice, cât și corelarea cu indicii biochimici urinari permit prognozarea evoluției, prognosticului bolii.
5. Tabloul clinic al GN se manifestă în funcție de sindroamele principale (sindrom nefritic, nefrotic, nefritic cronic cât și sindrom nefritic rapid progresiv), dereglările fiziopatologice, dar și de mecanismele imunologice, cât și cele secundare implicate.
6. Bilanțul unor parametri clinici, biochimici, histologici permit întregirea substanțială a criteriilor prognostice de apreciere a gravității maladiei, dezvoltării precoce și a evoluției complicațiilor, în estimarea diagnosticului evolutiv și prognosticului GN la copii.
7. Modificările funcțional-biochimice pot servi drept bază pentru elaborarea unor algoritmi de diagnostic, tratament la etapele clinico-evolutive, precum și pentru prognozarea complicațiilor.
8. Utilizarea în practica științifică a procedeele biochimice de diagnostic în ser și urină ca metode non invazive, reprezintă o opțiune semnificativă în ameliorarea diagnosticului, prognosticului glomerulonefritei primare la copii.

**Implementarea rezultatelor științifice.** În baza studiului dat au fost implementate noi metode de diagnostic al pacienților cu glomerulonefrită primară în secția nefrologie a IMSP IM și C, secția nefrourologie, IMSP SCM nr.1 "Valentin Ignatenco" și în procesul didactic al Departamentului pediatrie, IP USMF „Nicolae Testemițanu”, având ca scop ameliorarea asistenței medicale acordate copiilor cu glomerulonefrită. Au fost elaborate și aprobate pentru implementare 10 propuneri de raționalizare.

**Aprobarea rezultatelor științifice.** Materialele tezei au fost raportate în cadrul diferitor foruri științifice: Conferința Pediatriilor cu participare internațională consacrată jubileului de 40 ani de activitate a catedrei Pediatrie F.P.M. USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, 2003); Congresul V al igieniştilor, epidemiologilor și microbiologilor din Republica Moldova (Chișinău, 2003); Congresul VI al Fiziologilor din Republica Moldova cu participare internațională (Chișinău, 2005); Conferința a III-a Internațională de Medicină Perinatală (Chișinău, 2006); Conferința a XI-a științifică Internațională (Chișinău, 2008); The International Congress of Nephrology (Lion, 2008); Congresul V-lea al pediatriilor și neonatologilor din Republica Moldova cu participarea internațională (Chișinău, 2009); Congresul V de Urologie, Dializă și Transplant Renal din Republica Moldova cu participare internațională (Chișinău, 2011); Congresul III al Medicilor de Familie din Republica Moldova cu participare internațională (Chișinău, 2012); IV Конгресс Педиатров стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развития и питания» (Львов, 2012); The 4-th Congress of the Academy of Paediatric Societies (Istanbul, 2012); XXV-a Conferință Națională Zilele Pediatriei Iașene ”N.N.Trifan” (Iași, 2012); Maladii reumatice la copii: oportunități în diagnostic și tratament (Chișinău, 2012); VI-й Конгресс Педиатров и Неонатологов и V-й Конгресс Федерации Педиатров Стран СНГ (Кишинев, 2013); Межрегиональная научно-практическая конференция врачей-педиатров с международным участием «Проблемные вопросы диагностики и лечения детей с соматической патологией» (Харьков, 2013); The XIX-th Session of the Balkan medical days and the second congress of emergency medicine of the Republic of Moldova (Chișinău, 2013); XII Российский Конгресс «Иновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2013); VI Конгресс Педиатров Стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развития и питания» (Минск, 2014); Conferința Națională de Pediatrie. Urgențe în Pediatrie. Boli cronice în Pediatrie (București, 2014); The 5<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Pediatric Societies (EAPS) (Barcelona, 2014); The Xth International Congress of Geneticists and Breeders, (Chișinău, 2015); Conferința națională cu participare internațională “Actualități în pediatrie” consacrată celei de-a 70-a aniversări a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, (Chisinau, 2015); al XII-lea Congres Național de Pediatrie cu participare Internațională (Timișoara, 2015); Congresul Național de Nefrologie (Iași, 2015); al VI-lea Congres de Urologie, Dializă și Transplant Renal din Republica Moldova cu participare internațională (Chișinău, 2015); Conferința Națională de Pediatrie (București, 2016); Conferința Națională de Nefrologie Interdisciplinară cu Participare Internațională” (București, 2016); IV Конгресс Ассоциации нефрологов новых независимых государств (ANNIS)

«Мультидисциплинарность и дифференциация направлений современной нефрологии» (Минск, 2016).

Teza a fost discutată și aprobată la ședința Departamentului Pediatrie din 28.10.2016 (proces verbal nr. 4); ședința Seminarului științific extern ad-hoc din cadrul IMSP Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, din 14.03.2017 (proces-verbal nr. 1); ședința Seminarului științific de profil Pediatrie al IP USMF „Nicolae Testemițanu” din 28.04.2017, (proces-verbal nr.2).

**Publicații la tema tezei.** Materialele tezei au fost publicate în 64 de lucrări științifice, inclusiv *monografie monoautor – 1, articole în reviste de circulație internațională – 6, articole în reviste naționale recenzate – 18, articole în culegeri științifice naționale – 4, comunicări rezumative în materialele congreselor internaționale – 12, teze la conferințe naționale – 13, protocoale clinice naționale – 5, capitole în manuale pentru învățământul universitar – 2, îndrumări metodice – 3*, 36 din publicațiile menționate sunt cu titlu de monoautor.

**Volumul și structura tezei.** Teza este expusă pe 275 pagini de text de bază, procesate la calculator, și include adnotări în limba română, rusă, engleză, lista abrevierilor, introducere, 6 capitole, concluzii generale, recomandări practice, bibliografie din 394 titluri, declarația privind asumarea răspunderii, CV- autorului. Materialul iconografic conține 93 tabele și 43 figuri, anexe.

**Cuvinte-cheie:** copii, glomerulonefrită primară, sindrom nefrotic, citokine, enzime lizozomale, plasmatic, proteolitice, stres oxidativ.

#### **Sumarul compartimentelor tezei.**

În compartimentul **Introducere** al lucrării, sunt prezentate actualitatea și importanța științifico-practică a problemei abordate în studiu, sunt formulate scopul și obiectivele studiului, noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor.

**Capitolul 1. Glomerulonefrita primară la copii: mecanisme patogenice, clinice, evolutive** cuprinde sinteza datelor din literatura de specialitate referitoare la prevalența glomerulonefritei în funcție de variantele clinice, histologice. Sunt relatate date despre mecanismele patogenice și patofiziologice ale GN. Sunt analizate mecanismele de progresare a glomerulonefritei, precum și elucidați factorii de risc implicați în dezvoltarea GN, interacțiunile acestora cu diverse laturi patogenetice și clinice ale GN. De asemenea, sunt analizați factorii care pot influența semnificativ evoluția GN, aspectele clinice, complicațiile și rolul lor în evaluarea prognosticului.

**Capitolul 2. Materiale și metode de cercetare.** Totalizează caracteristica clinică a pacienților cu GN, metodele de examinare clinică, biochimică, care au confirmat diagnosticul



clinic și au permis de a aprecia activitatea, severitatea GN și stabilirea prognosticului pe termen lung la pacienții cu GN; de asemenea este prezentată caracteristica clinică a grupurilor de pacienți cu GN, cercetați în vederea estimării clinico-evolutive, paraclinice, rolului lor în aprecierea prognosticului GN în funcție de varianta clinico-evolutivă. Este prezentat design-ul studiului care reflectă loturile evaluate, investigațiile efectuate și succesiunea etapelor cercetării. Sunt descrise metodele de cercetare, precum și metodele statistice utilizate.

### **Capitolul 3. Profilul clinico-paraclinic al copiilor cu glomerulonefrită primară.**

Capitolul cuprinde evaluarea particularităților clinico-evolutive ale pacienților cu diferite variante ale GN precum și modificările paraclinice în funcție de varianta clinică a bolii.

**Capitolul 4. Particularitățile modificărilor moleculelor de semnalizare celulară și ale proceselor de oxidare cu radicali liberi la copiii cu glomerulonefrită primară.** Capitolul relevă valoarea diagnostică a unor markeri și include studiul modificărilor homeostaziei la copiii cu GN la diferite etape clinico-evolutive ale maladiei, evidențiază semnificația concentrațiilor urinare ale moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere, sistemului oxidant, sistemului antioxidant, oligoelementelor.

**Capitolul 5. Particularitățile modificărilor unor indici ai homeostaziei biochimice la copiii cu glomerulonefrită primară.** Capitolul dat relevă importanța diagnostică a AMP-azi, ADA-zei, PCE, enzimelor plasmatică, proteolitice, lizozomale, oligoelementelor în funcție de activitatea maladiei, precum și de sensibilitatea față de steroizi la copii cu GN. S-a estimat valoarea corelațiilor dintre valorile enzimatică în ser și în urină și modificările paraclinice, histologice la copiii cu GN. A fost confirmată importanța investigațiilor biochimice pentru stabilirea diagnosticului diferențial și evolutiv al GN. Este argumentat rolul modificărilor urinare în procesele de sclerozare, contribuția lor în procesele de progresare, rolul lor în etiopatogenia, și diagnosticul precoce al GN la copil.

**Capitolul 6. Modificările histologice și caracteristica unor corelații clinico-paraclinice, biochimice în evoluția glomerulonefritei la copii.** Capitolul elucidează rezultatele studiului histologic la copiii cu GN. S-a estimat valoarea variantelor histologice în prognosticul și evoluția bolii. A fost apreciată semnificația markerilor clinici și paraclinici în funcție de varianta histologică, cât și corelațiile clinico-biochimice și modificările histologice.

## 1.GLOMERULONEFRITA PRIMARĂ LA COPII: MECANISME PATOGENICE, CLINICE, EVOLUTIVE

### 1.1.Mecanisme patogenice și fiziopatologice ale glomerulonefritei primare la copii

Glomerulonefritele primare (GNP) prezintă o grupă eterogenă de afecțiuni patologice declanșate, în particular, de dereglări imunologice cu tablou clinico-morfologic inflamator glomerular. În clasificarea glomerulonefritelor imune glomerulonefrita poststreptococică ocupă un loc distinct, făcând parte din categoria celor cu etiologie cunoscută [3]. Agentul patogen etiologic este streptococul ( $\beta$ -hemolitic de grup A, cu localizare faringiană și otică (63%) sau cutanată (5-10%). În producerea nefritei sunt incriminate numai anumite tipuri (nefritigene): tipul 1,12,4 și mai rar, 3, 6, 25, 52, 55, 57, 60 (cel mai frecvent tipul 12-faringian și 49, secundar unor infecții cutanate). Reinfectia cu alt tip nefritigen de streptococ este puțin probabilă, astfel că recurența glomerulonefritei poststreptococice este rară. 85% dintre glomerulonefritele întâlnite au etiologie streptococică dovedită. În cazurile nedovedite ar mai putea intra în discuție și alte cauze, cum sunt varicela, mononucleoza infecțioasă, Stafilococul auriu, Stafilococcus epidermidis, micobacterii atipice, mycoplasma, brucella, meningococul, infecțiile Echo și hepatitele virale, citomegalovirusul, virusul herpes [111], Epstein-Barr, parazitozele [91, 239].

Un studiu retrospectiv de cohortă la nivel național a fost realizat în Taiwan. Analiza multivariabilă a relevat faptul că la copiii cu infecție enterovirală există un risc crescut de SN, comparativ cu cei fără infecție enterovirală (risc ajustat, 1,20, 95% ÎI – 1.04-1.39;  $p = 0,01$ ), în special la copiii infectați cu Cocksackie virus. Acest studiu a relevat o asociere semnificativă între infecția enterovirală și SN la copii [193].

Din punct de vedere etiopatogenic, GN pot fi clasificate [89] :

#### 1. GN primare:

##### a) GN cu complexe imune:

- GN acută postinfecțioasă (în majoritate poststreptococică);
- Nefropatia mezangială IgA (boala Berger, GN membranoasă și membranoproliferativă.

##### b) GN mediată prin anticorpi antimembrană bazală glomerulară (sindromul Goodpasture);

##### c) Idiopatice (patogenie necunoscută).

#### 2. GN asociate unor boli sistemice (GN secundare)

##### a) Mediate imunologic:

- Purpura Henoch-Schonlein;
- LES și alte boli de țesut conjunctiv;
- Vasculite (ex: poliarterită nodoasă);

- Infecții: endocardita bacteriană subacută, malaria etc.
- b) Ereditare, ex: sindromul Alport

### **Clasificația SN la copii [3]**

#### *1. Sindroame nefrotice congenitale (cu mutații genetice dovedite)*

- b) sindromul nefrotic congenital
- c) sindromul nefrotic infantil
- d) sindromul nefrotic familial
- e) sindroamele nefrotice rezultate din nefropatiile ereditare:
  - ✓ sindromul Lowe
  - ✓ sindromul Alport.

#### *2. Sindroame nefrotice idiopatice sau primitive*

- a) nefroza lipoidă (leziuni glomerulare minime)
- b) glomeruloscleroza focală
- c) glomerulonefrita membranoasă
- d) glomerulonefrita proliferativă
- e) glomerulonefrita cronică.

#### *• Sindroame nefrotice secundare*

- În infecțiile intrauterine (toxoplasmoză, citomegalovirus, sifilis congenital)
- În alte infecții (TBC, hepatitele B, C etc.)
- În bolile sistemice ale țesutului conjunctiv
- În disembriogeneza structurală renală, inclusiv în displazia hipoplasică
- În bolile dismetabolice (deregări ale metabolismului triptofanului, glicogenoze, diabet zaharat etc.)
- În amiloidoză
- În tromboze ale venelor renale
- În intoxicații sau hipersensibilizare medicamentoasă
- În bolile și sindroamele ereditare
- În bolile cromozomiale
- În sindroame rare (sarcoidoză, drepanocitoză etc.)

Leziunile glomerulare în GN pot apărea prin mecanisme:

1. *Imune* (cele mai frecvente, la aproximativ 75% glomerulopatii);
2. *Neimune* – metabolice, hemodinamice, toxice, infecțioase (diabetul zaharat, amiloidoză, nefrite ereditare, HTA, acțiunea unor medicamente).

Leziunile imunologice sunt declanșate de *depunerea în glomeruli* de:

- a) autoanticorpi îndreptați împotriva unor antigeni glomerulari structurali, intrinseci (ex. anticorpi antimembrană bazală glomerulară);
- b) complexe imune circulante;
- c) complexe imune formate “in situ”;
- d) reacții imune de tip celular [315].

Sunt două modalități de producere a GN prin complexe imune: fie prin complexe imune circulante (CIC), fie prin complexe imune „in situ”. CIC se formează în circulația sangvină și sunt depozitate la nivelul capilarelor glomerulare în cursul ultrafiltrării.

Pentru complexele imune „in situ” antigenul care este circulant se fixează ulterior în structurile glomerulare, iar anticorpii se fixează în următorul timp de acest antigen [3, 261, 283, 297].

Prezența materialelor imune în corpusculii renali declanșează o reacție inflamatorie, prin atragerea celulelor proinflamatorii și prin diversele sisteme de mediatori ai inflamației, antrenând adesea proliferare celulară, acumularea de matrice extracelulară și scleroză glomerulară.

În condițiile unui raport cantitativ optim între antigeni și anticorpi, reacția dintre ei duce la formarea unei rețele de precipitare, care este fagocitată de macrofage. În prezența unui exces de antigeni se formează CIC, care nu sunt fagocitate, circulă în sânge și sunt depozitate în diverse organe.

Condițiile care favorizează depunerea complexelor imune circulante în rinichi sunt: suprafața endotelială mare, fluxul sangvin renal ridicat, eventual afinități electrostatice sau structurale între complexe și componentele filtrului glomerular, pierderea barierei anionice a membranei bazale responsabilă, de asemenea, și de proteinurie.

CIC se depun, în general, subendotelial sau mezangial, în timp ce complexe formate „in situ” se localizează subepitelial. Complexele imune pot fi evidențiate la microscopia optică, dar mai ales cea electronică, sub formă de depozite granulare; la imunofluorescență conțin imunoglobuline și fracțiuni de complement.

Antigenul este, de regulă, deficil sau imposibil de identificat [261, 283, 297]. Manifestările depind de localizarea complexelor și a leziunilor:

- leziunile endoteliale și afectarea versantului subendotelial al membranelor bazale duc la atragerea leucocitelor, la inflamație, la perturbările hemostaziei cu o eventuală microangiopatie trombotică și vasoconstricție cu leziune renală acută (LRA);
- leziunile mezangiale sunt de regulă mai atenuate și determinate de proteinurie, hematurie și insuficiența renală moderată;
- leziunile membranare subepiteliale conduc la proteinurie importantă;
- leziunile celulelor epiteliale se însoțesc de semilune, cu insuficiență renală rapid progresivă [283].

GNAPS reprezintă o boală a complexelor imune. Antigenul este de natură streptococică, aflându-se la nivelul peretelui celular al germenului. În timpul infecției streptococice netratate, antigenul este eliberat în circulație în cantitate mare. Într-un interval de 6-10 zile sunt eliberați anticorpi specifici (de către organismul gazdă), anticorpi care formează cu antigenul complexe imune circulante solubile (cu exces de antigen).

Leziunile glomerulare sunt consecința acțiunii locale a complementului înglobat în complexe imune, care sunt reținute mecanic la nivelul glomerulilor, „ca într-o sită”. Procesul patologic glomerular este nespecific. Componentele activate ale complementului sunt responsabile de principalele „evenimente” care au loc la nivelul glomerulului și care realizează o inflamație cu substrat imun [3]. *Cascada complementului* poate fi activată pe două căi:

- *calea clasică* – legarea IgM sau IgG din complexe imune de activarea componentelor C<sub>4</sub> și C<sub>2</sub>, cu clivarea și activarea C<sub>3</sub>;
- *calea alternă* – declanșată prin intermediul factorilor D și B, care duc la clivarea C<sub>3</sub>; calea alternă ar avea rol în nefropatia cu IgA (IgA și IgD declanșează calea alternă) și în GN membranoproliferativă tip II (majoritatea pacienților cu această formă de suferință glomerulară au factorul C<sub>3</sub> nefritic; acesta este un autoanticorp care blochează C<sub>3</sub> din sânge). Indiferent de calea pe care se produc, etapele finale ale activării complementului generează complexul C<sub>59</sub> (MAC – membrane activating complex), care uzează membranele celulare [3, 167, 189].

Creșterea permeabilității vasculare renale ușurează depunerea subepitelială a complexelor imune. Prezența acestora inițiază leucochemotaxia, antrenând aglomerarea la locul de reacție a polinuclearelor, cu rol în fagocitarea agregatelor depozitate. Prin stimularea lizosomilor celulari, este generată eliberarea de enzime proteolitice și de substanțe pirogene, care contribuie la deteriorarea membranei bazale, deformându-i geometria și făcând-o permeabilă pentru proteinele serice și eritrocite. Se activează procesul local de coagulare, pentru că histamina eliberată de mastocite favorizează localizarea complexelor antigen-anticorp pe endoteliul vascular, căruia îi

distrug continuitatea. Este activat factorul XIII (Hageman) și este inițiată cascada coagulării. Formarea intravasculară de fibrină poate genera ea însăși leziuni glomerulare. Oriunde în organism, dacă depozitul de fibrină nu este distrus prin mecanisme fibrinolitice locale, apar leziuni ca urmare a organizării de trombi și a lezării endoteliului. Demonstrarea prezenței fibrinei la nivelul giomerulilor este o dovadă certă că la acest nivel a avut loc un proces de activare a coagulării, după modelul prezentat mai sus. Întrucât epiteliul capilar are o bună capacitate de regenerare, se înțelege de ce este posibilă vindecarea glomerulonefritei prin *restitutio ad integrum*, atunci când antigenul streptococic inițiator al reacției imune dispare [206, 212].

Shaloub R.J. [302] a fost primul care a emis ipoteza că SNSM este o manifestare renală a unei dereglări de celule T în care citokinele modifică ultrastructura podocitelor. Această ipoteză s-a bazat pe dovezi indirecte, cum ar fi lipsa anticorpilor în rinichi, sensibilitatea la steroizi și ciclofosamidă, care modifică răspunsurile mediate celular și, în cele din urmă, asocierea cu boala Hodgkin. Dezvoltarea unui SN tranzitoriu la un nou-născut a cărui mamă avea sindrom nefrotic, dar și unele date experimentale similare au sugerat existența unui factor circulant ce afectează podocitele [178].

Astfel că prima ipoteză patogenică a fost că SNI este rezultatul unei disfuncții a limfocitelor T ce generează creșterea nivelelor plasmaticice ale unui factor de permeabilitate limfocit-derivat [101, 350].

Argumente în favoarea acestei ipoteze sunt: absența complexelor imune la nivel glomerular și răspunsul rapid la corticoterapie. Cea mai importantă dovadă au constituit-o cazurile de transplant renal în care SN a dispărut după transplantul rinichiului cu leziuni minime la pacienți fără SN și, invers, dezvoltarea SN cu leziuni minime după transplantul unui rinichi normal la pacienții cu SN anterior [173]. Implicarea imunității dobândite și a celulelor B este sugerată de rezultatele obținute pe modelele experimentale efectuate pe animale și om.

În general, rolul imunității dobândite a fost demonstrat prin intermediul modelelor experimentale pe animale cu SNSM cu descoperirea unei molecule co-stimulatoare CD80 exprimate de celulele prezentatoare de antigen (Ag) și de către celulele B. Această moleculă co-stimulatoare face parte din așa-numita „sinapsă imunologică” implicată în reglarea echilibrului dintre activarea și blocarea imunității [60]. De fapt, CD80 interacționează cu CD28 asupra CD4+ inducând activarea lor în celule efectoare, pe de altă parte interacționează cu Ag 4 al limfocitelor T citotoxice (ALTC-4) asupra celulelor T<sub>reg</sub>, mediind blocarea maturării limfocitelor T efectoare.

Lipopolizaharidele (LPZ) sunt mediatori ai infecției bacteriene, infuzia lor la șoareci este urmată de proteinurie tranzitorie și schimbări progresive în arhitectura glomerulară, care pe

parcursul a câteva săptămâni evoluează în glomeruloscleroză; acest proces patologic imită evoluția naturală a bolii la pacienții cu SNSM [271] și în studii experimentale [316].

CD 40 este o altă moleculă costimulatoare implicată în imunitatea dobândită. Nivelele serice ridicate ale anticorpilor anti-CD 40 au fost raportate recent în asociere cu recurențele proteinuriei în forme mai severe ale SNSM care s-au soldat cu GSFS [102]. De fapt, studiile clinice și experimentale sugerează că GSFS prezintă o etapă în evoluția SNSM.

CD 40 aparține superfamiliei genei TNF- $\alpha$ , exprimată preferențial pe limfocitele B, monocite/macrofage și celule dendritice, toate implicate în răspunsul imun adaptiv [266]. Legarea CD 40 la ligandul CD40 exprimat pe limfocitele T și trombocite declanșează un proces inflamator cu consecințe relevante. Cartografia epitopilor a sugerat modificarea imunogenității CD 40 la pacienții cu glomeruloscleroză și a anticorpilor anti-CD 40 pentru a putea identifica pacienții cu risc crescut de incompatibilitate posttransplant [102].

Stabilirea semnificației anticorpilor anti-CD 40 este crucială pentru înțelegerea mecanismului proteinuriei, o posibilitate ar fi saturarea cu CD 40 pe celulele prezentatoare de antigeni, astfel ar crește nivelul de liganzi liberi CD 40 (sCD40L) capabili de a interacționa cu CD 40 în podocite. Astfel, CD 80 și CD 40 reflectă un ansamblu de stări inflamatorii, în care sunt implicate celulele prezentatoare de Ag, care imită SNSM în fazele timpurii și tardive ale bolii [266].

Un grup de cercetători din Statele Unite au caracterizat factorul circulant de creștere a permeabilității în GSFS ca fiind *factorul 1 cardiotrofînă-like* (cardiotrophin-like cytokine factor 1 - CLC-1), membru al familiei interleukinei 6. S-a constatat că CLC-1 poate fi obținut *in vitro* din limfocitele T activate și că el la rândul lui poate activa limfocitele B, astfel că s-au putut stabili niște verigi în imunopatogeneza SNI [296].

De asemenea, de interes este faptul că galactoza folosită experimental ca material de înaltă afinitate în izolarea CLC-1 din plasmă pare să fie o opțiune terapeutică pentru unele forme de SN, aflată acum în studii clinice. Prin legarea CLC-1 circulant, galactoza împiedică cuplarea acestuia la reziduurile de galactoză de pe suprafața podocitelor și ar putea împiedica apariția proteinuriei [171, 290].

Modelele experimentale și studii umane sugerează participarea speciilor reactive de oxigen (SRO) în patogeneza SNSM. SRO sunt reactanți tipici ai primei faze, fiind produse de celulele polimorfonucleare (PMN) ca răspuns al triggerilor (declanșatorilor) infecțioși. Bertelli R și coautorii a fost primul care a demonstrat că celulele PMN produc în cantități mari oxidanți la copiii afectați cu SNSM în timpul recidivei de proteinurie, ca urmare, probabil, a unei deteriorări a mecanismului de feed-back negativ [50].

De asemenea au fost demonstrate dovezi indirecte precum că activarea oxidanților in vivo a fost observată la pacienții cu SNSM la care o parte majoră de albumină serică este oxidată, concomitent cu proteinuria.

Albumina a fost recent recunoscută ca fiind cel mai important antioxidant seric, o funcție fiziologică care posedă un rol crucial în timpul episoadelor acute infecțioase umane [61]. Modele experimentale ale SN au folosit puromicina și adriamicina pentru a induce stresul oxidativ în glomeruli [238]. De asemenea, injectarea de  $H_2O_2$  induce proteinurie la șobolani și NO previne creșterea permeabilității față de albumină determinate de producerea  $O_2$  sub acțiunea  $TNF-\alpha$  indusă într-un sistem de glomeruli la animale [303]. GSFS în perioada acută a maladiei este asociată cu oxidarea masivă a albuminei în plasmă [238].

Un alt factor studiat implicat în patogeniza SNI este activatorul plasminogenului tip urokinază (soluble urokinase-type plasminogen activator receptor – su-PAR) [71]. Su-PAR intervine în migrarea către locul inflamației a limfocitelor T activate, a monocitelor și neutrofilelor, se leagă la vitronectina și integrina podocitară, amplificând activitatea acestora. Activitatea integrinei podocitare scade în serul pacienților aflați în remisiune completă a proteinuriei și este blocată total prin utilizarea anticorpilor anti-uPAR [153, 200].

Rolul limfocitelor T nu este pe deplin înțeles. Pacienții cu SNI cu modificări minime au un număr mai mare de limfocite T CD8+ comparativ cu lotul control. In vitro, limfocitele T ale pacienților cu SNI produc spontan IL-13. Limfocitele B IgE- și IgG4- care au constituțional pe suprafață receptori pentru IL-13 pot fi stimulate de către limfocitele T să producă IgE și IgG4 și acest efect poate fi blocat prin tratamentul cu anticorpi anti-IL-13 [51].

Celulele mononucleare periferice ale pacienților cu leziuni minime produc cantități mari de IL-10 și IL-13 în cazul recăderilor SNI. Unele studii au sugerat un dezechilibru de tip Th2 din cauza asocierii frecvente a SNI cu leziuni minime, cu atopia și cu bolile alergice. Există însă și autori care au identificat un raport normal între subseturile de limfocite T (Th0/Th1/Th2), astfel că nu este definitiv stabilit că SNI este o boală Th2 dirijată [101].

Au fost raportate niveluri crescute de IL-2 (rol în stimularea activității limfocitelor T), IL-4, IL-13 (ambele cu rol în sinteza IgE, rol major în inflamația alergică), IL-10 (citokină cu rol antiinflamator), IL-12 (rol în polarizarea celulelor dendritice), IL-18,  $TNF-\alpha$  (citokine proinflamatorii), factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF).

Studii limitate au investigat efectul direct al citokinelor asupra dezvoltării proteinuriei. VEGF crește permeabilitatea capilară, însă infuzia de VEGF nu a indus proteinurie pe modele animale. Din cauză că IL-13 joacă rol important în inflamația alergică și datorită constatării creșterii expresiei CD 80 prin inducerea experimentală a proteinuriei IL-13 mediate, s-a sugerat că



legătura între alergii și SNI ar putea fi stimularea de către IL-13 a expresiei CD 80 pe membrana podocitelor fragile [101].

O altă citokină ce pare să aibă rol patogenic în SN este TNF- $\alpha$ , dovezi în acest sens fiind aduse de evoluția favorabilă sub tratament cu anticorpi anti-TNF- $\alpha$  a pacienților cu SNSR, de identificarea unor niveluri plasmatice crescute de TNF- $\alpha$  la pacienții cu boală activă și de normalizarea acestora în perioadele de remisiune [14, 136].

Datele în favoarea implicării fiziopatologice a limfocitelor B sunt indirecte, sugerate de răspunsul clinic favorabil al SN sever la tratamentul cu anticorpi anti-CD 20 (fosfoproteină glicozilată de pe suprafața limfocitelor B) [268]. Nu se cunosc exact mecanismele intervenției limfocitelor B, dar s-a sugerat o posibilă acțiune anticorp-independentă a limfocitelor B asupra limfocitelor T sau, posibil, sinteza unor imunoglobuline anormale, identificate la 50% din pacienți [103]. O nouă ipoteză este implicarea podocitelor în patogeneza SN, care a apărut după identificarea unei mutații a genei NPHS1 ce codifică sinteza nefrinei ca și cauză a SN congenital [179].

Podocitele formează bariera finală a filtrării glomerulare. Piciorușele podocitelor formează o diafragmă fenestrată selectiv permeabilă. Conțin o structură contractilă dinamică constituită din actină, miozină 2,  $\alpha$ -actinină-4, talină, vinculină și sinaptopodină. Piciorușele se ancorează la MBG prin intermediul  $\alpha 3/(\beta 1$ - integrinei și al distroglicanilor. Pe suprafața podocitelor se găsesc receptori pentru numeroase citokine (IL-4, IL-10, IL-13 și TNF- $\alpha$ ) și exprimă, la fel ca limfocitele B și celulele prezentatoare de antigen, molecula CD80 [336].

S-a constatat, pe modele experimentale și la pacienții cu SNI cu leziuni minime, că moleculele CD 80 induc modificări structurale ale citoscheletului ce favorizează detașarea podocitelor și apariția astfel a proteinuriei, scopul fiziopatologic al acestei acțiuni fiind probabil acela de creștere a eliminării antigenilor în timpul episoadelor alergice sau infecțioase [159, 271].

Studii experimentale ale SN au arătat creșterea expresiei genelor pentru receptorii IL-4, IL-13 și CD 80 și scăderea expresiei genelor podocinei, nefrinei (proteină transmembranară din superfamilia Ig care, în asociere cu podocina, asigură transmiterea semnalelor promovând adeziunea intercelulară) [271]. Nivelurile CD 80 urinare sunt crescute în timpul recidivei SNSM, fără a fi crescute la pacienții cu GSFS sau SNSM în remisiune [136].

Serurile pacienților cu recidivă SNSM, dar nu în remisiune, au stimulat expresia CD 80 în cultura podocitelor. Studii recente au raportat reglarea semnificativă în CD 80 a podocitelor ce a fost detectată în SNSM și biopsiile pacienților cu GSFS, comparativ cu lotul martor, utilizând anticorpi primari diferiți și teste imunohistochimice, sugerând că o confirmare suplimentară este necesară cu CD 80 în SNSM [165, 195].

Rezumând cele expuse, SNI manifestat prin leziuni minime asociază expresie crescută a CD 80 la nivelul podocitelor și creșterea eliminării urinare de CD 80. Shimada M. și coautorii consideră drept explicație patogenică a SNI o afectare imună a podocitului cu două etape-cheie [307]. Prima este inducerea expresiei moleculei CD 80 pe suprafața podocitului de către un factor circulant (citokine, alergeni, componente microbiene). Creșterea expresiei CD 80 induce modificări structurale ale podocitelor și declanșarea proteinuriei [248].

A doua etapă este reprezentată de disfuncții ale mecanismelor de reglare a expresiei CD 80. Expresia CD 80 pe suprafața podocitelor este indusă de către receptorii TLR3, TLR4, de lipopolizaharidele microbiene, unele componente virale. Un deficit al reglării acestui proces (sinteză scăzută de IL-10, CTLA-4, molecule ce în mod obișnuit inhibă expresia CD 80) ar putea să fie o altă explicație a proceselor patologice ce stau la baza dezvoltării SNI.

Raportul CD 80/CTLA-4 urinar este de peste 100 ori mai mare la pacienții cu leziuni minime și proteinurie activă, comparativ cu cei aflați în remisiune [307].

O altă moleculă cu posibil rol în inducerea modificărilor podocitare cauzate de proteinurie este Angptl 4, o glicoproteină care este exprimată în multe țesuturi, dar și la nivelul podocitelor, asemănătoare structural și funcțional cu angiopoietina [87, 339].

Studii recente au constatat modificări calitative și cantitative în exprimarea angptl 4 în podocite care pot inhiba activitatea lipoproteinlipazei, ducând la creșterea nivelurilor plasmatice ale trigliceridelor [81, 88]. Clement L. C. și coautorii în modelele experimentale și clinice ale SNSM au raportat că expresia glomerulară a angptl 4 este înalt reglementată în ser și podocite [88].

Angptl 4 inhibă lipaza lipoproteinelor legate la endoteliu, fapt ce condiționează creșterea nivelului plasmatic de trigliceride, iar constatarea că la pacienții cu SNI cu leziuni minime este amplificată activitatea angptl 4 la nivelul țesutului adipos asociată cu creșterea expresiei CD 80 pe suprafața podocitelor sugerează un rol pentru această glicoproteină în inducerea SN, însă nu se cunoaște relația dintre angptl 4 și CD80 [69, 101].

Pe modele experimentale de SN la șobolani, analiza proteinelor extrase de la nivelul glomerular a evidențiat prezența unei producții crescute de angptl 4 ce se leagă la MBG și perturbă interacțiunile între proteine, promovând detașarea piciorușelor podocitelor [136].

Un posibil rol al atopiei în SNI a fost sugerat de recăderile induse de expunerea la alergeni de tip polenuri, mucegaiuri, alimente, vaccinuri sau veninuri de insecte. Nivelul seric al IgE, obișnuit crescut la atopie, este frecvent crescut și la pacienții SNI cu leziuni minime.

Pentru a produce IgE, limfocitele B au nevoie de 2 semnale, unul asigurat de IL-4 și IL-13,

eliberate de limfocitele Th2, celălalt asigurat de interacțiunea între antigenul de suprafață CD 40 al limfocitelor B cu ligandul său situat pe limfocitele T activate [81]. Pacienții cu SNI cu leziuni minime au adesea nivele crescute de IgE serice, chiar în absența atopiei. Tratamentul cu corticosteroizi poate fi un element de confuzie, deoarece s-a constatat că hidrocortizonul, în combinație cu IL-4, poate induce sinteza de IgE de către limfocitele B purificate, obținute de la donori nonatopici [38, 169]. În plus, s-a constatat că nivelul de IgE crește cu durata SNI la pacienții cu leziuni minime și ivalorile IgE totale sunt mai mari la pacienții cu SNI corticorezistent, comparativ cu cei corticosensibili [323].

Un studiu recent efectuat pe un lot de 192.295 de copii cu dermatită atopică (DA) a relevat risc semnificativ crescut pentru dezvoltarea SNI, amplificat concordant de severitatea DA, fapt ce subliniază contribuția bolilor alergice în dezvoltarea SN [323].

Cazuri familiale de SNSM sunt destul de rare, prin urmare, fondul genetic este în mare parte necunoscut, în timp ce 23,6% cazuri de SNSR și 29,5% din cazuri familiale de SNSR sunt cauzate de mutația genei [338]. Mai mult de 24 de gene sunt cunoscute în prezent de a fi patogene în SRNS și au fost deja utilizate din punct de vedere clinic [214].

Edemele generalizate reprezintă o caracteristică clinică majoră a copiilor cu SN. Studiile privind patogeniza edemelor în SN sugerează că ele pot apărea prin intermediul unor mecanisme foarte variabile, adică volumul intravascular *subumplere* versus *supraumplerea* [54, 64]. În comparație cu adolescenții și adulții, nou-născuții și copiii mici au o proporție mai mare a corpului și interstițiului total și volumului de fluide care se poate dubla sau tripla, din cauza edemului din SN.

Datorită anatomiei unice, proprietăților fiziologice și forțelor Starling ale capilarelor glomerulare, rinichiul joacă un rol central în retenția de fluide corporale și electroliți [3]. În conformitate cu *ipoteza de subumplere*, reducerea presiunii oncotice a plasmei promovează trecerea liberă netă a fluidului din spațiu intravascular, ceea ce duce la epuizarea volumului sau subumplere. Acest lucru determină activarea fiziologică adecvată sau compensatorie a mai multor mecanisme, în cele din urmă rezultând în retenție secundară de Na<sup>+</sup> și de lichide, care vizează refacerea volumului intravascular și a tensiunii arteriale. Acesta este mecanismul cel mai răspândit la copii cu SN [54, 120].

Fenomenul menționat este în contrast cu cel de al doilea mecanism al SN, sau *ipoteza supraumplere*, ce este caracteristic glomerulonefritei poststreptococice acute și altor tulburări proteinurice inflamatorii în care procesul fiziopatologic activează mai mulți mediatorii care mențin retenția primară de Na<sup>+</sup>, având ca rezultat expansiunea volumului intravascular, creșterea presiunii hidraulice capilare și edemul [54].

Astfel, în producerea edemelor sunt implicate:

- pierderea barierei anionice a membranei bazale care este responsabilă de proteinurie;
- o anomalie tubulară asociată, localizată la nivelul tubului colector, este responsabilă de retenția hidro-sodică;
- hipoproteinemia și creșterea complianței spațiului interstițial, favorizând acumularea în exces a lichidelor, ce protejează organismul de o supraîncărcare a spațiului intravascular [3,4].

Creșterea permeabilității glomerulare pentru proteinele plasmatică este cauzată de alterarea funcției de barieră electrică și/sau dimensională a MBG. Pierderea proteinelor în urină depinde atât de mărimea și încărcătura electrică ale moleculei proteice, cât și de natura defectului de permselectivitate. Albumina este încărcată electronegativ și se pierde predominant în defectele de barieră electrică, cum se întâmplă în SNSM. În afecțiunile asociate cu modificări structurale ale glomerulilor și cu defecte ale barierei dimensionale se pierd în urină atât albumina, cât și proteine mai mari (IgG).

Rata excreției de proteine este influențată de RFG, fluxul plasmatic renal, activitatea sistemului renină-angiotensină, sinteza și concentrația plasmatică a albuminei, aportul proteic. Scăderea marcantă a concentrației albuminei serice e însoțită de scăderea proteinuriei; și invers, administrarea intravenoasă de albumină e însoțită de creșterea proteinuriei. Gravitatea leziunilor glomerulare este corelată cu selectivitatea MBG [70, 189].

Pierderile urinare de albumină produc stimularea sintezei de albumină, compensând astfel, parțial, trecerea albuminei în urină și în spațiul interstițial; de asemenea, stimulează catabolismul proteic. Scăderea presiunii oncotice a plasmei, datorită hipoalbuminemiei în sinusoidale hepatice, este stimulul sintezei de albumină [70].

IgG sunt scăzute în ser, gradul scăderii necorelând cu magnitudinea pierderilor. Pe lângă pierderile renale, intervin inhibiția sintezei și creșterea excreției fracțiilor extrarenale. Pierderea proteinelor care leagă hormoni (colecalfiferol binding-protein, tiroxin binding-protein) poate influența relația dintre fracția liberă, activă a hormonilor și fracția legată.

Pierderea de cortizol binding-protein duce la alterări ale distribuției hormonilor glucocorticoizi exogeni; ca urmare, bolnavii cu SN dezvoltă sindrom Cushing mai rapid decât nonnefroticii [4, 189].

Hiperlipidemia în SN se caracterizează prin alterări ale tuturor claselor de lipoproteine în ceea ce privește concentrația lor plasmatică, compoziția și rata de metabolizare. Sunt crescute raporturile colesterol/trigliceride și lipide/apolipoproteine. Nivelul seric al colesterolului total, fosfolipidelor și trigliceridelor este înalt.

Hiperlipidemia poate precede instalarea hipoalbuminemiei și poate persista după diminuarea/dispariția acesteia. Drept urmare a proteinuriei, catabolizarea lipoproteinelor, a chilomicronilor este scăzută (prin urină se pierde lipoprotein-lipaza – enzimă care catabolizează aceste lipoproteine) [3, 4, 186, 247].

În SN se atestă o tendință spre hipercoagulabilitate, explicată prin implicarea următoarelor mecanisme: creșterea concentrației principalilor factori plasmatici de coagulare - I, II, V, VII, VIII, X și XIII. Alterarea sistemului inhibitor al coagulării intervine în patogenia accidentelor tromboembolice prin: scăderea concentrației AT III, care apare în proteinurii mai mari de 10g/24 h; apariția valorilor normale sau chiar crescute ale proteinei-C și ale macroglobulinei care pot compensa pierderile de AT III; creșterea sau scăderea valorilor proteinei S. În SN apar următoarele anomalii ale fibrinolizei: scăderea concentrației plasminogenului secundar pierderilor urinare; eliberarea activatorilor plasminogenului este normală sau crescută; scăderea inhibitorilor plasminei; anomalii plachetare: trombocitoza (rar întâlnită); trombocitele au o hiperadezivitate și hiperagregabilitate plachetară la ADP și collagen; hiperlipidemia din SN crește adezivitatea plachetară; alterarea încărcăturii negative a membranei trombocitelor; creșterea viscozității sangvine [3,4].

## **1.2. Rolul modificărilor histologice și corelațiile cu markerii biochimici în glomerulonefrită la copii**

Majoritatea copiilor cu SNI se prezintă sub 3 forme histopatologice: SN cu schimbări minimale în glomeruli (SNSM), glomerulonefrita mezangialproliferativă (GNMzP) sau glomeruloscleroza focală segmentară (GSFS). SN în care sunt prezente complexe imune în țesutul renal include: glomerulonefrita membranoproliferativă (GNMP), glomerulonefrita membranoasă (GNM), și altele, care sunt rare în rândul copiilor [82, 148, 162].

*SNI cu leziuni glomerulare absente sau minime (cca 85% dintre SNI).* În această formă glomerulii apar optic normali (inclusiv la imunofluorescență) sau cu o minimă creștere a numărului de celule mezangiale și a matricei mezangiale. Microscopia electronică evidențiază fuzionarea și tendința de dispariție a proceselor podocitare. Peste 95% dintre copiii cu această formă răspund favorabil la corticoterapie [3].

*SNI cu proliferare mezangială difuză (cca 5% dintre SNI).* Circa 50-60% dintre copiii cu această formă răspund favorabil la corticoterapie. Unii pacienți cu SNSR atestă o marcantă creștere a matricei mezangiale asociată cu hipercelularitate [82, 353]. Cu toate acestea, pereții capilarelor periferice sunt normali, iar microscopia imunofluorescentă este negativă. Microscopia electronică arată procese de fuziune similare cu modificările observate în maladia cu schimbări minimale.

Prezența hipercelularității mezangiale are o semnificație prognostică și o rată mai mare de progresie spre insuficiența renală [353].

Tabelul 1.1. Incidența formelor histologice în SNSR

| Variante histologice | Bonilla-F. M., 1999 [56] | Gulati S., 2006 [146] | Seif E.I., 2013 [294] | Mubarak M., 2012 [236] | Olowu W.A., 2010 [252] | Obiagwu P.N., 2014 [250] | Adanze O.,(2015) [18] |
|----------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Perioada studiului   | 1987–1997                | 1990–1996             | 2005–2011             | 2009–2011              | 2001–2007              | -                        | 2006–2013             |
| Numărul de subiecți  | 152                      | 33                    | 53                    | 147                    | 19                     | 11                       | 30                    |
| Vârsta medie         | 5,3                      | 5,7                   | 6,7                   | 7                      | 8                      | 8                        | 9                     |
| GNMP                 | 5,0 %                    | 1,6 %                 | 7,5 %                 | 4,8 %                  | 43,5 %                 | 9,1 %                    | 27 %                  |
| GSFS                 | 31 %                     | 58,8 %                | 30,2 %                | 38,7 %                 | 39,1 %                 | 54,5 %                   | 60 %                  |
| GNM                  | 35 %                     | 17,6 %                | 24,5 %                | 23,1 %                 | 4,35 %                 | 27,3 %                   | 3 %                   |
| GNMzP                | 25 %                     | 17,6 %                | 1,9 %                 | 10,2 %                 | 8,7 %                  | -                        | -                     |

GSFS (cca 10% dintre SNI), în cadrul căreia debutul este în medulară (de aceea uneori biopsia renală poate fi eronat interpretată drept formă cu leziuni glomerulare minime). Această formă este adesea progresivă, afectând în final toți glomerulii, totuși cca 20% dintre copii răspund favorabil la corticosteroizi sau la citotoxice [3].

GSFS reprezintă un tablou histologic ce se caracterizează printr-un proces de glomeruloscleroză care cuprinde numai o porțiune din glomerul (leziune segmentară) și numai o parte din glomeruli (leziune focală). GSFS reprezintă nu o singură boală, ci mai degrabă un grup heterogen de leziuni histologice caracterizate prin proteinuria variabilă, de obicei, de rang nefrotic și modificări histologice, cu schimbări cronice focale și segmentare, cicatrice glomerulare și parenchimatoase [97, 325].

Clasificarea Columbia distinge 5 variante morfologice: varianta colaps, tip, celulară, perihilară și nespecificată, care pot fi aplicate în formele primare și secundare ale GSFS [98]. Mai multe studii au documentat diferențe semnificative în caracteristicile clinice inițiale și ale rezultatelor între variantele morfologice ale GSFS primare, susținând că această clasificare poate furniza informații utile de prognostic [317].

GSFS a fost descrisă pentru prima dată în 1957, însă abia în anii 70 a fost recunoscută drept entitate clinico-patologică separată.

Tabelul 1.2. Clasificarea Columbia a variantelor morfologice de GSFS  
( D'Agati VD, 2004) [98]

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                               |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| GSFS nespecificată          | Cel puțin un glomerul cu creștere segmentară a matricei ce obliterează lumenul capilar<br>Pot prezenta colaps segmental al MBG fără hiperplazie podocitară                                                                                                                                                                                                                       | Se exclud alte variante definite mai jos.                                     |
| GSFS varianta perihilară    | Cel puțin un glomerul cu hialinoză perihilară, cu / fără hialinoză<br>Scleroza perihilară și hialinoza afectând >50% din glomerulii cu scleroză segmentală                                                                                                                                                                                                                       | Se exclud variantele celulară, tip și de colaps.                              |
| GSFS varianta celulară      | Cel puțin un glomerul cu hipercelularitate segmentară endocapilară cu ocluzia lumenului, cu sau fără celule groase și cariorexis                                                                                                                                                                                                                                                 | Se exclud variantele tip și de colaps.                                        |
| GSFS tip polară             | Cel puțin o leziune segmentară afectând domeniul tip (cadrantul extern al ghemului în apropiere de originea tubului proximal)<br>Polul tubular trebuie identificat în leziunea definită<br>Leziunea trebuie să conțină adeziune sau confluență a podocitelor cu celule tubulare și parietale la nivelul lumenului tubular<br>Leziunea tip trebuie să fie sclerozată sau celulară | Se exclude varianta colaps.<br>Se exclude dacă un glomerul prezintă scleroză. |
| GSFS varianta de tip colaps | Cel puțin un glomerul cu colaps segmentare sau global și hipertrofie sau hiperplazie podocitară                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Fără excluderi.                                                               |

**Forma clasică** (sau cu leziuni nespecificate): la *microscopia optică*, unii glomeruli prezintă arii segmentare de colaps mezangial și scleroză. *Imunofluorescența* poate evidenția IgM și C<sub>3</sub>, rareori și C<sub>1</sub> în regiunile de fibroză, drept urmare a fixării nespecifice a acestora. *Microscopia electronică (ME)* relevă fuziunea proceselor podocitare ale celulelor epiteliale.

**Varianta cu colaps:** predomină colapsul și scleroza întregului glomerul, leziunile segmentale fiind mai rare. Sunt prezente leziuni tubulointerstițiale importante. De asemenea, se evidențiază dilatații microchistice. Podocitele sunt edemațiate și vacuolizate, spațiul endocapilar este redus. În ME MBG este plisată. Această variantă are o evoluție severă, cu prognostic rezervat.

**Varianta tip polară:** procesul de fibroză e localizat în apropierea zonei în care începe tubul proximal. Sunt prezente celule spumoase. Imunofluorescența relevă depozite de IgM și C<sub>3</sub>.

**Varianta perihilară:** procesul de fibroză e localizat în vecinătatea polului vascular. Se manifestă cu scleroză și hialinoză perihilară cu dispoziție segmentală și focală. Cuprinde mai mult de 50% din glomeruli. Este întâlnită în GSFS primară și în formele secundare ale GSFS, asociate cu creșterea presiunii intraglomerulare sau cu agenezia renală [3,4].

**Varianta celulară:** se evidențiază hiper celularitate segmentară endocapilară, însoțită de o zonă de fibroză adiacentă. Se mai poate evidenția *scleroza focală globală*, care se deosebește de scleroza segmentală și focală prin aceea că glomerulii afectați sunt sclerozați în totalitate. Se întâlnește la copii mici și are o evoluție mai bună sub tratament. Au fost publicate mai multe studii privind elaborarea caracteristicilor clinic-pathologice ale acestor variante histologice ale GSFS la copii, precum și la adulți [56, 121, 258, 332, 333].

Conform studiului efectuat de Shakeel S. [301], GSFS a constituit 33,4% din totalul biopsiilor renale efectuate la copii cu GSFS, iar varianta nedeterminată este cea mai răspândită în rândul copiilor cu SN. Varianta tip colaps se întâlnește într-un număr mic, dar semnificativ, în timp ce celelalte trei variante sunt distinct rare. Rezultate mai mult sau mai puțin similare au fost raportate din 1996 până în 2008 de către alți cercetători [236].

Tabelul 1.3. Prevalența variantelor histologice ale GSFS la copii

| Variante histologice | Shakeel S., [301] | Abrantes M.M., [16] | Paik K.N., [258] | El-Refaey A.M., [121] | Silverstein D.M., [311] |
|----------------------|-------------------|---------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| Nedeterminată        | 89,1              | 84,2                | 72,7             | 85                    | 43,9                    |
| Colaps               | 8                 | 15,8                | 10,6             | 6                     | 26,8                    |
| Tip                  | 1,4               | -                   | 6,1              | 2                     | -                       |
| Perihilară           | 0,7               | -                   | 9,1              | 7                     | -                       |
| Celulară             | 0,7               | -                   | 1,5              | -                     | 29,3                    |

Studiul efectuat de Silverstein D.M. și coautorii a demonstrat prezența tuturor celor cinci variante ale GSFS care este, de asemenea, relativ mare [311]. Cu toate acestea, prevalența unora dintre aceste variante histologice ale GSFS a fost foarte scăzută. Date similare au fost raportate de Paik K.N. [258] a constatat, de asemenea, prezența tuturor celor cinci variante ale GSFS în cohortă și distribuția de frecvență fiind similară. La rândul său El-Refaey A.M. și coautorii [121] au raportat rezultate similare cu studiul lui Shakeel S. [301].

Studiul efectuat de Swarnalatha G. și coautorii pe un lot de 116 pacienți cu SN a demonstrat că GSFS a constituit 35,47% cazuri. Cea mai frecventă variantă patologică a fost varianta nespecificată (62,2%), urmată de varianta perihilară (11,2%), tipul celular (9,4%) și tipul glomerular (7,7%), iar varianta colaps a constituit numai 4,3%.



Majoritatea pacienților cu variantele colaps, nespecificate și variantele de tip glomerular au prezentat proteinurie de rang nefrotic. Cu toate acestea, nivelul proteinuriei a fost cel mai înalt în variantele tip glomerular și colaps. Un procent mai mare de pacienți cu variantele colaps și celulare au prezentat insuficiență renală, la momentul prezentării.

O rată mai mare a modificărilor tubulare și interstițiale a fost observată în variantele colaps și cea celulară. Variantele colaps și celulară au avut o rată de răspuns mai mică la tratamentul efectuat și rate mai mari de BRC terminală, în timp ce variantele de tip glomerular au avut cea mai mare rată de remisiune și cea mai mică rată de BRC terminală. Factorii de prognostic nefavorabil pentru evoluția spre BRC terminală în GSFS au fost insuficiența renală inițială, schimbări severe tubulo-interstițiale, lipsa răspunsului la steroizi inițială și varianta histopatologică de colaps. Studiul dat sugerează că clasificarea histopatologică a GSFS prezintă o importanță primordială în managementul și estimarea prognosticului bolii [322].

GSFS implică heterogenitate histologică considerabilă în ceea ce privește localizarea și calitatea leziunilor segmentale glomerulare. Studiul efectuat de Taneda S. și coautorii a demonstrat heterogenitatea leziunilor segmentale în fiecare variantă histologică a GSFS, din clasificarea Columbia, precum și relevanța clinică a acestora [325]. Toate leziunile segmentale glomerulare a 80 de cazuri de FSGS primară au fost evaluate histologic. Printre 1.299 glomeruli a celor 80 exemplare de biopsie, 210 glomeruli (16,2%) au prezentat leziuni segmentale, care cuprind 57 (27%) tip celular, 4 (2%) tip fibros, 42 (20%) nespecificate celular, 86 (41%) nespecificate fibros, iar 21 (10%) leziuni fibroase perihilare.

Suprapunerea leziunilor segmentale în diferite categorii de locație a fost observată în variantele colaps, tip și perihilar, iar heterogenitatea calității a fost evidentă în variantele colaps și celulară. Descoperirile histologice ale variantei celulare (hipercelularitate endocapilară) au fost observate în nouă din cele 13 variante de colaps. Rezultatele studiului dat au demonstrat heterogenitatea histologică a leziunilor glomerulare segmentale în toate variantele histologice ale clasificăției Columbia, cu excepția celor nespecificate [325].

Există studii limitate privind corelațiile clinico-patologice ale GSFS la copii. Studiul efectuat de Nickavar A. și coautorii a evaluat rezultatele histologice la 46 copii cu GSFS primară pe perioada anilor 1994 și 2015 [243]. Datele clinice și de laborator au fost evaluate la momentul efectuării biopsiei renale. Cea mai frecventă variantă histologică a fost cea nespecificată, fiind prezentă la 38 de pacienți. Nu a existat nici o corelație între vârstă, sex, proteine serice, proteinurie, hematurie și răspunsul la steroizi, cu cele cinci variante patologice distincte și leziuni histopatologice. A fost stabilită o corelație negativă între nivelul Hb și hialinoza glomerulară, hipercelularitate mezangială, depunerea mezangială și volumul glomerular. Disfuncția renală și

valorile crescute ale tensiunii arteriale au avut o corelație pozitivă semnificativă cu gradul de atrofie tubulară, fibroza interstițială, sinehiile în capsulă Bowman, hialinoza arteriolară, infiltrarea mononucleară, ateroscleroza, hialinoza glomerulară, hiper celularitatea mezangială, depunerea mezangială și scleroza glomerulară.

Conform studiului dat, creatinina serică și tensiunea arterială au fost predictori semnificativi ai leziunilor histopatologice la copiii cu GSFS primară [243]. Aproximativ 30-40% dintre pacienții adulți cu GSFS dezvoltă BRC terminală la 10 ani de supraveghere. Prognosticul este relativ mai favorabil la copii, dar datele din literatura de specialitate au arătat rezultate contradictorii [16, 311].

Evoluția variantelor morfologice în GSFS în baza biopsiei renale native repetate reprezintă un instrument util pentru observarea evoluției modificărilor histologice în GSFS. Transformarea variantei nedeterminate în alte subtipuri histologice a fost cea mai frecventă modificare fiind însoțită de progresie clinică [379].

Biopsiile renale repetate la pacienții cu SNI au demonstrat o modificare morfologică între cele trei forme histologice principale. Unii pacienți cu dovezi clare de modificări minime confirmate la biopsia renală inițială au prezentat leziuni GSFS la biopsia renală repetată. O mare parte din acești pacienți sunt steroidrezistenți. Studiul efectuat de Tejani A. a constatat că leziuni GSFS au dezvoltat 60% din cei 48 pacienții cu SNSR cu schimbări minimale, în asociere cu agravarea simptomelor clinice [330].

Progresia sclerozei poate să apară în leziunile cu modificări minimale sau proliferarea mezangială [353]. Pe de altă parte, unii pacienți care au prezentat proliferarea mezangială difuză, indiferent dacă era sau nu asociată cu scleroza focală la biopsia renală inițială, pot pierde din hiper celularitate, iar, cu timpul, prezintă modificări minime sau GSFS la biopsia renală repetată [156].

Astfel, în concluzie, se poate deduce că, la copii cu boala cu leziuni minime, GSFS și proliferarea mezangială difuză reprezintă variații histologice ale SNI care poate fi singur sau în orice combinație în biopsiile renale secvențiale la unul și același pacient [300].

Frecvențele relative ale celor trei variante histologice diferă la pacienții cu SNSS și SNSR. Conform studiului ISKDS, dintr-un număr de 354 de pacienți cu SNI care au răspuns inițial la prednison, 95,5% au avut boală cu schimbări minimale, 3% – GSFS și 1,5% – proliferarea mezangială difuză [162]. Pe de altă parte, din 55 pacienți care nu au răspuns la prednison, 45,5% au prezentat boală cu schimbări minimale, 47,5% – GSFS și 7% – proliferarea mezangială difuză. Studiul dat a analizat, de asemenea, numărul de pacienți care au răspuns și care nu răspund la tratamentul cu steroizi în cadrul variantelor histologice.

Astfel, printre cei 363 de pacienți ce prezentau leziuni cu modificări minime, 91,8% au răspuns la tratamentul cu steroizi, iar 6,9% nu au răspuns, deoarece printre cei 37 (29,7%) pacienți cu GSFS, au răspuns la prednison, iar 70,3% nu au răspuns. O creștere a rezistenței către steroizi a fost raportată la pacienții cu GSFS [162].

Referitor la modificările histologice în GNAPS, *microscopia optică* evidențiază o glomerulită cu creșterea în volum a glomerulilor, cu proliferare a celulelor endoteliale și mezangiale ce realizează o glomerulită proliferativă difuză. La nivelul glomerulilor este prezent și un infiltrat inflamator cu leucocite polimorfonucleare, uneori și cu monocite și eozinofile realizând o glomerulită exsudativă. La nivelul interstițiului există infiltrat inflamator discret. Tubii sunt de aspect normal sau cu leziuni discrete de degenerescență focală, atrofia tubulară lipsește. Vasele sangvine sunt normale. Leziuni rare: proliferare extracapilară cu formare de semilune sau îngroșarea membranei bazale ce realizează excepțional o GN membranoasă. *Imunofluorescența*: depozite de complement și imunoglobuline de tip granular; se dispun în diverse modalități: mezangial în ghirlandă și sub formă de cer înstelat. *Microscopia electronică*: evidențiază depozite extramembranoase de tipul unor proeminențe, denumite humpsuri, hipertrofie mezangială și prezența de polimorfonucleare [167, 206].

Studiile recente au raportat că datele clinice, de laborator, precum și modificările histologice sunt predictorii ai bolii renale progressive [317, 350, 354].

Caracteristicile histopatologice, inclusiv glomeruloscleroza, atrofia tubulară, fibroza interstițială și hiper celularitatea mezangială, au fost identificate ca fiind predictorii independenți ai BCR terminale atât la copii cât și la adulți cu maladii glomerulare [118, 275].

Determinarea severității modificărilor histologice renale în supravegherea copiilor cu GNMzP poate facilita în identificarea pacienților care vor dezvolta ulterior BRC. De-a lungul ultimelor decenii, markerii proteinelor urinare, inclusiv IgG urinară, albumina, transferina,  $\alpha$ 1-microglobulina,  $\beta$ 2-microglobulina și NAG- $\beta$ , au fost utilizate pe scară largă în practica clinică pentru evaluarea afectării renale la pacienții cu maladii glomerulare.

Studiile recente au demonstrat corelații semnificative între nivelul proteinelor urinare, leziunilor renale și progresia insuficienței renale [49, 99, 373].

Rezultatele unui studiu efectuat la copii cu GNMzP au demonstrat valoarea predictivă a proteinelor urinare, măsurate în același timp cu biopsia renală, pentru detectarea leziunilor histologice renale [373].

Pentru evaluarea leziunilor histologice renale la copii cu GNMzP au fost utilizate următoarele variabile: celularitatea mezangială, procentul glomerulilor cu adeziuni segmentare sau scleroză și procentul de atrofie tubulară / fibroză interstițială.

În conformitate cu clasificarea Oxford a IgA nefropatiei, mai multe caracteristici patologice ar putea fi folosite pentru a aprecia semnificația independentă de prognostic a datelor clinice în IgAN, care sunt susceptibile de a fi aplicabile altor tipuri de glomerulonefrită [151]. Patru dintre aceste caracteristici, inclusiv hipercelularitate mezangială, glomeruloscleroză, atrofia tubulară și fibroză interstițială, s-au dovedit ulterior a avea o valoare independentă în estimarea rezultatelor renale [275]. Mai mult decât atât, glomeruloscleroza și atrofia tubulară / fibroza interstițială sunt considerate a fi cei mai puternici predictorii histologici în progresia BRC atât la copii cât și la adulți cu boli glomerulare [118].

Studiul efectuat de Yanhong L. și coautorii a demonstrat că excreția urinară a transferinei, albuminei,  $\alpha$ 1-microglobulinei IgG și proteinei timp de 24 h sunt predictorii în proliferarea severă a celulelor mezangiale la copiii cu GNMzP [373].

Transferina urinară și proteinuria timp de 24 h au fost factorii independenți asociați cu dezvoltarea glomerulosclerozei la copii. Astfel, transferina urinară are o valoare predictivă crescută în raport cu alte proteine urinare, evaluată prin AUC, fiind predictor al severității, celularității mezangiale și glomerulosclerozei la copii cu GNMzP. Creșterea transferinei urinare este determinată de permeabilitatea anormală a membranei bazale glomerulare și poate fi un marker în detectarea stadiilor incipiente ale bolilor glomerulare.

Masa moleculară a transferinei este foarte similară cu cea a albuminei, dar are ea un punct izoelectric mai mare. Excreția urinară crescută a transferinei poate precede dezvoltarea albuminuriei în boli glomerulare [373]. Transferina urinară reprezintă un predictor al severității, celularității mezangiale și glomerulosclerozei în stadiile incipiente ale bolilor glomerulare potențial progressive [49].

Atrofia tubulară / fibroza interstițială se datorează traficului crescut de proteine de-a lungul celulelor tubulare în bolile glomerulare. Potrivit unor studii, proteinele filtrate acumulate anormal ajung în lumenul tubular, declanșând eliberarea mai multor citokine proinflamatorii care cauzează infiltrarea inflamatorie interstițială și fibroză [99]. Excreția crescută a NAG- $\beta$  urinar sintetizate în celulele tubulare expuse la diverse substanțe toxice este utilă pentru detectarea leziunilor tubulointerstițiale la copiii cu GNMzP. S-a demonstrat că excreția crescută de NAG- $\beta$ , asociată cu creșterea secreției de transferină ar putea avea loc chiar și în absența unor dovezi morfologice ale leziunilor celulelor tubulare [49, 100].

În studii anterioare, a fost demonstrat că excreția urinară de  $\alpha$ 1- microglobulina,  $\beta$ 2- microglobulină și IgG este, de asemenea, considerată a fi un marker pentru detectarea leziunilor tubulare la pacienții cu boli glomerulare prin analiza de corelație [99]. Studii recente au confirmat corelarea diferitelor proteine urinare, cu excepția  $\beta$ 2-microglobulinei, cu leziunile

tubulointerstițiale la copii cu GNMzP. Cu toate acestea, prin analiza de regresie logistică binară, numai excreția urinară de NAG- $\beta$  și transferina au fost semnificativ asociate cu gradul de afectare tubulointerstițială [373].

Wu Y. și coautorii au analizat corelațiile existente între biomarkerii urinari și modificările histologice la copii cu nefrită interstițială indusă de medicamente [366]. Rezultatele obținute au demonstrat că nivelele urinare ale  $\alpha_1$ -microglobulinei au corelat pozitiv cu edemul interstițial, infiltrarea celulelor inflamatorii și atrofia tubulară, în timp ce nivelul IL-6 urinar a corelat negativ cu parametrii de mai sus. Nivelul NAG- $\beta$  urinar a avut o corelație pozitivă cu infiltrarea celulelor inflamatorii și atrofia tubulară, în timp ce u TGF- $\beta$  urinare au avut corelație pozitivă cu atrofia tubulară. Rezultatele analizei ROC au indicat că AUC pentru  $\alpha_1$ -microglobulinei a fost mai mare, comparativ cu cea a NAG- $\beta$  (0,797 vs 0,734,  $p < 0,05$ ).

Măsurarea combinată a  $\alpha_1$ -microglobulinei și NAG- $\beta$  ar putea spori sensibilitatea detectării interstițiale și a infiltrării celulelor inflamatorii. Pentru detectarea edemului interstițial și atrofiei tubulare, numai  $\alpha_1$ -microglobulina a avut o semnificație statistică (AUC = 0,723,  $p = 0,027$ ; AUC = 0,774,  $p = 0,008$ , respectiv).

Astfel, determinarea nivelelor  $\alpha_1$ -microglobulinei și NAG- $\beta$  urinare pot reflecta severitatea infiltrării inflamatorii interstițiale, iar măsurarea combinată a ambelor poate spori sensibilitatea. Nivelul urinar al  $\alpha_1$ -microglobulinei poate reflecta, de asemenea, gradul de edem interstițial și atrofie tubulară.

### **.3. Importanța factorilor de risc și mecanisme de progresie ale glomerulonefritei la copii**

Conform datelor literaturii de specialitate, diverși factori influențează evoluția sindromului nefrotic idiopatic steroid rezistent (SNISR). Vârsta, hematuria, hipertensiunea arterială, scăderea clearance-ului creatininei endogene în debut, varianta histopatologică, persistența proteinuriei, precum și rezistența tardivă la steroizi în debut reprezintă factori de risc pentru progresia SNISR [25, 28].

Rezultatele studiului efectuat de Zagury A. și coautorii [377] au demonstrat că vârsta la debutul SN a fost semnificativ mai mare în grupul cu BRC terminală, comparativ cu grupul fără BRC terminală. Acest fapt poate fi explicat prin incidența mai mare a GSFS, comparativ cu SNSM în acest grup. Vârsta la debut a fost mai mare la copiii cu GSFS, comparativ cu grupul de copii cu SNSM. Analiza copiilor cu GSFS a demonstrat că vârsta la debut a fost identică între cele două grupuri (cu și fără BRC terminală). În ceea ce privește clearance-ul creatininei endogene și insuficiența renală în debut nu s-a semnalat nici o diferență între cele 2 grupuri. Analiza univariată a arătat că prezența hematuriei și a hipertensiunii arteriale la debut au fost factori de risc pentru SNISR, iar acest lucru ar putea fi explicat prin incidența mai mare a hematuriei și a hipertensiunii

arteriale la pacienții cu GSFS, comparativ cu SNSM. Alte studii au raportat că hematuria la debut nu a fost un factor predictiv pentru SNISR [219].

S-a constatat că există o relație între prezența hematuriei în debut și dezvoltarea recidivelor SN în viitor [288]. Conform studiului efectuat de Chang J. V. și coautorii [72], prevalența hematuriei în debutul bolii a constituit 28% cazuri într-un grup de 50 de copii cu SN cu vârsta > 8 ani. Un alt studiu indian recent a relatat că prezența hematuriei a fost asociată în mod independent cu rezistența steroidă tardivă [312]. Insuficiența renală prezentă în debut [16] la o vârstă mai mare reprezintă un factor de risc pentru BRC terminală [15, 258].

GSFS este modelul histologic cel mai răspândit, fiind cauză majoră a BRC terminale [243]. Într-un studiu multicentric european care a inclus copii cu SNISR, varianta histopatologică inițială nu a fost un predictor semnificativ pentru dezvoltarea BRC terminale [219]. Niaudet P. a raportat că la pacienții cu SNISR progresia spre BRC terminală a fost similară pacienților cu SNSM sau GSFS confirmată la biopsia inițială; cu toate acestea, pacienții cu SNSM au progresat spre BRC, având întotdeauna la biopsia renală ulterioară GSFS [242]. Pacienții cu rezistență tardivă par să aibă un rezultat mai bun, comparativ cu cei cu rezistență precoce. Conform studiului efectuat de Otukesh H. și coautorii, o rată mai bună de supraviețuire renală se atestă la pacienții cu SNISR tardiv, comparativ cu cei cu rezistență precoce [255]. Schwaderer P. și coautorii a demonstrat că nu a semnalat scăderea funcției renale la 14 pacienți cu SNISR tardiv [292], dar alte studii recente au demonstrat că incidența globală a funcției renale a scăzut cu 23%, într-un lot de 126 de pacienți. Rezistența la tratamentul cu imunosupresoare crește riscul de rezistență la alte imunosupresoare care ulterior duc la progresia BRC [377].

Unul dintre factorii noi care ar putea anticipa răspunsul la terapie și rezultatele evoluției bolii sunt variantele genetice ale SN [52, 340, 351]. Mutațiile NPHS1, NPHS2, LAMB2 și WT-1 au fost identificate la două treimi din cohorta europeană de 89 de sugari cu SN sub vârsta de 1 an. Vârsta medie a pacienților cu BRC a fost de 5,6 ani. Pacienții cu mutații NPHS1 au prezentat BRC terminală la o vârstă medie de 4,6 ani, în timp ce cei cu mutații NPHS2 au dezvoltat BRC terminală la o vârstă medie de 7,4 ani [155]. Aceste diferențe ar putea fi explicate prin diferențele tabloului clinic și gestionării SN congenital (de exemplu, nefroectomie), comparativ cu modificările genetice ale bolii.

Există peste 40 de mutații genetice asociate cu GSFS și continuă să fie identificate noi mutații genetice [22]. O singură mutație genetică poate fi identificată la 29% dintre pacienții cu SNISR în debut până la vârsta de 25 de ani [282, 284].

Pacienții cu mutații genetice sunt mai puțin probabili să răspundă la terapia cu imunosupresoare și au mai mari șanse de a dezvolta BRC terminală [63, 197].

Studii efectuate de Buscher A.K. și coautorii au examinat supraviețuirea renală pe parcursul a 10 ani de supraveghere a unui lot de 231 de copii cu SNISR într-un grup european. 58% copii care prezentau SNISR după vârsta de 3 luni, au fost asociate cu mutații genetice și au progresat spre BRC terminală, comparativ cu 29% copii cu SNISR fără mutații genetice identificate [63]. Recent au fost identificate variante genetice în APOL1 ca factori de risc pentru bolile renale la subiecți de origine africană. Două copii ale variantelor de codare a APOL1 (G1 și G2) reprezintă factori de risc în dezvoltarea nefropatiei hipertensive, nefropatiei lupice, GSFS [138].

Trialul clinic randomizat, controlat care a analizat tratamentul cu mofetil micofenolat (MMF) și ciclosporină la copiii și adulții tineri cu GSFS [140] a demonstrat că 67-72% din 94 pacienți de origine africană posedau două copii ale variantelor de risc APOL1 și aveau șanse mai mari de a progresa spre BRC terminală, cu o rată de 40% a BRC terminale în aproximativ 8 ani [185]. Multe studii genetice s-au concentrat asupra populațiilor europene, în mare parte și omogene; cohortele studiului NEPTUNE și CureGN oferă oportunități de a înțelege contribuția genei și interacțiunile între gene-mediul în modularea rezultatelor pe termen lung [135, 285].

Recent, au fost identificate două gene asociate cu SNSS. Proteina membranară epitelială 2 (EMP2) a fost depistată în SNSS familial. Deși s-a atestat doar la un număr mic de pacienți, majoritatea nu au avut insuficiență renală, după 20 de ani de supraveghere [137].

Studiile din ultimii ani au schimbat viziunea savanților despre mecanismele progresării glomerulonefritei. Astfel, s-a demonstrat că indiferent de afectarea primară (mecanisme imune sau neimune), în rinichi au loc modificări hemodinamice, biochimice de lezare a glomerulilor cu implicarea țesutului interstițial și tubular; cu o evoluție spre nefroscleroză [173].

Brenner B.M. a stabilit că reducerea masei parenchimului renal duce la modificări adaptive structurale și funcționale ale nefronilor funcționali rămași și cu evoluție în progresarea glomerulonefritei și nefrosclerozei [59]. Studii efectuate au demonstrat că la animale, după nefroectomie în nefronii rămași, se intensifică de trei ori metabolismul absorbției  $O_2$ , totodată viteza glomerulară crește de 2 ori, iar tensiunea transcapilară cu 20% [272].

Modificările structurale și funcționale descrise sunt însoțite de creșterea permeabilității membranei bazale, acumularea macromoleculelor în mezangiu, pierderea încărcăturii negative a membranei bazale și intensificarea proteinuriei. Studiile denotă că hipertrofia glomerulilor conduce la dezvoltarea glomerulosclerozei. Astfel, modelarea experimentală a diabetului zaharat a permis de a conchide că hipertrofia glomerulilor este perioada inițială în dezvoltarea nefropatiei diabetice. Conform unor studii hipertrofia glomerulară contribuie în mai mare măsură la dezvoltarea glomerulosclerozei, comparativ cu hiperfuzia adaptivă [272].

Dezvoltarea glomerulosclerozei a fost demonstrată în mai multe studii, iar etapele morfologice au fost descrise în 1975 de Shimmamura T. și coautorii, care au arătat că schimbările morfologice sunt asociate cu autoreglarea hemodinamicii intrarenale [308]. Conform ipotezei lui Brenner B.M., dereglările hemodinamice adaptive duc la un șir de modificări în glomeruli, cu modificarea integrității și permeabilității, formarea de microtrombi și microanevrisme. Ca rezultat, are loc disfuncția endoteliului, lezarea epiteliului glomerular și a membranei bazale cu transudația macromoleculelor, disfuncția celulelor mezangiale și a epiteliului tubular, cu creșterea producției de citokine, factorilor de creștere care, la rândul lor duc la formarea nefrosclerozei și fibrozei interstițiale [59].

În studii experimentale Fogo A. a demonstrat că hipertrofia glomerulară contribuie la dezvoltarea glomerulosclerozei [131]. Totodată el consideră că pentru GSFS este caracteristică creșterea în dimensiuni a glomerulilor, comparativ cu alte maladii renale pentru care sunt caracteristice schimbări minimale în glomeruli. Particularități analogice autorii au atestat și la mături, la care glomeruloscleroza a fost asociată cu creșterea dimensiunilor glomerulilor. Rezultatele aceluiași studii demonstrează că hipertrofia glomerulilor este rezultatul acțiunii factorilor de creștere care stimulează atât hipertrofia cât și creșterea excesivă a matricei extracelulare, servind ca substrat al glomerulosclerozei.

Fine L.G. și coautorii a susținut ipoteza „hipoxiei” conform căreia principalul factor ce determină procesele de fibrogenză în rinichi îl constituie ischemia cronică [128]. Conform ipotezei date, leziunile grave ale parenchimului renal sunt inevitabil urmate de ischemie, care apare în legătură cu atrofia canaliculelor renale și care stimulează procesele de fibrogenză în glomeruli și interstițiul renal. Astfel, procesele date sunt condiționate de hiperperfuzie și hiperfiltrație. Sub acțiunea hipoxiei are loc stimularea producerii citokinelor profibrotice, factorilor de creștere [129]. Posibil că fenomenul „hipoxiei” joacă un rol cheie în patogenia progresării mai multor maladii renale dobândite, cât și ereditare [241].

Conform datelor literaturii de specialitate un rol important în dereglările hemodinamicii îi revine angiotensinei II generate de sistemul renină-angiotensină care acționează atât autocrin, cât și paracrin la nivelul pereților vasculari [364]. Expresia genică a reninei a fost identificată în celulele endoteliale și în celulele musculare netede din peretele vascular, iar expresia genică a angiotensinogenului a fost depistată în peretele vascular și în țesutul adipos. Celulele endoteliale conțin enzima de conversie a angiotensinei.

Principalele efecte în organism ale angiotensinei II sunt efectul vasoconstrictor puternic și cel de factor de creștere tisulară.



Angiotensina II își realizează acțiunea sa cu ajutorul receptorilor AT1 și AT2. Activarea receptorilor AT1 provoacă vasoconstricție, stimularea creșterii, activarea fibroblastelor și a miocitelor. Rolul receptorilor de tip AT2 este controversat în prezent, majoritatea autorilor consideră a fi contrareglator, benefic. Prin receptorii AT2 angiotensina II provoacă acțiune vasodilatatoare și un răspuns antiproliferativ, cât și creșterea apoptozei [112].

Angiotensina II își exercită efectul său vasoconstrictor atât direct, prin intermediul stimulării receptorului AT1, cât și indirect, prin intermediul diferitor mediatorii secundari. Receptorii AT1 mediază efectele nefavorabile ale AT-II. Ei sunt responsabili de eliberarea aldosteronului, catecolaminelor, vasopresinei și corticosteroizilor. Acești receptori se găsesc în mai multe țesuturi – creier, mușchiul cardiac, medulosuprarenală, rinichi, peretele vascular. La stimularea receptorilor AT1 vasculari are loc eliberarea ionului de  $\text{Ca}^{2+}$  din reticulul sarcoplasmatic, ceea ce rezultă cu contracția fibrelor musculare netede vasculare. Un mediator secundar important care mediază efectul vasoconstrictor al angiotensinei II este diacilglicerolul, implicat în activarea protein-kinazei C [364].

Diacilglicerolul împreună cu inozitol trifosfatul, care se formează la scindarea fosfolipidelor membranare de către enzima fosfolipaza C, este implicat în transmiterea semnalului în celulă. Inozitol trifosfatul se poate transforma în inozitol tetrafosfat, un compus care determină deschiderea canalelor de calciu. La nivelul arteriolelor renale a fost demonstrată existența unui mecanism vasoconstrictor suplimentar, intermediat tot de protein-kinaza C [3].

Angiotensina II produce creșterea depozitării matrixului extracelular fie prin acțiune directă, fie indirect prin stimularea altor factori de creștere, care potențează acest fenomen prin activarea fibrinolizei și proteolizei [132]. Modularea matrixului extracelular este produsă de un șir de proteaze și inhibitorii lor. Inhibitorul 1 al activatorului plasminogenului (PAI-1) inhibă transformarea plasminogenului în plasmină. S-a constatat că PAI-1 este indus atât *in vitro* cât și *in vivo* de angiotensină și această acțiune este amplificată de asocierea aldosteronului [251].

Angiotensina II posedă acțiuni prosclerotice, participă la sinteza factorilor hemotactici, MCP-1. Efectele prosclerotice ale AT II nu exclud, ci suplinesc efectul prosclerotic al TGF- $\beta$  și PAI-1 [223, 254]. În ultimii ani, a fost demonstrat rolul angiotensinei II în proliferarea celulelor mezangiale ale glomerului renal, inducerea sintezei factorilor profibrotici de creștere: TGF- $\beta$ 1, PDGF, precum și activarea TGF- $\beta$ 1, din forma latentă în cea activă. Inducând sinteza osteopontinei, angiotensina II contribuie la dezvoltarea fibrozei tubulo-interstițiale, proliferarea mezangiului și fibrozarea glomerulilor [223].

Un alt efect al angiotensinei II este stimularea stresului oxidativ, ca rezultat al creșterii catabolismului oxidului de azot (NO). Stresul oxidativ parțial realizat prin angiotensina II intensifică expresia moleculei adezive a produșilor hemoatractanți și citokinelor [241].

Rolul central în producerea crescută a angiotensinei II intrarenale și efectelor fibrotice îl joacă factorul nuclear de transcripție kB (NF-kB), reglând astfel transcripția diferitor gene în diferite țesuturi, inclusiv rinichi. NF-kB este localizat în citoplasma celulară, unde se află în formă neactivă (IkB). Forma activă a NF-kB este compusă din 2 proteine, care direct sau indirect, contribuie la procesul de fibrozare. Pe lângă angiotensina II, NF-kB este activat de asemenea de TNF- $\alpha$ , producția căruia, pe de altă parte, este indusă de NF-kB [150].

NF-kB duce la fibrozare prin stimularea proliferativă a fibroblastelor și diferențierea lor în miofibroblaste [150]. Concomitent, activarea NF-kB stimulează producerea hemoatractantelor și proteinelor adezive ale celulelor tubulare, ceea ce duce la un răspuns inflamator cu infiltrație macrofagică a interstițiului, producerea citokinelor profibrotice, creșterea matricei extracelulare. Ca rezultat al acestor procese are loc instalarea fibrozei tubulointerstițiale și progresarea maladiei renale [150].

În paralel cu angiotensina II, are loc și activarea altor substanțe vasoactive, ca endotelina, tromboxanul A<sub>2</sub>, prostaglandinele. În producția citokinelor profibrotice participă de asemenea endotelina 1. Este demonstrat că endotelina 1 duce la vasoconstricția vaselor renale, contribuind la reducerea fluxului renal și a vitezei de filtrare glomerulară. În același timp, endotelina 1 favorizează producerea matricei de către celulele mezangiului, epiteliului și fibroblastelor, care duc la rândul lor la formarea glomerulosclerozei [234].

Antigenii celulelor epiteliale glomerulare sunt ținte primare în multe afecțiuni glomerulare mediate imun. Ca răspuns la conflictul imun produs, celula epitelială din glomerulul hipertrofiat se poate detașa de membrana bazală. Aceste zone denudate pot juca un rol important în progresia cicatricelor, datorită proteinelor plasmatice exsudate.

Celula epitelială glomerulară produce în mod normal o substanță endogenă heparin-like, ce determină inhibiția creșterii celulelor mezangiale. Prin lezarea lor, acest efect inhibitor dispare și se dezvoltă o hiperplazie a celulelor mezangiale. Celulele epiteliale sunt de asemenea sursa principală a unui factor de creștere vascular endotelial, care joacă un rol-cheie în procesul de angiogeneză și permeabilitate vasculară. Alterarea integrității celulei epiteliale este responsabilă de unele tulburări structurale, cum ar fi fuzionarea podocitelor care explică producerea proteinuriei. Celulele mezangiale se activează în urma acțiunii citokinelor și își cresc susceptibilitatea la leziune [3].

Hipertensiunea arterială sistemică adesea însoțește maladiile renale și ambele pot contribui la instalarea BRC. În plus, glomerulul are o structură unică, incluzând atât o arteriolă aferentă cât și una eferentă, care permite modularea perfuziei glomerulare și presiunii corespunzătoare, fără a schimba tensiunea arterială sistemică. În modelul rinichiului restant, eliminarea a două treimi din rinichiul restant (de exemplu, a 5/6 prin nefroectomie), induce hiperperfuzia progresivă, hiperfiltrație, hipertrofie și FSGS [233].

Studiile efectuate denotă că hiperfiltrația cauzează scleroză, punând în mișcare un cerc vicios de hiperfiltrație și glomeruloscleroză. Manevrelor ce duc la micșorarea capacității de filtrare, cum ar fi dieta săracă în proteine, inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei (IECA), agenții de reducere a lipidelor sau heparina au fost, într-adevăr, eficace în ameliorarea sclerozei glomerulare [201]. Cu toate acestea, în unele studii, scleroza glomerulară a fost redusă fără alterarea hiperfiltrației glomerulare și scleroză glomerulară, survenite în unele stări chiar și în absența instalării hiperfiltrației. Astfel, hipertensiunea arterială glomerulară reprezintă un mediator-cheie al sclerozei progresive [112].

Renina în sine poate avea efecte directe, independent de activarea SRAA, cu activitate la nivel de receptori pentru renină detectat pe celulele mezangiale. Multe dintre acțiunile profibrotice sunt mediate direct de către angiotensina II. Angiotensina II facilitează migrarea celulelor vasculare endoteliale și musculare netede, stimulează hipertrofia, hiperplazia celulelor musculare netede și a celulelor mezangiale. Toate componentele SRAA sunt prezente în macrofage, care pot servi drept o sursă în plus de angiotensină II și, de asemenea, răspund la IECA și blocatorii receptorilor angiotensinei (BRA) [112, 201].

Angiotensina II induce, de asemenea, alți factori de creștere, inclusiv PDGF, TGF- $\beta$ , PAI-1, toate acestea pot avea impact asupra fibrozei renale [254, 364]. Foarte important este faptul că aldosteronul are acțiune atât genică, cât și nongenică de activare a fibrozei, independent de acțiunile sale de creștere a presiunii arteriale prin medierea retenției de sare. Aldosteronul îmbunătățește inducerea angiotensinei de către PAI-1 și are de asemenea acțiuni directe în formarea fibrozei renale [112, 251].

PAI-1, prin inhibarea activatorului tisular al plasminogenului, modulează activarea plasminogenului și, în consecință, a activității fibrinolitice. Nivelele crescute ale PAI-1 au fost identificate în leziunile de infarct miocardic, la diabetici, precum și în leziunile de scleroză glomerulară [116, 199]. Angiotensina II stimulează producția de PAI-1. În consecință, inhibiția angiotensinei-II are drept efect modelarea procesului tromboză-fibrinoliză, precum și scăderea procesului de scleroză [254].

Activarea plachetelor prin complexe imune este un element crucial în inițierea și amplificarea leziunii inflamatorii glomerulare. Plachetele activate eliberează substanțe cu acțiuni chemotactice sau vasoactive care interacționează cu alți mediatori generați de celulele rezidente sau inflamatorii. Astfel, plachetele favorizează fluxul PMN în glomerul participând la producerea leziunii glomerulare. Factorul de activare plachetar secretat de plachetele activate, precum și de alte celule care participă la inflamații (celule PMN, monocite, celule endoteliale) declanșează agregarea și degranularea plachetară. Pe lângă aceste efecte, PAI-1 produce și activarea leucocitelor și a sistemului complementului, stimularea celulelor mezangiale participând la producerea și perpetuarea leziunii glomerulare [315].

Prezența leziunilor tubulo-interstițiale nu trebuie interpretată ca simple sechele ale sclerozei glomerulare, ci, dimpotrivă, ele pot constitui un declanșator al unor fenomene locale ce pot conduce la perpetuarea leziunii renale. Inflamația tubulo-interstițială reprezintă influxul și proliferarea celulelor inflamatorii capabile de a produce o varietate de mediatori locali ai inflamației, precum și activarea celulelor tubulare și a unor celule renale rezidente. Odată declanșată, inflamația tubulo-interstițială urmează un model de progresie autonomă, deteriorând funcția renală chiar după o vindecare aparentă a leziunii inițiale [350].

Numarul de celule inflamatorii corelează strâns cu severitatea leziunilor glomerulare și tubulo-interstițiale precum și cu pierderea funcției renale. Leziunea inițială declanșează un influx de celule inflamatorii chiar în fazele precoce ale bolii. Activarea celulelor tubulare favorizează producția de molecule chemotactice care permit migrarea celulelor inflamatorii spre interstițiu. Aceste celule sunt reprezentate de macrofage și limfocite T și B. Limfocitele T activate (CD4, CD8) produc citokine cu un rol deosebit în procesul inflamator local, în special interferonul, care permite celulelor epiteliului tubular să joace rolul de celule prezentatoare de antigen, asemănător macrofagelor [3]. Astfel, interferonul gama activează macrofagele care vor fi deosebit de importante în procesul inflamator și de fibroză. Principalele mecanisme prin care macrofagul participă la producerea leziunii renale sunt secreția de enzime proteolitice, a unor radicali de oxigen, de substanțe vasoactive, citokine și factori de creștere, responsabili de întreținerea inflamației și, ulterior, de producerea modificărilor fibrotice [51].

La rândul lor celulele tubulare activate, pe lângă rolul de celule prezentatoare de antigen, pot secreta citokine proinflamatorii și componente ale matrixului extracelular (colagen I, II, fibronectină, laminină) fiind implicate în procesul de fibroză și cicatrizare.

Un alt mecanism de activare al celulelor tubulare ar putea fi declanșat de reabsorbția masivă a proteinelor. Un argument în favoarea acestui mecanism îl constituie renoprotecția conferită de inhibitorii angiotensinei I care micșorează rata proteinuriei.

Procesul de fibrogeneză, ca răspuns la leziunea inflamatorie, are ca celulă efectoră fibroblastul. Activarea acestor celule se face prin intermediul unor factori de creștere secretați de macrofage și de celulele tubulare - TGF- $\beta$ . Acest mediator produce o creștere a matrixului prin stimularea producției proteinelor majore (fibronectina, colagenul, proteoglicanii) [66]. Pe de altă parte, inhibă degradarea matrixului prin creșterea producției de inhibitori ai activatorului plasminogenului. În plus, poate produce o inhibare a proliferării limfocitelor T, limitând astfel procesul inflamator. Procesul de retracție cicatriceală este rezultatul activității microfilamentelor retractile, formațiuni asemănătoare actinei din celulele musculare netede [199].

Studii experimentale demonstrează că lipidele cu structura anormală modulează frecvent scleroza glomerulară la șobolani. Pacienții cu modificări minime precum și cei cu glomerulonefrită membranoasă, care este caracterizată prin hiperlipidemie ca element al SN, de regulă, nu dezvoltă cicatrice glomerulare. Unele studii clinice demonstrează că lipidele anormale sunt deseori asociate cu pierderea crescută a RFG cât și tratamentul cu statine în bolile cardiovasculare poate fi un beneficiu și pentru BRC progresivă [247].

Studiile denotă că un rol important în progresia glomerulonefritei îl are proteinuria, care apare în cazul progresării fibrozei renale. Valorile înalte și de durată ale proteinuriei cresc semnificativ riscul de dezvoltare a insuficienței renale faza terminală [70].

O amprentă în dezvoltarea proteinuriei și fibrozei tubulointerstițiale o are și complementul.

Rolul principal al complementului este de a facilita dezvoltarea unui răspuns inflamator cu chemotaxis și fagocitoză.

Activarea sistemului complementar în celulele tubulare duce la sinteza mediatorilor proinflamatori. O creștere a activității fracției C3 și C4 a complementului în celulele tubulare a fost depistată în nefrobiopțiile pacienților cu proteinurie masivă. La rândul său activarea sistemului complementului din celulele tubulare duce la apariția stresului oxidativ, deteriorarea citoscheletului epitelului tubular și creșterea producției citokinelor profibrotice.

Proteinuria poate modifica astfel funcția tubulară a celulelor în mod direct, cu potențial de a contribui la creșterea inflamației interstițiale, în special cu ajutorul macrofagelor [26].

Rolul primordial în progresarea glomerulonefritei îi revine angiotensinei II, citokinelor, factorilor de creștere, substanțelor vasoactive, care favorizează depunerea în matricea interstițială a unei cantități mari de colagen, fibronectină și alte componente implicate în formarea fibrozei interstițiale și dezvoltarea BRC.

#### **1.4. Semnificația modificărilor moleculelor de semnalizare celulară și a sistemelor enzimatică în ser și urină în progresarea glomerulonefritei la copii**

O serie de studii au relevat rolul predispozant al diferitor factori secundari sau neimuni, în special, a proteazelor serinice, care influențează unele elemente anatomice la nivelul capilarului glomerular (creșterea permeabilității celulare, modularea activității celulelor mezangiale, proliferarea sau liza celulară) și pot declanșa glomerulonefritele, dar și contribuie la activarea sau dereglarea diverselor sisteme funcționale ale organismului, în special, a sistemului renină-angiotensină-aldosteron (SRAA), asociată cu tulburări ale coagulabilității sangvine, sistemului kalikreină-kininică (SKK), complementului pe cale clasică printr-un complex antigen-anticorp sau pe cale alternativă care începe cu activarea moleculei  $C_3$ , ceea ce contribuie la declanșarea glomerulonefritei cu evoluție spre complicații ca insuficiență renală etc. Studiile recente confirmă faptul că paralel cu rolul lor în distrucția tisulară, sistemele umorale și celulare posedă și importante funcții reglatorii [26, 112, 116, 364]. În procesele imune din GN participă numeroși mediatorii: citokine, chemokine, factori de creștere, radicali liberi, factori ai coagulării etc.[27, 36, 122].

Actualmente în cercetările științifice biomarkerii au devenit o sursă de diagnostic eficientă în diagnosticul GN la copii. Studii recente au identificat o serie de biomarkeri noi în ser și urină, care pot determina riscul potențial de leziuni renale, distinge diferite tipuri de leziuni renale, prognozează progresia bolii și au potențial de a evalua eficacitatea intervenției terapeutice. Unii dintre acești biomarkeri pot fi utilizați independent, în timp ce alții sunt mai benefici atunci când sunt utilizați în combinație cu alți factori clinici de risc.

Aceste revizui se concentrează în principal pe descrierea biomarkerilor noi și stabilesc identificarea proceselor fiziopatologice care duc la dezvoltarea diferitor boli renale. Acestea oferă o imagine de ansamblu a unora dintre diferitele clase de biomarkeri renali care pot fi evaluați în ser / plasmă și urină, inclusiv markeri ai funcției renale, stresului oxidativ, afectării structurale și celulare, răspunsului imun și fibrozei [1, 2, 73, 126, 202, 208].

IL-1 $\beta$  joacă un rol în inflamația acută, este sintetizată în principal de macrofagele activate (stimulate antigenic), dar și de limfocitele B și celulele NK (natural killer), acționează nu numai asupra progresării glomerulonefritei, stimulând sinteza moleculelor de adeziune celulară (ICAM-1), dar și participă la formarea fibrozei interstițiului renal [74]. Nivelul crescut de IL-1 $\beta$  determinat în studiu este semnificativ prin rolul său major în mecanismul imunopatogenic al proteinuriei. Efectele vasculare de bază ale IL-1 $\beta$  sunt creșterea aderenței trombocitare, creșterea permeabilității vasculare, creșterea sintezei prostaglandinelor și hipertensiunea.

Mai mult, IL-1 $\beta$  poate stimula creșterea sintezei eicosanoizilor. Acestea pot trece prin celulele endoteliale, afectând podocitele încărcate negativ, care de obicei previn trecerea albuminei, determinând astfel neutralizarea lor și, respectiv, proteinuria [74].

Un important efect al creșterii IL-1 $\beta$  în asociere cu IL-6 este majorarea numărului leucocitelor provenite din două surse: măduva osoasă și leucocitele solitare atașate către celulele endoteliale. Valorile crescute ale numărului de leucocite poate indica că infiltrația monocitelor și macrofagelor este potențiala sursă majoră a citokinelor inflamatorii, în special IL-1 $\beta$ , IL-6, mai rar decât celulele glomerulare rezidente. IL-6 are un rol major atât în inflamațiile acute, cât și cele cronice. Este sintetizată de celulele endoteliale și mezangiale, ca răspuns la o varietate de agoniști: Ag, mitogene, endotoxine, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 are o acțiune stimulatorie pentru proliferarea celulelor mezangiale.

Factorul de necroză tumorală  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) este o citokină pleiotropă cu proprietăți proinflamatorii și imunoreglatoare în maladiile renale [122]. Este produsă în principal de macrofagele activate. În rinichii normali, TNF- $\alpha$  de obicei nu a fost detectat. Cu toate acestea, expresia TNF- $\alpha$  a fost demonstrată în celulele endoteliale, mezangiale și epiteliale glomerulare precum și în celulele tubulare după stimulare în timpul inflamației care a fost documentată în studii *in vitro* și *in vivo*.

Expresii semnificativ crescute ale TNF- $\alpha$  au fost depistate în monstre din biopsiile renale, iar concentrațiile ridicate ale acestei citokine au fost demonstrate în serul și urina pacienților cu diferite tipuri de GN. În modele experimentale de nefrită nefrotoxică, administrarea exogenă a TNF- $\alpha$  a contribuit la exacerbarea injuriei glomerulare [268].

TNF- $\alpha$  stimulează eliberarea unor mediatori inflamatori, incluzând IL-1 $\beta$ , MCP-1 și TGF- $\beta$ , principalii factori de reglementare ai sintezei de collagen.

CD 40 este o glicoproteină membranară care aparține superfamiliei receptorilor factorului de necroză tumorală și este exprimat pe linii celulare multiple, inclusiv limfocite B, macrofage și monocite, celule dendritice și celule endoteliale. Activarea receptorului CD 40 de pe epiteliul tubular proximal al rinichilor conduce la fibroză și inflamație în modele experimentale de leziuni renale.

Ligandul CD 40 solubil este eliberat de trombocitele activate. Rolul ligandului CD 40 solubil CD 40 la pacienții cu boală renală ischemică este necunoscut [106].

Printre diverșii biomarkerii iminenți, un rol important îl au citokinele chemotactice, denumite chemokine. Ultimele constituie o familie mare de citokine cu masa moleculară mică, a căror acțiune principală constă în recrutarea diferitor tipuri de leucocite în condiții homeostatice

și inflamatorii; evaluarea acestor mediatori inflamatori ar putea contribui la managementul diverselor boli renale la copii și la depistarea pacienților cu risc crescut de a dezvolta BCR [35].

Din marea familie de chemokine, un rol important se atribuie proteinelor monocitare inflamatorii. La om, există două forme majore, MIP-1 $\alpha$  și MIP-1 $\beta$ , denumite CCL3 și, respectiv, CCL4. Proteinele MIP-1 care acționează prin intermediul receptorilor celulari de suprafață cuplați cu proteina G (CCR1, 3, 5), expresați pe limfocite și monocite/macrofage, sunt bine cunoscute pentru efectele lor chemotactice și proinflamatorii. MIP-1 $\alpha$  și MIP-1 $\beta$  sunt esențiale pentru răspunsurile imune față de infecții și inflamații. Ele, la rândul lor, activează granulocitele umane (neutrofile, eozinofile și bazofile), care pot induce reacția neutrofilică acută [191]. De asemenea, ele induc sinteza și eliberarea altor citokine proinflamatorii, cum ar fi interleukinele IL-1, IL-6 și TNF- $\alpha$ , de către fibroblaste și macrofage.

Studii recente au demonstrat că celulele mezangiale umane cultivate produc proteina-1 chemoattractantă monocitară (MCP-1), ca răspuns la citokinele inflamatorii, frecvent întâlnite în glomeruli la pacienții cu GN [53]. MCP-1 reprezintă una dintre cele mai puternice chemoattractante de macrofage/monocite și limfocite T. MCP-1 este produsă la nivel local și induce o serie de evenimente inflamatorii, ceea ce are ca efect secreția altor citokine, activarea transcripției și reglementarea factorilor de creștere, în special, celor profibrogenici și TGF- $\beta$  [9].

S-a stabilit că familia endotelinei (ET) cuprinde trei peptide constituite din 21 de aminoacizi (ET-1, ET-2, și ET-3), dintre care ET-1 are cel mai relevant rol biologic pentru aprecierea funcției renale la copii sănătoși și în afecțiuni renale. Deși ET-1 a fost descrisă inițial ca un vasoconstrictor derivat din endoteliu, s-a demonstrat că peptida poate fi produsă de orice celulă și poate acționa asupra oricărei alteia din organism [41, 183].

Endotelinele activează două tipuri de receptori – ETA și ETB [203]. În general, în condiții de sănătate, complexul ETA produce vasoconstricție, proliferarea celulelor și acumularea de matrice extracelulară, pe când activarea receptorilor ETB conduce la vasodilatație, acțiune antiproliferativă și antifibrotică. În anumite condiții patologice, ETB poate provoca o injurie a țesuturilor și cicatrice [43]. Aceste efecte ale ET-1, fie la subiecții sănătoși sau în caz de boală, sunt exercitate într-un mod autocrin și / sau paracrin. S-a dovedit că endotelina endogenă (ET) renală reglează excreția renală de apă și sodiu [41, 259].

ET renală modulează, de asemenea, alte aspecte ale fiziologiei renale, inclusiv debitul total și regional de sânge, contracția mezangială, funcția podocitelor și reglarea echilibrului acido-bazic [259]. Implicarea endotelinei în secreția acidității renale poate avea o importanță deosebită în BRC. Creșterea acidității renale determină producția de ET-1, care, la rândul său, stimulează



secreția protonilor în nefronul proximal și distal; blocarea sistemului ET afectează excreția renală normală de acid [259].

Endotelina joacă un rol cardinal în dezvoltarea proteinuriei, fibrozei și în progresia BRC. ET-1 favorizează proliferarea celulară, hipertrofia, inflamația și acumulare a matricei extracelulare, toți aceștia sunt factori importanți în progresia BRC [42].

Producția ET-1 renală crește în condiții asociate cu progresia bolii renale, cum ar fi diabetul zaharat, rezistența la insulină, obezitatea, activarea sistemului imunitar, dislipidemia, formarea radicalilor liberi de oxigen [31].

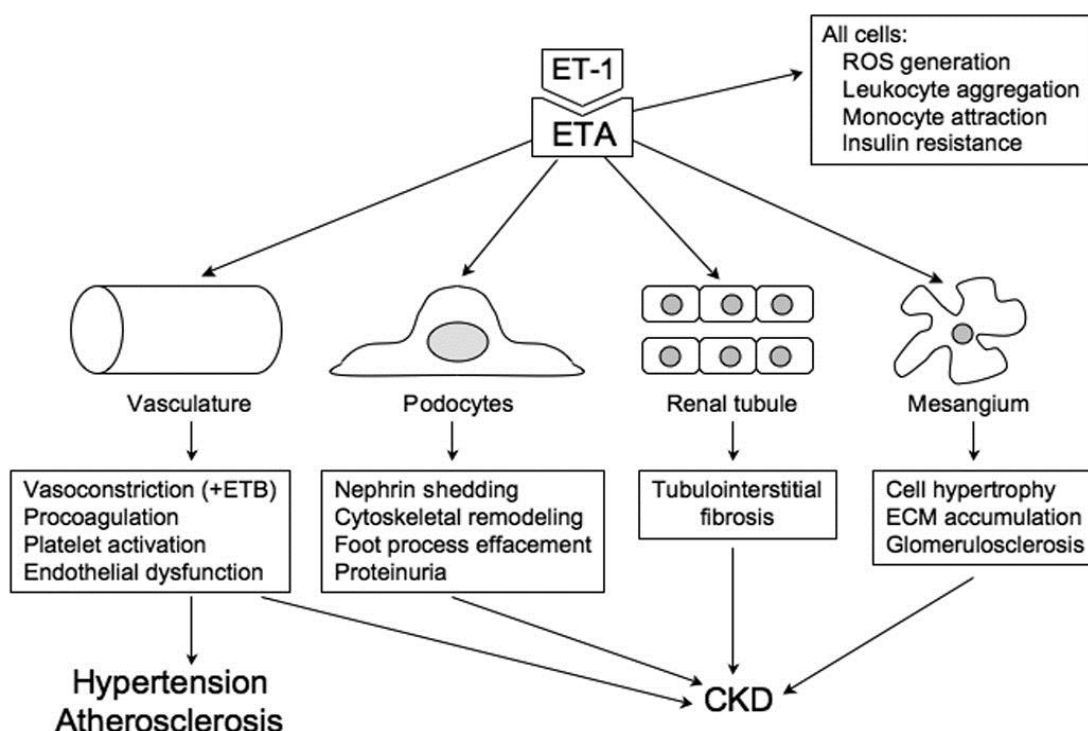


Figura1.1. Efectele ET-1 asupra celulelor vasculare și renale, rezultând cu hipertensiune, ateroscleroză și boala renală cronică (BRC). Receptorul ETA mediază cele mai multe efecte ale ET-1, iar receptorul ETB prin intermediul musculaturii netede vasculare poate media vasoconstricția. ETA – receptorul ETA, ROS –speciile reactive ale oxigenului [183].

Un aspect important al activității ET în fiziopatologie este implicarea podocitelor. Injuria podocitelor este un semn distinctiv al bolilor renale proteinurice și precede dezvoltarea glomerulosclerozei [43, 96].

S-a stabilit că factorul de creștere a endoteliului vascular (VEGF) stimulează proliferarea și diferențierea celulelor endoteliale, crește permeabilitatea vasculară, mediază vasodilatația dependentă de endoteliu și asigură integritatea vasculară prin prevenirea apoptozei endoteliale. În

plus, VEGF induce activatorul de plasminogen, inhibitorul activatorului de plasminogen -1 și collagenaza interstițială, factori importanți în remodelarea matricei [110].

Cercetările denotă că VEGF reprezintă un factor de creștere endotelial specific care antrenează proliferarea celulelor endoteliale, diferențierea și supraviețuirea lor, mediază vasodilatația dependentă de endoteliu, induce hiperpermeabilitatea microvasculară și participă la remodelarea matricei interstițiale [289].

În prezent, nu există concluzii ferme cu privire la rolul VEGF în glomerulonefrita cu schimbări minime sau cea membranoasă [211]. VEGF poate fi un mediator esențial al microangiopatiei trombotice și nefrotoxicității induse de ciclosporină. VEGF este puternic exprimat de celulele epiteliale viscerale în timp ce situs-urile sale de legare sunt localizate pe celulele endoteliale glomerulare. Dacă se presupune existența unui mecanism paracrin în glomeruli, VEGF trebuie să se miște în direcția opusă a filtratului glomerular, în scopul de a se lega la receptorii săi [253].

FGF- $\beta$  este o peptidă de legare a heparinei care, fiind eliberată din celulele endoteliale deteriorate, stimulează angiogeneza, neovascularizarea și creșterea rinichilor. În rinichi, FGF- $\beta$  este exprimat în celulele epiteliale deja în timpul dezvoltării fetale. La etapele ulterioare, expresia acestei citokine a fost depistată în celulele epiteliale ale tubului distal, glomeruli și în unele celule interstițiale.

FGF- $\beta$  reglează proliferarea, migrarea și diferențierea celulelor, având un efect auto- și paracrine [320]. Pentru prima dată proteina de legare a factorului de creștere fibroblastic (FGF-PL) a fost descrisă în anul 1991 de către Wu D. și coautorii [367].

FGF-PL joacă un rol important în creșterea eliberării și activării FGF- $\beta$  în tubulointerstițiul renal la copiii cu insuficiență renală și astfel, poate participa în patogenia unor maladii renale [369]. Interpretarea rolului FGF- $\beta$  în patogenia bolilor renale este insuficient studiată.

Pe de o parte, contribuind la proliferarea fibroblastelor și a celulelor epiteliale de transformare tubulo-mezenchimală, FGF- $\beta$  joacă un rol important în dezvoltarea fibrozei tubulointerstițiale [320]. Nivele ridicate ale FGF- $\beta$  au fost depistate în rinichii și sângele copiilor infectați cu HIV și cu nefropatie asociată HIV, la copiii cu sindrom hemolitic-uremic (SHU) [269]. Aceste date sugerează faptul că FGF- $\beta$  este eliberat în circulația sistemică și interstițiul renal de către celulele endoteliale deteriorate și celulele epiteliale renale, care pot juca un rol în patogenia SHU și HIV-nefropatiei [269, 369].

Pe de altă parte, FGF- $\beta$  poate induce exprimarea proteinelor de reparație și astfel facilitează accelerarea proceselor de reparare a țesuturilor atunci când sunt administrate parenteral sau invers, pentru a promova continuarea leziunii renale în cazul inhibării [348].

Factorul de creștere a țesutului conjunctiv (CTGF) este, implicat în procese biologice, cum ar fi reglarea ciclului celular, migrația, adeziunea și angiogeneza. Expresia acestuia este reglementată de diverși factori implicați în leziuni renale, cum ar fi angiotensina II, TGF- $\beta$ , concentrații mari de glucoză și stresul celular. CTGF este implicat în inițierea și progresia leziunilor renale fiind capabil să inducă un răspuns inflamator și să provoace fibroza (prin activarea factorului NF-kB, care reglează chemokinele și citokinele) [276].

Datele sugerează că CTGF este un participant activ în stadiile precoce de proteinurie și progresare fibrotică în GSFS. Studiile demonstrează că creșterea nivelului de CTGF în podocite este asociată cu creșteri rapide ale proteinuriei și poate exacerba proteinuria și expansiunea mezangială.

Factorul de creștere derivat plachetar (PDGF-B) este un mediator profibrotic puternic al fibrozei renale și un mediator proangiogenic în glomeruli. În studii recente a fost demonstrat rolul central și selectiv a formei dimerice PDGF-BB în activarea mezangiului prin proliferarea celulelor mezangiale și acumularea matricei glomerulare [76].

PDGF participă la dezvoltarea normală a rinichilor prin recrutarea de celule mezenchimale în glomeruli și interstițiul renal. Proliferarea, migrația și activarea acestor celule mezenchimale sunt principalele efecte mediate de PDGF [262].

Aceste acțiuni predefinesc rolurile majore ale PDGF în patologia renală, în special în glomerulonefrita mezangioproliferativă și fibroza interstițială. O implicare a PDGF în alte maladii renale, de exemplu leziunea renală acută, leziuni vasculare și hipertensiunea arterială, nefropatia diabetică sunt mai puțin cunoscute.

Expresia crescută a receptorului PDGFR- $\beta$  și formei dimerice PDGF-BB în semilunele glomerulare a fost demonstrată anterior în biopsiile renale umane. La animale cu anti-GBM nefrită, ambele forme ale PDGFR- $\beta$  și PDGF-BB au fost supraexprimate în semilune. Există date insuficiente privind rolul potențial al PDGF în alte maladii glomerulare. Ambii receptori PDGF și toți liganzii prezintă o reglementare înaltă în fibroza renală [57].

Factorul stromal derivat-1 (SDF-1) aparține unui grup de chemokine, care reprezintă molecule mici implicate în reglarea inflamației și migrarea celulelor [196]. Efectele biologice majore ale SDF-1 includ inducerea motilității, răspunsurile chemotactice, adeziunea celulară și adeziunea crescută către molecula-1 vasculară de adeziune celulară, molecula 1 de adeziune intercelulară, fibrinogenul, inducerea metaloproteinazelor și a factorilor angiopoietici, precum proliferarea și supraviețuirea celulară [335].

Stresul oxidativ poate fi definit ca o tulburare a funcției moleculare și celulare normale, cauzate de dezechilibrul dintre producerea de specii reactive de oxigen și capacitatea antioxidantă a celulei [184].

Isoprostanii, unul dintre markerii stresului oxidativ, merită o atenție deosebită, deoarece aceștia sunt produse specifice ale peroxidării formate *in vivo*, sunt stabili chimic, mai puțin influențați de dietă și sunt prezenți în toate țesuturile normale și fluidele biologice, acest lucru permițând determinarea unei limite normale, iar nivelurile lor au fost crescute substanțial în modelele animale. De notat că, F2-isoprostanii sunt detectabili în forma lor esterificată în toate țesuturile și fluidele biologice sub formă liberă normală, toate indicând nivelul "fiziologic" al stresului oxidativ [230].

Isoprostanii au fost descriși în 1990 de Morrow J.D. [234], ca unul dintre cei mai importanți markeri ai stresului oxidativ, ce detectează produsele specifice finale ale leziunilor provocate de radicalii liberi. Măsurarea F2-izoprostanilor în țesuturile și fluidele biologice oferă o abordare nouă cu valoare în cuantificarea stresului oxidativ, precum și o bază biochimică pentru evaluarea intervenției terapeutice [224]. Diferite studii au arătat că isoprostanii sunt biomarkeri disponibili ai peroxidării lipidelor și a fost studiat rolul lor în patogenia BRC [230, 273]. Aceste cercetări au demonstrat că isoprostanii pot fi considerați mediatori fiziopatologici în boli diferite, inclusiv bolile renale [94, 160].

Prođușii proteici de oxidare avansată (PPOA) au fost descriși pentru prima dată de Witko-Sarsat în 1996, fiind detectați în plasma pacienților cu uremie cronică. Ei se formează în timpul stresului oxidativ prin acțiunea oxidanților clorurați, în special a acidului hipocloros și cloraminei (produși de către mieloperoxidază în neutrofilele activate) [362]. Se presupune că aceștia sunt structural asemănători cu produșii finali de glicare avansată (AGE) și exercită activități biologice similare, de exemplu, inducerea citokinelor proinflamatorii și adezivității celulare. Nivelele lor sunt crescute la pacienții cu insuficiență renală, totodată, înregistrându-se cele mai înalte valori la pacienții tratați cu terapie de substituție renală [184].

PPOA sunt generați de către proteinele plasmatice oxidate, în special de către albumină, și se acumulează la pacienții cu leziune renală. Măsurarea nivelului de PPOA permite aprecierea concentrației proteinelor supuse unui proces intens de oxidare, în special a albuminelor [184, 295]. Studiile clinice și experimentale indică faptul că PPOA sunt implicate în modificările structurale ale nefropatiilor progresive, cum ar fi glomeruloscleroza, fibroza interstițială și atrofia tubulară prin calea dependentă de redox [67, 68, 356]. În ciuda numeroaselor studii realizate în acest domeniu, până în prezent, nu există suficiente informații privind modificările PPOA în bolile renale glomerulare la copii în diferite stadii clinice-evolutive ale bolii.

Prođușii finali de glicare avansată (AGE) constituie un grup eterogen de compuși ce sunt generați în urma unor reacții de glicare secvențială non enzimatică a glucidelor cu grupările aminice-libere ale proteinelor, peptidelor sau aminoacizilor [55].

În prezent, s-a stabilit că AGE se pot forma prin multe alte căi, inclusiv oxidarea glucidelor, lipidelor și aminoacizilor cu generarea de aldehide reactive care se leagă covalent cu proteinele [29].

O altă cale de generare a aldehydelor reactive importante în formarea AGE implică mieloperoxidaza și NADPH-oxidaza secretate de fagocitele activate și neutrofile, monocitele care aderă la locul inflamației. Mai mult decât atât, se sugerează că oxidanții derivați din aceste celule ar putea fi mai importanți, decât glucoza, pentru formarea AGE la site-urile de inflamație [29].

AGE sunt metabolizați și eliminați din organism de către rinichi. De asemenea, AGE sunt implicați în patogenia nefropatiei diabetice și a complicațiilor BRC terminale [141, 207, 218]. AGE se acumulează în zona mezangială și peretele capilar glomerular în caz de nefropatie diabetică, fapt confirmat prin studii imunohistochimice ale țesutului renal.

Intensitatea de imunocolorare a AGE este mai mare în zonele de scleroză glomerulară extinsă, ceea ce este caracteristic nefropatiei diabetice avansate [218, 371]. AGE participă în procesele de inflamație și sinteză a fibronectinei, lamininei și colagenului de tip IV în rinichi, intensifică scleroza glomerulară, fibroza și hipertrofia renală [55].

De asemenea, AGE au fost depistați în glomeruli, în afectarea renală nondiabetică (glomeruloscleroză focal-segmentară, nefroscleroză hipertensivă și nefrită lupică), însă rolul AGE în progresia bolii nu a fost, totuși, stabilit definitiv [95].

Modificările proteinelor în caz de uremie nu se limitează la AGE, deoarece produșii finali de lipidoxidare avansată sunt, de asemenea, depistați în componentele proteinelor plasmatică la bolnavii cu uremie. Acumularea acestor compuși nu pare a fi dependentă doar de declinul funcției renale.

Precursorii carbonili ai AGE și produșii finali de lipidoxidare avansată sunt semnificativ crescuți la pacienții cu uremie. Pe această bază, a fost formulată teoria „stresului carbonil”, conform căreia oxidarea crescută a glucidelor și lipidelor și/sau detoxifierea inadecvată a compușilor carbonil poate contribui la apariția complicațiilor pe termen lung ale bolii renale în stadiul terminal, cum ar fi amiloidoza de dializă și bolile cardiovasculare.

AGE, care sunt compuși proinflamatori și prooxidanți se acumulează la pacienții cu BRC și pot juca un rol important în prevalența crescută a disfuncției endoteliale și a bolilor cardiovasculare ulterioare [20].

Printre multiplii antioxidanți, tiolii (grupări sulfhidril) joacă un rol important în diferite

maladii renale. Sistemul antioxidant la pacienții cu SN, boala glomerulară primară și la pacienții cu proteinurie sau insuficiență renală este redus [177].

Procesele homeostazice în condiții normale, dar și în cele definite de stările patologice sunt dirijate de numeroși factori, printre care un rol cardinal îl joacă microelementele, în special, cele de tranziție, cum ar fi zincul și cuprul. Zincul și cuprul sunt două dintre metalele esențiale și membrii al uneia dintre cele mai importante subgrupe de micronutrienți în nutriția și sănătatea umană.

Cuprul este un co-factor comun pentru mai multe enzime, inclusiv oxidaze și oxigenaze, și contribuie în generarea de specii reactive de oxigen (SRO). De notat că citocromoxidaza, monoaminooxidaza, tirozinaza și superoxiddismutaza (SOD) sunt metalo-enzime ce conțin cupru. Acesta din urmă exercită proprietăți antioxidante puternice față de acțiunea toxică a ionilor superoxizi, pe care îi convertește în  $O_2$  și  $H_2O_2$ . Activitate enzimatică de tip oxidazic manifestă proteina plasmatică – ceruloplasmina, deosebit de bogată în cupru [192].

Zincul este un microelement esențial fiind implicat în structura multor enzime asociate cu diferite procese metabolice, inclusiv metabolismul acizilor nucleici, glucidelor și proteinelor. Zincul este necesar pentru funcționarea normală a sistemului imunitar; deficitul de Zn poate deprima imunitatea și afecta mecanismele de apărare ale organismului. Zincul stabilizează membranele celulare prin scăderea peroxidării lipidelor. Deficiența de zinc determină creșterea producției de  $H_2O_2$  precum și creșterea NADPH-citocrom P450 reductazei și a concentrației de fier în plămâni și microzomii ficatului [192]. Există studii limitate în care a fost investigat nivelul de microelemente în sindromul nefrotic, iar rezultatele acestor studii sunt contradictorii în ceea ce privește unele microelemente [114, 227, 237, 341], fapt ce justifică necesitatea continuării cercetărilor în această direcție.

Arginaza mamiferă are două izoenzime (arginaza-1 și arginaza-2), care sunt codificate de gene diferite în ceea ce privește distribuția tisulară, localizarea subcelulară și reactivitatea imunologică și sunt reglementate în mod independent [225]. Arginaza-2 este izoforma predominantă exprimată în mod normal în rinichi. Ambele izoforme ale arginazei sunt induse de numeroși stimuli patologici și contribuie la disfuncția celulelor vasculare și remodelarea peretelui vaselor [337, 358].

Există tot mai multe dovezi că oxidul de azot (NO) este unul dintre cei mai importanți modulatori paracrini și mediatori în controlul funcțiilor renale, cum ar fi fluxul global și regional renal sangvin, autoreglarea renală, filtrarea glomerulară, secreția de renină și excreția de săruri. NO joacă un rol important în patogeneza mai multor maladii renale, cum ar fi nefropatia diabetică, boala glomerulară inflamatorie, insuficiența renală acută, șocul septic, insuficiența renală cronică

și nefrotoxicitatea medicamentelor, transmițând atât efectele benefice prin intermediul funcțiilor sale hemodinamice, și efectele negative prin intermediul citotoxicității sale atunci când este produs în cantități mari prin nitric-oxid sintaza inductibilă (iNOS) [80, 134]. Există trei izoforme distincte de NOS; NOS neuronal (nNOS sau NOS-1), NOS endotelial (eNOS sau NOS-3) și NOS inductibil (iNOS sau NOS-2). Aceste izoenzyme prezintă diferită distribuție tisulară, localizare intracelulară, reglare moleculară, cinetică enzimatică și calciu-dependență [134].

Cele 3 izoforme NOS s-au dovedit a fi exprimate în rinichi. În rinichi nitric-oxid sintaza endotelială (eNOS) este importantă în menținerea ratei de filtrare glomerulară, tonusul vascular regional și fluxului sangvin renal [140]. Nitric-oxid sintaza neuronală (nNOS) este exprimată în principal în macula densa și participă la controlul hemodinamicii glomerulare prin feedback și eliberarea de renină. Cercetările recente arată că oxidul nitric (NO) este un mediator biologic care exercită efecte în mai multe țesuturi și căruia se acordă un mare rol în procesele fiziologice și patologice alături de peretele vascular [79].

Conform datelor literaturii de specialitate, NO sintetizat în rinichi joacă un rol important în patogenia GN, participând în răspunsul imun, precum și în procesele de nefroscleroză [79]. Studii recente au arătat, că NO poate fi implicat în formarea peroxidului nitric, chemochinelor proinflamatorii și căilor de semnalizare ca efecte adiționale celui de afectare glomerulară directă, care participă în permeabilitatea pentru albumină în GN. Astfel, NO derivat din izoforma NOS inductibilă poate genera leziuni inflamatorii, pe când NO derivat din NO sintaza endotelială (eNOS) menține funcția endotelială și protejează împotriva fibrozei tubulointerstițiale și mezangiale ulterioare [134].

Cercetările privind rolul NO în GN sunt insuficiente și controversate, iar legătura între componentul tubulointerstițial și producția NO practic nu s-a studiat. Conform studiilor, peroxinitritul, ca mediator al lezării proteinelor, are capacitatea de a inactiva inhibitorii metaloproteazei-1, astfel creând condiții favorabile pentru fibrogeneză. La rândul său factorul de creștere trombocitar, factorul de creștere a fibroblastelor reglează schimbările glomerulare induse de NO, care la rândul său determină intensitatea procesului inflamator și evoluția maladiei [79].

În vasele glomerulare microperfuzate, NO modulează preferențial efectul procontractil al angiotensinei II în arteriola aferentă, dar nu și în cea eferentă. Rolul de primă mărime al NO în menținerea filtrării glomerulare este confirmat și de faptul că semnalizarea maculei densa către aferentă este modulată de NO [134]. Conform datelor literaturii, NO sintetizat în rinichi joacă un rol important în patogeneza GN, participând în răspunsul imun, precum și în procesele de nefroscleroză [80].

Modificări dramatice ale metabolismului argininei pot duce la disfuncții vasculare, datorită creșterii activității arginazei, inclusiv disfuncția vasculară în diabetul zaharat [152]. Glutathionul și enzimele ciclului glutationic îndeplinesc în organism funcții diverse și de o importanță majoră: influențează asupra activității enzimelor și altor proteine, asupra proliferării țesuturilor și biosintezei acizilor nucleici, măresc rezistența celulei la acțiuni nocive, prezintă rezervă de cisteină, îndeplinesc funcții catalitice, reduc și izomerizează legăturile disulfurice, mențin funcțiile membranelor celulare, participă la metabolismul euconazoizilor etc.

În cazul epuizării glutathionului redus au loc dereglări ale funcțiilor renale: se micșorează filtrația în glomeruli, clearance-ul paraaminohipuratului, scade activitatea unor enzime (Na / K, ATP-azei, glucozo-6-fosfatazei), se atestă majorarea gluconeogenezei. Diamidul scade transportarea aminoacizilor în rinichi, dar glutathionul îl restabilește [202].

Conform unor studii recente,  $\alpha_1$ -antitripsina și  $\alpha_2$ -macroglobulinele sunt principalii inhibitori ai proteinazelor, deoarece ei neutralizează 97% din activitatea proteolitică a serului sangvin. Ele inhibă proteinazele bacteriene și macrofagice, activând procesul inflamator și totodată servesc ca modulatori ai răspunsului imun.

Sistemul proteinaze-antiproteinaze direct sau indirect este implicat în procesele de coagulare și fibrinoliză. S-a sugerat că există forme de GN generată de deficitul ereditar al  $\alpha$ -inhibitorilor proteazelor. O serie de studii clinice și experimentale arată că schimbările inițiale în mezangiu, soldate cu „îmbătrânirea” membranei bazale glomerulare, și glomerulonefrita focal-segmentară cu progresare rapidă poate fi condiționată de disfuncția  $\alpha_1$ -inhibitorilor proteinazelor [73].

Studii recente demonstrează că  $\alpha$ -antitripsina și complexul  $\alpha_2$ -macroglobulinic posedă proprietăți imunodepresante, micșorează citotoxicitatea antigenilor, anticorpilor, activarea limfocitelor provocată de proteinaze, dereglează migrația macrofagilor și monocitelor. Inhibitorii proteinazelor reduc permeabilitatea vaselor de calibru mic la inflamarea lor, contribuie la eliminarea în cantități mari a acidului arahidonic.

Formarea complexului  $\alpha_2$ -macroglobulină - proteinaze este însoțită de eliberarea unor peptide cu masa moleculară joasă. Se presupune că acestea reprezintă cauza imunodepresiei, ceea ce se realizează în cazul infecțiilor bacteriene, virale precum și al uremiei. Astfel,  $\alpha$ -antitripsina și  $\alpha_2$ -macroglobulina au fost depistate în nefronii sclerozați, fapt ce indică implicarea lor activă în procesele de nefroscleroză.

În organism  $\alpha_2$ -macroglobulina stimulează sinteza proteinei C-reactive în ficat, reglează activitatea multor endopeptidaze prin modularea specificității de substrat, participă la reglarea



fibrinolizei, care are ca bază enzima plasmina. Complexul plasmină- $\alpha_2$ -macroglobulină acționează selectiv asupra fibrinei, parțial descompune fibrinogenul [208].

Este cunoscut faptul că  $\alpha_2$ -macroglobulinele extrag surplusul de proteinaze formate în organism nu numai din patul vascular, dar și din spațiul extracelular. Complexele  $\alpha_2$ -macroglobulină cu proteinazele se elimină cu ajutorul fibroblastelor și sistemului imun de protecție. A doua funcție de bază a macroglobulinelor este proprietatea de a modula funcția diverselor sisteme imune. Se cunoaște legătura  $\alpha_2$ -macroglobulinei cu sistemul imun – ea fixează complementul. În aspect evoluțional  $\alpha_2$ -macroglobulina este predecesorul sau produsul catabolismului incomplet al imunoglobulinelor. Conform studiilor recente, estimarea nivelului  $\alpha_2$ -macroglobulinei reprezintă unul din testele sensibile, care reflectă starea funcțională a nefronului și aprecierea filtrației glomerulare [263].

Determinarea activității enzimelor în sânge și urină permite de a evalua caracterul procesului patologic, iar cercetarea activității enzimactice în dinamică permite de a aprecia eficiența tratamentului aplicat. Se cunosc trei tipuri de modificări ale spectrului enzimatic sangvin: 1) creșterea activității enzimelor, prezente permanent în sânge (hiperenzimemia) legată de tulburări ale organizării intracelulare ale enzimelor și de prezența permeabilității patologice ale barierelor histo-hematice; 2) micșorarea activității acestor enzime (hipoenzimemia) ca urmare a hipofuncției organelor afectate; 3) apariția în sânge a enzimelor care în condiții normale la persoanele sănătoase nu se depistează. Sensibilitatea înaltă a diagnosticului enzimatic se explică prin faptul că concentrația enzimelor în celule este de mii de ori mai înaltă, de cât concentrația lor în plasma sangvină. Acest gradient puternic celularo-plasmatic este menținut de mecanisme fine, care se deglează la cele mai mici leziuni ale celulei. Cele mai sensibile enzime sunt localizate pe membrana plasmatică și în citoplasma celulei (lactatdehidrogenaza - LDH, leucinaminopeptidaza - LAP, 5-nucleotidaza, adenzindezaminaza - ADA-za, fosfataza alcalină,  $\gamma$ -GPT, și al.).

Actualmente există câteva ipoteze, care explică modificările activității enzimelor serice în diverse stări patologice. Conform primei ipoteze, hiperenzimemia apare în urma pătrunderii în sânge a enzimelor din țesuturile distruse și ischemice, totodată caracterul, gradul și intensitatea enzimemiei sunt determinate de specificul organului afectat. Această ipoteză este infirmată de datele despre creșterea nivelului enzimelor, care lipsesc în organul afectat. Acest fapt a impus fondarea altei ipoteze, conform căreia hiperenzimemia este manifestarea sindromului acut, nespecific, însoțit de dereglări ale metabolismului energetic al celulelor și de modificări ale permeabilității membranelor celulare. În acest caz creșterea activității enzimelor în patul vascular este determinată de dereglarea proceselor de fosforilare oxidativă într-un șir de țesuturi și organe,

ceea ce mărește permeabilitatea membranelor celulare și contribuie la ieșirea enzimelor din celulă [263].

În pofida utilizării tot mai largi în practică a tehnologiilor diagnostice contemporane, rămâne actuală problema depistării timpurii a tulburărilor, a devierilor structural-funcționale ale rinichilor în diferite maladii și a prognozării riscului dezvoltării bolilor renale cronice. Pentru soluționarea acestor probleme o atenție deosebită se acordă depistării markerilor neinvazivi ai leziunilor celulare renale [73].

Conform datelor recente enzimele ce se elimină cu urina sunt localizate în toate regiunile nefronului, însă în general sunt concentrate în aparatul proximal al canaliculelor renale. Aici sunt concentrate mai mult de 30 enzime lizosomale și membranare. Un număr mare de enzime în urină au o proveniență renală.

Țesutul renal este reprezentat de stratul medular (20%), parenchimic (70%) și papile (8%). Repartizarea enzimelor în diferite sectoare ale nefronului are particularitățile sale. În corpusculii renali a fost depistată o cantitate neînsemnată de enzime. Se consideră că cea mai mare parte a enzimelor trece în urină din sectoarele proximale ale nefronului [202, 208].

În prezent, prin metode de laborator se determină activitatea a cca 70 enzime și izoenzime – indicatori sensibili ai afectării organelor interne, în primul rând a rinichilor. În condiții fiziologice, principala sursă de enzime sunt plasma sangvină, celulele epitelului canaliculelor renale, epiteliul celulelor tractului urinar [202].

Ca rezultat al fibrozei tubulointerstițiale din cauza hipoxiei cronice, în GN se observă îngroșarea membranei bazale, dereglarea funcționalității celulelor epiteliale tubulare și interstițiului cu eliberarea enzimelor cu localizare intracelulară diferită. S-a stabilit că în urma intensificării proceselor de endocitoză indusă în celulele epitelului canaliculelor renale crește activitatea funcțională a lizozimilor și se poate instala o „nefropatie osmotică” care se caracterizează prin vacuolizarea și edemațierea celulelor epiteliale, cu eliminarea unei cantități apreciabile de enzime lizosomale cu urina [263].

În condiții normale cu ajutorul filtrației glomerulare din plasmă în urină se excretă numai acele enzime a căror masă moleculară este mai joasă de 70 kDa (amilază, pepsinogen, lipază), enzimele cu masa moleculară mai mare nu trec prin filtrul glomerular. Numai în cazuri patologice, când are loc majorarea permeabilității membranei bazale a glomerulilor, este posibilă excreția cu urina a enzimelor cu masa moleculară mai mare de 70 kDa. Reabsorbția selectivă a enzimelor duce la aceea că unele enzime în condiții normale după filtrația în glomeruli se reabsorb complet în canaliculele proximale contorte [87]. S-a constatat că nivelul enzimuriei, activitatea enzimelor organospecifice în afecțiunile renale și, în special, în glomerulonefrită, pot servi drept markeri de

diagnostic precoce, de apreciere a gravității maladiei, patologiei topice, dinamicii lezării țesutului renal, activității maladiei și prognosticului [5, 6, 208, 346].

### **1.5. Concluzii la capitolul 1**

1. Glomerulonefrita primară are la bază mecanisme imunologice care implică toate componentele sistemului imun și include faza primară specifică, precum și faza nespecifică inflamatorie cu activarea principalelor sisteme biologice, și eliberarea mediatorilor injuriei renale. Mecanismele patogenice ale SNI confirmă o afectare imună a podocitului cu două etape- cheie. Prima etapă fiind inducerea expresiei moleculei CD 80 pe suprafața podocitului de către un factor circulant (citokine, alergeni, componente microbiene). Creșterea expresiei CD 80 induce modificări structurale ale podocitelor și declanșarea proteinuriei. A doua etapă include disfuncții ale mecanismelor de reglare a expresiei CD 80.

2. Majoritatea copiilor cu SNI prezintă 3 forme histopatologice ale bolii: SN cu schimbări minimale în glomeruli (SNSM), glomerulonefrită mezangială proliferativă (GNMzP) sau glomeruloscleroza focală segmentală (GSFS). Corelarea modificărilor histologice cu markerii urinari reflectă severitatea modificărilor inflamator interstițiale, gradul edemului interstițial și atrofia tubulară.

3. Factorii de risc care influențează progresia BRC include: vârsta, hematuria, hipertensiunea arterială, scăderea clearance-ului creatininei endogene în debut, modelul histopatologic, persistența proteinuriei, precum și rezistența tardivă la steroizi în debut. Factori de prognostic pe termen lung în SNI sunt prezența infecțiilor intercurrente și răspunsul la tratamentul cu steroizi.

4. Rolul primordial în progresarea glomerulonefritei îi revine angiotensinei II, proteinuriei, citokinelor, factorului de creștere, substanțelor vasoactive, care favorizează depunerea în matricea interstițială a unei cantități mari de collagen, fibronectină și alte componente care sunt responsabile de dezvoltarea fibrozei tubulointerstițiale și progresia BRC.

5. Modificările enzimatică în ser și urină relevă rolul predispozant al diferitor factori secundari sau neimuni, în special, al proteazelor serinice, care influențează câteva elemente la nivelul capilarului glomerular (creșterea permeabilității celulare, modularea activității celulelor mezangiale, proliferarea sau liza celulară) și pot declanșa glomerulonefritele, dar și contribuie la activarea sau dereglarea diverselor sisteme funcționale ale organismului, în special, a sistemului renină-angiotensină-aldosteron (SRAA), asociată cu tulburări ale coagulabilității sangvine, sistemului kalikreină-kininică (SKK), complementului.

**Scopul studiului:** evaluarea mecanismelor etiopatogenice prin estimarea particularităților fiziopatologice, clinico-evolutive, de progresare a diferitor variante ale glomerulonefritei pentru optimizarea diagnosticului clinic, prognosticului și elaborarea algoritmilor de diagnostic, tratament, profilaxie, reducerea recidivelor și riscului dezvoltării bolii renale cronice.

**Obiectivele studiului:**

1. Studiarea particularităților clinico-evolutive, factorilor de risc a diferitor variante ale glomerulonefritei primare la copii.
2. Estimarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP- $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , CD40) și a rolului lor în patogenia glomerulonefritei la copii.
3. Stabilirea suportului markerilor biochimici de progresare a nefrosclerozei (VEGF, PDGF-BB, CTGF, FGF- $\beta$ ) în glomerulonefrită la copii.
4. Evaluarea rolului stresului oxidativ și a sistemului antioxidant în fiziopatologia glomerulonefritei la copii.
5. Aprecierea informativității diagnostice a enzimelor plasmatice, proteolitice, lizozomale în fiziopatologia glomerulonefritei la copii.
6. Studiul modificărilor histopatologice și corelarea cu modificările clinico-paraclinice, biochimice și determinarea variabilelor de prognostic nefavorabil precoce și a riscului dezvoltării bolii renale cronice la copii cu glomerulonefrită.
7. Elaborarea schemei patogenice de lucru ale glomerulonefritei la copii în funcție de evoluția clinico-paraclinică, factorii de risc, modificările biochimice și histologice.
8. Elaborarea algoritmului de diagnostic, tratament diferențiat în aprecierea evoluției, variabilelor de risc ale injuriei cronice renale în glomerulonefrita la copii.

**Directiile noi de cercetare în știință și practică** obținute în cadrul studiului actual constă în abordarea aspectelor patogenice ale GN prin aprecierea nivelurilor serice și urinare ale moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere, sistemului oxidant, antioxidant, oxidului nitric, arginazei, endotelinei, enzimelor proteolitice, plasmatice, lizozomale, enzimelor ciclului glutationic, adenilic, PCE, aprecierea rolului biomarkerilor noninvazivi precoce ai fibrozei renale, injuriei tubulointerstițiale, disfuncției endoteliale, răspunsului imun la copii cu GN.

*Au fost stabilite criteriile principale de diagnostic diferențiat* în diferite variante ale glomerulonefritei. *Au fost elaborate metode originale de diagnostic timpuriu* în glomerulonefrită primară la copii. *A fost elucidat rolul major* ale moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere, sistemului oxidant, antioxidant, în evoluția, progresia glomerulonefritei. Datele obținute în cadrul cercetării științifice actuale constau în determinarea ponderii factorilor de risc implicați

în progresia GN prin analizarea variabilelor folosind metoda regresiei logistice, cu scopul calculării individualizate a riscului de dezvoltare a bolii.

*S-a abordat aspecte patogenice* ale injuriei renale prin aprecierea nivelurilor moleculelor de semnalizare celulară, factorilor de creștere în susținerea proceselor de injurie renală acestea fiind corelate cu varianta clinică, severitatea SN, specificul modificărilor paraclinice (proteinurie, hipoproteinemie, metabolismul lipidic crescut), histologice; implementarea metodelor de diagnostic precoce neinvaziv, ceea ce a permis precizarea simptomatologiei clinice timpurii și găsirea unor verigi patogenice importante în aprecierea și în formarea noilor viziuni privind optimizarea diagnosticului, prognosticului glomerulonefritei primare.

*A fost creat un algoritm al diagnosticului diferențiat* ale glomerulonefritei în funcție de varianta și activitatea bolii, conform utilizării markerilor serici și urinari. Pe parcursul studiului *a fost fundamentată științific o nouă platformă* de direcție în nefrologie.

**Problema științifică importantă soluționată în teză.** Problemele aplicative soluționate în cadrul studiului prezentat constă în elaborarea unei metodologii de format propriu pentru aprecierea variantelor clinice ale glomerulonefritei pentru care au fost definite abordări optime de diagnostic diferențial și de corecție medicală diferențiată, direcționate spre reducerea complicațiilor, recidivelor, restabilirea maximală a funcției renale și calității vieții viitorului adult.

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

### 2.1. Caracteristica generală a studiului: grupul de cercetare, etapele și design-ul studiului

Pentru realizarea scopului și obiectivelor de cercetare trasate a fost întocmit un plan metodologic de cercetare. Acesta a inclus: formularea și argumentarea problemei; stabilirea procedurii de cercetare; identificarea lotului general de studiu; elaborarea protocoalelor de studiu și chestionarelor; colectarea materialului, analiza și sinteza rezultatelor; formularea concluziilor și recomandărilor practice; aplicarea rezultatelor obținute în practică.

Pentru determinarea numărului necesar de pacienți incluși în studiu s-a utilizat următoarea formulă:

$$n = \frac{1}{(1-f)} \times \frac{2 \cdot (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot P \cdot (1-P)}{(P_0 - P_1)^2}, \quad (1)$$

unde:

- $P_0$  – proporția pacienților cu glomerulonefrită primară (GNP) în vârstă de 2–17 ani din populația generală a copiilor. Conform datelor statisticii oficiale, GNP în structura morbidității profilului dat la copii constituie 14,0% (0.14).
- $P_1$  – valoarea estimată a proporției pacienților cu GNP din lotul cazurilor va fi de 2 ori mai mare – 0.28.
- $P = (P_0 + P_1)/2 = 0.21$ .
- $Z_{\alpha}$  – valoare tabelară.
- $Z_{\beta}$  – valoare tabelară.

Când „ $\alpha$ ” – pragul de semnificație este de 5%, atunci coeficientul  $Z_{\alpha} = 1.96$

Când „ $\beta$ ” – puterea statistică a comparației este de 0.05, atunci coeficientul  $Z_{\beta} = 1.65$

- $F$  – rata de nonrăspuns, sau probabilitatea de abandonare a cercetării de către pacienții incluși în studiu,  $f = 10.0\%$  (0.1)

Introducând datele în formula 1, am obținut:

$$n = \frac{1}{(1-0.1)} \times \frac{2 \cdot (1.96 + 1.65)^2 \cdot 0.21 \cdot (1-0.21)}{(0.14 - 0.28)^2} = 245$$

Așadar, lotul general de cercetare după selectare a inclus 289 copii cu glomerulonefrită primară. Pacienții aveau vârsta cuprinsă între 2-17 ani și au fost urmăriți în medie 60 ( $48 \pm 12$ ) luni.

Cercetarea științifică a fost realizată consecutiv în câteva etape.

**La etapa I** – Studiul retrospectiv; a fost aplicat un chestionar special elaborat pentru colectarea datelor anamnestice, istoricul familial.

**La etapa II** – Au fost formate grupuri de lucru prin examinarea copiilor cu vârsta cuprinsă între 2 și 17 ani, cărora li s-au aplicat teste conform chestionarului. În funcție de rezultatele chestionarului, copiii au fost divizați în două loturi: L<sub>1</sub> (grupul de cercetare) – 289 copii cu GNP, și L<sub>0</sub> (grupul de control) – 289 de copii „convențional sănătoși.” Copiii din grupul L<sub>1</sub> de cercetare au fost repartizați în funcție de varianta clinică: 156 copii – GNA, 80 copii – SN, 28 copii – GNC forma nefrotică, 25 copii – GNC forma mixtă. Pentru aprecierea diagnosticului evolutiv al GN, toate cele patru loturi au fost urmărite repetat la 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 de luni.

**La etapa III** s-a efectuat prelucrarea statistică a datelor din chestionarele completate.

**Etapa IV** a inclus analiza comparativă a datelor, evaluarea rezultatelor, formularea concluziilor și recomandărilor practice.

Cercetarea a fost concepută și efectuată din 4 studii.

*Studiul I* – studiul retrospectiv, care a relevat analiza datelor anamnestice;

studiul prospectiv – analiza clinico-paraclinică de cohortă observațională evolutivă a copiilor cu GNP și celor „convențional sănătoși”.

*Studiul II* (clinico-imunoenzimatic) de tip prospectiv, nerandomizat, de cohortă a fost realizat în perioada aa 2002-2014 în Clinica de Nefrologie Departamentului Pediatrie al IP USMF „Nicolae Testemițanu” și în Laboratorul Biochimie al IP USMF „Nicolae Testemițanu” pe baza probelor biologice colectate conform principiilor contemporane de cercetare.

Pentru realizarea acestui obiectiv, din lotul general de studiu au fost selectați 131 de copii, dintre care 16 nu au îndeplinit criteriile de includere (9 au refuzat să participe, 7 au prezentat alte motive). În studiu au rămas 115 copii cu GN care au fost repartizați în funcție de variant clinică: 30 copii cu GNA sindrom nefritic, 30 copii cu SNSS, 15 copii cu SNSR, 20 copii cu GNC forma nefrotică, 20 copii cu GNC forma mixtă. Vârsta copiilor era cuprinsă între 2 și 17 ani și ei au fost monitorizați continuu, fiind supravegheați pe durata a 60 (48±12) luni.

Grupul de control a fost constituit din 25 copii practic sănătoși. Parametrii imunoenzimatici au fost urmăriți în dinamică: inițial la internare și la intervale de 4, 6 săptămâni, 3 luni.

*Studiul III* – studiu caz-control pentru determinarea factorilor de risc, în progresarea injuriei renale. Lotul L<sub>1</sub> – copii cu glomerulonefrită primară (289 copii) și Lotul L<sub>0</sub> (289 copii) – copii de vârsta respectivă, dar fără glomerulonefrită.

*Studiul IV* s-a bazat pe observațiile clinice-paraclinice și a întrunit evaluarea statistică și interpretarea rezultatelor obținute. Design-ul studiului este prezentat în figura 2.1.

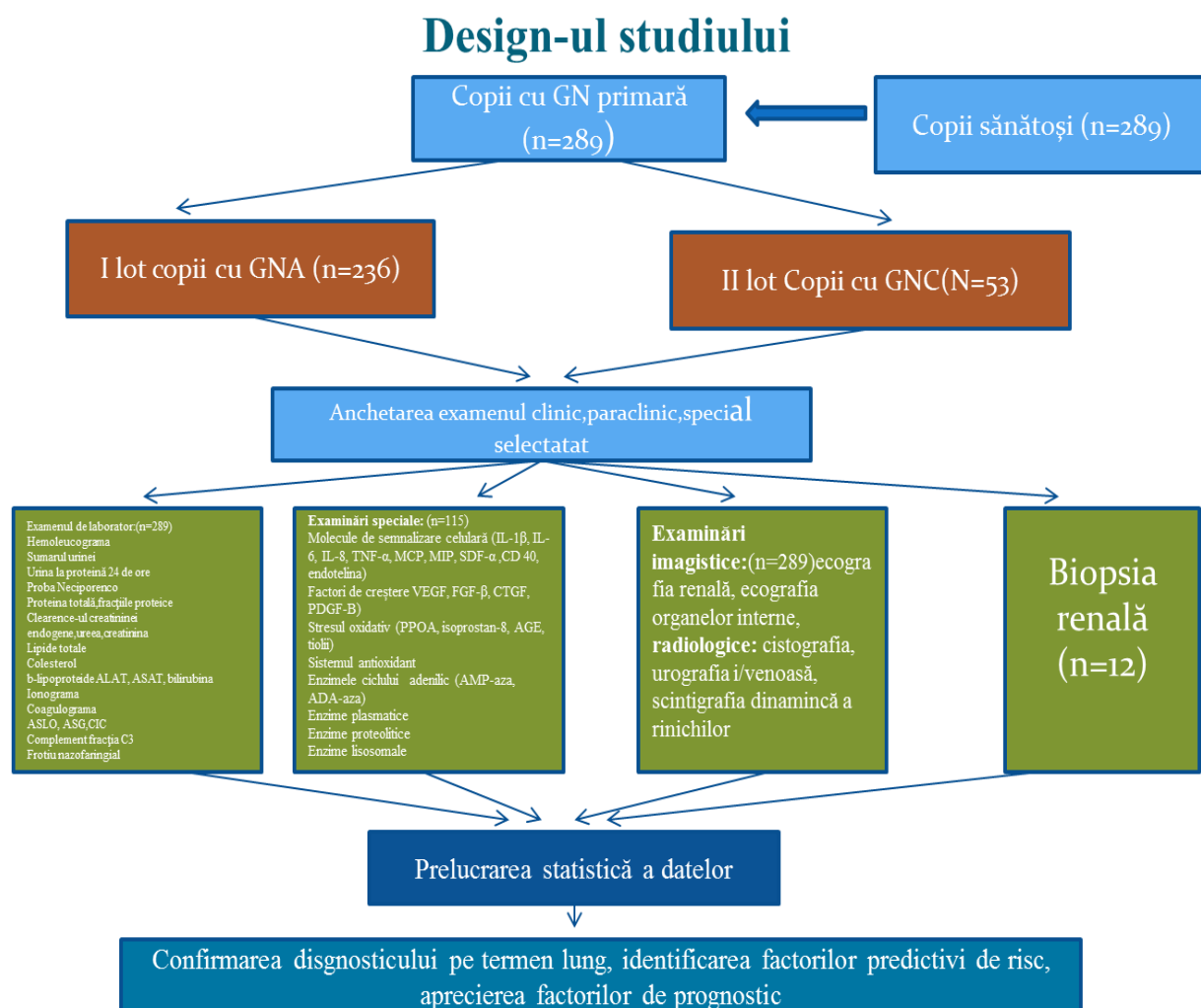


Figura.2.1. Design-ul general al studiului

#### Criterii de includere a pacienților în studiu:

1. Copii cu vârsta 2-17 ani.
2. Copii cu glomerulonefrită acută, cronică, sindrom nefrotic primar.
3. Clearance-ul creatininei endogene  $>70 \text{ ml/min/1,73m}^2$
4. Pacienți înrolați în studiu în conformitate cu criteriile reglementate de documentul de consens: Clasificarea internațională și statistică a bolilor și problemelor de sănătate înrudite, revizia a 10, modificarea australiană (ICD-10-AM), ediția a treia -1 iulie 2002 (revizuirea a X- a , 1992), [17], și KDIGO 2012 [180].

#### Criterii de excludere din studiu:

1. Pacienți cu SN congenital.



2. SN secundar asociat cu sindroame genetice, aberații cromozomiale, maladii ale țesutului conjunctiv, vasculite.
3. Clearance-ul creatininei endogene <60 ml/min/1,73m.<sup>2</sup>
4. Comorbități cardiovasculare, hepatice, metabolice.
5. Boli acute ale organelor interne în momentul începerii studiului.

Tabelul 2.1. Numărul total și structura pacienților incluși în studiu

| Pacienții investigați    | Pacienți investigați |      | Inclusiv |      |         |      |
|--------------------------|----------------------|------|----------|------|---------|------|
|                          |                      |      | Fete     |      | Băieți  |      |
|                          | absolut              | %    | absolut  | %    | absolut | %    |
| Glomerulonefrită acută   | 236                  | 81,7 | 82       | 34,7 | 154     | 65,3 |
| Glomerulonefrită cronică | 53                   | 18,3 | 12       | 22,6 | 41      | 77,4 |
| Total                    | 289                  | 100  | 94       | 32,5 | 195     | 67,5 |

Din cele expuse deducem că după varianta maladiei în lotul de cercetare au predominat copiii cu GNA, care au constituit 81,7%, iar cei cu GNC – 18,3% cazuri.

Tabelul 2.2. Repartizarea pacienților în funcție de forma nosologică

| Forma nosologică |                      | Numărul pacienților |      |
|------------------|----------------------|---------------------|------|
|                  |                      | Numărul de cazuri   | %    |
| GNA              | GNA sindrom nefritic | 156                 | 66,1 |
|                  | GNA sindrom nefrotic | 80                  | 33,9 |
| GNC              | GNC forma nefrotică  | 28                  | 52,8 |
|                  | GNC forma mixtă      | 25                  | 47,2 |

Primul lot de pacienți l-au constituit 236 copii cu GNA, inclusiv 156 copii (66,1%) cu GNA sindrom nefritic și 80 copii (33,9%) cu sindrom nefrotic. Al doilea lot de copii a inclus 53 copii cu GNC, dintre care 52,8% cazuri erau pacienți cu GNC forma nefrotică și 47,2% cazuri – cu GNC forma mixtă.

Repartiția pacienților cu GNA și GNC pe grupe de vârstă și sex în funcție de varianta maladiei este reflectată în tabelul 2.3.

După cum se vede din datele prezentate în tabelul 2.3, lotul de pacienți cu GNA sindrom nefritic a inclus 156 copii: băieți –101 (64,7%), fete –55 (35,3%), dintre care cu vârsta ≤ 5 ani – 37 (23,7%); 6-10 ani – 59 copii (37,8%); ≥11 ani – 60 copii (38,5%);  $\chi^2=4,62$ ;  $gl=2$ ,  $p<0,05$ . Astfel GNA sindrom nefritic s-a dovedit a fi mai frecventă în grupele de vârstă 6-10 ani și ≥11 ani, cu o pondere de 37,8 și 38,5% respectiv.

Tabelul 2.3. Distribuția copiilor în funcție de varianta clinică, vârstă și sex

| Varianta clinică           | Sexul  | ≤ 5 ani     | 6-10 ani   | ≥ 11 ani   | Total | p                                   |
|----------------------------|--------|-------------|------------|------------|-------|-------------------------------------|
| GNA<br>sindrom<br>nefritic | fete   | 18          | 16         | 21         | 55    | $\chi^2=4,62$ ;<br>gl=2;<br>p<0,05  |
|                            | băieți | 19          | 43         | 39         | 101   |                                     |
|                            | Total  | 37 (23,7%)  | 59 (37,8%) | 60 (38,5%) | 156   |                                     |
| GNA<br>sindrom<br>nefrotic | fete   | 16          | 4          | 7          | 27    | $\chi^2=2,88$ ;<br>gl=2;<br>p>0,05  |
|                            | băieți | 29          | 16         | 8          | 53    |                                     |
|                            | Total  | 45 (56,3%)  | 20 (25,0%) | 15 (18,7%) | 80    |                                     |
| GNC<br>forma<br>nefrotică  | fete   | -           | 2          | 1          | 3     | $\chi^2=12,3$ ;<br>gl=2;<br>p<0,01  |
|                            | băieți | 16          | 9          | -          | 25    |                                     |
|                            | Total  | 16(57,1%)   | 11(39,3%)  | 1(3,6%)    | 28    |                                     |
| GNC<br>forma<br>mixtă      | fete   | 3           | 1          | 5          | 9     | $\chi^2=0,731$ ;<br>gl=2;<br>p<0,05 |
|                            | băieți | 5           | 4          | 7          | 16    |                                     |
|                            | Total  | 8 (32,0%)   | 5 (20,0%)  | 12 (48,0%) | 25    |                                     |
|                            | Total  | 106 (36,7%) | 95 (32,9%) | 88 (30,4%) | 289   |                                     |

Al doilea lot de studiu a inclus 80 copii cu GNA sindrom nefrotic, dintre care 27 fete (33,7%) și 53 băieți (66,3%) cu vârsta: < 5 ani – 45 (56,3%) cazuri, 6–10 ani – 20 (25,0%) cazuri, > 11 ani – 15 (18,7%) cazuri.

Lotul pacienților cu GNC forma nefrotică a inclus 28 pacienți, dintre care 3 fete (10,7 %) și 25 băieți (89,3 %) cu vârsta cuprinsă până la 5 ani –16 (57,1 % cazuri); 6-10 ani 11 (39,3% cazuri); ≥11ani –1 (3,6% cazuri). GNC forma nefrotică s-a atestat mai frecvent în grupa de vârstă ≤5 ani și 6-10 ani, respectiv 57,1 %, și 39,3 %, iar GNC forma mixtă a prevalat în grupa de vârstă ≥11 ani (48%).

Lotul pacienților cu GNC forma mixtă l-au constituit 25 copii, inclusiv 9 fete și 16 băieți, dintre care cu vârsta sub 5 ani – 8 (32,0 %) cazuri; 6-10 ani – 5 (20,0 %) cazuri; ≥11 ani –12 (48,0%) cazuri.

Tabelul 2.4 reflectă repartizarea copiilor cu SN în debut în funcție de sensibilitatea față de steroizi. Din datele tabelului 2.4 rezultă că pacienții cu SNSS au constituit 61,25% cazuri, cu SNSD 18,75% cazuri, iar cei cu SNSR – 20,0% cazuri. SNSS s-a atestat mai frecvent în grupa de vârstă de 2- 5 ani în 57,1 % cazuri, SNSD – 60,0 % cazuri în grupa 2-5 ani, iar SNSR s-a atestat cu o pondere de 31,3% la pacienții de 6-9 ani și cei ≥14 ani.

Tabelul 2.4. Repartiția pacienților cu SN în debut în funcție de vârstă și sensibilitatea față de steroizi

| Varianta clinică | Sexul    | < 2 ani   | 2-5 ani   | 6-9 ani   | 10-13 ani | ≥ 14 ani | Total      |
|------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|------------|
| SNSS             | feminin  | -         | 12        | 1         | 1         | 1        | 15         |
|                  | masculin | 2         | 16        | 8         | 4         | 4        | 34         |
|                  | Total    | 2 (4,1%)  | 28(57,1%) | 9 (18,4%) | 5 (10,2%) | 5(10,2%) | 49(61,25%) |
| SNSD             | feminin  | -         | 3         | -         | 1         | -        | 4          |
|                  | masculin | 1         | 6         | 4         | -         | -        | 11         |
|                  | Total    | 1 (6,7%)  | 9 (60,0%) | 4 (26,7%) | 1 (6,7%)  | -        | 15(18,75%) |
| SNSR             | feminin  | 1         | -         | 3         | 1         | 3        | 8          |
|                  | masculin | 1         | 3         | 2         | -         | 2        | 8          |
|                  | Total    | 2 (12,5%) | 3 (18,8%) | 5 (31,3%) | 1 (6,25%) | 5(31,3%) | 16(20,0%)  |

Copiii care au format lotul celor convențional „sănătoși” nu au avut în anamnezic date despre maladii acute sau cronice, nu au suportat infecții virale acute sau bacteriene frecvente conform sumarului datelor anamnestice clinice și de laborator, la care în cadrul examinărilor medicale nu s-a depistat patologie acută sau cronică a sistemului gastrointestinal și a sistemului urogenital, patologie cardiovasculară, indici modificați în analizele paraclinice.

Tabelul 2.5. Estimarea după vârstă medie a pacienților incluși în studiu

| Varianta clinică     | Lotul pacienților | Vârsta medie, ani |
|----------------------|-------------------|-------------------|
| GNA sindrom nefritic | 156               | 9,1±0,36          |
| GNA sindrom nefrotic | 80                | 6,52±0,66         |
| GNC forma nefrotică  | 28                | 8,9±0,67          |
| GNC forma mixtă      | 25                | 10,1±0,99         |

Vârsta medie a pacienților cu GN a fost de 8,0±0,28 ani, durata bolii constituind 2,9±0,37 ani, iar intervalul până la progresia bolii a constituit 5,8±0,93 ani.

Tabelul 2.6. Durata bolii la pacienții cu GNC incluși în studiu

| Varianta clinică    | Durata bolii, ani |
|---------------------|-------------------|
| GNC forma nefrotică | 2,4±0,77 ani      |
| GNC forma mixtă     | 2,9±0,47 ani      |

Vârsta medie a pacienților cu GNA sindrom nefritic a constituit  $9,1 \pm 0,36$  ani, a celor cu GNA sindrom nefrotic –  $6,52 \pm 0,66$  ani, GNC forma nefrotică –  $8,9 \pm 0,67$  ani, GNC forma mixtă –  $10,1 \pm 0,99$  ani. Vârsta medie a copiilor cu SNSS a constituit  $6,27 \pm 0,62$  ani, cu SNSD –  $4,87 \pm 0,87$  ani și  $8,44 \pm 1,34$  ani în SNSR.

#### Definițiile entităților clinice studiate:

**Sindromul nefrotic (SN)** este diagnosticat în prezența edemelor, proteinuriei masive ( $>40$  mg/m<sup>2</sup>/h sau raportul proteină/creatinină urinară  $> 2,0$  mg/mg) și a hipoalbuminemiei [180].

Tabelul 2.7. Definiții ale SN la copii (KDIGO, 2012) [180]

|                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sindromul nefrotic:</b> proteinurie $> 40$ mg/m <sup>2</sup> /h, sau $> 50$ mg/kg/zi, sau raportul proteină/ creatinină $> 0,2$ g/mmol ( $> 2$ g/g) și hipoalbuminemie $<25$ g/l, cu sau fără edeme.     |
| <b>Remisiune:</b> proteinurie $<4$ mg/m <sup>2</sup> /h, sau fără urme pe Albustix timp de 3 zile consecutive, în asociere cu rezoluția edemelor, normalizarea albuminei serice până la 35,0 g/l.(3,5 g/dl) |
| <b>Steroid-sensibil:</b> remisiune completă realizată prin terapia cu corticosteroizi.                                                                                                                      |
| <b>Steroid-rezistent:</b> eșecul de a obține remisiune după 4 săptămâni de medicație cu prednison în doză 60 mg/m <sup>2</sup> , urmat de 3 cure cu metilprednisolon.                                       |
| <b>Recidive:</b> proteinurie $>> 40$ mg/h/m <sup>2</sup> , sau $> 50$ mg/kg/zi, sau Albustix + + + timp de 3 zile consecutive după ce a fost în remisiune.                                                  |
| <b>Recidive frecvente:</b> 2 sau mai multe recurențe pe parcursul a 6 luni de la răspunsul inițial sau 4 sau mai multe recidive în decurs de 1 an.                                                          |
| <b>Dependența de steroizi:</b> 2 recurențe consecutive în timpul tratamentului cu corticosteroizi sau în termen de 14 zile după întreruperea tratamentului.                                                 |
| <b>Lipsa răspunsului precoce:</b> rezistență la corticosteroizi în timpul primului episod .                                                                                                                 |
| <b>Lipsa răspunsului tardiv:</b> rezistență la corticosteroizi la un pacient care a răspuns anterior la acest tratament.                                                                                    |

**Sindromul nefrotic steroid-sensibil (SNSS)** – normalizarea analizei de urină în decursul a 4 săptămâni, mai rar 8 săptămâni după administrarea glucocorticoizilor și instalarea remisiunii complete.

**Remisiune completă** se constată în cazul rezoluției edemelor, normalizării albuminei serice până la 35,0 g/l (3,5 g/dl) și reducerii proteinuriei cu  $<4$  mg/m<sup>2</sup>/oră ( $100$  mg/m<sup>2</sup>/24 h) în 3 analize de urină consecutive.

**Remisiune parțială** – rezoluția edemelor, creșterea concentrației albuminei serice  $>$  cu 25 g/l și persistența proteinuriei între 4 și 40 mg/m<sup>2</sup>/oră.

**Recăderea (recidiva)** este definită ca o recurență a proteinuriei masive ( $>40 \text{ mg/m}^2/\text{h}$  sau raportul proteină/creatinină urinară  $> 0,2 \text{ g/mmol}$  ( $2,0 \text{ mg/mg}$ ) sau albuminurie  $\geq 2+$  pe parcursul a 3 zile consecutive; de regulă cu recurența edemelor.

**Frecvent recidivant** – 4 sau mai multe recidive în decurs de 1 an; 2 sau mai multe recidive pe parcurs de 6 luni, în cazul respectării schemelor de tratament.

## **2.2. Metodele de evaluare utilizate în studiu**

Pentru confirmarea diagnosticului de GN sunt necesare atât datele clinico-anamnestice obținute în cadrul realizării examenului clinic obiectiv, cât și o serie de metode de investigare identificate în funcție de anumite criterii.

În cercetare au fost folosite următoarele metode:

### ***Metodele generale de cercetare utilizate:***

1. Metode clinice, instrumentale;
2. Metode biochimice speciale de investigare;
3. Metoda statistico-matematică.

### ***Metode de acumulare a datelor primare:***

1. Chestionarul structurat din 5 compartimente
2. Datele fișelor de observație
3. Datele fișelor de ambulatoriu

Metodele convenționale de diagnostic de laborator au fost aplicate la toți pacienții și aa inclus hemoleucograma, analiza biochimică ale sângelui (creatinina, ureea, RFG, proteina totală, fracțiile proteice, bilirubina totală, ALAT, ASAT, colesterolul total, trigliceridele,  $\beta$ -lipoproteidele, glucoza, amilaza,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , P, coagulograma, ASLO, ASG, CIC, Ig A, Ig M, Ig G), sumarul urinei, proba Neciporenko, urina la proteină timp de 24h. Clearance-ul creatininei endogene a fost determinat după formula Schwartz G.J.[293].

### ***Metodele de explorare imagistică***

Evaluarea diagnostică complexă a GN a fost completată prin utilizarea diferitor metode imagistice, inclusiv: ecografia renală și abdominală, cistografia micțională, urografia intravenoasă, scintigrafia dinamică renală.

**Ecografia renală** s-a efectuat la ultrasonograful firmei Philips (Philips HD3 Ultrasound Equipment) în perioada de debut a bolii, precum și în dinamică, înainte de externare, și la distanță de 3 și 6 luni, și a determinat poziția, forma și dimensiunile renale, grosimea parenchimului, starea sistemului pielocaliceal, prezența lichidului liber în cavitatea abdominală.

**Cistografia micțională** s-a efectuat pentru diagnosticul obstrucției vezicii urinare, prezența refluxului vezico- ureteral și a fost efectuată prin introducerea substanței de contrast în vezica urinară.

**Urografia intravenoasă** servește pentru evaluarea morfofuncțională dinamică a pacienților cu malformații renourinare și a fost efectuată în perioada de remisiune. Procedeu a fost efectuat după injectarea intravenoasă a substanței de contrast triiodat (Omnipac, Urografin, Verografîn ș.a.), în doza de 0,5-1 ml/kg, realizând apoi cel puțin 3 clișee repetate (peste 5-7 min, 12-15 și peste 25-30 min).

**Scintigrafia renală dinamică.** Funcția renală a fost suplimentar evaluată prin intermediul scintigrafiei renale dinamice. Ca preparat radiofarmaceutic a fost utilizat <sup>131</sup>Ihipuran, în doză medie de 0,36 mbk („Duameg”, Federația Rusă), ulterior înlocuit cu <sup>131</sup>I-hipuran furnizat de „Nycomed Amersham plc”, Marea Britanie).

**Explorările morfologice** s-au efectuat în baza biopstatelor prelevate prin puncție-biopsie renală închisă, transcutană aplicată la 12 pacienți cu vârsta cuprinsă între 4 și 16 ani, spitalizați în Clinica Nefrologie a IM și C cu diagnosticul clinic SNSR și cu acordul informat al părinților, care au constituit lotul principal de studiu.

Metodologia explorărilor histologice s-a desfășurat conform protocolului standard de proceduri morfopatologice. Pentru cercetările histomorfologice s-au folosit biopstatele validate prin microscopia în material native, după care biopstatele au fost fixate în *sol. formol neutru* de 4% timp 12 ore, ulterior fiind procesate histologic utilizând histoprocessorul și rețeaua de colorație automatizată „DIAPATH” (Italia).

Testele histologice s-au obținut prin confecționarea la microtomul semiautomat SLEE MAINZ-CUT 6062 (Germania) a câte 5-6 secțiuni cu grosimea de  $\approx 3-3,5\mu$ . La etapa de colorație au fost utilizate metodele convenționale : *hematoxină-eozină* (H&E), *Van Gieson* (VG) și selectiv tricrom Masson. Explorările histologice prin metoda convențională cu hematoxină-eozină (H&E) și cele selective au relevat prezența zonei corticale și medulare cu un număr convenabil pentru testarea particularităților histomorfologice glomerulare, în toate biopstatele fiind prezente în medie câte 10 -12 glomereli (Figurile 6.3-6.4).

Examinarea microscopică s-a efectuat la microscopia fonică cu utilizarea microscopelor: Nikon Labophot-2 (Japonia) și Calr Zeiss (Germania) la obiectivele  $\times 2,5$ ,  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$ . În estimarea leziunilor s-a ținut cont de faptul că glomerulii din regiunile subcapsulare relevă frecvent o scleroză minimă nespecifică pentru rinichiul sănătos [357]. Modificările atestate s-au estimat în funcție de structura anatomică a biopstatului, coraportul diferitelor elemente nefroniale și internefroniale, numărul accesibil al glomerulilor și complexitatea modificărilor

morfopatologice – distribuția, forma, caracterul tinctorial al elementelor celulare, componenta vasculară, celulară și densitatea sau volumul matricei mezangiale, cuantificate și de alți autori [133].

### **2.3. Explorările imunoenzimatică și biochimice utilizate în studiu**

Metodele imunoenzimatică și biochimice de investigare aplicate în cercetare au permis estimarea nivelelor unor indici ai homeostaziei biochimice special selectați în serul sangvin și urină atât la bolnavii cu GN, cât și la copiii sănătoși și s-au bazat pe anumite nivele concentraționale de limită normale, determinate în mod practic și argumentate științific.

Materialele biologice pentru efectuarea diferitor tipuri de analize biochimice în studiul de față au fost sângele și urina. Determinarea excreției markerilor afectării renale în GN s-a efectuat în porția matinală de urină. Deoarece a fost analizată porția matinală de urină, iar eliminarea diferitor componenți biochimici ai urinei este supusă ritmului circadian, valorile acestor componenți au fost raportate la 1 mmol de creatinină, care pe parcursul zilei se elimină cu o viteză constantă. De aceea, în aceeași porție de urină, în paralel cu evaluarea indicilor biochimici și imuni, s-a determinat și concentrația de creatinină prin metoda cinetică cu ajutorul seturilor de analize ale firmei Eliteh, Franța, conform instrucțiunilor elaborate de producător.

În mod general, în studiu au fost evaluate concentrațiile moleculelor de semnalizare celulară, inclusiv nivelul factorilor de creștere. A fost apreciat statutul antioxidant și indicii stresului oxidativ, determinată funcționalitatea enzimelor ciclului glutationic, adenilic, enzimelor plasmatică, proteolitice, hidrolazelor lizozomale, concentrația oligoelementelor.

În continuare, prezentăm metodele imunoenzimatică și biochimice speciale de investigare utilizate în cercetarea clinică. În cercetare au fost incluși copii cu GN primară în perioadele de acutizare și remisiune, care au fost examinați paraclinic complex prin:

- determinarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară - citokinelor (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , endotelina-1);
- nivelului chemokinelor urinare (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , SDF-1, CD 40);
- nivelului factorilor de creștere (VEGF, FGF- $\beta$ , CTGF, PDGF-B);
- determinarea indicilor stresului oxidativ (isoprostan-8, PPOA, AGE, metaboliții oxidului nitric NO<sub>2</sub> și NO<sub>3</sub> și a raportului NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>);
- evaluarea activității arginazei – enzimei care poate limita concentrația argininei (substratului necesar pentru sinteza oxidului nitric);
- aprecierea sistemului antioxidant (activitatea antioxidantă totală, glucoza-6-fosfat

- dehidrogenaza (G-6-P-DH), S-nitrosotiolii, peptidele histidinice);
- evaluarea activității enzimelor ciclului glutationic (GR, GRO, G-S-T și  $\gamma$ -GTP);
  - determinarea activității enzimelor ciclului adenilic (ADA-aza, AMP-aza);
  - determinarea activității tripsinei, chimotripsinei și leucinaminopeptidazei (LAP) – markerii intensității proceselor proteolitice;
  - evaluarea activității pseudocolinesterazei (PCE) – markerului afectării permeabilității filtrului glomerular;
  - evaluarea markerilor afectării tubulare –  $\beta$ 2-microglobulinei,  $\gamma$ -GTP, fosfatazei alcaline,  $\alpha$ -glicozidazei neutre;
  - aprecierea funcționalității hidrolazelor lizozomale (NAG- $\beta$ , arilsulfatazei A și B, C,  $\beta$ -galactozidazei,  $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucuronidazei);
  - determinarea activității LDH – enzimă citozolică, localizată în citoplasma tubilor contorți proximali și în porțiunea descendentă a ansei Henle;
  - determinarea nivelului de acizi uronici – markerului proceselor fibrotice.
  - determinarea nivelului oligoelementelor (Zn, Cu).

### 2.3.1. Metodele de investigare imunoenzimatică

Citokinele și factorii de creștere sunt molecule de semnalizare celulară care mediază comunicarea intra-, intercelulară și care sunt implicate în mecanismele imunobiokimice ale patologiilor glomerulare prin coordonarea cooperării celulare la etapele clinico-evolutive ale maladiei. În conformitate cu scopul și obiectivele lucrării au fost evaluate următoarele molecule de semnalizare celulară:

- *citokinele pro- și anti- inflamatoare* – interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-6 (IL-6), factorul de necroză tumorală alfa (TNF-  $\alpha$  ), interleukina-8 (IL-8);
- *chemokinele cu rol chemotactic și proprietăți pro- inflamatoare și reparatorii tisulare* – proteina-1 chemotactică monocitară (MCP-1), proteina 1-alfa macrofagică inflamatoare (MIP-1 $\alpha$ ), factorul-1 derivat din celule stromale (SDF-1), clusterul de diferențiere 40 (CD-40);
- *factorii de creștere* – VEGF (factorul de creștere endotelial vascular cu acțiune mitogenică și angiogenă pe celulele endoteliale), FGF- $\beta$  (factorul de creștere al fibroblastelor beta care promovează proliferarea și diferențierea celulară, depunerea de matrice extracelulară, cu acțiune profibrogenică), CTGF (factorul de creștere al țesutului conjunctiv care induce fibroza glomerulară și interstițială), PDGF (factorul de creștere derivat din plachete cu acțiune mitogenă, induce proliferarea celulară).



Determinarea cantitativă (cuantificarea) acestor molecule a fost efectuată cu ajutorul kiturilor de analize ELISA-sandwich ale firmei PeproTech (SUA), conform protocoalelor oferite de producător.

*Endotelina-1* – o peptidă de origine endotelială, cu proprietăți vasoconstrictoare puternice, a fost dozată cu ajutorul kitului de analize ELISA-sandwich ale firmei DRG Instruments GmbH (Germania) conform instrucțiunilor oferite de producător.

*Principiul metodelor de cuantificare a citokinelor, chemokinelor și factorilor de creștere prin procedeul ELISA-sandwich* se bazează pe utilizarea anticorpilor anticitokinici, antichemokinici și anticorpilor antifactori de creștere de înaltă purificare, denumiți anticorpi de captare – „*capture antibodies*”, care sunt adsorbiți necovalent pe microplăci cu 96 godeuri și servesc pentru capturarea specifică a proteinei-țintă cu rol de antigen (în cazul de față a citokinelor, chemokinelor și factorilor de creștere, prezenți în proba biologică și în diluțiile consecutive ale soluției standard). Soluțiile standard conțineau diluțiile succesive cuprinse între 0 – 2000 pg/ml ale proteinei antigen respective (citokina, chemokina sau factorul de creștere) ce urmează a fi cuantificată.

După înlăturarea materialului neatașat prin spălări repetate cu soluție tampon de spălare, citokinele, chemokinele și factorii de creștere captați pe microplăci cu 96 godeuri reacționează cantitativ cu anticorpii anticitokinici, antichemokinici și anticorpii antifactori de creștere conjugați cu biotina, denumiți la general anticorpi de detecție – *detection antibodies*. În continuare, pentru înlăturarea anticorpilor de detecție liberi ce nu au reacționat, microplăcile cu 96 godeuri sunt supuse, din nou, procedurii de spălare repetată cu soluție tampon de spălare.

După aceasta, se adaugă conjugatul enzimatic – *Streptavidin-HRP* (conține streptavidină marcată cu peroxidază din hrean). Conjugatul enzimatic (*Streptavidin-HRP*) se leagă cu biotina cu formarea unui *sandwich* din mai multe straturi: *anticorpi de captare-proteina-țintă (citokine, chemokine sau factori de creștere)-anticorpi de detecție-conjugat enzimatic (Streptavidin-HRP)*.

Conjugatul enzimatic liber, care nu a reacționat se înlătură prin spălări repetate, apoi se adaugă substratul cromogenic (conține tetrametil-benzidină și  $H_2O_2$ ), iar reacția enzimatică, catalizată de peroxidaza din hrean, ulterior se stopează cu o soluție de 1M acid sulfuric.

Intensitatea produsului colorat este direct proporțională cu concentrația citokinei, chemokinei sau factorului de creștere prezenți în proba biologică și se măsoară prin spectrofotometriere la 450 nm cu o corecție a lungimii de undă de 540 nm la riderul spectrofotometric cu microplăci *PowerWave HT*, *BioTek*, *SUA*.

Calcularea rezultatelor s-a efectuat în baza curbei de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard ce conține citokina, chemokina sau factorul de creștere ce urmează

a fi determinat. Curba de calibrare a fost obținută prin proiectarea absorbantei calibratorilor (depuse pe axa ordonatelor Y) față de concentrația lor cunoscută (axa absciselor X).

### ***2.3.2. Metodele de evaluare a indicilor stresului oxidativ și protecției antioxidante***

Aprecierea intensității reacțiilor de oxidare cu radicali liberi în materialul biologic s-a efectuat prin dozarea principalilor indici ai proceselor de peroxidare.

*Dozarea produșilor finali de glicare avansată (AGE)* s-a efectuat conform procedurii descris de Makita Z. et al. [205] cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe măsurarea intensității fluorescenței probei de cercetat diluate în tampon fosfat. Calculul se efectuează folosind diluțiile de lucru ale sol. standard stock de AGE-albumină și se exprimă în  $\mu\text{mol/l}$  (ser sangvin) sau  $\text{pmol/mmol}$  creatinină (urina).

*Determinarea produșilor proteici de oxidare avansată (PPOA)* s-a efectuat conform procedurii descris de Witko-Sarsat V. et al. [363] modificat [11, 12]. Metoda se bazează pe măsurarea absorbantei probei de cercetat la 340 nm după prelucrarea acesteia cu o soluție de acid acetic. Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în baza diluțiilor succesive a sol. standard de cloramină-T cuprinse între 0-100  $\mu\text{mol/l}$  și se exprimă în  $\mu\text{mol/l}$  (ser sangvin) sau  $\text{pmol/mmol}$  creatinină (urină) echivalente de cloramină-T.

*Dozarea Isoprostanului-8 (Iso-8)* markerului cel mai specific al stresului oxidativ (standardul de aur) s-a efectuat cu ajutorul seturilor de analiză EIA competitivă ale firmei Cayman Chemical (SUA) conform instrucțiunilor oferite de producător. Metoda se bazează pe competiția dintre Iso-8 și conjugatul Iso-8 cu acetilcolinesteraza (Iso-8 Trasorul) pentru un număr limitat de situsuri de legare ale antiserului Iso-8 de iepure. Deoarece concentrația Iso-8 Trasorului este constantă, pe când concentrația Iso-8 variază, cantitatea de Iso-8 Trasor capabilă să se lege cu antiserul Iso-8 de iepure va fi invers proporțională cu concentrația de Iso-8 din godeu, deci din proba de cercetat. Calcularea rezultatelor s-a efectuat în baza curbei de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de Iso-8 și obținută prin proiectarea absorbantei calibratorilor (depuse pe axa ordonatelor Y) față de concentrația lor cunoscută (axa absciselor X).

*Dozarea metaboliților oxidului nitric –  $\text{NO}_2$  și  $\text{NO}_3$*  în materialul biologic s-a efectuat după deproteinizarea materialului biologic conform procedurii descris de Метельская В. А., Туманова Н. Г. [222] cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe determinarea spectrofotometrică a complexului colorat format la interacțiunea anionilor de nitrit –  $\text{NO}_2$  din proba de cercetat cu reactivul Griess. Anionul  $\text{NO}_3$  nu reacționează cu reactivul Griess. Determinarea concentrației anionului de nitrit –  $\text{NO}_2$ , s-a efectuat în proba biologică netratată cu clorura de vanadiu ( $\text{VCl}_4$ ), iar la prelucrarea probei biologice cu  $\text{VCl}_4$  are loc reducerea anionului

$\text{NO}_3^-$  în anionul de nitrit –  $\text{NO}_2^-$ , fapt ce permite cuantificarea concentrației sumare de  $\text{NO}_2^-$  și  $\text{NO}_3^-$  în proba de cercetat. Calculul se efectuează după curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de nitrit de sodiu cuprinse între 0-100  $\mu\text{mol/l}$  și se exprimă în  $\mu\text{mol/mmol}$  creatinină (urină). Concentrația de  $\text{NO}_3^-$  în probă se calculează după formula:

$$\text{NO}_3^-(\mu\text{mol/l}) = \text{concentrația sumară de } \text{NO}_2^- \text{ și } \text{NO}_3^- - \text{concentrația de } \text{NO}_2^-.$$

*Dozarea nitrozotiolilor* în materialul biologic s-a efectuat conform procedurii descris de Wink D. A. et al. [360], cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe eliberarea oxidului nitric din nitrozotiol (RSNO) în urma reacției cu clorura de mercur. În continuare oxidul nitric reacționează cu diaminonaftalena (DAN) cu formarea unei nitrozamine primare care este convertită rapid la un triazol fluorescent, intensitatea căruia este direct proporțională cu cantitatea de RSNO și se exprimă în  $\mu\text{mol/l}$  (ser sangvin).

*Determinarea activității arginazei* – enzimă importantă implicată în semnalizarea și proliferarea celulară – s-a efectuat după procedeul descris de Iyamu E.W., et al. [168] cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe capacitatea enzimei de a scinda arginina cu formarea ornitinei, iar cantitatea de ornitină eliberată este direct proporțională cu activitatea enzimei și se estimează prin reacția ornitinei cu ninhidrină. Calcularea activității enzimei se estimează folosind curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de ornitină și se exprimă în nmol pe s la 1 l ser sangvin (nmol/s.l), sau nmol/s.mmol creatinină.

*Aprecierea statusului antioxidant* s-a efectuat prin utilizarea următoarelor metode.

*Determinarea activității antioxidante totale (AAT) prin metoda cu ABTS* s-a efectuat conform procedurii descris de Re R. et al. [270], cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe degradarea radicalului 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolină 6 sulfonat) (ABTS) la interacțiunea acestuia cu compușii testați cu proprietăți antioxidante. Degradarea radicalului ABTS este monitorizată prin măsurarea descreșterii absorbanței la 734 nm și se exprimă în  $\mu\text{mol/l}$  ser sangvin sau  $\mu\text{mol/mmol}$  creatinină.

*Determinarea activității glutathionreductazei (GR)* se efectuează conform metodei descrise de Кулинский В. И. et al. [386, 387], cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe capacitatea enzimei de a reduce glutathionul oxidat în glutathion forma redusă. În paralel are loc oxidarea coenzimei NADPH în NADP, fapt ce conduce la micșorarea absorbantei mediului de reacție la 340 nm proporțională cu activitatea enzimei. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din coeficientul molar de absorbție ( $\epsilon$ ) al NADP-ului (la 37°C și 340 nm  $\epsilon = 6,22 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) și se exprimă în  $\mu\text{mol/s.l}$  ser sangvin.

Reducerea glutationului oxidat – GSSG în glutation forma redusă – GSH, catalizată de GR necesită NADPH, care, la rândul său, este regenerat de către enzima ciclului pentozic - glucozo-6-fosfat dehidrogenaza ( G-6-PDH ) ( Halliwell și Gutteridge 1989).

*Determinarea activității glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei (G-6-PDH)* a fost efectuată conform procedurii descris de [383], cu modificări [11, 12]. Procedul se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția de oxidare a glucozo-6-fosfatului în 6-fosfo-gluconolactonă cu participarea NADP, care se reduce în NADPH<sub>2</sub>. Concomitent, are loc creșterea absorbției la 340 nm, ceea ce corelează cu activitatea enzimei în proba de cercetat. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-lui ( $\epsilon = 6,22 \text{ mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin.

*Determinarea activității glutatinoxidazei (GPO)* s-a efectuat conform procedurii descris de Кулинский В. И. et al. [386, 387] cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe capacitatea enzimei de a oxida glutationul redus – GSH, în prezența peroxidului de hidrogen. În paralel are loc oxidarea coenzimei NADPH în NADP, fapt ce conduce la micșorarea absorbției mediului de reacție la 340 nm proporțional cu activitatea enzimei. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-ului (la 37°C și 340 nm  $\epsilon = 6,22 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) și se exprimă în  $\mu\text{mol/s.l}$  ser sangvin.

*Dozarea activității glutatinoxidazei (GST)* se efectuează conform procedurii descris de Habig W. H. și coautorii [149] după modificările noastre [11, 12]. Metoda se bazează pe capacitatea enzimei de a cataliza reacția de conjugare a GSH cu compusul clor-dinitro-benzen (CDNB), fapt ce conduce la creșterea absorbției mediului de reacție la 346 nm proporțional cu activitatea enzimei. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din coeficientul molar de absorbție al complexului CDNB cu GSH ( $\epsilon = 9,6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) și se exprimă în  $\mu\text{mol/s.l}$  ser sangvin.

*Dozarea activității gama-glutamil-transpeptidazei ( $\gamma$ -GTP)* s-a efectuat cu setul standard EliTech (Franța) conform instrucțiunilor oferite de producător. Metoda se bazează pe capacitatea enzimei de a transfera reziduul  $\gamma$ -glutamil al  $\gamma$ -L-glutamil-p-nitroanilidei la acceptorul dipeptidic. În calitate de acceptor se folosește glicil-glicină, care, în același timp, îndeplinește rolul de componentă a soluției-tampon. Ca rezultat al reacției enzimice se eliberează p-nitroanilina care în mediu alcalin are culoarea galbenă, intensitatea căreia este direct proporțională cu activitatea enzimei din proba de cercetat.

Calculul se efectuează după curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de p-nitroanilină cuprinse între 0-100  $\mu\text{mol/l}$  și se exprimă în  $\mu\text{mol/s.l}$  (ser sangvin) sau  $\mu\text{mol/s.mmol}$  creatinină (urină).

*Conținutul de dipeptide histidinice (DH)* a fost estimat conform procedurii descrise de Северин С.Е.[391], cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe deproteinizarea probei biologice cu o soluție de acid percloric, obținerea extractului aproteic prin centrifugare și prelucrarea ulterioară a acestui extract, mai întâi, cu o soluție de acid sulfanilic diazotat, apoi cu o soluție de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , după ce se măsoară absorbanta produsului colorat care se formează la diazotarea dipeptidelor histidinice.

Calcularea rezultatelor se efectuează după curba de calibrare care se construiește în baza diluțiilor de lucru ale soluției standard de carnozină în limitele concentrațiilor 2,0 - 8,0 mmol/l și se exprimă în  $\mu\text{mol/s.l}$  (ser sangvin) sau  $\mu\text{mol/s.mmol}$  creatinină (urină).

*Conținutul de acizi uronici* a fost determinat conform procedurii descrise de Леонтьев В. К., Гайдамак А. Н. [389], cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe interacțiunea carbazolului cu acizii uronici eliberați la hidroliza acidă a glicoproteinelor colagenice, iar intensitatea colorației compusului format este direct proporțională cu conținutul de acizi uronici în proba de cercetat. Calculul se efectuează conform curbei etalon, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de acid glucuronic. Cantitatea de acizi uronici se exprimă în mmol/l sau mmol/mmol creatinină.

*Studiul metabolismului nucleotidelor adenilice* a inclus dozarea enzimelor-cheie ale ciclului adenilic – activității adenilatdezaminazei (AMP-azei) și adenozindezaminazei (ADA-zei). Dozarea ambelor enzime – AMP-zei și ADA-zei s-a efectuat în conformitate cu procedeul descris de Тапбергенов С. О., Тапбергенова С. М. [392], cu modificări [11, 12]. Metoda de dozare a acestor enzime se bazează pe capacitatea lor de a scinda substratul (acidul adenozinmonofosforic pentru AMP-ază și adenzina pentru ADA-ază) cu formarea amoniacului, cantitatea căruia se determină spectrofotometric la 620 nm prin metoda fenol-nitroprusid-hipocloridică (metoda Bertlo). Cantitatea amoniacului format corelează cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de sulfat de amoniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  și se exprimă în nmol pe s la 1 l ser sangvin (nmol/s.l).

*Determinarea activității pseudocolinesterazei (PCE)* s-a efectuat cu setul standard EliTech (Franța), conform instrucțiunilor oferite de producător. Metoda se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza hidroliza substratului – butiriltiocolin-iodid, cu formarea acidului butiric și a tiocolinei. În continuare, tiocolina interacționează cu acidul 5,5-ditio-bis-(2-nitro-benzoic) cu formarea 2-nitro-mercapto-benzoatului – un compus de culoare galbenă-aurie. Activitatea enzimei este direct proporțională cu intensitatea colorației compusului format în mediul de reacție. Calculul se efectuează reieșind din coeficientul molar de absorbție a 2-nitro-mercapto-benzoatului

(la 37°C și lungimea de undă 405 nm  $\varepsilon = 14,66 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^2$ ) care se exprimă în  $\mu\text{mol}$  pe s la 1 l ser sangvin ( $\mu\text{mol/s.l}$ ) sau  $\text{nmol} \cdot \text{pe s la 1 mmol creatinină}$  ( $\text{nmol/s.mmol creatinină}$ ) în urină.

*Determinarea activității lactatdehidrogenazei (LDH)* s-a efectuat cu seturile de analiză ale firmei Eliteh, (Franța), conform instrucțiunilor oferite de producător. Metoda se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza reacția reversibilă de reducere a piruvatului în L-lactat. Concomitent are loc reacția de oxidare a coenzimei NADH, ceea ce duce la diminuarea absorbției la 340 nm și corelează cu activitatea enzimei.

Calculul se efectuează reieșind din coeficientul molar de absorbție al NADP-lui ( $\varepsilon = 6,22 \text{ mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) care se exprimă în  $\text{nmol/s.l ser sangvin}$  sau  $\text{nmol} \cdot \text{pe s la 1 mmol creatinină}$  ( $\text{nmol/s.mmol creatinină}$ ) în urină.

*Determinarea fosfatazei alcaline* s-a efectuat cu seturile firmei Eliteh, (Franța), conform instrucțiunilor oferite de producător. Metoda se bazează pe capacitatea enzimei de a hidroliza legătura esterică din para-nitrofenil-fosfatul de sodiu, iar cantitatea de para-nitrofenol eliberat în urma reacției de hidroliză este direct proporțională cu activitatea enzimei.

Calculul se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și cantitatea fosfatazei alcaline se exprimă în  $\text{nmol pe s la 1 l ser sangvin}$  ( $\text{nmol/s.l}$ ), sau  $\text{nmol pe s la un mmol creatinină}$  ( $\text{nmol/s.mmol creatinină}$ ).

*Determinarea  $\beta$ 2-microglobulinei*, markerului afectării funcțiilor glomerulare și tubulare ale rinichilor, s-a efectuat cu ajutorul setului de analiză al firmei IBL International GMBH (Germania), conform instrucțiunilor oferite de producător.

$\beta$ -2-Microglobulina ( $\beta$ -2-MG) este o proteină cu masa moleculară mică (11,8 kD), care face parte din clasa 1 de antigeni de histocompatibilitate HLA și se găsește pe membrana tuturor celulelor nucleate.  $\beta$ -2-MG este intens metabolizată în rinichi. Concentrația serică este influențată de ratele de sinteză și de metabolizare și este de obicei stabilă la persoanele sănătoase. Modificările concentrației serice indică prezența tulburărilor funcțiilor glomerulare și tubulare.

Cuantificarea  $\beta$ -2-MG în plasmă, ser și urină se bazează pe testul ELISA. În acest test  $\beta$ -2-MG prezentă în probele de cercetat se leagă la anticorpii anti- $\beta$ -2-MG policlonali de iepure, imobilizați pe suprafața microplăcilor cu 96 godeuri. Substanțele care nu s-au legat sunt eliminate prin spălări repetate cu tampon de spălare, iar cuantificarea  $\beta$ -2-MG care au reacționat cu anticorpii fixați pe microplacă se realizează prin adăugarea conjugatului enzimatic. Acesta conține anticorpi  $\beta$ -2-MG monoclonali marcați cu peroxidază de hrean (HRP). Acest conjugat se leagă la  $\beta$ -2-MG fixată pe godeurile microplăcii.

Cantitatea de enzimă legată este direct proporțională cu conținutul de  $\beta$ -2-MG în probele de cercetat. În continuare se adaugă substratul enzimatic (tetrametilbenzidină +  $H_2O_2$ ), care este transformat de HRP într-un compus cromogen și care poate fi determinat fotometric la 450 nm.

Calculul se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de  $\beta$ 2-microglobulină și se exprimă în  $\mu$ g la 1 l ser sangvin sau  $\mu$ g  $\beta$ 2-MG la un mmol creatinină ( $\mu$ g $\beta$ 2-MG/mmol creatinină).

**Intensitatea proceselor proteolitice** a fost evaluată prin determinarea *activității proteazelor* – tripsina, chimotripsina și leucinaminopeptidaza (LAP).

*Determinarea activității tripsinei* s-a efectuat după procedeul descris de [385] cu modificări [11, 12]. Principiul metodei se bazează pe capacitatea acestei enzime de a hidroliza substratul sintetic – benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BANA) – cu formarea p-nitroanilinei, cantitatea căreia cu activitatea enzimei.

Calculul activității tripsinei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin, sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.

*Determinarea activității chimotripsinei* s-a efectuat după procedeul descris de [385] cu modificări [11, 12]. Principiul metodei se bazează pe capacitatea chimotripsinei de a hidroliza substratul sintetic – benzoil-L-tirozina-p-nitroanilida (BTNA), cu formarea p-nitroanilinei, cantitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Calculul activității chimotripsinei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.

*Dozarea inhibitorului proteazelor serinice – alfa2-macroglobulinei* s-a efectuat după procedeul descris de Карягина И.Ю. și coautorii [385], cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe proprietatea alfa2-macroglobulinei de a forma cu tripsina un complex care își păstrează activitatea sa catalitică față de substratul N- $\alpha$ -benzoil-arginin-p-nitroanilidă. Ținând cont de acest fapt, cantitatea de  $\alpha$ 2-macroglobulină poate fi apreciată prin determinarea activității tripsinei adăugată suplimentar în mediul de reacție, ce a fost captată (legată de  $\alpha$ 2-macroglobulină). Excesul de tripsină care nu a reacționat cu  $\alpha$ 2-macroglobulina se înlătură prin adăugarea inhibitorului specific al tripsinei din soia.

Calculul se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în g la 1 l ser sangvin (g/l) sau în mg la un mmol creatinină (mg/mmol creatinină) în urină.

*Determinarea activității leucinaminopeptidazei (LAP)* s-a efectuat după procedeul descris de Vafa A. și coautorii [345] cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe proprietatea enzimei de a cataliza hidroliza substratului sintetic H-Leu-p-nitroanilida cu formarea p-nitroanilinei, care în mediu alcalin are o colorație galbenă, intensitatea căreia este direct proporțională cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.

*Aprecierea gradului de exocitoză a hidrolazelor lizozomice* în urma destrucției biomembranelor celulare în focarul patologic s-a realizat în baza determinării activității  $\beta$ -galactozidazei,  $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucuronidazei, arilsulfatazelor A și B și C.

*Determinarea activității  $\beta$ -glucozidazei și a  $\beta$ -galactozidazei* s-a efectuat după procedeul descris de Асатиани В. С. [383], cu modificări [11, 12]. Principiul metodei se bazează pe hidroliza enzimatică a substratului sintetic – p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranozid (pentru  $\beta$ -glucozidază) sau p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranozid (pentru  $\beta$ -galactozidază) cu eliberarea p-nitrofenolului, cantitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează, folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol pe s la 1 l ser sangvin (nmol/s.l), sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.

*Determinarea activității  $\alpha$ -glucozidazei neutre* s-a efectuat după procedeul descris de Асатиани В. С. [383], cu modificări [11, 12]. Alfa-glucozidaza neutră face parte din grupa hidrolazelor, care se găsește în cantități deosebit de mari în stratul cortical al rinichilor și practic lipsește în alte organe și țesuturi (cu excepția mucoasei intestinale unde a fost depistată în cantități moderate). Alfa-glucozidaza neutră de origine renală este localizată în celulele epiteliale „cu marginea în perie” ale tubilor renali proximali și ansa Henle, iar depistarea ei în urină are importanță diagnostică și indică la afectarea tubilor contorți renali, deci această enzimă poate servi drept marker al afectării țesutului renal.

Principiul metodei se bazează pe hidroliza enzimatică a substratului sintetic - p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranozid cu eliberarea p-nitrofenolului cantitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează, folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol pe s la 1 l ser sangvin (nmol/s.l), sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.



*Determinarea activității  $\beta$ -glucuronidazei* se bazează pe hidroliza enzimatică a p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucuronidului la pH-ul 5,0. Produsul reacției – p-nitrofenolul, are o colorație galbenă, intensitatea căreia corelează cu activitatea enzimei și se determină prin spectrofotometriere.

Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol pe s la 1 l ser sangvin (nmol/s.l) sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină [11, 12].

*Determinarea activității N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidazei (NAG)* s-a efectuat după procedeul descris de Vafa A. și coautorii și Илараев П. H. [345, 394], cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe estimarea spectrofotometrică a cantității de p-nitrofenol – produsului reacției de hidroliză enzimatică a p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidei, cantitatea căruia corelează cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.

*Determinarea activității arilsulfatazelor A și B* s-a efectuat după procedeul Roy J. (1953), cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe estimarea spectrofotometrică a cantității de p-nitrocatehină – care se formează la hidroliza enzimatică a p-nitrocatehol-sulfatului de potasiu. Para-nitrocatehina în mediu alcalin are o colorație vișinie, intensitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrocatehină și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.

*Determinarea activității arilsulfatazei C* s-a efectuat după metoda Dodgson K. și Spencer B. (1957), cu modificări [11, 12]. Metoda se bazează pe estimarea spectrofotometrică a cantității de p-nitrofenol care se formează la hidroliza enzimatică a p-nitrofenil-sulfatului de potasiu. Para-nitrofenolul în mediu alcalin are o colorație galbenă, intensitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin, sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s.mmol creatinină) în urină.

*Determinarea activității fosfatazei acide* s-a efectuat conform metodei descrise de Асатиани В. С. [383], cu modificări [11, 12]. Principiul metodei se bazează pe estimarea

spectrofotometrică a cantității de p-nitrofenol care se formează la hidroliza enzimatică a p-nitrofenil-fosfatului. Para-nitrofenolul în mediu alcalin are o colorație galbenă, intensitatea căreia corelează cu activitatea enzimei.

Calcularea activității enzimei se efectuează folosind curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitrofenol și se exprimă în nmol/s.l ser sangvin sau nmol pe s la un mmol creatinină (nmol/s-mmol creatinină) în urină.

*Determinarea nivelului oligoelementelor (Zn, Cu)* s-a efectuat cu ajutorul seturilor standard de reactivi EliTech (Franța) conform instrucțiunilor oferite de producător.

Metoda de *determinare a zincului* se bazează pe capacitatea ionilor de zinc de a forma în mediu alcalin un compus colorat stabil cu complexantul 5-Br-PAPS. Intensitatea colorației este proporțională cu concentrația de zinc în proba de cercetat și se exprimă în  $\mu\text{mol}$  la 1 l ser sangvin ( $\mu\text{mol/l}$ ). Metoda de dozare a cuprului se bazează pe reducerea ionilor de Cu (II) cu acid ascorbic la Cu(I). Ultimul reacționează cu compusul 3,5-di-Br-PAESA cu formarea unor compuși complecși colorați.

Intensitatea colorației este proporțională cu conținutul de cupru în proba biologică și se exprimă în  $\mu\text{mol}$  la 1 l ser sangvin ( $\mu\text{mol/l}$ ).

*Determinarea proteinelor totale și albuminelor* s-a efectuat cu seturile de reagenți ale firmei Eliteh, Franța, conform instrucțiunilor oferite de producător.

#### **2.4. Metodele de evaluare statistică**

Analiza statistică a rezultatelor obținute ale pacienților a fost realizată utilizând componenta Excel a suitei Microsoft Office și programele SPSS 22.0 (SPSS Inc) cu ajutorul funcțiilor și modulelor acestor programe. Au fost utilizate următoarele metode: [388]

**Media aritmetică** este indicatorul cel mai utilizat pentru caracterizarea tendinței centrale. Media aritmetică calculată pentru o colectivitate statistică este acea valoare care s-ar fi obținut dacă toți factorii ar fi exercitat o influență constantă asupra tuturor unităților înregistrate. Media aritmetică simplă exprimă un nivel mediu, anihilând abaterile individuale, netipice. Ea este cuprinsă între valoarea cea mai mare și cea mai mică.

**Dispersia** este media pătratelor abaterilor de la media aritmetică. Măsura dispersiei se referă la „împrăștierea” valorilor dintr-un set de date.

**Eroarea standard (ES)** – arată cât de precis aproximează media calculată din valorile unei serii, media populației din care a fost extras lotul pe care s-au făcut măsurătorile.

**Frecvența relativă** a unei grupe reprezintă ponderea unităților statistice în volumul total al colectivității care au valoarea caracteristicii cuprinsă între limita inferioară și cea superioară a

grupe respective. Se determină ca raportul între frecvența absolută a grupei și volumul eșantionului (eventual înmulțit cu 100) și se exprimă în coeficienți sau în procente. Suma frecvențelor relative este 1 sau 100, după cum sunt exprimate în coeficienți sau în procente.

**Coeficientul de corelație** (Pearson) este o măsură a asocierii liniare dintre două variabile, cu alte cuvinte a gradului în care reprezentarea bivariată sub forma unei diagrame de dispersie se apropie de o dreaptă. Coeficientul de corelație ia valori între  $-1$  și  $+1$ , inclusiv, cu semnificația de asociere pozitivă/negativă după semnul coeficientului și de lipsă de asociere pentru  $r_{XY} = 0$ .

Pentru aprecierea deosebirilor dintre grupe s-a folosit testul Mann-Whitney "U" în cazul dispersiilor neparametrice și criteriul Student în cazul dispersiilor parametrice.

**Testul Student** este utilizat în analiza statistică pentru compararea mediei unei caracteristici la două populații. Caracteristica studiată trebuie să fie o caracteristică cantitativă, măsurabilă. Testul t Student reprezintă de fapt o familie de teste statistice care pot fi aplicate în diferite situații practice. Astfel: se poate testa dacă o medie a unei serii de valori obținute prin măsurători pe un lot de pacienți este compatibilă cu o medie teoretică dată, sau știută dinainte; se pot compara cu ajutorul acestui test mediile a două loturi diferite, atunci când se știe că dispersiile sunt diferite; se pot compara cu ajutorul acestui test mediile a două loturi diferite, atunci când se știe că dispersiile sunt egale; se pot compara mediile obținute prin măsurători pe așa-numitele loturi pereche.

**Testul Mann-Whitney "U"** este echivalentul nonparametric al testului t neîmperecheat, folosit pentru compararea variabilelor ordinale.

**Testul  $\chi^2$  (chi pătrat) al lui Pearson** este utilizat pentru a măsura potrivirea dintre date categoriale și un model multinominal care prognozează frecvența relativă a rezultatelor din fiecare categorie posibilă. Dacă modelul este corect, ne vom aștepta atunci ca numărul de rezultate să fie, cu mici abateri, valoarea așteptată anterioară.

**Testul ANOVA** este un test care testează dintr-odată medii mai multor loturi. În practică, acesta este cazul când cele 3 sau mai multe loturi sunt supuse la tratamente diferite și se urmărește să se stabilească dacă efectele tratamentului sunt diferite la unul sau altul din loturi. Testul ANOVA face compararea celor trei medii dintr-odată. Dacă nu se găsesc diferențe semnificative, tratamentul folosit nu poate fi considerat ca fiind mai eficace. Dacă însă testul evidențiază diferențe semnificative, este nevoie ca studiul statistic să fie continuat prin aplicarea unor teste de comparare a două loturi.

**Regresia logistică** modelează relația dintre o mulțime de variabile independente  $X_i$  (categoriale, continue) și o variabilă dependentă dihotomică (nominală, binară)  $Y$ . O astfel de variabilă dependentă apare, de regulă, atunci când reprezintă apartenența la două clase, categorii

– prezență/absență, da/nu etc. Ecuația de regresie obținută, de un tip diferit de celelalte regresii discutate, oferă informații despre: importanța variabilelor în diferențierea claselor; clasificarea unei observații într-o clasă. Regresia logistică permite determinarea prognosticului. Prognosticul se referă la rezultatele posibile ale unei boli și la frecvențele cu care acestea sunt așteptate să apară.

**Sensibilitatea** este probabilitatea de a avea testul pozitiv, atunci când ești bolnav, sau proporția celor cu test pozitiv printre bolnavi (bolnavii cu test pozitiv/toți bolnavii). Sensibilitatea unui test este puterea acestuia de a descoperi boala; cu cât testul este mai sensibil, riscul este mai mic să scape bolnavi nedescoperiți ( $1 - Sn$  = proporția FN, adică cu cât sensibilitatea este mai mare, cu atât avem mai puțini fals negativi).

**Specificitatea** este probabilitatea de a avea testul negativ, atunci când ești sănătos, sau proporția celor cu test negativ printre sănătoși (sănătoșii cu test negativ/toți sănătoșii). Un test specific este foarte util pentru a pune diagnosticul de boală, când acesta este pozitiv, pentru că specificitatea este invers proporțională cu rata fals pozitivilor ( $1 - Sp$  = proporția fals pozitiv).

Eficacitatea diagnostică a diferitor indici și metode de diagnostic de laborator de apreciere a afectării parenchimului renal a fost apreciată cu ajutorul analizei ROC (Receiver Operator Characteristic). Curba ROC este un mijloc de a exprima relația între sensibilitatea și specificitatea unui test diagnostic. Ea permite descrierea preciziei testului și se poate folosi pentru a compara în mod practic 2 teste diferite pentru diagnosticarea aceleiași boli. Curba ROC se construiește luându-se în considerare procentul de cazuri real pozitive (sensibilitate) pe abscisă și procentul de rezultate fals pozitive (specificitate) pe ordonată. Valorile se eșalonează pe axe de la o probabilitate de 0 până la o probabilitate de 1.

Un test cu o bună putere discriminatorie va ocupa partea stângă superioară a graficului: astfel, măbind progresiv sensibilitatea, nu există nici o pierdere de specificitate, atâta timp cât sensibilitatea nu a atins niveluri maxime. Un test mai puțin performant are o curba ROC care cade mai aproape de diagonala graficului, mergând din partea stângă inferioară spre partea dreaptă superioară a graficului.

Precizia globală a testului poate fi descrisă prin suprafața de sub curba ROC, denumită AUC (Area Under Curve); cu cât este mai mare această suprafață, cu atât este mai bun testul. Astfel, calitatea modelului (eficacitatea diagnostică a indicelui) se apreciază după scala de expertiză unanim acceptată pentru valoriile AUC.

Concluzia privind calitatea “excelentă” a modelului obținut este făcută în cazul când  $AUC > 0,9$ ; «foarte bună» când valorile sunt cuprinse între  $0,9 > AUC > 0,8$ ; “bună” –  $0,8 > AUC > 0,7$ . În toate cazurile diferențele, legăturile și dependențele se considerau statistic semnificative când  $p < 0,05$ .

**Analiza de corelație** a permis stabilirea legăturii dintre două caracteristici. Coeficientul de corelație poate fi cuprins între minus unu (-1), zero și plus unu (+1). Când valoarea coeficientului de corelație se apropie de (+1), înseamnă că între cele două fenomene ce se corelează există o legătură foarte puternică. Semnul (+) al coeficientului de corelație denotă că legătura de dependență dintre fenomene este directă. Deci ambele fenomene evoluează în același sens, în aceeași direcție.

Când valoarea coeficientului de corelație se apropie de (-1), înseamnă că între cele două fenomene există o legătură foarte puternică, dar inversă, în sens opus: crește un fenomen, scade cel cu care se corelează.

Interpretarea coeficientului de corelație: corelația cuprinsă între  $\pm 1$  denotă o corelație foarte puternică între fenomene; corelația cuprinsă între  $\pm 0,99$  și  $\pm 0,70$  denotă o corelație puternică; cuprinsă între  $\pm 0,69$  și  $\pm 0,30$  denotă o corelație medie între fenomene; corelația cuprinsă între  $\pm 0,0$  și  $\pm 0,29$  exprimă existența unei corelații slabe între fenomene; corelația 0 denotă că legătura dintre fenomene în mod practic o considerăm inexistentă.

Pentru analiza rezultatelor studiului caz-control au fost calculate următorii indicatori: raportul probabilității (RP, eng. OR), semnificația statistică a rezultatelor pentru 95,0% s-a determinat prin mărimea intervalului de încredere ( $\hat{I}_{95} - 95CI$ ). Unele rezultate ale cercetării au fost prezentate prin intermediul diferitor tipuri de tabele, grafice și diagrame.

## 2.5. Concluzii la capitolul 2

1. Conform obiectivelor cercetării, a fost efectuat un studiu de tip retrospectiv și prospectiv, nerandomizat. În studiu au fost incluși 289 copii cu GN care au fost repartizați în funcție de varianta clinică: 236 copii cu GNA și 53 copii cu GNC cu vârsta cuprinsă între 2–17 ani, care au fost distribuiți în loturi în funcție de forma nosologică: 156 – pacienți cu GNA sindrom nefritic, 80 – cu GNA sindrom nefrotic, 28 – GNC forma nefrotică, 25 – GNC forma mixtă. Lotul de control a inclus 289 de copii „practic sănătoși” de aceeași vârstă.

2. Analiza rezultatelor studiului a constatat că, pacienții cu GNA au constituit 81,7% și 18,3% copii cu GNC. GNA sindrom nefritic s-a dovedit a fi mai frecvent în grupele de vârstă 6-10 ani și  $\geq 11$  ani (cu o pondere de 37,8-38,5% respectiv). SN s-a atestat mai frecvent în grupul de vârstă  $< 5$  ani – 56,3%. Ponderea SNSS a constituit 61,25% cazuri, SNSD – 18,75% cazuri, SNSR – 20,0% cazuri. SNSS a prevalat la pacienții sub 5 ani (57,1%), SNSD – cu ponderea cea mai mare la vârsta de 2-5 ani (60,0%) și SNSR cu o frecvență mai mare la vârsta de 6-9 și  $\geq 14$  ani, câte 31,3% respectiv. GNC forma nefrotică s-a atestat mai frecvent în grupa de vârstă  $\leq 5$  ani și 6-10 ani, respectiv 57,1 %, și 39,3 %, iar GNC forma mixtă s-a depistat mai frecvent în grupa de vârstă  $\geq 11$  ani (48%).

3. Pentru elucidarea particularităților clinico-evolutive ale GN, a fost efectuat un studiu clinic observațional, care a inclus metode clinice, biochimice, instrumentale, histologice. Cercetarea particularităților patogenetice ale GN s-a realizat pe baza unui lot de 115 de copii selectați din lotul de bază la care au fost efectuate investigații speciale selectate (aprecierea concentrațiilor moleculelor de semnalizare celulară, statutului pro- și antioxidant, enzimelor ciclului glutationic, adenilic, oligoelementelor, enzimelor plasmatice, proteolitice, hidrolazelor lizozomice etc.) în perioada de acutizare și remisiune.

4. Metodele descrise în acest capitol vor permite de a efectua:

- evaluarea la un nivel științific aprofundat a mecanismelor patogenice care stau la baza dezvoltării GN și SN;
- elucidarea particularităților modificărilor moleculelor de semnalizare celulară (citokinelor și chemokinelor cu proprietăți pro- și antiinflamatorii și reparatorii tisulare, factorilor de creștere) și aprecierea corelațiilor lor cu leziunile glomerulare, tubulointerstițiale și activitatea bolii;
- evaluarea proceselor de peroxidare cu radicali liberi, a stării sistemului antioxidant și altor parametri homeostazici la pacienții cu GN și a rolului lor în determinarea gradului de leziuni tisulare;
- determinarea gradului de exocitoză a hidrolazelor lizozomice și enzimelor tisulare în urma destrucției biomembranelor celulare și degranulării leucocitelor în focarul patologic și a rolului lor la etapele clinico-evolutive ale GN;
- rezultatele obținute ar putea sugera dezvoltarea de noi strategii de tratament eficient al glomerulonefritei la copii și de profilaxie a complicațiilor.

5. Luând în considerare obiectivele proiectate și centrate pe realizarea sarcinilor propuse, pentru ameliorarea rezultatelor cercetării, au fost aplicate metode moderne de prelucrare statistică a datelor obținute. Metoda regresiei logistice a oferit informații referitoare la prezența variabilelor care pot gestiona riscul pentru dezvoltarea maladiei. Această metodă permite elaborarea modelelor predictive, prognozarea bolii, a rezultatelor posibile ale unei boli cu consecințele sale, precum și a frecvenței cu care se pot dezvolta bolile.

### 3. PROFILUL CLINICO-PARACLINIC AL COPIILOR CU GLOMERULONEFRITĂ PRIMARĂ

#### 3.1. Evaluarea parametrilor clinici și paraclinici ale copiilor cu glomerulonefrită acută

Scopul acestui compartiment este studierea particularităților clinice, paraclinice, factorilor de risc și aprecierea prognosticului GNP în comparație cu subiecții „practic sănătoși”. Bolnavii au fost repartizați în funcție de starea clinică, ținând cont de informația privind numărul absolut și ponderea pacienților pentru fiecare stare clinică la momentul internării (tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Caracteristica stării clinice generale a copiilor cu glomerulonefrită primară

| Starea clinică | Bolnavii internați |                    |
|----------------|--------------------|--------------------|
|                | Numărul de cazuri  | Ponderea, % cazuri |
| Grav-medie     | 118                | 40,8               |
| Gravă          | 138                | 47,8               |
| Foarte gravă   | 33                 | 11,4               |
| Total          | 289                | 100,0              |

Analizând informația din tabelul 3.1, putem constata că la momentul internării bolnavilor în staționar, din eșantionul general de 289 pacienți s-a determinat: stare grav-medie – la 118 de pacienți, sau 40,8% cazuri; stare generală gravă – 138 de bolnavi (47,8% cazuri); stare foarte gravă – 33 pacienți (11,4%) cazuri din totalul pacienților internați. După cum observăm, stare gravă și foarte gravă în eșantionul general de studiu s-a înregistrat în 59,2% cazuri.

În baza studierii anamnezei pacienților cu GN incluși în studiu am stabilit următoarele patologii, care au fost observate în urma primei investigații: infecții respiratorii virale acute (IRVA) – 70,2 %; angină – 15,9%; pneumonie – 9,3%; streptodermie – 3,5%; bronșită – 1,1 %.

Tabelul 3.2. Maladiile depistate la copiii cu glomerulonefrită primară

| Maladii suportate | Numărul de cazuri | Ponderea, % cazuri |
|-------------------|-------------------|--------------------|
| IRVA              | 203               | 70,2               |
| Angină            | 46                | 15,9               |
| Pneumonie         | 27                | 9,3                |
| Streptodermie     | 10                | 3,5                |
| Bronșită          | 3                 | 1,1                |

În simptomatologia clinică la bolnavii cu GN s-au atestat următoarele manifestări clinice: edeme – la 225 bolnavi (77,85±3,05 %), HTA – la 138 bolnavi (47,75±2,39 %), macrohematurie

– 115 (39,79±2,18 %) cazuri, micțiuni rare – 109 (37,72±2,12 %), anasarca – 64 (22,15±1,63 %), cefalee – 66 (22,84±1,65 %), sindrom algic abdominal – 54 (18,69±1,49 %), vomă – 21 (7,27±0,93 %), dureri în regiunea lombară – 23 (7,96±0,98 %), leziune renală acută – 12 (4,15±0,7 %) cazuri, dispnee – 7 (2,42±0,54%) cazuri.

Tabelul 3.3. Manifestările clinice la copii cu glomerulonefrită primară

| Simptome clinice                                                                      | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Edeme                                                                                 | 225               | 77,85±3,05         |
| HTA sistolică >90 percentilă,<br>diastolică >90 percentilă<br>după sex, vârstă, talie | 138               | 47,75±2,39         |
| Macrohematurie                                                                        | 115               | 39,79±2,18         |
| Micțiuni rare                                                                         | 109               | 37,72±2,12         |
| Anasarcă                                                                              | 64                | 22,15±1,63         |
| Cefalee                                                                               | 66                | 22,84±1,65         |
| Sindrom algic abdominal                                                               | 54                | 18,69±1,49         |
| Vomă                                                                                  | 21                | 7,27±0,93          |
| Dureri lombare                                                                        | 23                | 7,96±0,98          |
| Leziune renală acută                                                                  | 12                | 4,15±0,7           |
| Dispnee                                                                               | 7                 | 2,42±0,54          |

Rezultatele prezentate în tabelul 3.4 relevă modificările indicilor biochimici ai sângelui estimați la bolnavii cu GN.

Estimarea markerilor biochimici în sânge a demonstrat că proteina totală a constituit 60,5±0,68 g/l, albuminele – 39,35±2,03%,  $\alpha_2$ -globulinele – 18,73±1,71%,  $\beta$ -globulinele – 15,48±1,39%,  $\gamma$ -globulinele – 15,5±1,46%, ureea serică – 6,19±0,29 mmol/l, creatinina serică – 0,075±0,0047 mmol/l, lipidele totale – 8,91±0,73 g/l,  $\beta$ -lipoproteidele 70,5±1,93 u.c.

Rezultatele expuse în tabelul 3.4 relevă creșterea titrului ASL-0 până la 468,2±36,17 u/l și ASG până la 663,2±10,45 u/l. Nivelul complementului seric C3 a fost redus în 78 % cazuri.



Tabelul 3.4. Analiza biochimică a sângelui la copiii cu glomerulonefrită primară

| Parametrii biochimici       | $\bar{X} \pm ES$ |
|-----------------------------|------------------|
| Proteina totală, g/l        | 60,5±0,68        |
| Albumină, %                 | 39,35±2,03       |
| $\alpha_2$ -globuline, %    | 18,73±1,71       |
| $\beta$ -globuline, %       | 15,48±1,39       |
| $\gamma$ -globuline, %      | 15,5±1,46        |
| Fibrinogen, g/l             | 4,80±0,37        |
| Protrombină, %              | 92,1±0,72        |
| Ureea, mmol/l               | 6,19±0,29        |
| Creatinină, mmol/l          | 0,075±0,0047     |
| Lipide totale, g/l          | 8,91±0,73        |
| Colesterol, mmol/l          | 6,84±0,23        |
| $\beta$ -lipoproteide, u.c. | 70,5±1,93        |
| CIC                         | 99,3±4,03        |
| ASL-0                       | 468,2±36,17      |
| ASG                         | 663,2±10,45      |

În hemoleucogramă la pacienții cu GN s-a semnalat creșterea VSH până la 28,5±1,07 mm/oră, Hb a constituit 115,5±1,22 g/l, numărul de eritrocite  $3,7 \pm 0,04 \times 10^{12}/l$  și leucocite -  $8,1 \pm 0,23 \times 10^9/l$ .

Tabelul 3.5. Hemoleucograma la copiii cu glomerulonefrită primară

| Parametrii studiați        | $\bar{X} \pm ES$ |
|----------------------------|------------------|
| Hb, g/l                    | 115,5±1,22       |
| Eritrocite $\times 10^9/l$ | 3,7±0,04         |
| Leucocite $\times 10^9/l$  | 8,1±0,23         |
| VSH, mm/oră                | 28,5±1,07        |

Sumarul urinei a semnalat prezența proteinuriei până la 5,3±0,51g/l, proteina în urină timp de 24 h a constituit 3,6±0,26 g/l. Proba Neciporenko a notat hematurie până la  $10,9 \pm 3,07 \times 10^6/l$  (tabelul 3.6).

Tabelul 3.6. Modificările sedimentului urinar la copiii cu glomerulonefrită primară

| Parametrii studiați               | $\bar{X} \pm ES$ |
|-----------------------------------|------------------|
| Proteina în sumarul urinei, g/l   | 5,3±0,51         |
| Eritrocite în sumarul urinei, c/v | 32,9±4,53        |
| Leucocite în sumarul urinei, c/v  | 16,2±2,05        |
| Proba Neciporenko                 |                  |
| Eritrocite x10 <sup>6</sup> /l    | 10,9±3,07        |

Datele echografiei renale au evidențiat rinichi măriți în dimensiuni, cu lărgirea zonei parinchimatoase, care este ușor hipoecogenă, în 100 % cazuri, în 153 (52,9%) cazuri prezența lichidului liber în cavitatea abdominală.

Urografia intravenoasă efectuată în perioada de remisiune a GN a evidențiat prezența diferitor anomalii reno urinare – rinichi dublu în 18 cazuri, aghenezia renală în 4 cazuri, distopia pelviană în 2 cazuri.

Cistografia micțională a relevat prezența cistitei cronice în 12 cazuri, reflux vezico-ureteral gr.I la 3 pacienți. Scintigrafia renală dinamică a demonstrat diminuarea funcției de filtrație și excreție glomerulară, cât și reținerea îndelungată a substanței cu izotopi la nivelul bazinetelor în 24 cazuri.

În continuare prezintăm analiza clinico-paraclinică a bolnavilor din loturile investigate. Evaluarea clinică a pacienților cu GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, a evidențiat prezența edemelor de diferit grad localizate pe față, abdomen, gambe, hipertensiune arterială, urina de culoarea „spălăturii de carne”, oligoanurie, vomă, sindrom alergic abdominal.

Datele expuse în tabelul 3.7. atestă că edemele au fost prezente în 100,0±6,4% cazuri, HTA – 118 (75,64±5,56 %), macrohematurie – 99 (63,46±5,1%), micțiuni rare – 50 (32,05±3,62%) cazuri, cefalee – 43(27,56±3,36 %) cazuri, sindrom alergic abdominal – 37 (23,72±3,12 %), dureri lombare – 15 (9,62±0,2%), vomă – 7 (4,5±1,36%), LRA – în 5 (3,21±1,15%) cazuri.

Rezultatele cercetărilor au relevat prezența sindromului nefritic în tabloul clinic al GNA, în timp ce alte studii au raportat și prezența SN în 10% cazuri, cele mai multe studii au raportat doar 2-4% astfel de cazuri [167].

Cele mai frecvente semne clinice în studiul nostru au fost similare cu cele raportate în alte studii: edeme periferice, hematurie, hipertensiune arterială, macrohematurie și azotemie [212].

Tabelul 3.7. Manifestările clinice la copii cu glomerulonefrită acută sindrom nefritic  
în perioada manifestărilor clinice

| Simptome clinice                                                                     | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Edeme                                                                                | 156               | 100,00 $\pm$ 6,4   |
| HTA sistolică >90 percentilă<br>diastolică >90 percentilă<br>după sex, vârstă, talie | 118               | 75,64 $\pm$ 5,56   |
| Macrohematurie                                                                       | 99                | 63,46 $\pm$ 5,1    |
| Micțiuni rare                                                                        | 50                | 32,05 $\pm$ 3,62   |
| Cefalee                                                                              | 43                | 27,56 $\pm$ 3,36   |
| Sindrom algic abdominal                                                              | 37                | 23,72 $\pm$ 3,12   |
| Dureri lombare                                                                       | 15                | 9,62 $\pm$ 0,2     |
| Vomă                                                                                 | 7                 | 4,5 $\pm$ 1,36     |
| Leziune renală acută                                                                 | 5                 | 3,21 $\pm$ 1,15    |

Cu excepția cazurilor rare ce prezintă manifestări atipice, hematuria este prezentă în mod esențial la toți pacienții. Descrierea clasică a urinei de culoare „cola” se atestă la aproximativ 25-60% dintre pacienți [212].

Conform datelor unor studii recente hipertensiunea arterială apare la aproximativ 82,4 % din cazuri [278]. Complicațiile hipertensiunii arteriale, inclusiv cefalee, convulsii, modificări ale stării psihice și schimbări vizuale, au o frecvență de 30-35% cazuri [167].

Mecanismul hipertensiunii arteriale este determinat, cel mai probabil de retenția de sodiu și apă, ca rezultat al extinderii în spațiului extracelular. În cazul altor patologii similare cu glomerulonefrita, excreția fracționată de sodiu este în general mai mică de 1%, ca în cazul azotemiei prerenale, iar nivelele de renină (activitatea reninei plasmatică) la debutul bolii reduse [112]. Retenția de lichide este determinată de obicei de inhibarea activității reninei plasmatică. Valorile tensiunii arteriale diastolice corelează semnificativ cu gradul de supraîncărcare.

Datele studiilor recente demonstrează că în timp ce dispneea este raportată în 5% cazuri, dovezi pentru insuficiență cardiacă congestivă au existat la doar jumătate dintre copiii investigați [176].

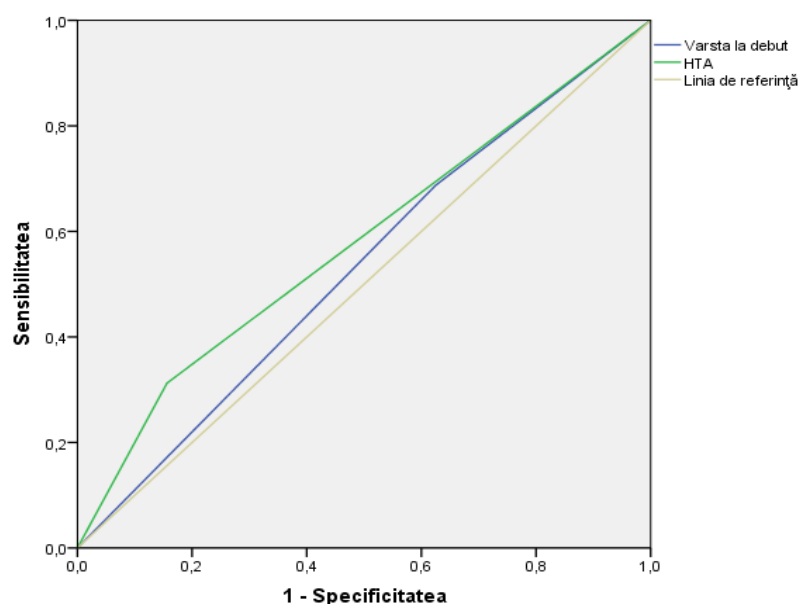


Figura 3.1. Curba ROC pentru vârstă și hipertensiunea arterială în GNA sindrom nefritic perioada manifestărilor clinice

Analiza matematică de apreciere a autenticității a permis să stabilim relația între specificitatea și sensibilitatea HTA în stabilirea diagnosticului de GNA.

Din figura 3.1 observăm că pentru HTA,  $AUC=0,578$  (95% ÎI: 0,413-0,743).

Tabelul 3.8. Maladiile suportate de copiii cu GNA sindrom nefritic

| Maladii suportate | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|-------------------|-------------------|--------------------|
| IRVA              | 107               | $68,6 \pm 3,7$     |
| Angina            | 32                | $20,51 \pm 1,7$    |
| Pneumonie         | 9                 | $5,76 \pm 1,5$     |
| Streptodermie     | 8                 | $5,13 \pm 1,5$     |

Debutul maladiei în GNA sindrom nefritic a avut loc după 2-3 săptămâni de la episodul de IRVA la 107 copii ( $68,6 \pm 3,7\%$  cazuri); după un episod de angină – la 32 copii ( $20,51 \pm 1,7\%$  cazuri); pneumonie – 9 ( $5,76 \pm 1,5\%$ ); streptodermie – 8 ( $5,13 \pm 1,5\%$ ); Datele raportate de alte studii au relatat că cea mai frecventă cauză a GNAPS a fost faringita (44,8%) cazuri, unele infecții ale tractului respirator superior (25,6%), gastroenterita (11,2%), infecții cutanate (5,6%) și pneumonia (3,2%) cazuri [278].

Estimarea markerilor biochimici în sânge a demonstrat, că proteina totală a constituit  $67,9 \pm 0,61$  g/l, albuminele serice –  $42,98 \pm 4,81\%$ ,  $\alpha_2$ -globulinele –  $15,42 \pm 2,17\%$ ,  $\beta$ -globulinele –

16,98±1,96%,  $\gamma$ -globulinele – 17,41±2,47%, ureea serică – 5,56±0,164 mmol/l, creatinina serică – 0,067±0,02 mmol/l. Colesterolul total a constituit 4,94±0,204 mmol/l,  $\beta$ -lipoproteidele 49,7±1,30 u.c. RFG< 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> a fost atestată în 13, 5 % cazuri. Frotiul nazofaringian a confirmat prezența  $\beta$ -streptococcului hemolitic pozitiv în 65 % cazuri.

Markerii serologici cel mai frecvent utilizați sunt determinarea titrului antistreptolizină O (ASLO) și nivelul seric al C<sub>3</sub>. Rezultatele studiului nostru au atestat creșterea titrului ASL-0 până la 557,6±47,35 u/l și a ASG până la 826,0±163,00 u/l, CIC a constituit 141,5±4,31 UD. Conform altor studii, titrele ASLO sunt mai mari în GNAPS asociate cu faringita, comparativ cu GNAPS asociate piodermiei [176].

Astfel, studiul efectuat demonstrează că sensibilitatea titrului ASLO a fost extrem de mare (97%), dar specificitatea lui a fost de numai 80%, probabil datorită faptului că până la 20% din controalele efectuate prezintă semne de expunere streptococică cu un titru semnificativ crescut [176]. Conform altui studiu într-un grup de pacienți cu glomerulonefrita acută, titrul ASLO a fost crescut în 72% cazuri [212].

La copiii ale căror titre ASLO sunt inițial normale, măsurătorile ulterioare pot fi crescute, sprijinind astfel diagnosticul suspectat. Studii recente au demonstrat că titrul ASLO a continuat să crească în cele patru săptămâni după debutul bolii, în unele cazuri, iar titrul mediu a atins punctul culminant după trei săptămâni [212].

Rezultatele studiului nostru au evidențiat reducerea nivelului complementului seric C<sub>3</sub> în 78% cazuri, ceea ce indică participarea C<sub>3</sub> în mecanismele imune. Activarea complementului prin calea alternativă este recunoscută prin rolul important ce i se atribuie în patogeneza GNAPS. Conform altor studii, nivelul complementului seric C<sub>3</sub> a fost scăzut la 89 % dintre pacienți [278]. O explicație a diferenței dintre studiul nostru și altele ar putea fi momentul testării complementului seric, deoarece aceste momente pot varia în cursul bolii sau diversitatea genetică în măsura activării complementului.

Reducerea acută a concentrației serice a C<sub>3</sub> în GNAPS cu revenirea tipică la niveluri normale în termen de șase săptămâni de la debut este de o importanță diagnostică în primul rând, atunci când biopsia renală nu este efectuată. Conform unor studii, scăderea nivelului seric al C<sub>3</sub> în GNAPS precede debutul hematuriei [176].

În hemoleucogramă s-a constatat creșterea VSH până la 20,70±1,30 mm/oră, Hb a constituit 110,7±1,50 g/l, eritrocitele 3,58±0,057x10<sup>9</sup>/l, leucocitele 7,33±0,22x10<sup>9</sup>/l. Anemia reprezintă una dintre cele mai frecvente modificări raportate la pacienții cu GNAPS. Conform studiilor efectuate a fost demonstrat că anemia era prezentă la 79% dintre pacienți, și este atribuită

în principal diluției retenției de lichide intravasculare, cu toate că și alți factori, cum ar fi procesul inflamator, secreția de eritropoietină suprimată și hemoliza pot fi implicate [278].

Alte studii au raportat că doar 10% din 155 de pacienți au avut un nivel al hemoglobinei 12 g / dl, iar la peste 50% acest indicator era sub nivelul de 10 g / dl. În cazuri extreme, poate să apară anemia severă. În două cazuri, anemia hemolitică autoimună a fost documentată în primele stadii ale GNAPS [189].

În tabelul 3.9 sunt redate modificările sedimentului urinar la copiii cu GNA sindrom nefritic.

Tabelul 3.9. Sumarul urinei la copiii cu GNA sindrom nefritic  
în perioada manifestărilor clinice

| Parametrii studiați   | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES \%$ |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| Eritrocite 10-45 c/v  | 56                | 35,9 $\pm$ 3,8      |
| Eritrocite 45-100 c/v | 20                | 12,82 $\pm$ 1,5     |
| Eritrocite >100 c/v   | 80                | 51,28 $\pm$ 3,5     |
| Leucocite 10-45 c/v   | 46                | 29,5 $\pm$ 3,7      |
| Leucocite 45-100 c/v  | 10                | 6,4 $\pm$ 2,0       |
| Leucocite >100 c/v    | 1                 | 0,6 $\pm$ 0,6       |

Sumarul urinei a evidențiat proteinurie până la 1,0 $\pm$ 0,09 g/l. Proteina în urină timp de 24 h a constituit 1,8 $\pm$ 0,08 g/l. Probele biologice ale urinei au pus în evidență hematurie cu valori de 45-100 c/v și >100 c/v în 12,82% și 51,28 % cazuri respectiv, iar hematurie de 10-45 c/v în 35,9 % cazuri.

Rezultatele expuse în tabelul 3.9 relevă prezența leucocituriei cu valori 10-45 c/v în 29,5% cazuri, de la 45-100 c/v în 6,4 % cazuri. Modificările sedimentului urinar confirmă implicarea glomerulară acută cu prezența celulelor roșii dismorfice și a leucocitelor sangvine. În faza timpurie acută, leucocitele urinare pot predomina asupra eritrocitelor. Asocierea leucocituriei cu hematuria se datorează diapedezei exagerate la nivelul membranei filtrante a leucocitelor în cursul proceselor glomerulare cu component exsudativ mare.

Studii care au cuantificat excreția urinară de proteine au evidențiat că la 78 pacienți cu GNAPS era prezentă proteinuria de rang nefrotic (definită ca fiind >40 mg/m<sup>2</sup>/h) în 27 (34,6%) cazuri și excreția urinară normală a proteinelor (definită ca fiind <5 mg/m<sup>2</sup>/h) în 20 (25,6%) cazuri. Albumina serică la pacienții cu GNAPS a fost mai mică de 3,0 g/dl în 46% cazuri și mai mică de 2,5 g/dl la 15% pacienți [212].

Sublotul II de copii cu GNA sindrom nefritic a inclus 21 pacienți (13,5 %) cu GNA sindrom nefritic cu retenția ureei. Starea generală gravă a fost prezentă în 16 (76,2%) cazuri, foarte gravă – în 2 (9,5%) cazuri, starea medie – 3 (14,3%) cazuri.

În tabelul 3.10 sunt redate maladiile suportate în antecedente de copiii cu GNA sindrom nefritic cu retenția ureei.

Tabelul 3.10. Maladiile suportate de copiii cu GNA sindrom nefritic cu retenția ureei

| Maladiile suportate | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES \%$ |
|---------------------|-------------------|---------------------|
| IRVA                | 13                | 61,9 $\pm$ 10,6     |
| Pneumonie           | 4                 | 19,0 $\pm$ 8,6      |
| Angină              | 3                 | 14,3 $\pm$ 7,6      |
| Streptodermie       | 1                 | 4,8 $\pm$ 1,6       |

Din anamnestical bolii am constatat că pacienții cu GNA sindrom nefritic cu retenția ureei au suportat IRVA în 61,9 $\pm$ 10,6% cazuri; pneumonie – 19,0 $\pm$ 8,6%; angină – în 14,3 $\pm$ 7,6% cazuri; streptodermie – 4,8 $\pm$ 1,6% cazuri.

Tabelul 3.11. Manifestările clinice la copii cu glomerulonefrită acută sindrom nefritic cu retenția ureei în perioada manifestărilor clinice

| Simptome clinice                                                                | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Edeme                                                                           | 21                | 100,0 $\pm$ 4,65   |
| HTA sistolică >90 percentilă, diastolică >90 percentilă după sex, vârstă, talie | 16                | 76,19 $\pm$ 4,08   |
| Macrohematurie                                                                  | 14                | 66,67 $\pm$ 3,82   |
| Micțiuni rare                                                                   | 12                | 57,14 $\pm$ 3,55   |
| Cefalee                                                                         | 10                | 47,62 $\pm$ 3,25   |
| Dureri lombare                                                                  | 6                 | 28,57 $\pm$ 2,53   |
| Leziune renală acută                                                            | 2                 | 9,52 $\pm$ 1,47    |

Debutul bolii a fost dominat de prezența edemelor în regiunea feței, abdomenului, gambelor, a hipertensiunii arteriale, urină de culoarea „spălăturii de carne”, vomă, cefalee, oligoanurie, dureri în abdomen. Astfel edemele s-au atestat în 21 (100,0 $\pm$ 4,65%) cazuri având localizare în regiunea feței, abdomenului și gambelor, HTA – 16 (76,19 $\pm$ 4,08 %), urină de culoare „spălături de carne” – 14 (66,67 $\pm$ 3,82%) cazuri, micțiuni rare s-au constatat în 12 (57,14 $\pm$ 3,55 %)

cazuri, cefalee – 10 (47,62±3,25%), dureri în regiunea lombară – 6 (28,57±2,53 %). La 2 pacienți (9,52±1,47 % cazuri) în debutul maladiei s-a atestat tabloul clinic al LRA. (tabelul 3.11).

Probele biologice ale sângelui atestă creșterea creatininei serice până la 0,104±0,009 mmol/l, a ureei sangvine până la 10,15±1,25 mmol/l, proteina totală a constituit 68,6±1,36 g/l, albumina serică 42,40±3,45%,  $\alpha$ -globulina 15,10±1,40%,  $\gamma$ -globulina 4,15±2,43%. Astfel,  $\beta$ -lipoproteidele au constituit 49,30±3,37 u.c. Conform studiului nostru, RFG a fost <90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> în 13,5 % cazuri.

Tabelul 3.12. Modificările sedimentului urinar la copiii cu GNA sindrom nefritic cu retenția ureei

| Parametrii studiați               | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES$ |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| Eritrocite 10-45 c/v              | 7                 | 33,3±10,3        |
| Eritrocite 45-100 c/v             | 8                 | 38,1±10,6        |
| Eritrocite >100c/v                | 6                 | 28,6±5,9         |
| Leucocite 10-45 c/v               | 9                 | 42,9±10,8        |
| Leucocite 45-100 c/v              | 3                 | 14,3±7,6         |
| Proba Neciporenko                 |                   |                  |
| Eritrocite <10x10 <sup>6</sup> /l | 8                 | 38,1±4,3         |
| 10-45 x10 <sup>6</sup> /l         | 8                 | 38,1±4,3         |
| >100 x10 <sup>6</sup> /l          | 5                 | 23,8±3,6         |

Conform altor studii recente, nivelul ureei sangvine a fost crescut în 70,2% cazuri, cu reducerea clearance-ului creatininei <90 ml / min / 1,73 m<sup>2</sup> în 81, 5% cazuri [278]. S-a semnalat creșterea valorilor ASLO până la 434,8±81,16 u/l, și ASG până la 643,6±173 u/l, comparativ cu valorile normale.

Hemoleucograma a evidențiat creșterea VSH până la 24,1±2,46 mm/oră, reducerea Hb până la 107,9±3,96 g/l, eritrocitele – 3,48±0,12x10<sup>12</sup>/l, leucocitele – 9,03±0,64x10<sup>9</sup>/l. În tabelul 3.12 sunt redate rezultatele modificărilor sedimentului urinar la copiii cu GNA sindrom nefritic cu retenția ureei.

Analiza sumarului urinei atestă proteinurie până la 0,7±0,17 g/l. Proteina în urină timp de 24 h a constituit 0,8±0,15 g/l. În analiza sedimentului urinar s-a semnalat hematurie până la 10-45x10<sup>6</sup>/l în 33,3±10,3% cazuri; hematurie 45-100x10<sup>6</sup>/l în 38,1±10,6% cazuri; macrohematurie >100x10<sup>6</sup>/l în 28,6±5,9% cazuri. A fost prezentă leucocituria cu valori de 10-45 c/v în 42,9±10,8% cazuri; leucociturie 45-100 c/v – 14,3±7,6% cazuri.



Debutul maladiei la copiii cu GNA sindrom nefrotic a avut loc la 2-3 săptămâni după suportarea unui epizod IRVA la 57 (71,3±5,1%) pacienți; după o angină la 11 (13,8±3,9%) pacienți; după pneumonie – 11 (13,8±3,4%) pacienți; după streptodermie – 1 pacient (1,2±0,2% cazuri).

Tabelul 3.13. Maladiile suportate de copiii cu GNA sindrom nefrotic în debut

| Maladiile suportate | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|---------------------|-------------------|--------------------|
| IRVA                | 57                | 71,2±5,1           |
| Angină              | 11                | 13,8±3,9           |
| Pneumonie           | 11                | 13,8±3,4           |
| Streptodermie       | 1                 | 1,2±0,2            |

Manifestările clinice la copiii cu SN atestate în perioada debutului maladiei au fost determinate de edeme generalizate, până la anasarcă, oligoanurie, sindrom algic abdominal și dureri în regiunea lombară (tabelul 3.14).

Tabelul 3.14. Manifestările clinice la copiii cu glomerulonefrită acută sindrom nefrotic în perioada manifestărilor clinice

| Simptome clinice        | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|-------------------------|-------------------|--------------------|
| Anasarcă                | 48                | 60,0±9,65          |
| Edeme                   | 32                | 40,0±7,9           |
| Micțiuni rare           | 39                | 48,75±8,7          |
| Cefalee                 | 18                | 22,5±5,92          |
| Macrohematurie          | 11                | 13,75±4,63         |
| Vomă                    | 12                | 15,0±4,84          |
| Sindrom algic abdominal | 7                 | 8,75±3,7           |
| Dureri lombare          | 8                 | 10,0±3,95          |
| Leziune renală acută    | 4                 | 5,0±1,8            |
| Dispnee                 | 3                 | 3,75±1,42          |

Astfel, anasarca a fost înregistrată în 48 (60,0±9,65%) cazuri, edemele au fost prezente în 32 (40,0±7,9 %) cazuri, micțiuni rare – 39 (48,75±8,7%), cefalee – 18 (22,5±5,92%), vomă – 12 (15,0±4,84%), macrohematurie – 11 (13,75±4,63%) cazuri, sindrom algic abdominal – 7

( $8,75 \pm 3,7\%$ ) cazuri, dureri în regiunea lombară – 8 ( $10,0 \pm 3,95\%$ ) cazuri, LRA – 4 ( $5,0 \pm 1,8\%$ ) cazuri, dispnee – 3 ( $3,75 \pm 1,42\%$ ) cazuri (tabelul 3.14).

Unul din factorii fundamentali în mecanismul formării edemelor în SN este scăderea presiunii oncotice determinată de hipoalbuminemie. Scăderea albuminelor determină diminuarea presiunii oncotice, cu trecerea lichidelor în spațiile interstițiale, urmată de edeme și hipovolemie. Hipovolemia determină secreția de renină, angiotensină, aldosteron și, ulterior de hormonul antidiuretic (ADH), cu apariția edemelor [54].

Astfel, în producerea edemelor sunt implicate: pierderea barierei anionice a membranei bazale care este responsabilă de proteinurie; anomalia tubulară asociată și localizată la nivelul tubului colector, care este responsabilă de retenția hidro-sodică; hipoproteinemie și creșterea complianței spațiului interstițial, favorizând acumularea în exces a lichidelor, protejează organismul de o supraîncărcare a spațiului intravascular [120].

Copiii cu SN au prezentat recidive frecvente în 10% cazuri, recidive rare în 16,2% cazuri, iar 73,8% din cazuri nu au prezentat recidive ale SN, comparativ cu GNC forma nefrotică, la care 96,4% au prezentat recidive pe parcursul bolii (64,3% recidive rare și 32,1% recidive frecvente).

Tabelul 3.15. Frecvența recidivelor la copiii cu SN

| Numărul de recidive     | SN<br>(n=80)    | SNSS<br>(n=49)  | SNSD<br>(n=15)  | SNSR<br>(n=16) |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Recidive până la 6 luni | $2,21 \pm 0,21$ | $2,0 \pm 0,41$  | $1,92 \pm 0,27$ | $2,6 \pm 0,22$ |
| Recidive după 6 luni    | $1,6 \pm 0,20$  | $1,17 \pm 0,47$ | $1,50 \pm 0,17$ | $2,3 \pm 0,14$ |

**Notă:** SN – sindrom nefrotic, SNSS – sindrom nefrotic steroid sensibil, SNSD – sindrom nefrotic steroid dependent, SNSR – sindrom nefrotic steroid rezistent.

Rezultatele analizei biochimice a sângelui la pacienții cu SN sunt reflectate în tabelul 3.16.

Din datele prezentate observăm că nivelul proteinelor serice totale, albuminei, colesterolului, lipidelor totale,  $\beta$ -lipoproteidelor, proteinuriei au fost mai exprimate în SNSR, comparativ cu SNSS, date similare cu rezultatele altor studii efectuate [314].

Estimarea markerilor biochimici ai sângelui a evidențiat hipoproteinemie în toate subloturile de pacienți cu SN (tabelul 3.16).

Tabelul 3.16. Analiza biochimică a sângelui la pacienții cu SN în debut

| Parametrii biochimici    | SN<br>(n=80) | SNSS<br>(n=49) | SNSD<br>(n=15) | SNSR<br>(n=16) |
|--------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|
| Proteină totală, g/l     | 52,9±0,91    | 53,3±1,27      | 53,47±1,99     | 51,13±1,49     |
| Albumină,%               | 34,03±2,83   | 35,72±3,56     | 28,95±0,35     | 20,76±2,63     |
| α-globulină,%            | 25,10±3,94   | 25,46±4,81     |                |                |
| γ-globulină,%            | 12,37±1,88   | 10,72±1,12     |                |                |
| Ureea, mmol/l            | 6,2±0,53     | 6,84±0,80      | 4,94±0,71      | 5,12±0,48      |
| Creatinină, mmol/l       | 0,060±0,04   | 0,064±0,006    | 0,050±0,004    | 0,054±0,037    |
| Lipide totale, g/l       | 9,53±0,98    | 9,20±1,13      | 11,15±1,85     | 12,56±1,49     |
| Colesterol total, mmol/l | 8,48±0,35    | 7,43±0,34      | 9,56±0,62      | 10,05±0,95     |
| β-lipoproteide, u.c.     | 99,4±2,75    | 95,07±3,64     | 105,15±3,98    | 107,23±6,88    |
| Protrombină, %           | 92,5±0,93    | 92,95±1,096    | 91,29±2,94     | 92,50±1,71     |
| Fibrinogen, g/l          | 5,38±0,53    | 4,59±0,38      | 6,29±1,40      | 6,69±1,88      |

**Notă:** SN – sindrom nefrotic, SNSS – sindrom nefrotic steroid sensibil, SNSD – sindrom nefrotic steroid dependent, SNSR– sindrom nefrotic steroid rezistent.

Astfel, în sindromul nefrotic SS s-a semnalat hipoproteinemie până la 53,3±1,27 g/l și s-au atestat corelații indirecte între nivelul proteinei totale și fibrinogen ( $r_{xy} = -0,551$ ,  $p < 0,01$ ); între nivelul proteinei totale și β-lipoproteide ( $r_{xy} = -0,339$ ,  $p < 0,05$ ); între nivelul proteinei totale și proteina în urină timp de 24 h ( $r_{xy} = -0,373$ ,  $p < 0,05$ ).

Datele tabelului 3.16 demonstrează că în sindromul nefrotic SD proteina totală a constituit 53,47±1,99 g/l, pe când în sindromul nefrotic SR – 51,13±1,49 g/l, totodată, atestându-se corelații indirecte între nivelul proteinei totale și colesterol ( $r_{xy} = -0,550$ ,  $p < 0,001$ ); între nivelul proteinei totale și trigliceride ( $r_{xy} = -0,635$ ,  $p < 0,001$ ).

Studii recente demonstrează că indicii reduși de proteină totală și albumină serică în sindromul nefrotic SR se pot datora proteinuriei îndelungate din cauza bolii sau a tratamentului tardiv. Conform altor studii nivelul creatininei serice este majorat în sindromul nefrotic SR, sindromul nefrotic frecvent recidivant și sindromul nefrotic SD[279].

Hiperlipidemia este o caracteristică importantă a SNI la copii, fiind de obicei observată în timpul fazei active a bolii și dispare cu rezoluția proteinuriei [221].ce

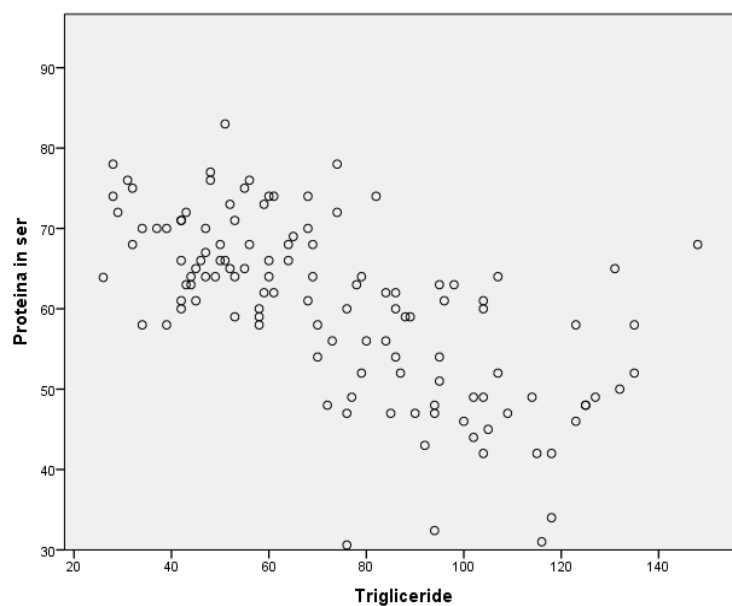


Figura 3.2. Corelații între nivelul proteinei totale și trigliceride la copiii cu SNSS

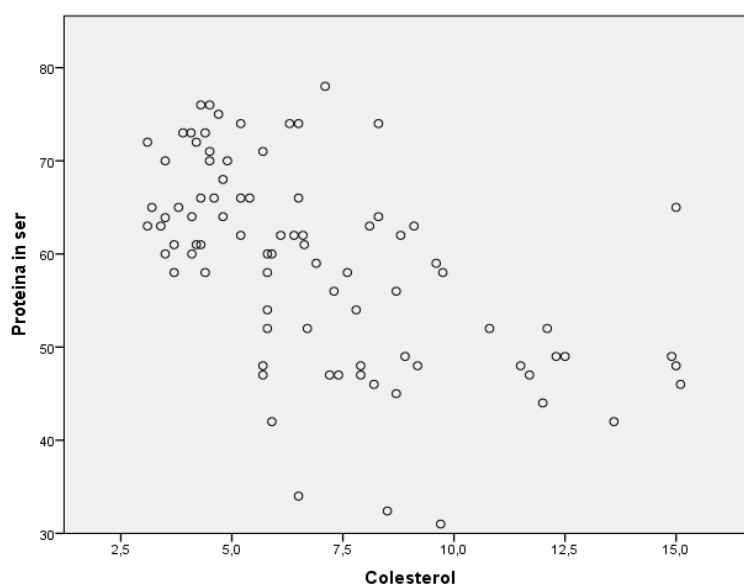


Figura 3.3. Corelații între nivelul proteinei totale și colesterol la copiii cu SNSS

Aceste date sunt în concordanță cu rezultatele altor studii [221]. Conform cercetărilor efectuate de R.Roy nu au fost observate diferențe semnificative la evaluarea modificărilor parametrilor biochimici (ureea, creatinină serică, proteine totale, albumină, colesterol) între diferite subgrupuri, iar lipsa răspunsului la tratament a fost asociată cu vârsta mai mare de 8 ani în debutul SN, cu sexul masculin, hipertensiunea arterială, hematuria microscopică și prezența leziunilor nonminimale la examenul histopatologic [279].

Persistența și severitatea modificărilor lipidelor în ser conduce la un risc crescut de ateroscleroză și dezvoltarea injuriei renale progresive. Nivelul colesterolului seric foarte ridicat și hemoglobina scăzută, de obicei, sunt determinate de leziuni nonminimale în SN [279].

Rezultatele studiului nostru au demonstrat modificări pronunțate ale indicilor metabolismului lipidic în toate subgrupurile de pacienți. Astfel, lipidele totale în sindromul nefrotic SS au crescut până la  $9,20 \pm 1,13\%$  g/l, până la  $11,15 \pm 1,85$  g/l în sindromul nefrotic SD și până la  $12,56 \pm 1,49$  g/l în sindromul nefrotic SR. Referitor la colesterolul total, s-a semnalat o creștere de până la  $7,43 \pm 0,34$  mmol/l în sindromul nefrotic SS, fiind prezente corelații directe între nivelul colesterolului total și  $\beta$ -lipoproteide ( $r_{xy}=0,518$ ,  $p<0,01$ ), în sindromul nefrotic SD până la  $9,56 \pm 0,62$  mmol/l și o creștere de până la  $10,05 \pm 0,95$  mmol/l în sindromul nefrotic SR, notându-se corelații puternice directe între nivelul colesterolului total și trigliceride ( $r_{xy}=0,764$ ,  $p<0,001$ ). Astfel în prezentul studiu s-a semnalat creșterea semnificativă a colesterolului total, lipidelor totale, în comparație cu valorile normative, ceea ce este în concordanță cu rezultatele altor studii [107, 186, 314].

Merouani A. și coautorii au relatat că hiperlipidemia în timpul fazei active a SN s-a normalizat odată cu rezoluția proteinuriei și a fost persistentă, anormal în timpul recidivei SN la copii [221].

Conform datelor altor studii, copiii cu SN frecvent recidivant au perioade mai mari de hipercolesterolemie. Prin urmare, colesterolul seric poate fi considerat un predictor al recidivei la copii cu SN [204]. În studiul nostru, s-a stabilit o corelație semnificativă între albumină și colesterolul seric, fapt menționat și de alți autori [204]. De asemenea, conform rezultatelor altor studii, s-a constatat o corelație semnificativă între nivelul colesterolului și albuminei serice ceea ce se datorează sintezei lipoproteinei hepatice care este stimulată ca răspuns al hipoalbuminemiei, presiunii oncotice scăzute și pierderii de albumină urinară [314].

Rezultatele studiului nostru au atestat hiperfibrinogenemie cu valori de până la  $6,29 \pm 1,40$  g/l în sindromul nefrotic SD și  $6,69 \pm 1,88$  g/l în sindromul nefrotic SR, comparativ cu valorile normative, ceea ce denotă prezența unui sindrom inflamator nespecific. Hipercoagulabilitatea crescută este determinată de pierderea urinară a proteinelor anticoagulante, cum ar fi antitrombina III și plasminogenul, odată cu creșterea simultană a factorilor de coagulare, în special a factorilor I, VII, VIII și X. În sindromul nefrotic SS s-au semnalat corelații directe puternice între nivelul ureei și creatininei serice ( $r_{xy}=0,841$ ,  $p<0,001$ ).

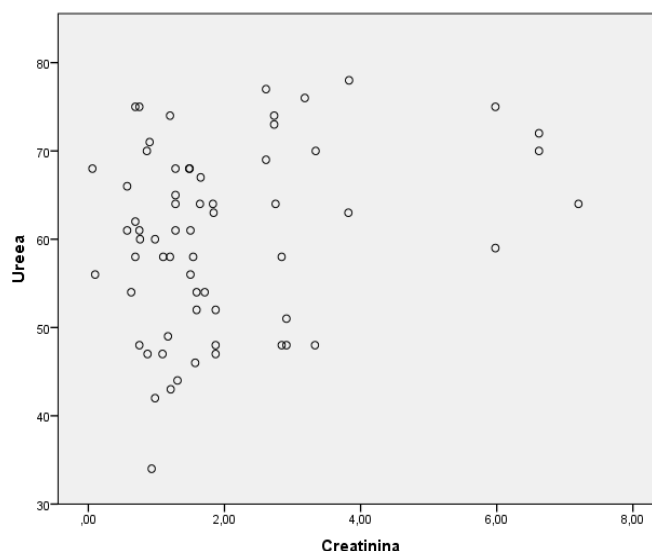


Figura 3.4. Corelații între nivelul creatininei serice și ureea la copiii cu SNSS

De asemenea, s-au notat corelații între nivelul creatininei serice și  $\beta$ -lipoproteide ( $r_{xy}=-0,344$ ,  $p<0,05$ ); între nivelul creatininei serice și eritrocite în urină ( $r_{xy}=0,451$ ,  $p<0,05$ ).

În tabelul 3.17 sunt redate datele hemoleucogramei la copiii cu SN.

Astfel, în sindromul nefrotic SS s-a semnalat creșterea VSH sângelui până la  $38,46 \pm 2,83$  mm/oră, în sindromul nefrotic SD - până la  $42,83 \pm 4,68$  mm/oră și până la  $35,53 \pm 2,59$  mm/oră în sindromul nefrotic SR. În plus, la copiii cu sindromul nefrotic SD s-a înregistrat o leucocitoză până la  $13,30 \pm 2,99$ .

Aceste date biologice indică prezența unui sindrom inflamator nespecific.

Tabelul 3.17. Hemoleucograma la copiii cu SN

| Parametrii studiați           | SN<br>(n=80)     | SNSS<br>(n=49)    | SNSD<br>(n=15)    | SNSR<br>(n=16)    |
|-------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Hb, g/l                       | $123,1 \pm 2,40$ | $121,20 \pm 3,11$ | $129,54 \pm 5,88$ | $123,54 \pm 4,55$ |
| Eritrocite $\times 10^{12}/l$ | $3,87 \pm 0,72$  | $3,84 \pm 0,099$  | $4,7 \pm 0,15$    | $3,87 \pm 0,13$   |
| Leucocite $\times 10^9/l$     | $9,3 \pm 0,65$   | $8,23 \pm 0,37$   | $13,30 \pm 2,99$  | $9,03 \pm 1,02$   |
| VSH, mm/oră                   | $38,6 \pm 1,96$  | $38,46 \pm 2,83$  | $42,83 \pm 4,68$  | $35,53 \pm 2,59$  |

Analiza sumarului urinei a evidențiat proteinurie până la  $4,65 \pm 0,6$  g/l în sindromul nefrotic SS, până la  $6,10 \pm 2,09$  g/l în sindromul nefrotic SD și până la  $7,15 \pm 0,09$  g/l în sindromul nefrotic SR.

Tabelul 3.18. Sumarul urinei la copiii cu SN

| Parametrii studiați              | SN<br>(n=80) | SNSS<br>(n=49) | SNSD<br>(n=15) | SNSR<br>(n=16) |
|----------------------------------|--------------|----------------|----------------|----------------|
| Proteina în sumarul urinei, g/l  | 5,5±0,66     | 4,65±0,6       | 6,10±2,09      | 7,15±0,09      |
| Eritrocite, c/v                  | 36,4±5,78    | 32,63±4,77     | 18,0±1,4       | 57,83±7,38     |
| Leucocite, c/v                   | 16,8±2,49    | 16,33±2,41     | 16,0±8,42      | 18,63±6,31     |
| Proteina în urină timp 24 h, g/l | 4,0±0,54     | 3,79±0,66      | 4,28±2,09      | 4,55±0,99      |

**Notă:** SN – sindrom nefrotic, SNSS – sindrom nefrotic steroid sensibil, SNSD – sindrom nefrotic steroid dependent, SNSR – sindrom nefrotic steroid rezistent.

În sindromul nefrotic SS s-au semnalat corelații între proteina din urină și nivelul proteinei totale din serul sangvin ( $r_{xy}=0,31$ ,  $p<0,05$ ); între proteina din urină și trigliceride ( $r_{xy}=-0,433$ ,  $p<0,001$ ); între proteina din urină și endotelină - 1 ( $r_{xy}=0,529$ ,  $p<0,001$ ); între proteina din urină și  $\gamma$ -GTP ( $r_{xy}=0,621$ ,  $p<0,001$ ); între proteina din urină și PPOA ( $r_{xy}=0,432$ ,  $p<0,001$ ); între proteina din urină și NAG- $\beta$  ( $r_{xy}=0,38$ ,  $p<0,01$ ), iar în sindromul nefrotic SR s-au semnalat corelații directe între proteina din urină și nivelul proteinei totale din serul sangvin ( $r_{xy}=0,267$ ,  $p<0,05$ ); între proteina din urină și  $\gamma$ -GTP ( $r_{xy}=0,318$ ,  $p<0,01$ ); între proteina din urină și PPOA ( $r_{xy}=0,440$ ,  $p<0,001$ ); între proteina din urină și NAG- $\beta$  ( $r_{xy}=0,374$ ,  $p<0,01$ ); între proteina din urină și CTGF ( $r_{xy}=0,301$ ,  $p<0,05$ ).

Ecografia renală efectuată la pacienții cu SN evidențiază rinichi măriți în dimensiuni cu lărgirea zonei parenchimatoase, hiperechogenitate sporită, prezența lichidului liber în cavitatea abdominală în 90 % cazuri.

### 3.2. Aprecierea statutului clinic și ale parametrilor paraclinici la copiii cu glomerulonefrită cronică

În tabelul 3.19 sunt prezentate datele despre maladiile suportate în GNC forma nefrotică.

Tabelul 3.19. Maladiile suportate la copiii cu GNC forma nefrotică

| Maladiile suportate | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES$ % |
|---------------------|-------------------|--------------------|
| IRVA                | 24                | 85,8±6,6           |
| Angină              | 2                 | 7,1±1,9            |
| Pneumonie           | 2                 | 7,1±1,9            |

Astfel, în grupul GNC forma nefrotică debutul maladiei a survenit la 2-3 săptămâni după suportarea unei IRVA la 24 (85,8±6,6 %) pacienți; după angină la 2 (7,1±1,9 %) pacienți; după pneumonie la 2 (7,1±1,9 %) pacienți.

Manifestările clinice au fost determinate de edeme generalizate în regiunea feței, abdomenului, gambelor în 21 (75,0±3,05%) cazuri, anasarcă – 7 (25,0±1,78 %) cazuri, micțiuni rare – 10 (35,71±2,12 %) cazuri, sindrom algic abdominal – 3 (10,71±1,17%) cazuri, dureri în regiunea lombară – 1 (3,57±0,67%) cazuri.

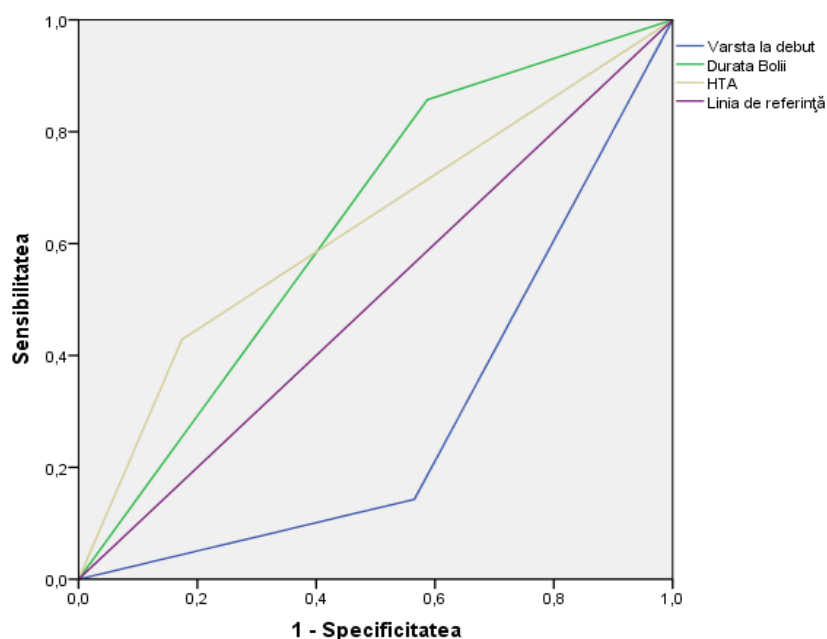


Figura 3.5. Curba ROC pentru vârstă, HTA, durata bolii în GNC

Curba ROC a permis aprecierea autenticității între specificitatea și sensibilitatea vârstei pacientului în debutul bolii, durata bolii, HTA în GNC pentru stabilirea diagnosticului. Din figura 3.5 observăm că pentru vârstă AUC=0,289 (95% ÎI: 0,103-0,475), pentru durata bolii AUC=0,635 (95% ÎI: 0,434-0,836), pentru hipertensiunea arterială AUC=0,627 (95% ÎI: 0,386-0,868).

În tabelul 3.20 sunt reflectate rezultatele analizei biochimice a sângelui la pacienții cu GNC forma nefrotică.

Probele biologice ale sângelui atestă hipoproteinemie până la 52,7±1,95g/l, majorarea indicilor metabolismului lipidic (lipide totale – 8,39±1,11g/l, colesterolul – 8,11±0,81mmol/l, β-lipoproteidele – 87,0±6,82 u.c).



Tabelul 3.20. Analiza biochimică a sângelui la copiii cu GNC formă nefrotică

| Parametrii biochimici       | $\bar{X} \pm ES$  |
|-----------------------------|-------------------|
| Proteină totală, g/l        | 52,7 $\pm$ 1,95   |
| Albumină, %                 | 46,40 $\pm$ 4,60  |
| $\gamma$ -globuline, %      | 11,28 $\pm$ 1,12  |
| Ureea, mmol/l               | 4,75 $\pm$ 0,37   |
| Creatinină, mmol/l          | 0,060 $\pm$ 0,004 |
| Lipide totale, g/l          | 8,39 $\pm$ 1,11   |
| Colesterol, mmol/l          | 8,11 $\pm$ 0,81   |
| $\beta$ -lipoproteide, u.c. | 87,0 $\pm$ 6,82   |

Hemoleucograma a evidențiat creșterea VSH a sângelui până la 35,8 $\pm$ 3,25 mm/oră, Hb a constituit – 128,0 $\pm$ 3,13 g/l, eritrocitele – 4,07 $\pm$ 0,10 $\times 10^{12}$ /l, leucocitele – 8,54 $\pm$ 0,74 $\times 10^9$ /l.

Tabelul 3.21. Hemoleucograma la copiii cu GNC formă nefrotică

| Parametrii studiați            | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|--------------------------------|--------------------|
| Hb, g/l                        | 128,0 $\pm$ 3,13   |
| Eritrocite $\times 10^{12}$ /l | 4,07 $\pm$ 0,10    |
| Leucocite $\times 10^9$ /l     | 8,54 $\pm$ 0,74    |
| VSH, mm/oră                    | 35,8 $\pm$ 3,25    |

Analiza sumarului urinei a relevat proteinurie cu valori de 4,2-20,6 g/l, ceea ce constituie în medie – 4,26 $\pm$ 0,89 g/l, proteina în urină timp de 24 h a variat de la 3,9-30,6 g/l (3,9 $\pm$ 1,21 g/l).

La copiii cu GNC formă nefrotică s-a înregistrat prezența în urină a 13,0 $\pm$ 4,02 de eritrocite și a 12,5 $\pm$ 1,71 de leucocite în c/v.

Tabelul 3.22. Analiza sumarului urinei la copiii cu GNC forma nefrotică

| Parametrii studiați             | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|---------------------------------|--------------------|
| Proteina în sumarul urinei, g/l | 4,26 $\pm$ 0,89    |
| Eritrocite, c/v                 | 13,0 $\pm$ 4,02    |
| Leucocite, c/v                  | 12,5 $\pm$ 1,71    |

Din figura 3.6 observăm că pentru prezența eritrocitelor în urină AUC=0,601 (95% ÎI: 0,372-0,830).

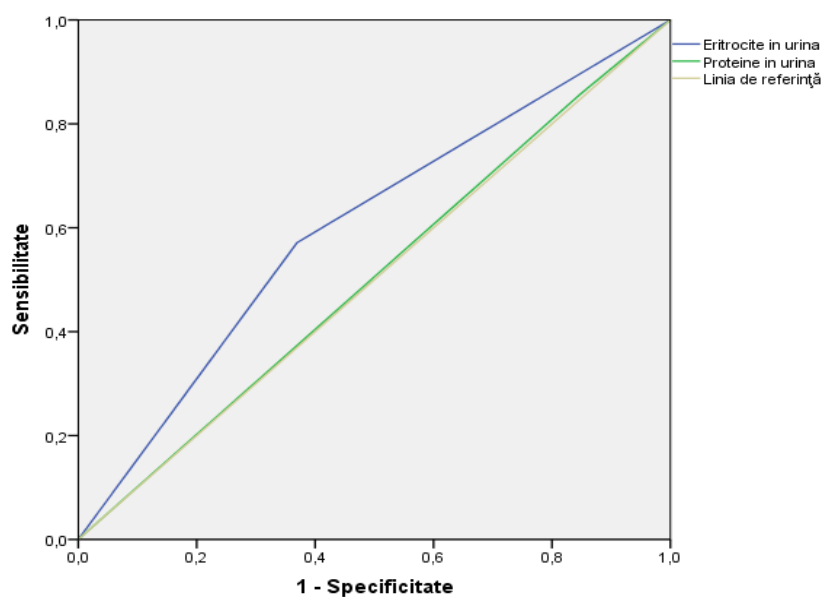


Figura 3.6. Curba ROC pentru sumarul urinei în GNC

În lotul pacienților cu GNC forma mixtă acutizarea maladiei a fost precedată de suportarea unei IRVA la 15 ( $60,0 \pm 9,8$  %) cazuri; unui epizod de pneumonie – 5 ( $20,0 \pm 8,0$  %) pacienți; bronșită – 3 ( $12,0 \pm 0,81$  %) pacienți; angină – 1 ( $4,0 \pm 1,9$  %) cazuri; streptodermie – 1 ( $4,0 \pm 1,9$  %) cazuri.

Tabelul 3.23. Maladiile suportate de copiii cu GNC forma mixtă

| Maladiile suportate | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES$ % |
|---------------------|-------------------|--------------------|
| IRVA                | 15                | $60,0 \pm 9,8$     |
| Pneumonie           | 5                 | $20,0 \pm 8,0$     |
| Bronșită            | 3                 | $12,0 \pm 0,81$    |
| Angină              | 1                 | $4,0 \pm 1,9$      |
| Streptodermie       | 1                 | $4,0 \pm 1,9$      |

Datele tabelului 3.24 reflectă manifestările clinice la copiii cu GNC forma mixtă în perioada de acutizare.

Manifestările clinice a fost dominate de edeme – 16 ( $64,0 \pm 3,16$  %) cazuri, anasarcă – 9 ( $36,0 \pm 2,38$  %), HTA – 20 ( $80,0 \pm 3,52$  %), micțiuni rare – 10 ( $40,0 \pm 2,51$  %), macrohematurie – 5 ( $20,0 \pm 1,78$  %), cefalee – 5 ( $20,0 \pm 1,78$  %), dispnee – 4 ( $16,0 \pm 1,59$  %), sindrom algic abdominal – 7 ( $28,0 \pm 2,10$  %), vomă – 2 ( $8,0 \pm 1,13$  %), LRA – 2 ( $8,0 \pm 1,13$  %) cazuri.

Tabelul 3.24. Manifestările clinice la copii cu glomerulonefrită cronică forma mixtă în perioada de acutizare

| Simptome clinice        | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES \%$ |
|-------------------------|-------------------|---------------------|
| Edeme                   | 16                | 64,0 $\pm$ 3,16     |
| HTA                     | 20                | 80,0 $\pm$ 3,52     |
| Anasarca                | 9                 | 36,0 $\pm$ 2,38     |
| Micțiuni rare           | 10                | 40,0 $\pm$ 2,51     |
| Macrohematurie          | 5                 | 20,0 $\pm$ 1,78     |
| Cefalee                 | 5                 | 20,0 $\pm$ 1,78     |
| Sindrom algic abdominal | 7                 | 28,0 $\pm$ 2,10     |
| Dispnee                 | 4                 | 16,0 $\pm$ 1,59     |
| Vomă                    | 2                 | 8,0 $\pm$ 1,13      |
| Leziune renală acută    | 2                 | 8,0 $\pm$ 1,13      |

Datele tabelului 3.25 reflectă rezultatele analizei biochimice a sângelui la pacienții cu GNC forma mixtă. Analiza biochimică a sângelui a evidențiat hipoproteinemie până la 52,6 $\pm$ 2,23 g/l, ureea serică fiind 8,0 $\pm$ 1,38 mmol/l, creatinina serică până la – 0,052 $\pm$ 0,21 mmol/l, creșterea indicilor metabolismului lipidic (colesterolul – 9,09 $\pm$ 0,78 mmol/l,  $\beta$ -lipoproteidele – 93,2 $\pm$ 5,07 u.c).

Tabelul 3.25. Analiza biochimică a sângelui la copiii cu GNC forma mixtă

| Parametrii biochimici       | $\bar{X} \pm ES$ |
|-----------------------------|------------------|
| Proteină totală, g/l        | 52,6 $\pm$ 2,23  |
| Albumină, %                 | 40,73 $\pm$ 4,90 |
| $\alpha$ 2globuline, %      | 17,3 $\pm$ 2,95  |
| $\beta$ -globuline, %       | 13,4 $\pm$ 2,37  |
| $\gamma$ -globuline, %      | 19,20 $\pm$ 4,17 |
| Ureea, mmol/l               | 8,0 $\pm$ 1,38   |
| Creatinină, mmol/l          | 0,052 $\pm$ 0,46 |
| Colesterol, mmol/l          | 9,09 $\pm$ 0,78  |
| $\beta$ -lipoproteide, u.c. | 93,2 $\pm$ 5,07  |
| Protrombină, %              | 92,5 $\pm$ 1,65  |
| Fibrinogen, g/l             | 4,15 $\pm$ 0,47  |

În hemoleucogramă s-a semnalat creșterea VSH până la 37,2 $\pm$ 3,38 mm/oră. Astfel, Hb a sângelui a constituit 110,92 $\pm$ 5,48 g/l, eritrocitele sângelui – 3,40 $\pm$ 0,16 $\times 10^{12}$ /l, leucocitele – 7,77 $\pm$ 0,48 $\times 10^9$  g/l.

Tabelul 3.26. Hemoleucograma la copiii cu GNC forma mixtă

| Parametrii studiați             | $\bar{X} \pm ES\%$ |
|---------------------------------|--------------------|
| Hb, g/l                         | 110,6 $\pm$ 5,48   |
| Eritrocite x10 <sup>12</sup> /l | 3,40 $\pm$ 0,16    |
| Leucocite x10 <sup>9</sup> /l   | 7,77 $\pm$ 0,48    |
| VSH, mm/oră                     | 37,2 $\pm$ 3,38    |

Analiza sumarului urinei a semnalat proteinurie de la 2,4 g/l până la 20,7 g/l, ceea ce constituie în medie 5,98 $\pm$ 1,48 g/l. Proteina în urină timp de 24 h a variat de la 1,1 g/l până la 15,6 g/l (4,40 $\pm$ 0,77 g/l). Sumarul urinei a indicat prezența hematuriei în 92,1 % cazuri și leucociturie în 14,8 % cazuri.

### 3.3. Factorii de risc în dezvoltarea injuriei renale la copiii cu glomerulonefrită

Importanța diagnosticului în GN a fost definitorie pentru stabilirea strategiei terapeutice de lungă durată și a programului terapeutic. Măsurile specifice constau din: „dieta renală”, terapie cu diuretice, antihipertensive, antiagregante, anticoagulante, antibacteriale.

Tratamentul simptomatic a inclus: Terapie cu diuretice – furosemid 1-2 mg/kg/24 h, la necesitate – 3-5 mg/kg/24 h; spironolacton – 1-3 mg/kg/24 h în 2-3 prize. În cazul edemelor masive, tratamentul diuretic a fost dublat, cu scopul creșterii presiunii oncotice eficace, amplificând astfel eficiența diureticelor prin administrarea sol. Albumini 20-25% în doză 0,5-1 g/kg (până la 5 ml/kg), cu administrarea furosemidului i/v 1-2 mg/kg la finalul infuziei.

Terapia cu antihipertensive: inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei (IECA) care a inclus enalapril – 0,15-0,5 mg/kg/24 h, în 1-2 prize; captopril – 0,3-5,0 mg/kg/24 h, în 1-2 prize. În caz de ineficiență, a fost posibilă combinarea IECA sau a blocații receptorilor angiotensinei II (BRA) cu blocații canalelor de calciu: nifedipine – 0,25-2,0 mg/kg/24 h, sublingual, în 2 prize.

Anticoagulantele și antiagregantele au fost indicate în cazul hipoalbuminemiei pronunțate (<20-15 g/l), creșterea nivelului trombocitelor (>400 x 10<sup>9</sup>/l) și fibrinogenului (>6 g/l). În calitate de antiagregante a fost administrat dipiridamolul – 3-5 mg/kg/zi, în 3 prize; heparina – în doză de 200-250 un/kg/zi, în 4 prize sub controlul coagulogramei.

În dependență de varianta clinico-histologică au fost administrate următoarele scheme de tratament.

*Tratamentul SNSM a episodului inițial:*

Conform (KDIGO, 2012) tratamentul episodului inițial al SN a inclus administrarea prednisolonului în doză 2mg/kg/24h timp 4-6 săptămâni, apoi 1,5 mg într-o singură priză pe parcursul a 2-5 luni, cu scăderea treptată a dozei.

### *Tratamentul recidivelor rare ale SNSS*

- Recidivele rare ale SNSS la copii s-au tratat cu prednisolon în doză 2mg/kg (maxim 60 mg/24h) doză unică zilnică până când copilul a obținut remisiune completă pentru cel puțin 3 zile.
- După obținerea remisiunii a fost administrat prednisolon, în doza (40 mg/m<sup>2</sup> sau 1,5 mg/kg, maxim 40 mg/48h) într-o singură priză în zile alternante, timp de cel puțin 4 săptămâni.

### *Tratamentul SN frecvent recidivant și SD SNSS*

- Recăderile la copiii cu recidive frecvente (FR) sau steroidodependență (SD) ale SNSS s-au tratat cu prednisolon zilnic până când copilul a obținut remisiune pentru cel puțin 3 zile, urmate de cura de prednisolon în zile alternante cel puțin 3 luni.
- La copii cu SD SNSS, tratamentul cu prednisolon în zile alternante inefficient a fost substituit cu terapia zilnică cu prednisolon în doze minimale cu scopul menținerii remisiunii fără efecte adverse majore.

### *Indicații pentru terapia cu citostatice:*

- recidive frecvente fără semne de dependență steroidă și complicații;
- recidive frecvente fără semne de dependență steroidă, dar cu semne de toxicitate steroidă; sindrom nefrotic SR

Au fost administrate următoarele imunosupresoare:

- Ciclofosamid 2,0 mg/kg/24h (doza maximă cumulativă 168 mg/kg) timp de 8-12 săptămâni.
- Clorambucil 0,1-0,2 mg/kg/24h per os (doza maximă cumulativă 11,2 mg/kg) timp de 8-12 săptămâni.
- Ciclosporin A 3-5 mg/kg/24 h timp de 6- 12 luni în asociere cu prednisolon 1 mg/kg/48h.

Programul terapeutic utilizat a contribuit la aceea că 75,5 % pacienți cu SNSS au prezentat remisiune completă la ultima supraveghere, comparativ cu 43,8 % în SNSR (tabelul 3.27). La pacienții cu SNSS boala a evoluat spre cronicizare în 24,5 % cazuri, iar la cei din grupul cu SNSR rata de cronicizare a fost de 3 ori mai înaltă – 75,5 % cazuri.

În urma tratamentului cu steroizi și imunosupresoare pacienții cu GNC forma nefrotică au prezentat remisiune completă în 89,3 % cazuri, pe când cei cu forma mixtă – în numai 40% cazuri. Un număr de 32% pacienți cu GNC forma mixtă nu au răspuns la tratamentul cu steroizi și imunosupresoare din cauza multirezistenței la aceste preparate.

Totodată, la 28,1 % pacienți boala a evoluat în BRC, iar în 21,9 % cazuri s-a efectuat hemodializă cronică.

Tabelul 3.27. Starea pacienților la ultima supraveghere

| Variabile studiate       | SNSS<br>(n=49) | SNSR<br>(n=16) | GNC forma<br>nefrotică<br>(n=28) | GNC forma<br>mixtă<br>(n=25) |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------------------------|------------------------------|
| Remisiune completă       | 37(75,5%)      | 7(43,8%)       | 25(89,3%)                        | 10(40%)                      |
| Remisiune parțială       | 12(24,5%)      | 3(18,8%)       | 1(3,6%)                          | 7(28%)                       |
| Fără efect               |                | 3(18,8 %)      | 1(3,6%)                          | 8(32%)                       |
| BRC gr.II-IV             |                | 2(12,5%)       | 1(3,6%)                          | 3(12%)                       |
| BRC gr.V                 |                | 1(6,25%)       |                                  | 3(12%)                       |
| Trecere în forma cronică | 12(24,5 %)     | 12(75,5%)      |                                  |                              |
| Dializă                  |                | 1 (6,25 %)     | 1(3,6%)                          | 3(12%)                       |
| Deces                    |                | 2 (12,5%)      |                                  |                              |

A fost apreciată specificitatea și sensibilitatea pentru sindromul nefrotic SR, calculate variabilele pentru lipsa remisiunii, lipsa eficacității la tratamentul efectuat, rezultatul biopsiei renale în stabilirea diagnosticului.

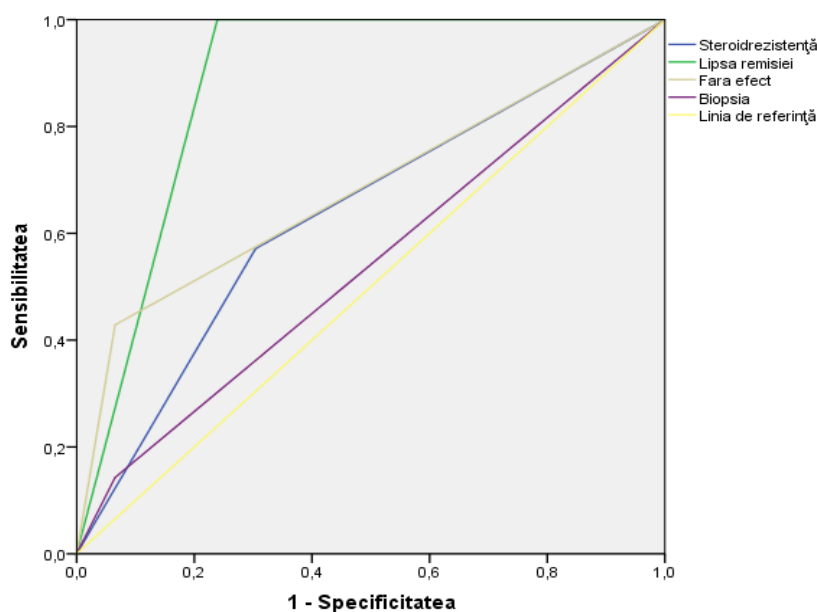


Figura 3.7. Curba ROC pentru sindrom nefrotic SR, lipsa remisiunii, lipsa eficacității la tratamentul efectuat, rezultatul biopsiei renale în GNC

Astfel, pentru sindromul nefrotic SR (AUC=0,634 (95% ÎÎ: 0,405-0,863), lipsa remisiiei AUC=0,880 (95% ÎÎ: 0,788-0,973), lipsa eficacității la tratamentul efectuat, AUC=0,682 (95% ÎÎ: 0,435-0,928), rezultatul biopsiei renale AUC=0,539 (95% ÎÎ: 0,298-0,780), exprimate grafic prin curba ROC (figura 3.7).

A fost calculat riscul de dezvoltare a cronicizării prin regresia logistică (tabelul 3.28).

Tabelul 3.28. Regresia logistică pentru riscul dezvoltării cronicizării la pacienții cu GNA

| Variabile studiate     | Coeficientul, (β) | ±ES       | Criteriul Wald (χ <sup>2</sup> ) | p     |
|------------------------|-------------------|-----------|----------------------------------|-------|
| Vârsta <6 ani          | 3,146             | 1,452     | 4,692                            | 0,030 |
| Sexul                  | 0,225             | 0,814     | 0,077                            | 0,782 |
| Colesterol             | -1,270            | 0,827     | 2,357                            | 0,125 |
| Eritrocite în urină    | -,343             | 0,835     | 0,169                            | 0,681 |
| Proteină în urină      | -0,349            | 0,780     | 0,200                            | 0,655 |
| Rezistența la steroizi | 2,474             | 1,088     | 5,169                            | 0,023 |
| Lipsa remisiunii       | -21,521           | 40192,970 | 0,000                            | 1,000 |
| IR în debut            | 45,483            | 43653,790 | 0,000                            | 0,999 |
| Constanta              | -3,909            | 1,483     | 6,948                            | 0,008 |

Astfel, la interacțiunea diferitor factori, în studiul nostru, doar doi factori influențează direct dezvoltarea cronicizării – vârsta până la 6 ani și rezistența la tratamentul cu steroizi. Regresia logistică se poate utiliza și pentru prognozarea dezvoltării unui fenomen.

Rezultatul analizei regresiei logice este calcularea coeficienților  $b_1, b_2, \dots$  din ecuația:  $y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_iX_i$ , unde  $X_1 \dots X_i$  – variabile de prognostic independente.

Valoarea  $y$  din ecuația regresiei este logaritmul natural al raportului șanselor pentru evenimentul studiat.

Probabilitatea evenimentului pentru fiecare subiect al studiului poate fi calculată prin formula:  $P = \frac{e^y}{1 + e^y}$ , unde  $e$  – constantă matematică = 2,72.

În cazul prezenței tuturor variabilelor de prognostic pozitive obținem următoarea ecuație:

$$Y = -4,349 + (3,910 \times 1) + (3,317 \times 1) = 2,878$$

$$P = \frac{2,72^{2,878}}{1 + 2,72^{2,878}} = 0,947$$

Astfel, probabilitatea trecerii GNA în GNC în studiul nostru este egală cu 0,947 sau 94,7%.

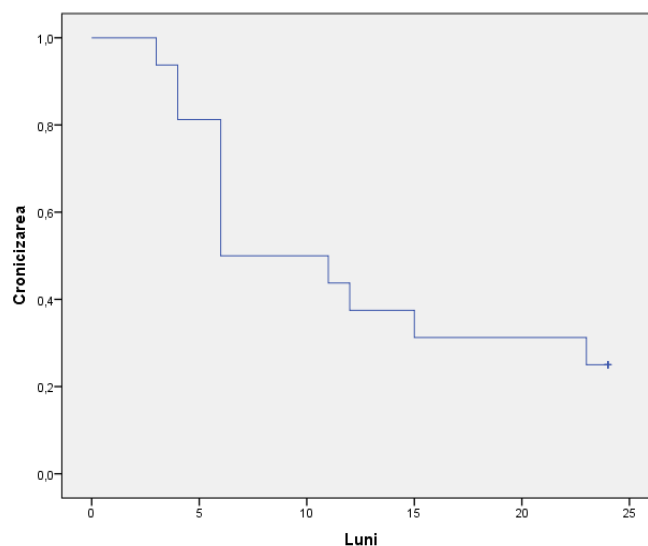


Figura 3.8. Curba Kaplan-Meier a estimării proporției copiilor cu sindrom nefrotic SS care au prezentat cronicizare

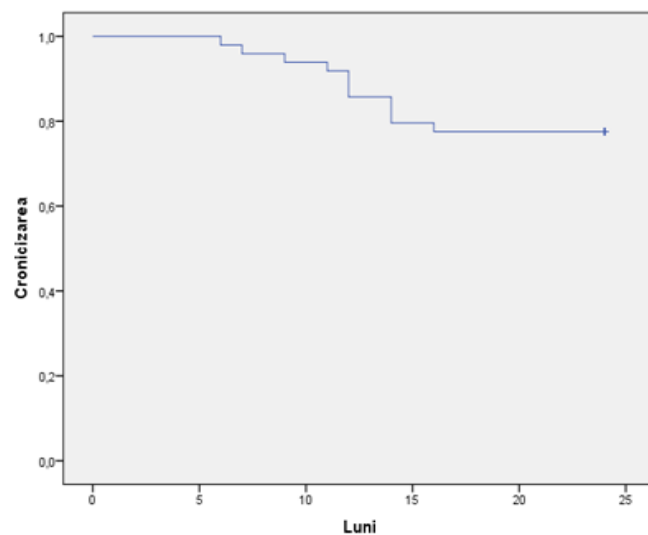


Figura 3.9. Curba Kaplan-Meier a estimării proporției copiilor cu sindrom nefrotic SR care au prezentat cronicizare

Tabelul 3.29. Analiza discriminantă a copiilor cu SN care au dezvoltat BRC

| Variabilele                   | Coeficientul de corelație canonică, SNSS | p     | Coeficientul de corelație canonică, SNSR | p     |
|-------------------------------|------------------------------------------|-------|------------------------------------------|-------|
| Hematurie                     | 0,396                                    | 0,000 | 0,598                                    | 0,000 |
| Hipertensiune arterială       | 0,377                                    | 0,000 | 0,590                                    | 0,000 |
| Varianta histologică          | 0,206                                    | 0,001 | 0,545                                    | 0,003 |
| Vârsta                        | 0,164                                    | 0,008 | 0,518                                    | 0,005 |
| Rezistența la imunosupresoare | 0,129                                    | 0,009 | 0,355                                    | 0,031 |
| Sexul                         | 0,119                                    | 0,029 | 0,275                                    | 0,04  |



Analiza discriminantă a copiilor cu sindrom nefrotic SS a demonstrat că cel mai mare aport în dezvoltarea BRC a revenit hematuriei (coeficientul de corelație canonică  $K=0,396$ ,  $p<0,001$ ) și hipertensiunii arteriale ( $K=0,377$ ,  $p<0,001$ ), pe când în sindromul nefrotic SR a fost determinat de hematurie (coeficientul de corelație canonică  $K=0,598$ ,  $p<0,001$ , hipertensiune arterială – ( $K=0,590$ ,  $p<0,001$ ), varianta histologică – ( $K=0,545$ ,  $p<0,003$ ).

### **3.4. Concluzii la capitolul 3**

1. Estimarea comparativă a manifestărilor clinice la pacienții cu GN a evidențiat semne clinice în dependență de varianta clinică. Manifestările clinice ale GNA au fost dominate de infecția streptococică în antecedente, debutul cu oligurie, edeme de diferit grad localizate pe față, abdomen, gambe, hipertensiune arterială, macrohematurie, vomă. SN în perioada de debut a fost dominat de edeme generalizate, anasarcă, iar în forma mixtă a GNC s-a atestat prezența SN în asocieră cu hipertensiunea arterială și hematurie de diferit grad.

2. Datele paraclinice care au confirmat GNA sindrom nefritic au fost dominate de semnele biologice sugestive: sindromul urinar de tip nefritic (oligurie, hematurie, proteinurie) sau sindromul de retenție azotată (ureea, creatinină cu valori serice crescute,  $\text{RFG} < 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ), asociate cu valori scăzute ale complementului seric și titrul ASLO crescut. SN a fost determinat de hipoproteinemie, creșterea indicilor metabolismului lipidic, proteinurie  $\geq 3,5 \text{ g/l}$ .

3. În sindromul nefrotic SS, s-au semnalat corelații directe între nivelul colesterolului total și  $\beta$ -lipoproteide ( $r_{xy}=0,518$ ,  $p<0,01$ ), între nivelul ureei și creatininei serice ( $r_{xy}=0,841$ ,  $p<0,001$ ), pe când în sindromul nefrotic SR s-au atestat corelații puternice între nivelul proteinei totale și colesterol ( $r_{xy}=-0,550$ ,  $p<0,001$ ); între nivelul proteinei totale și trigliceride ( $r_{xy}=-0,635$ ,  $p<0,001$ ), între nivelul colesterolului total și trigliceride ( $r_{xy}=0,764$ ,  $p<0,001$ ).

4. Conform datelor studiului 75,5 % pacienți cu SNSS au prezentat remisiune completă la ultima supraveghere, comparativ cu 43,8 % în SNSR. Pacienții cu SNSS au evoluat spre cronicizare în 24,5 % cazuri, comparativ cu cei cu SNSR la care boala s-a cronicizat în 75,5 % cazuri. La 28,1% s-a semnalat evoluția bolii spre BRC, iar 21,9% au efectuat hemodializă cronică.

5. Rezultatele studiului dat, denotă că principalii factorii de risc care au influențat direct dezvoltarea cronicizării au fost: vârsta sub 6 ani și rezistența la tratamentul cu steroizi. Conform analizei discriminante s-a stabilit că la pacienții cu sindrom nefrotic SR cel mai mare aport în dezvoltarea BRC îl are hematuria (coeficientul de corelație canonică  $K=0,598$ ,  $p<0,001$ ), hipertensiunea arterială ( $K=0,590$ ,  $p<0,001$ ) și varianta histologică ( $K=0,545$ ,  $p<0,003$ ).

#### 4. PARTICULARITĂȚILE MODIFICĂRILOR MOLECULELOR DE SEMNALIZARE CELULARĂ ȘI ALE PROCESELOR DE OXIDARE CU RADICALI LIBERI LA COPIII CU GLOMERULONEFRITĂ PRIMARĂ

##### 4.1. Estimarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară (interleukinelor și chemokinelor) în urină la copiii cu glomerulonefrită

Luând în considerare multiplele informații de specialitate cu privire la rolul moleculelor de semnalizare celulară în patogenia GN, în cadrul studiului actual am evaluat modificările concentrației citokinelor proinflamatorii: interleukina – 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8) și factorul necrozei tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) la diferite etape clinico-evolutive ale maladiei.

Interleukina-1 $\beta$  este o citokină proinflamatorie care exercita efecte pleiotrope asupra unei varietăți de celule și joacă un rol-cheie în afecțiunile inflamatorii și autoimune acute și cronice.

Datele despre nivelul citokinelor proinflamatorii IL-1 $\beta$  și IL-6 în urină la copiii cu glomerulonefrită sunt redată în tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Nivelul citokinelor urinare la copiii cu glomerulonefrită (pg/mM creatinină)

| Grupuri de studiu    | IL-1 $\beta$                                        |                                                       | IL-6                                               |                                                        |
|----------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                      | acutizare                                           | remisiune                                             | acutizare                                          | remisiune                                              |
| GNA sindrom nefritic | 15,9 $\pm$ 5,93<br>139,5 %                          | 13,8 $\pm$ 1,60<br>121,05%,<br>p <sub>1</sub> >0,05   | 19,6 $\pm$ 1,04***<br>206,3%                       | 12,8 $\pm$ 1,12*<br>134,7 %,<br>p <sub>1</sub> <0,05   |
| GNA SNSS             | 21,9 $\pm$ 1,57***<br>192,1 %                       | 15,3 $\pm$ 0,84**<br>134,2 %,<br>p <sub>1</sub> <0,01 | 28,7 $\pm$ 1,51***<br>302,1 %                      | 60,4 $\pm$ 2,87***<br>635,8%,<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| GNA SNSR             | 31,6 $\pm$ 2,94***<br>277,2 %, p <sub>2</sub> <0,05 | -                                                     | 39,7 $\pm$ 2,20***<br>417,9%, p <sub>2</sub> <0,01 | -                                                      |
| GNC forma nefrotică  | 23,1 $\pm$ 4,73*<br>202,6%                          | 18,2 $\pm$ 2,53<br>159,6 %,<br>p <sub>1</sub> >0,05   | 46,6 $\pm$ 9,99***<br>490,5%                       | 30,3 $\pm$ 3,30***<br>318,9%, p <sub>1</sub> >0,5      |
| GNC forma mixtă      | 30,7 $\pm$ 3,38***<br>269,3 %                       | 12,4 $\pm$ 0,64<br>108,8 %,<br>p <sub>1</sub> <0,001  | 51,8 $\pm$ 8,19***<br>545,3%                       | 24,5 $\pm$ 2,11***<br>257,9%, p <sub>1</sub> <0,01     |
| Control              | 11,4 $\pm$ 0,45                                     |                                                       | 9,5 $\pm$ 0,41                                     |                                                        |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub> – autenticitatea în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare; p<sub>2</sub> – autenticitatea la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Rezultatele prezentate în tabel sugerează prezența modificărilor nivelului IL-1 $\beta$  în urină mai pronunțate la pacienții cu GNC, comparativ cu cei din grupul cu GNA.

La pacienții cu GNA sindrom nefritic în perioada manifestărilor clinice, nivelul IL-1 $\beta$  în urină a crescut de 1,4 ori (până la 15,9 $\pm$ 5,93 pg/mM creatinină), față de 11,4 $\pm$ 0,45 pg/mM creatinină în grupul de control, normalizându-se practic în perioada de remisiune. Totodată, s-au înregistrat valori medii mai mari ale concentrației IL-1 $\beta$  în urină la pacienții cu sindrom nefrotic SR, comparativ cu cei cu sindrom nefrotic SS. Nivelul IL-1 $\beta$  în urină a crescut de 2,8 ori (până la 31,6 $\pm$ 2,94 pg/mM creatinină) la pacienții cu sindrom nefrotic SR în perioada de debut, pe când la cei cu sindrom nefrotic SS a crescut de 1,9 ori (până la 21,9 $\pm$ 1,57 pg/mM creatinină), comparativ cu valorile de control. În perioada remisiunii, în GNA sindromul nefritic nivelul IL-1 $\beta$  în urină s-a redus și practic a atins valorile de control.

În GNC forma mixtă, în perioada acutizării, nivelul IL-1 $\beta$  în urină s-a majorat de 2,7 ori (până la 30,7 $\pm$ 3,38 pg/mM creatinină), pe când în GNC forma nefrotică a crescut de 2,0 ori (până la 23,1 $\pm$ 4,73 pg/mM creatinină), față de 11,4 $\pm$ 0,45 pg/mM creatinină în grupul de control. Totodată, au fost înregistrate corelații negative puternice între nivelul IL-1 $\beta$  și IL-6 ( $r_{xy}$  = -0,731,  $p < 0,01$ ); între nivelul IL-1 $\beta$  și G-S-T ( $r_{xy}$  = -0,999,  $p < 0,001$ ). În perioada remisiunii în GNC forma mixtă nivelul IL-1 $\beta$  în urină a atins nivelul grupului de control, pe când în GNC forma nefrotică, nivelul IL-1 $\beta$  a rămas crescut.

O altă citokină – IL-6, este unul dintre cei mai importanți mediatori ai fazei acute a inflamației. Ea stimulează sinteza hepatică a proteinelor de fază acută, stimulează proliferarea și diferențierea celulelor B și T, intensifică leukopoieza, fiind secretată de mai multe celule.

Din datele expuse în tabelul 4.1 reiese că în GNA sindrom nefritic, în perioada manifestărilor clinice nivelul IL-6 în urină a crescut de 2,1 ori (până la 19,6 $\pm$ 1,04 pg/mM creatinină), față de 9,5 $\pm$ 0,41 pg/mM creatinină în grupul de control. De notat că pacienții cu sindrom nefrotic SR au prezentat valori medii ale IL-6 în urină mult mai mari, comparativ cu cei cu sindrom nefrotic SS. Astfel, nivelul IL-6 în urină a crescut de 4,2 ori (până la 39,7 $\pm$ 2,20 pg/mM creatinină) în sindromul nefrotic SR, perioada de debut, pe când în sindromul nefrotic SS a crescut de 3 ori (până la 28,7 $\pm$ 1,51 pg/mM creatinină), față de 9,5 $\pm$ 0,41 pg/mM creatinină în grupul de control. În perioada remisiunii nivelul IL-6 în urină practic se normalizează în GNA sindromul nefritic, dar se majorează de 6,4 ori în sindromul nefrotic SS, fapt ce indică persistența procesului patologic în rinichi.

Cel mai înalt nivel al IL-6 în urină s-a înregistrat în GNC forma mixtă, perioada de acutizare, în cadrul căreia concentrația citokinei date a crescut de 5,5 ori (până la 51,8 $\pm$ 8,19 pg/mM

creatinină), pe când în GNC forma nefrotică nivelul IL-6 în urină a crescut de 4,9 ori (până la  $46,6 \pm 9,99$  pg/mM creatinină), comparativ cu grupul de control ( $9,5 \pm 0,41$  pg/mM creatinină).

În perioada remisiunii concentrația IL-6 în urină în GNC rămâne crescută, ceea ce indică persistența procesului patologic în rinichi și prezența reabilitării imunobiologice incomplete.

Astfel, cercetările efectuate de noi denotă creșterea nivelului citokinelor proinflamatorii IL-1 $\beta$  și IL-6 la copiii cu GN la diferite etape clinico-evolutive ale maladiei.

Aceste date concordă cu rezultatele unor studii care au pus în evidență nivele crescute de IL-6 în urină la pacienții cu GN mezangial proliferativă [142], precum și la 30-50% dintre pacienții cu nefropatie IgA [174]. În plus, șoarecii transgenici care poartă gena umană IL-6 pot dezvolta glomerulonefrită mezangial proliferativă [326]. Pe de altă parte, IL-6 nu a fost detectată la majoritatea pacienților cu nefropatie membranoasă sau sindrom nefrotic cu modificări minime [75]. Studiile clinice și experimentale din ultimii ani au adus dovezi certe precum că citokinele proinflamatorii IL-1 $\beta$  și IL-6 sunt implicate în fiziopatologia SNI [261]. Referitor la importanța patogenică a tulburărilor depistate, putem menționa că excreția urinară crescută a IL-1 $\beta$  și IL-6 ar putea reflecta producția locală indusă de către celulele glomerulare, mezangiale, celulele endoteliale, dar și de către alte celule ce au infiltrat glomerulii în condiții patologice [244]. Există dovezi că IL-6 și TNF- $\alpha$  pot juca un rol important în proliferarea celulelor mezangiale și epiteliale, precum și infiltrarea glomerulilor cu celule mononucleare în leziunile renale [244].

Conform unor date, IL-6 poate acționa ca o citokină proinflamatorie, care contribuie la activarea excesivă și amplificarea celulelor T și B, accelerează apoptoza celulară și favorizează proliferarea celulelor mezangiale renale. În plus, IL-6 poate lega receptorul IL-6 de la suprafața celulelor mezangiale, stimulând astfel proliferarea lor și acționând ca un factor ce induce expresarea matricei extracelulare și fibrogenza [359]. IL-6 poate stimula, de asemenea, activarea factorilor procoagulanți, ceea ce provoacă trombogeneza vasculară și crește permeabilitatea capilarelor glomerulare și excreția urinară de proteine [198]. Aceste rezultate se află în concordanță cu datele noastre. Pe de altă parte, un important efect al creșterii excreției urinare a IL-6 în asociere cu IL-1 $\beta$  este majorarea numărului de leucocite provenite din două surse: măduva osoasă și leucocitele solitare atașate la celulele endoteliale. Valorile crescute ale numărului de leucocite indică faptul că infiltrația monocitelor și macrofagelor este sursă majoră potențială a citokinelor inflamatorii, în special IL-1 $\beta$ , IL-6 și mai rar din celulele glomerulare rezidente. Expresarea IL-6 în urină și țesuturile renale a fost corelată cu proteinuria în SNSM la animale. Studiile clinice și experimentale din ultimii ani au adus dovezi certe precum că citokinele proinflamatorii IL-1 $\beta$  și IL-6 sunt implicate în fiziopatologia SNI [261].

IL-8 (denumită și CXCL8) este o citokină produsă de mai multe celule, inclusiv macrofage, fibroblaste, celule mezangiale renale, celule tubulare și epiteliale renale, ea fiind implicată în chemotaxia leucocitelor și angiogenează. Rezultatele evaluării concentrației IL-8 în urină la copiii cu GN incluși în studiu sunt prezentate în tabelul 4.2.

S-a constatat că în GNA sindrom nefritic, în perioada manifestărilor clinice, nivelul IL-8 în urină s-a majorat de 1,4 ori, dar aceste modificări s-au dovedit a fi fără relevanță statistică ( $p > 0,05$ ). Totodată, în sindromul nefrotic SR, perioada de debut, s-a înregistrat un nivel crescut al IL-8 în urină ce depășea de 9,5 ori, iar în sindromul nefrotic SS de 4,7 ori, valorile de control. În perioada remisiunii nivelul IL-8 în urină a rămas majorat în toate variantele clinice ale GN, comparativ cu grupul de control.

Tabelul 4.2. Nivelul interleukinelor urinare la copiii cu glomerulonefrită (pg/mM creatinină)

| Grupuri de studiu    | IL-8                                             |                                              | TNF- $\alpha$                               |                                           |
|----------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                      | acutizare                                        | remisiune                                    | acutizare                                   | remisiune                                 |
| GNA sindrom nefritic | 38,1 $\pm$ 4,73<br>135,6%                        | 28,3 $\pm$ 5,02<br>100,7%, $p_1 > 0,05$      | 52,4 $\pm$ 3,77***<br>157,4%                | 33,4 $\pm$ 4,39<br>100,3%, $p_1 < 0,01$   |
| GNA SNSS             | 130,7 $\pm$ 14,28***<br>465,1%                   | 86,0 $\pm$ 8,94***<br>306,04%, $p_1 < 0,05$  | 95,8 $\pm$ 9,85***<br>287,7%                | 59,9 $\pm$ 7,37**<br>179,9%, $p_1 < 0,05$ |
| GNA SNSR             | 267,3 $\pm$ 21,87***<br>951,2%,<br>$p_2 < 0,001$ | -                                            | 135,2 $\pm$ 7,83***<br>406,0%, $p_2 < 0,01$ | 82,3 $\pm$ 10,34<br>247,1%, $p_1 < 0,01$  |
| GNC forma nefrotică  | 291,0 $\pm$ 25,73***<br>1035,6%                  | 102,8 $\pm$ 5,47***<br>365,8%, $p_1 < 0,001$ | 62,3 $\pm$ 5,72***<br>187,1%                | 22,1 $\pm$ 0,78<br>66,4%, $p_1 < 0,001$   |
| Control              | 28,1 $\pm$ 3,71                                  |                                              | 33,3 $\pm$ 2,91                             |                                           |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$  – autenticitatea la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

IL-8 poate induce schimbări în permeabilitatea membranei glomerulare bazale (MBG) prin reducerea sintezei de heparan sulfat și proteoglicani în podocitele de șobolani, ceea ce determină apariția proteinuriei [77].

De asemenea, nivelele serice de IL-8 au fost mai mari în faza de acutizare a SN, comparativ cu faza de remisiune la copiii cu sindrom nefrotic SS, iar concentrațiile urinare ale IL-8 la copiii cu SN au fost corelate cu proteinuria [313].

Menținerea nivelelor ridicate de IL-8 în timpul remisiunii înregistrate în cercetările noastre ar putea fi explicată prin diminuarea clearance-ului urinar sau degradarea lentă a acestei citokine și persistența procesului patologic în rinichi.

Factorul de necroză tumorală alfa (TNF- $\alpha$ ), sau cașectina, este o moleculă de semnalizare celulară implicată în procesele inflamatorii, fiind considerată una dintre citokinele fazei acute a inflamației. Este produsă, în principal, de către macrofagele activate și de multe alte tipuri de celule, cum ar fi leucocitele neutrofile, eozinofilele, limfocitele, etc. TNF- $\alpha$  este un pirogen endogen care induce febra, apoptoza, cașexia, inhibă tumorigeneza și replicarea virală și mediază răspunsul la sepsis, fiind, totodată, implicat într-o varietate de boli umane [77].

Rezultatele evaluării nivelului TNF- $\alpha$  în urină la copiii cu GN sunt prezentate în tabelul 4.2. Din datele expuse rezultă că TNF- $\alpha$  în urină crește în toate loturile de pacienți.

Nivelul TNF- $\alpha$  în urină s-a majorat mai pronunțat în sindromul nefrotic SR perioada de debut, comparativ cu sindromul nefrotic SS. Astfel, nivelul TNF- $\alpha$  în urină a crescut de 4,1 ori în sindromul nefrotic SR și de 2,9 ori în sindromul nefrotic SS, comparativ cu grupul de control, iar în perioada remisiei nivelul TNF- $\alpha$  în urină, deși scade ușor, a rămas la valori majorate în aceste grupuri de pacienți.

În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, de asemenea, s-au înregistrat valori crescute de TNF- $\alpha$  ce depășeau aproape de 2 ori nivelul controlului. În perioada de remisiune indicele dat descrește, fiind cu 33,6% inferior valorilor grupului de control, dar fără relevanță statistică ( $p < 0,001$ ). Astfel, în studiul dat s-au determinat nivele crescute ale moleculelor de semnalizare celulară – interleukinelor, moment semnificativ prin rolul lor major în mecanismul imunopatogenic al proteinuriei în SN.

În continuarea cercetărilor pentru elucidarea perturbărilor în sistemul de semnalizare celulară am evaluat dinamica chemokinelor urinare la pacienții cu GN la diferite etape clinico-evolutive ale maladiei (tabelele 4.3, 4.4). Au fost evaluate următoarele chemokine urinare: MCP-1, MIP-1, CDF-1, CD 40.

Proteina monocitară chemoattractantă 1 (MCP-1), denumită și chemokina (C-C motif), ligand 2 (CCL2) este o citokină cu masa moleculară mică care aparține familiei chemokinelor CC. MCP-1 recrutează monocite, celule T și celulele dendritice la locul inflamației produse prin leziuni tisulare sau infecție [182].

Rezultatele obținute indică o creștere statistic autentică a nivelului MCP-1 în urină în toate grupurile de pacienți, comparativ cu grupul de control, cele mai înalte valori fiind înregistrate la copiii cu GNC forma nefrotică și în GNC forma mixtă (tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Nivelul chemokinelor MCP-1 și MIP-1 $\alpha$  în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu   | MCP-1(pg/mM creatinină)         |                                                        | MIP-1 $\alpha$ (ng/mM creatinină)                                |                                           |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                     | acutizare                       | remisiune                                              | acutizare                                                        | remisiune                                 |
| GNA SNSS            | 108,02 $\pm$ 8,78**<br>212,1%   | 121,88 $\pm$ 7,26**<br>239,3%                          | 0,48 $\pm$ 0,08<br>p <sub>3</sub> <0,001                         | 0,16 $\pm$ 0,017<br>p <sub>1</sub> <0,05  |
| GNA SNSR            | 96,99 $\pm$ 7,63***<br>190,4%   | 112,13 $\pm$ 6,88**<br>220,2%                          | 1,28 $\pm$ 0,09<br>p <sub>2</sub> <0,01;<br>p <sub>3</sub> <0,01 | 0,30 $\pm$ 0,080<br>p <sub>1</sub> <0,01  |
| GNC forma nefrotică | 170,32 $\pm$ 12,01***<br>334,4% | 93,21 $\pm$ 8,43**<br>183,01%,<br>p <sub>1</sub> <0,01 | 2,36 $\pm$ 0,21                                                  | 0,50 $\pm$ 0,059<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| GNC forma mixtă     | 430,76 $\pm$ 49,73<br>845,8%    | 122,49 $\pm$ 15,97*<br>240,5%,<br>p <sub>1</sub> <0,01 | 7,58 $\pm$ 2,72                                                  | -                                         |
| Control             | 50,93 $\pm$ 3,79                |                                                        | 0,0                                                              |                                           |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub>–autenticitatea în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare; p<sub>2</sub>–autenticitatea la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR; p<sub>3</sub>- autenticitatea la compararea GNC forma nefrotică cu SNSS și SNSR.

Concentrația MCP-1 în urină în grupurile de pacienți cu sindrom nefrotic SS și sindrom nefrotic SR, atât în perioada manifestărilor clinice, cât și în perioada de remisiune depășea de 2,0 - 2,4 ori valorile grupului de control. Totodată, diferențele valorilor medii ale MCP-1 în perioadele de acutizare și de remisiune nu au atins pragul semnificației statistice, cu toate că acestea păreau să fie mai înalte în faza de remisiune, comparativ cu perioada manifestărilor clinice. De notat că grupul de pacienți cu sindrom nefrotic SS a prezentat valori medii ale MCP1 în urină mai mari, comparativ cu cei din grupul cu sindrom nefrotic SR, dar fără a atinge pragul semnificației statistice.

În loturile de pacienți cu GNC forma nefrotică și în GNC forma mixtă în perioada acutizării, concentrația MCP-1 în urină s-a majorat de 3,3 ori și, respectiv de 8,5 ori, comparativ cu grupul de control. În perioada remisiunii în grupele de pacienți cu GNC concentrația MCP-1 în urină rămâne a fi sporită, ceea ce denotă persistența procesului cronic renal și lipsa unei recuperări imunobiochimice complete [9].

Totodată în GNC formă nefrotică perioada de acutizare s-au semnalat corelații pozitive puternice între concentrațiile MCP-1 și FGF- $\beta$  ( $r_{xy}=0,810$ ,  $p<0,001$ ) și corelații indirecte medii între MCP-1 și isoprostan-8 ( $r_{xy} = - 0,565$ ,  $p<0,05$ ) (figura 4.1).

În GNC formă mixtă, perioada de acutizare, au fost stabilite corelații foarte puternice indirecte negative între MIP-1 $\alpha$  și MCP-1 ( $r_{xy} = - 1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și IL-1 $\beta$  ( $r_{xy} = - 1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și IL-6 ( $r_{xy} = - 1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și VEGF ( $r_{xy} = - 1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = - 1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și CTGF  $r_{xy} = - (1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și isoprostan-8 ( $r_{xy} = - 1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și PPOA ( $r_{xy} = - 1,0$ ,  $p<0,001$ ), care demonstrează implicarea chemokinelor studiate în procesele de fibrozare renală.

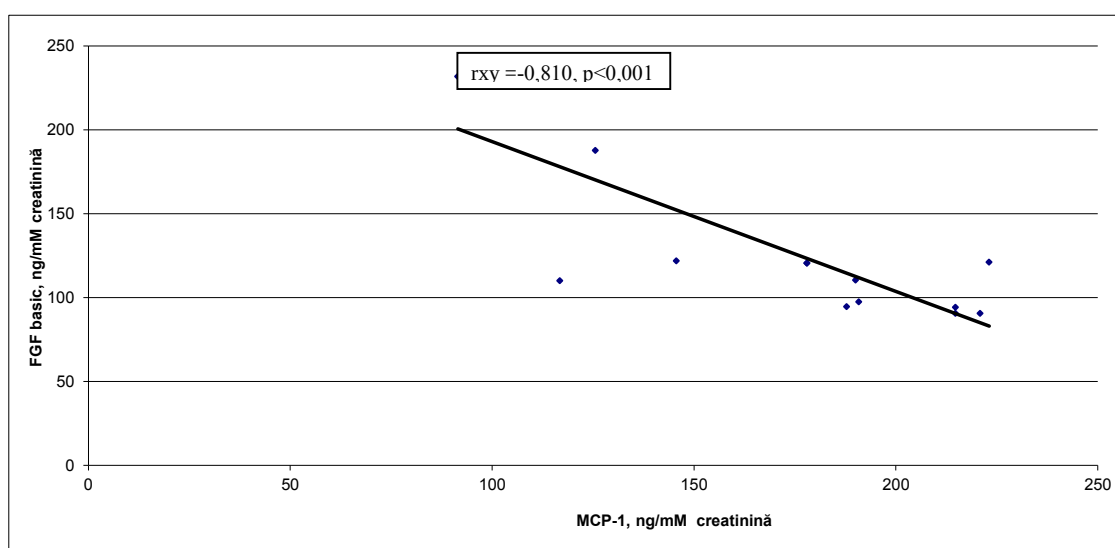


Figura 4.1. Corelația între concentrațiile MCP-1 și FGF- $\beta$  în urină în GNC forma nefrotică perioada de acutizare.

Creșterea importantă a MCP-1 constatată de noi la copiii cu GNC forma nefrotică și cea mixtă ar putea deține un rol important în dezvoltarea și progresarea nefrosclerozei la acești pacienți.

Rezultate similare au obținut un șir de cercetători. Astfel, I.N.Bobkova și coautorii au înregistrat, de asemenea, creșterea excreției urinare a MCP-1/CCL2 la pacienții cu GNC, comparativ cu grupul de control [53].

Nivele ridicate ale MCP-1 în urină au fost depistate în glomeruloscleroza focală segmentară, nefrita lupică și IgA nefropatia. Nivelul crescut al MCP-1 în urină, probabil, indică prezența injuriei glomerulare la acești pacienți.

Concentrația MCP-1 în urină a fost mai înaltă la pacienții cu forme proliferative ale glomerulonefritei, comparativ cu formele non proliferative [355].



Asocierea dintre nivelele MCP-1/CCL2 și bolile glomerulare poate fi legată nu numai de leziunea glomerulară, dar și de bolile asociate [21, 40]. Astfel, unele studii demonstrează că nivelele urinare ale MCP-1/CCL2 corelează pozitiv cu nivelele serice ale colesterolului și trigliceridelor numai la pacienții cu boli glomerulare. Prin urmare, MCP-1/CCL2 poate fi produsă în țesutul adipos și/sau celulele inflamatorii, atingând nivele crescute la pacienții cu dislipidemie.

Conform datelor literaturii de specialitate, MCP-1 contribuie la instalarea insulinorezistenței și promovează absorbția de acizi grași liberi, aterogeneza și trombogeneza, efecte care pot afecta direct sau indirect structura și funcția renală [347]. Aceste date sugerează faptul că eliberarea de MCP-1/CCL2 în țesutul renal ar putea fi legată de dislipidemie în bolile glomerulare.

Proteina monocitară inflamatorie-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) este o chemokină ce aparține familiei de chemokine chemotaxice, fiind produsă de macrofage după stimularea lor cu endotoxine bacteriene. Ei îi revine un rol crucial în răspunsul imun contra infecțiilor și inflamației.

În acest studiu am obținut nivele semnificativ sporite ale MIP-1 $\alpha$  în urină în toate loturile de pacienți în perioada acutizării, comparativ cu perioada remisiunii. Nivelul MIP-1 $\alpha$  în urină s-a majorat de 2,7 ori în grupul de pacienți cu GNA sindrom nefrotic SR, comparativ cu GNA sindrom nefrotic SS în perioada manifestărilor clinice.

În lotul de pacienți cu GNC forma nefrotică, perioada acutizării, concentrația MIP-1 $\alpha$  în urină depășea de 4,9 ori nivelul acestui indice înregistrat la pacienții cu sindrom nefrotic SS și de 1,8 ori, la pacienții cu sindrom nefrotic SR [8].

În lotul de pacienți cu GNC forma nefrotică în perioada acutizării au fost semnalate corelații indirecte puternice între MIP-1 $\alpha$  și MCP-1 ( $r_{xy} = -0,774$ ,  $p < 0,01$ ); corelații puternice pozitive între MIP-1 $\alpha$  și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = 0,848$ ,  $p < 0,001$ ); corelații directe medii între MIP-1 $\alpha$  și PPOA ( $r_{xy} = 0,551$ ,  $p < 0,05$ ), care confirmă implicarea lor în procesele de fibrozare renală (figura 4.2).

Rezultatele obținute de noi se află în concordanță cu datele unor studii care au demonstrat că nivelele urinare de MIP-1 $\alpha$  și MIP-1 $\beta$  sunt crescute în glomerulonefrita cu semilune, comparativ cu pacienții cu alte boli renale sau cu subiecții sănătoși [352].

Expresia crescută a MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  și MCP-1 în glomerulii cu semilune celulare și fibrocelulare sugerează că aceste chemokine pot fi implicate în progresarea semilunelor adițional cu recrutarea macrofagelor. S-a constatat, că MIP-1 $\alpha$  poate promova în mod specific și genera infiltrarea glomerulară cu macrofage în procesul acut care duce la formarea de semilune celulare.

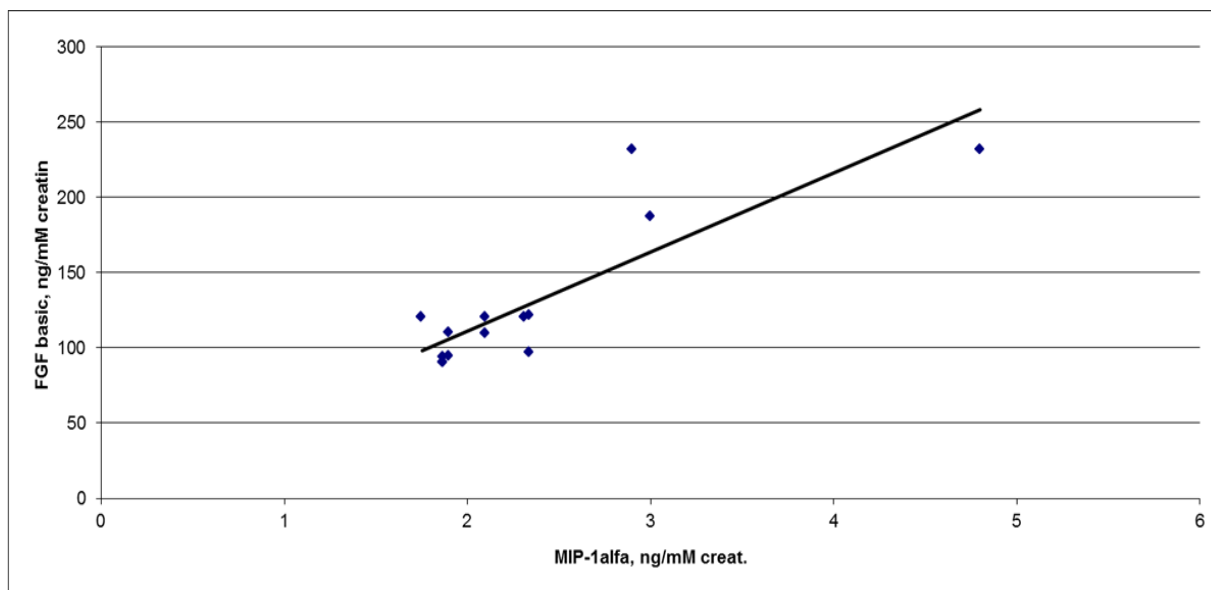


Figura 4.2. Corelația între nivelele MIP-1 și FGF- $\beta$  în urină în GNC forma nefrotică perioada de acutizare.

MIP-1 $\alpha$  poate participa în mod special în fazele acute ale dezvoltării leziunii glomerulare în timpul formării semilunelor celulare, iar existența receptorilor de chemokine poate confirma rolul funcțional al MIP-1 $\alpha$  în medierea chemotaxisului CCR5-dependent în leziunile glomerulare la pacienții cu glomerulonefrită cu semilune [213].

Astfel, MIP-1 $\alpha$  induce eliberarea de enzime lizosomale și generează producerea de anioni superoxizi macrofagali, adițional funcției de chemoatractant pentru celulele macrofagale. Implicarea enzimelor lizosomale, oxidului nitric (NO) și speciilor reactive de oxigen (SRO) produse de către macrofage ar putea juca un rol esențial în inducerea injuriei renale. În plus, MIP-1 $\alpha$  induce sinteza și eliberarea citokinelor proinflamatorii, cum ar fi IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  din macrofage.

MIP-1 $\alpha$  poate fi implicată în patogenia GN prin recrutarea celulelor macrofagale și activarea lor prin mecanismul dependent de chemokine, iar determinarea nivelelor urinare ale MIP-1 $\alpha$  poate fi utilă pentru monitorizarea procesului patologic și pentru prognosticul maladiei.

Factorul derivat din celula stromală-1 – stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), cunoscut de asemenea sub numele de C-X-C motif chemokină 12 (CXCL12), este o chemokină expresată ubicuitar în multe țesuturi și tipuri de celule, inclusiv rinichi, fiind indusă de mai mulți stimuli proinflamatori, cum ar fi lipopolizaharide, TNF- $\alpha$  și IL-1 [196].

După cum relevă datele expuse în tabelul 4.4, nivelul SDF-1 în urină a crescut de 4,5 -4,2 ori (până la  $3,13 \pm 0,96$  ng/mM creatinină) în sindromul nefrotic SS și sindromul nefrotic SR, față de ( $0,69 \pm 0,16$  ng/mM creatinină) în grupul de control.

Tabelul 4.4. Nivelul chemokinelor SDF-1 și CD 40 în urină la copii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | SDF-1(ng/mM creatinină) |                     | CD 40(ng/mM creatinină) |                                           |
|----------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------------------------|
|                      | acutizare               | remisiune           | acutizare               | remisiune                                 |
| GNA sindrom nefritic | 0,70±0,13<br>101,4%     | 1,16±0,10<br>168,1% | 57,1±10,86<br>115,8%    | 60,7±1,41<br>123,1%, p <sub>1</sub> >0,05 |
| GNA SNSS             | 3,13±0,96***<br>453,6%  | 1,04±0,16<br>150,7% | 161,2±43,33**<br>327,0% | 70,0±8,89<br>142,0%, p <sub>1</sub> <0,01 |
| GNA SNSR             | 2,92±0,62***<br>423,2%  | -                   | 120,2±34,24**<br>243,8% | 78,1±9,24<br>158,4%, p <sub>1</sub> >0,05 |
| GNC forma nefrotică  | 1,22±0,16**<br>176,8%   | 0,35±0,05<br>50,7%  | 51,1±5,21<br>103,7%     | 27,0±2,83<br>54,8%, p <sub>1</sub> <0,01  |
| Control              | 0,69±0,16               |                     | 49,3±35,39              |                                           |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub>–autenticitatea în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare.

În GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, nivelul SDF-1 în urină practic nu s-a modificat, pe când în perioada remisiunii nivelul SDF-1 a crescut de 1,7 ori (până la 1,16±0,10 pg/mM creatinină), față de valorile grupului de control.

În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare s-a atestat o creștere de 1,8 ori (până la 1,22±0,16 pg/mM creatinină) a nivelului SDF-1 în urină, și o reducere practic de 2 ori (până la 0,35±0,05 ng/mM creatinină) în perioada remisiunii, față de 0,69±0,16 ng/mM creatinină în grupul de control. În același timp au fost depistate corelații pozitive puternice între SDF-1 și CD-40 ( $r_{xy}=0,989$ ,  $p<0,001$ ); între SDF-1 și TNF- $\alpha$  ( $r_{xy}=0,940$ ,  $p<0,001$ ).

Studiile din ultimii ani au adus tot mai multe dovezi despre rolul esențial al semnalizării SDF-1 / CXCR4 în menținerea integrității microvasculare și păstrarea funcției renale în BRC. CXCR-4 este receptorul factorului derivat din celula stromală-1 (SDF-1) și reprezintă o moleculă înzestrată cu o activitate chemotactică puternică pentru limfocite.

Un șir de cercetători au investigat modelul de exprimare și funcțiile sistemului SDF-1/CXCR4 în rinichii normali, precum și după ischemie/reperfuzie indusă de insuficiența renală acută.

Rezultatele obținute au demonstrat că SDF-1 (denumit și CXCL12) renal reprezintă un mediator important al migrării celulelor-CXCR4 pozitive în rinichii afectați de procesul patologic. Mai mult decât atât, aceste date indică faptul că SDF-1 este un factor major implicat în reparația rinichilor prin recrutarea de celule implicate în regenerare, inclusiv celulele endoteliale precursorale și celulele stem progenitoare [318, 335].

SDF-1 (CXCL12) susține integritatea vasculară, similar VEGF, el induce angiogeneza, promovează supraviețuirea celulară [368]. În acest sens SDF-1 (CXCL12) s-a dovedit a fi un mediator important al reparației în diverse maladii, cum ar fi diabetul zaharat de tip 1 [291] și insuficiența renală acută ischemică [196, 335].

Unele studii experimentale au demonstrat că SDF-1 se produce în mod constitutiv în podocite și că blocarea temporară a SDF-1 (CXCL12) previne progresia glomerulosclerozei și proteinuria în modelul experimental de diabet zaharat de tip 2. Aceste date demonstrează elocvent faptul că SDF-1 (CXCL12) joacă un rol patogenic în glomeruloscleroza indusă de diabetul zaharat și că podocitele glomerulare sunt o sursă importantă a acestei chemokine [291, 374].

Printre moleculele de semnalizare implicate în dezvoltarea reacțiilor imune și a inflamației, un loc important revine sistemului de receptori CD40-CD40 ligand (CD40-CD40L). Expresarea CD40 și / sau CD40L a fost detectată în limfocite, monocite, trombocite, celulele endoteliale și musculare netede, fibroblaste, adipocite și alte tipuri de celule. CD40-CD40 L este implicat în formarea răspunsurilor imunoinflamatorii, trombogeneză și boli autoimune [274].

Din datele tabelului 4.4 rezultă că, atât în perioada de debut în sindromul nefrotic SS, cât și în sindromul nefrotic SR, are loc o creștere marcantă a nivelului CD-40 în urină, ce depășea de 3,3-2,4 ori valorile înregistrate în grupul de control.

În perioada de remisiune se înregistrează restabilirea parțială a indicelui dat, fapt ce demonstrează persistența procesului patologic renal.

Totodată, nivelul CD-40 în urină corelează puternic printr-o legătură directă cu concentrația de PDGF ( $r_{xy}=0,751$ ,  $p<0,05$ ). Determinarea expresiei CD-40 în celule (limfocite, monocite, adipocite) și a nivelelor de CD-40 în fluidele biologice (sânge și urină) pot fi utilizate pentru diagnosticul și prognosticul proceselor inflamatorii în GN și al complicațiilor acesteia.

Se știe că interacțiunea dintre CD-40 și ligandul CD-40 (CD-40L) mărește expresia citokinelor, chemokinelor, metaloproteinazelor matriceale, factorilor de creștere și moleculelor de adeziune, în principal, prin stimularea factorului nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), participând astfel în numeroase căi inflamatorii, contribuind la dezvoltarea mai multor procese patofiziologice [106].

Conform unor studii, interacțiunile CD40-CD40L pot ameliora angiogeneza indusă de factorul vascular endotelial de creștere (VEGF) și migrarea celulelor endoteliale. De asemenea, CD40-CD40L sunt implicate în reglarea semnalizării proceselor cu radicali liberi de oxigen, ceea ce ar putea facilita dezvoltarea unor metode de medicație a diverselor boli inflamatorii [274].

După cum se știe, inhibitorii HMG-CoA reductazei (statinele), inhibitorii agregării trombocitelor (acid acetilsalicilic, clopidogrel) pot inhiba activitatea sistemului CD40-CD40L.

Studii suplimentare privind corecția farmacologică pot deveni baza pentru dezvoltarea unor noi abordări terapeutice pentru tratamentul GN și al complicațiilor acesteia.

Sistemul endotelinic se implică activ în mecanismele patogenetice ale afecțiunilor renale, fapt ce ne-a determinat să efectuăm un studiu detaliat vizând particularitățile modificărilor ET-1 în urină la copii cu diferite variante clinico-evolutive ale GN.

Rezultatele expuse în tabelul 4.5 relevă creșterea de 1,6 ori a nivelului ET-1 în urină în sindromul nefrotic SS în perioada manifestărilor clinice și de 1,8 ori în sindromul nefrotic SR, comparativ cu grupul de control. În același timp, schimbări esențiale ale concentrației ET-1 în urină la compararea loturilor de pacienți cu sindrom nefrotic SS și sindrom nefrotic SR atât în perioada de acutizare, cât și de remisiune nu au fost depistate. În perioada remisiunii s-a înregistrat reducerea importantă a valorilor ET-1 în urină, constatându-se, în același timp, nu doar revenirea în cadrul normal, dar și diminuarea acestui indice cu 8%-20%, însă fără relevanță statistică.

Tabelul 4.5. Nivelul endotelinei urinare la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | Endotelina-1, ng/ml                       |        |                                                              |       |
|----------------------|-------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------|-------|
|                      | acutizare                                 | %      | remisiune                                                    | %     |
| GNA sindrom nefritic | 139,1±12,08 **                            | 168,6  | 71,0±5,08<br>p <sub>1</sub> <0,001                           | 86,1  |
| GNA SNSS             | 130,4±7,35**<br>p <sub>2</sub> >0,05      | 158,1  | 66,1±5,41<br>p <sub>1</sub> <0,001                           | 80,1  |
| GNA SNSR             | 147,6±16,65*<br>p <sub>2</sub> >0,05      | 179,0  | 75,9±4,71<br>p <sub>1</sub> <0,01; p <sub>2</sub> >0,05      | 92,0  |
| GNC forma mixtă      | 1391,6±241,95***<br>p <sub>3</sub> <0,001 | 1686,8 | 670,1±54,74***<br>p <sub>1</sub> <0,05; p <sub>3</sub> <0,01 | 812,2 |
| Control              | 82,5±6,72 (100%)                          |        |                                                              |       |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub>–autenticitatea în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare; p<sub>2</sub>–autenticitatea la compararea sindromului nefrotic SR cu sindromul nefrotic SS; p<sub>3</sub>–autenticitatea la compararea GNC cu GNA SN.

În acest studiu am obținut nivele semnificativ sporite ale concentrației ET-1 în urină la copiii cu diferite variante ale GN în perioada de acutizare și de remisiune, cele mai înalte valori fiind înregistrate la copiii cu GNC forma mixtă, la care a fost indentificată o creștere marcantă, de 16,9 ori, a concentrației ET-1 în urină în perioada acutizării, comparativ cu grupul de control, și care depășea de 10 ori nivelul grupului cu GNA sindrom nefritic.

În perioada remisiunii a avut loc o diminuare notabilă, aproape dublă a ET-1 la pacienții cu forma mixtă a GNC, dar care a rămas crescută depășind de 8,1 ori nivelul grupului martor și de 9,4 ori valorile acestui indice, comparativ cu GNA sindrom nefritic [86].

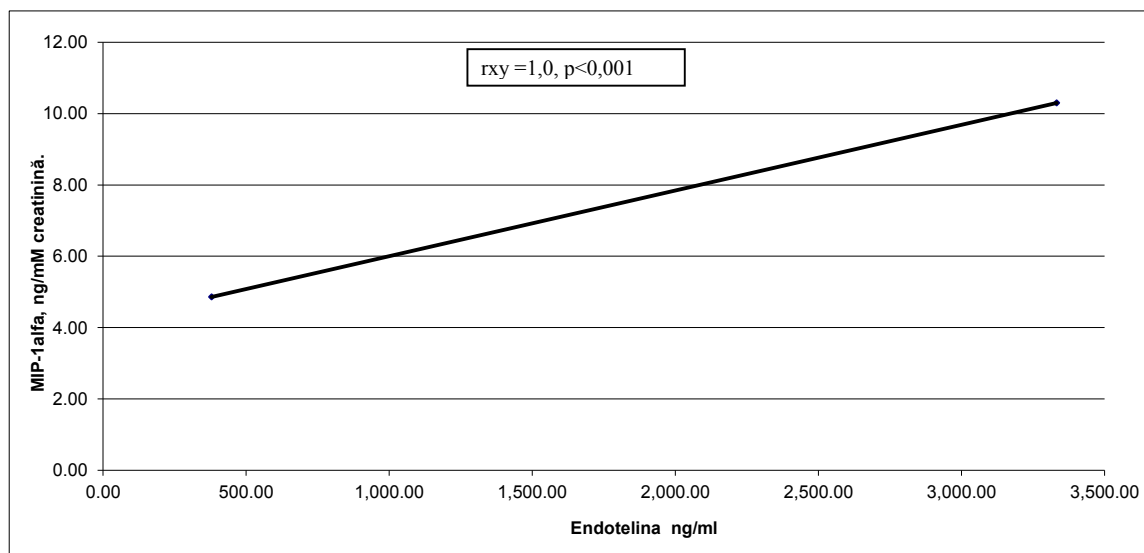


Figura 4.3. Corelația între nivelul endotelinei-1 și MIP-1 $\alpha$  în urină în GNC forma mixtă, perioada de acutizare.

În GNC forma mixtă, perioada de acutizare, s-au semnalat corelații directe foarte puternice între nivelul endotelinei-1 și MIP-1 $\alpha$  ( $r_{xy}=1,000$ ,  $p<0,001$ ); între nivelul endotelinei-1 și MCP ( $r_{xy}=0,791$ ,  $p<0,01$ ), fapt ce ar putea contribui la progresarea procesului patologic în rinichi în GN la copii (figura 4.3).

În GNC, perioada remisiunii tratamentul aplicat s-a soldat cu diminuarea notabilă a endotelinei în urină, dar care n-a atins indicii martorului, ceea ce sugerează că remisiunea este incompletă, cura de tratament, doar parțial, contribuie la eliminarea dereglărilor nivelului ET-1.

Creșterea nivelului ET-1 în urină la copiii cu GN indică activarea sintezei acestei peptide de către elementele structurale renale. Sinteza renală a ET-1 poate fi stimulată de citokine, factorii de creștere, chemokine, factorii vasoactivi, hormoni, specii reactive ale oxigenului, colesterol și de alte substanțe. Însuși excesul de proteine alimentare, supraîncărcarea cu proteine stimulează producția de ET-1 de către tubii proximali renali, fapt ce poate fi de importanță critică în progresarea bolilor renale. În plus, ET-1 poate induce reducerea nefrinei de către podocite, care se consideră principala cauză a proteinuriei [41].

După cum s-a menționat anterior, vasoconstricția renală puternică ar putea contribui la scăderea fluxului sangvin și a RFG, de asemenea, ET-1 crește stresul oxidativ și inflamația în rinichi [109].

Studii din ultimii ani au adus tot mai multe dovezi experimentale și clinice că ET-1, acționând primar prin receptorul endotelinei, poate juca un rol important în dezvoltarea proteinuriei, leziunilor glomerulare, fibrozei și inflamației, iar folosirea antagoniștilor receptorilor ET poate încetini progresia bolii renale în primul rând prin reducerea tensiunii arteriale și proteinuriei [93].

Într-un studiu preclinic recent Tobe S. și coautorii aduce dovezi consistente privind utilizarea antagoniștilor ET pentru tratamentul maladiilor renale, în general, și nefropatia diabetică, în particular [334].

Nivelele ET-1 în urină mai scăzute în sindromul nefrotic SS și sindromul nefrotic SR în remisiune, comparativ cu perioada de acutizare cu reducerea indicilor clinico-paraclinici (rezoluția edemelor, proteinuriei, normalizarea albuminemiei) stabilite în cercetările noastre, se datorează tratamentului efectuat ce a inclus steroizi, imunosupresoare și administrarea preparatelor IECA. Aceste date se află în concordanță cu rezultatele unor explorări. Astfel, Barton M. și coautorii [43] a stabilit că mai multe medicamente antiproteinurice, incluzând IECA, antagoniști ai receptorilor angiotensinei, statine și anumite blocante ale canalelor de calciu, inhibă formarea endotelinei-1. Studii clinice au arătat ca inhibitori ai SRAA, cum ar fi IECA sau BRA, încetinesc progresia BRC. Prin mecanismele lor de acțiune, în special, independente de presiune, aceste medicamente nu numai că întârzie progresia injuriei glomerulare, dar și pot chiar inversa proteinuria la pacienții cu maladii cronice proteinurice [43, 267].

Pe de altă parte, studiile preclinice au demonstrat că antagoniștii receptorilor endotelinei pot inversa boala proteinurică renală și glomeruloscleroza, iar studiile preliminare la oameni cu boli renale au arătat că aceste medicamente au efecte antiproteinurice remarcabile, care sunt aditive celor ale terapiei antiproteinurice standard [43].

Determinarea nivelului endotelinei în urină reprezintă un marker important cu rol cardinal în dezvoltarea proteinuriei, injuriei podocitelor, având un semn distinctiv în maladiile proteinurice, care precede dezvoltarea glomerulosclerozei, fibrozei și progresia BRC.

Rezultatele studiului nostru relevă importanța clinico-diagnostică a determinării concentrației moleculelor de semnalizare celulară în urină pentru diagnosticul precoce al afectării renale la copiii cu GN, notând o creștere semnificativă a concentrațiilor urinare a acestora. Determinarea concentrațiilor urinare ale moleculelor de semnalizare celulară poate fi utilă ca o metodă noninvazivă predictivă pentru estimarea activității maladiei și monitorizarea evoluției bolii la copiii cu diferite variante ale GN, precum și pentru elaborarea unor strategii terapeutice eficiente și, eventual, diferențiate la acești pacienți.

#### 4.2. Valoarea diagnostică a factorilor de creștere în patogenia glomerulonefritei la copii

Progresia glomerulonefritei la copii este determinată de creșterea nivelului factorilor de creștere, care participă direct în unele verigi patogenice ale GN la copii. Studiul de față a vizat cercetarea factorilor de creștere (VEGF, PDGF, FGF- $\beta$ , CTGF) în urină la diferite etape clinico-evolutive ale maladii. Datele despre dinamica factorilor de creștere în urină la copiii cu GN sunt prezentate în tabelele 4.6-4.7.

Tabelul 4.6. Nivelul factorilor de creștere VEGF și FGF- $\beta$  în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu   | VEGF<br>(ng/mM creatinină)                   |                                               | FGF- $\beta$<br>(ng/mM creatinină)               |                                                             |
|---------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                     | acutizare                                    | remisiune                                     | acutizare                                        | remisiune                                                   |
| GNA SNSS            | 51,8 $\pm$ 6,24<br>150,6%                    | 30,6 $\pm$ 1,02<br>89,0%, $p_1 < 0,05$        | 25,0 $\pm$ 1,24**<br>142,04%                     | 16,4 $\pm$ 0,975<br>93,2%, $p_1 < 0,001$                    |
| GNA SNSR            | 108,6 $\pm$ 6,43***<br>315,7%, $p_2 < 0,01$  | 44,6 $\pm$ 9,90<br>129,7%,<br>$p_1 < 0,001$   | 43,8 $\pm$ 4,91***<br>248,9%,<br>$p_2 < 0,05$    | 24,5 $\pm$ 1,87<br>139,2%,<br>$p_1 < 0,01$ ; $p_2 < 0,01$   |
| GNC forma nefrotică | 90,2 $\pm$ 6,65***<br>262,2%                 | 59,3 $\pm$ 5,61**<br>172,4%, $p_1 < 0,01$     | 130,2 $\pm$ 13,23***<br>739,8%,<br>$p_3 < 0,001$ | 63,6 $\pm$ 5,21<br>361,4%,<br>$p_1 < 0,001$ ; $p_3 < 0,001$ |
| GNC forma mixtă     | 155,7 $\pm$ 18,02***<br>452,6%, $p_3 < 0,01$ | 71,0 $\pm$ 9,58**<br>206,4%,<br>$p_1 < 0,001$ | 162,5 $\pm$ 9,73***<br>923,3%,<br>$p_3 < 0,001$  | 36,3 $\pm$ 4,17<br>206,3%,<br>$p_1 < 0,001$ ; $p_3 < 0,01$  |
| Control             | 34,4 $\pm$ 2,32                              |                                               | 17,6 $\pm$ 0,76                                  |                                                             |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$ –autenticitatea indicelor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$ –autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR;  $p_3$ – autenticitatea indicilor la compararea GNC forma nefrotică cu GNC forma mixtă.

Rezultatele obținute indică existența unui nivel crescut de VEGF în urină în toate grupurile de pacienți cu GN în perioada acutizării maladii. Totodată, în perioada remisiunii s-a constatat reducerea nivelului VEGF cu revenirea până la valori normale doar în cazul sindromului nefrotic SS și sindromului nefrotic SR.

Rezultatele expuse în tabelul 4.6 relevă că nivelul VEGF în urină la copiii cu sindrom nefrotic SS în perioada manifestărilor clinice a crescut de 1,5 ori, dar aceste modificări au fost fără relevanță statistică, pe când la pacienții cu sindrom nefrotic SR acest nivel s-a majorat semnificativ de 3,2 ori, comparativ cu grupul de control.

În perioada remisiunii la pacienții cu sindrom nefrotic SS și sindrom nefrotic SR nivelul citokinei în cauză nu diferă de valorile martorului. Pentru grupul cu GNC forma nefrotică în



perioada acutizării maladii concentrația VEGF în urină a crescut de 2,6 ori față de valorile martorului [85]. Totodată, a fost indentificată o creștere semnificativă, de 4,5 ori, a nivelului VEGF în urină la pacienții cu GNC forma mixtă în perioada acutizării maladii, care a corelat cu IL-6 ( $r_{xy} = -0,642$ ,  $p < 0,05$ ). În perioada remisiunii nivelul VEGF în urină continuă să fie majorat în ambele grupuri cu GNC, față de valorile de control, deși a scăzut veridic în raport cu faza de acutizare.

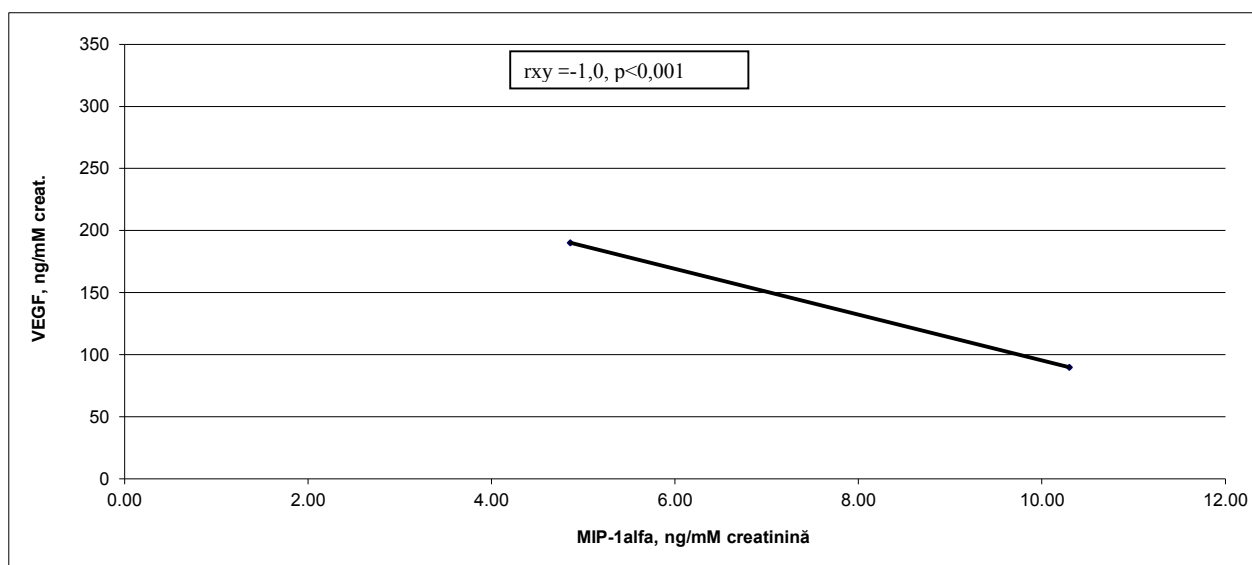


Figura 4.4. Corelații între nivelele VEGF și MIP-1 $\alpha$  în urină la copiii cu GNC forma mixtă în perioada de acutizare

Creșterea concentrațiilor VEGF în urina copiilor cu diferite variante ale GN stabilite de noi sunt, fără îndoială, unul dintre factorii care contribuie la dezvoltarea și progresia acestei boli. Rezultate similare au evidențiat și alți cercetători. Astfel, Matsumoto K. și Kanmatsuse K. au atestat nivele de VEGF urinare majorate la pacienții cu sindrom nefrotic cu schimbări minime și la pacienții cu IgAN cu SN, comparativ cu pacienții fără SN și grupul martor și care, totodată, au corelat cu gradul de proteinurie. Rezultatele cercetării denotă că nivelele de VEGF urinare au scăzut treptat după terapia cu steroizi [211].

VEGF poate juca roluri atât benefice cât și dăunătoare în bolile renale. Astfel, procesele de angiogeneză afectată și scăderea expresiei VEGF au fost recent documentate în modelul de rinichi restant în cazul insuficienței renale progresive, iar tratamentul cu VEGF reduce fibroza și stabilizează funcția renală [175].

În timp ce VEGF este considerat un factor important de creștere pentru menținerea integrității capilare glomerulare și a funcției, creșterea acțiunii VEGF în boala renală diabetică

poate avea consecințe negative [226]. Studiile sugerează că efectele VEGF sunt amplificate de instalarea disfuncției endoteliale și de către nivelele reduse de oxid nitric (NO), care reprezintă o caracteristică comună în diabet. Insuficiența de NO poate amplifica efectele VEGF pentru a induce inflamație (prin efecte asupra macrofagelor) și poate provoca tulburări ale vascularizației, agravând caracteristicile bolii renale diabetice [324].

Complexitatea acțiunii VEGF-A în boala renală ar putea fi parțial reprezentată de rolurile distincte ale celor doi receptori ai săi: VEGFR1 este implicat în răspunsurile inflamatorii, în timp ce VEGFR2 mediază predominant angiogeneza [127, 211]. Deoarece BRC nediabetică este asociată cu pierderea capilară, s-a emis ipoteza că stimularea selectivă a VEGFR2 ar putea fi benefică. Cu toate acestea, activarea VEGFR2 poate fi dăunătoare în prezența deficienței de NO și prestimularea VEGFR2, în acest caz, poate fi potențiată o afectare renală ulterioară [289].

Constatarea excreției urinare crescute a regulatorului angiogenezei VEGF-A și asocierea cu cea a markerilor leziunilor renale la pacienții cu forme proteinurice ale GNC sugerează că această excreție poate fi considerată ca un indice integral, care indică un prejudiciu glomerular și denotă remodelarea/ hipoxică, tubulointerstițială proteinurică [309].

Totodată, mecanismele care controlează eliberarea și activitatea VEGF în bolile renale acute și cronice și care asigură modularea daunelor induse de acest factor rămân insuficient clarificate, fapt ce dictează necesitatea continuării studiilor în această direcție.

Factorul de creștere fibroblastic-beta (FGF- $\beta$ ) este o peptidă de legare a heparinei, care după eliberarea din celulele endoteliale lezate stimulează angiogeneza, neovascularizarea și creșterea țesutului renal.

Conform datelor tabelului 4.6, nivelul FGF- $\beta$  în urină era crescut în toate loturile de pacienți, mai pronunțat în variantele cronice ale bolii comparativ cu cele acute. De notat, că în sindromul nefrotic SR nivelul FGF- $\beta$  în urină a fost mai înalt, față de cel înregistrat în sindromul nefrotic SS. Astfel, în sindromul nefrotic SR, perioada de debut, nivelul FGF- $\beta$  în urină a crescut de 2,5 ori (până la  $43,76 \pm 4,91$  ng/mM creatinină), pe când în sindromul nefrotic SS a crescut doar de 1,4 ori (până la  $25,0 \pm 1,24$  ng/mM creatinină), față de  $17,6 \pm 0,76$  ng/mM creatinină în grupul de control.

În GNC forma mixtă perioada de acutizare, concentrația FGF- $\beta$  în urină a sporit semnificativ – 9,2 ori (până la  $162,5 \pm 9,73$  ng/mM creatinină), pe când în GNC forma nefrotică a crescut de – 7,4 ori (până la  $130,2 \pm 13,23$  ng/mM creatinină), față de valorile grupului de control. În perioada remisiunii în ambele grupuri nivelul FGF- $\beta$  în urină rămâne înalt, deși s-a redus de 2 ori și mai mult în raport cu perioada manifestărilor clinice [393].

În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, s-au stabilit corelații directe de intensitate medie între nivelul FGF- $\beta$  și suma NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> ( $r_{xy}=0,565$ ,  $p<0,05$ ); între nivelul FGF- $\beta$  și NO<sub>3</sub> ( $r_{xy}=0,546$ ,  $p<0,05$ ), iar în GNC forma mixtă FGF- $\beta$  a corelat cu nivelul CTGF ( $r_{xy}=0,655$ ,  $p<0,05$ ).

Este cunoscut faptul că în leziunile renale expresia FGF- $\beta$  este crescută [320]. Astfel, dezvoltarea nefropatiei diabetice (ND) la pacienții cu diabet zaharat de tip 1 este însoțită de creșterea excreției urinare a factorilor de creștere fibrogenici (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , FGF- $\beta$ ). Procesul de fibrozare glomerulară și interstițială în ND este caracterizat prin creșterea producției de factori de creștere, inclusiv FGF- $\beta$  în țesutul renal [384].

Modificările concentrației FGF- $\beta$  la copiii cu GN înregistrate în studiile noastre sunt importante, deoarece există studii recente care demonstrează că expresia FGF- $\beta$  se intensifică în scleroza tubulointerstițială cronică, indiferent de maladia primară. Conform unor studii, rolul esențial în fibroza renală îl joacă fibroblastele interstițiale și corticali cu aspect fenotipic de miofibroblaste, iar FGF- $\beta$  provoacă proliferarea acestor celule [220, 320]. În maladiile cronice renale există o corelație directă între expresia FGF- $\beta$  și fibroza interstițială [320].

Pe de altă parte, studii recente au demonstrat că FGF- $\beta$  poate reduce tulburările funcționale și structurale în modelarea BRC [349]. Acest factor ar putea stimula proliferarea celulelor renale și participa în reglarea diferențierii celulelor mezenchimale (CM) [90]. În prezent, s-a stabilit că CM sunt capabile de a produce diverși factori trofici și prin urmare, participă la regenerarea țesutului renal [78]. FGF- $\beta$  induce nu numai sinteza proteinelor reparative, dar și participă în menținerea formării nefrosclerozei interstițiale, ceea ce duce la pierderea progresivă a funcției organelor.

Astfel, continuitatea proliferării fibroblastelor, aparent, este una dintre principalele diferențe între fibroză și procesul de regenerare a țesutului renal în maladiile renale, iar FGF- $\beta$  joacă un rol important în acest proces [320]. În același timp, mecanismele care controlează eliberarea și activitatea FGF- $\beta$  în maladiile renale acute și cronice, precum și mecanismele capabile să asigure în același timp procesele de lezare și regenerare ale țesutului renal rămân insuficient studiate [384, 390].

Determinarea concentrației FGF- $\beta$  în urină reprezintă un marker relevant pentru determinarea severității procesului, evaluarea severității modificărilor sclerotice în rinichi, precum și pentru evaluarea eficacității tratamentului aplicat.

Factorul de creștere a țesutului conjunctiv (CTGF) este o proteină a matricei celulare din familia de proteine de legare a heparinei asociate matricei extracelulare cu rol important în multe

proces biologice, inclusiv adeziunea celulară, migrarea, proliferarea, angiogeneza, dezvoltarea și repararea țesuturilor și vindecarea rănilor, fiind implicat în mod critic în fibrogeneză.

În studiul de față a fost evaluată dinamica nivelelor CTGF în urină și serul sangvin la copiii cu GN. Rezultatele prezentate în tabelul 4.7 relevă că nivelul CTGF în urină suferă modificări diferite în raport de variantele clinice ale GN.

În GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, nivelul CTGF în urină practic nu s-a modificat.

Nivelul CTGF în urină s-a majorat de 2,6 ori (până la  $247,5 \pm 50,73$  ng/mM creatinină) în sindromul nefrotic SR perioada de debut și practic nu s-a modificat în grupul de pacienți cu sindrom nefrotic SS.

În GNC forma nefrotică, perioada acutizării, concentrația GTGF a depășit de 2 ori valorile grupului de control.

Tabelul 4.7. Nivelul factorilor de creștere în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | CTGF<br>(ng/mM creatinină)                          |                                                                  | PDGF-BB<br>(ng/mM creatinină)                  |                                                |
|----------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                      | acutizare                                           | remisiune                                                        | acutizare                                      | remisiune                                      |
| GNA sindrom nefritic | -                                                   | -                                                                | $21,4 \pm 4,67$<br>123%                        | $17,6 \pm 1,32$<br>$101,1\%, p_1 > 0,05$       |
| GNA SNSS             | $109,8 \pm 3,80$<br>113,2%                          | $101,9 \pm 3,09$<br>$105,1\%, p_1 > 0,05$                        | $60,6 \pm 18,75^{**}$<br>348,3%                | $25,1 \pm 2,20^*$<br>$144,3\%, p_1 < 0,01$     |
| GNA SNSR             | $247,5 \pm 50,73^{**}$<br>$255,2\%, p_2 < 0,05$     | $115,7 \pm 9,61$<br>$119,3\%, p_1 < 0,05$                        | $64,8 \pm 11,65^{**}$<br>$372,4\%, p_2 > 0,05$ | $40,2 \pm 5,12^{**}$<br>$231,03\%, p_1 > 0,05$ |
| GNC forma nefrotică  | $202,3 \pm 27,11^{***}$<br>208,6%                   | $176,5 \pm 19,82$<br>$182,0\%, p_1 > 0,05$                       | $25,8 \pm 1,97$<br>148,3%                      | $15,2 \pm 1,81$<br>$87,4\%, p_1 < 0,05$        |
| GNC forma mixtă      | $702,6 \pm 71,36^{***}$<br>724,3%,<br>$p_3 < 0,001$ | $598,07 \pm 39,19$<br>616,6%,<br>$p_1 > 0,05$ ;<br>$p_3 < 0,001$ | -                                              | -                                              |
| Control              | $97,0 \pm 2,691$                                    |                                                                  | $17,4 \pm 2,98$                                |                                                |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$ –autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$ –autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR;  $p_3$ – autenticitatea indicilor la compararea GNC forma nefrotică cu GNA forma mixtă.

Cele mai pronunțate creșteri ale nivelului CTGF în urină s-au înregistrat în GNC forma mixtă perioada acutizării, unde valorile CTGF în urină au crescut de 7,2 ori (până la  $702,6 \pm 71,36$  ng/mM creatinină,  $p < 0,001$ ), pe când în forma nefrotică s-a majorat de numai 2 ori ( $p < 0,001$ ), comparativ cu grupul de control. În perioada remisiunii, nivelul CTGF în urină rămâne a fi înalt în GNC forma mixtă (tabelul 4.7).

La efectuarea analizei corelative în GNC forma nefrotică perioada acutizării au fost înregistrate anumite interrelații: corelație pozitivă puternică între CTGF în urină și IL-1 $\beta$  ( $r_{xy} = 0,807$ ,  $p < 0,001$ ), precum și corelație inversă de intensitate medie dintre nivelul de CTGF în urină și suma NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>; între nivelul de CTGF în urină și NO<sub>3</sub> ( $r_{xy} = -0,595$ ,  $p < 0,05$ ).

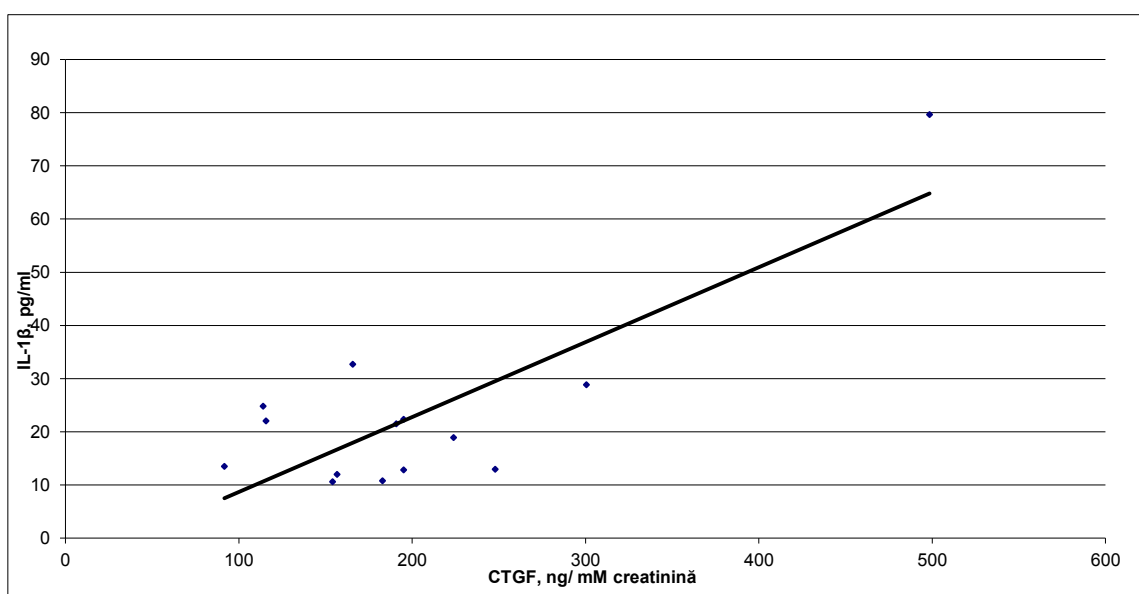


Figura 4.5. Corelația între nivelele CTGF și IL-1 $\beta$  în urină în GNC forma nefrotică perioada de acutizare.

În tabelul 4.8 sunt expuse rezultatele evaluării concentrației CTGF în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită.

Cercetările efectuate demonstrează că nivelul CTGF în serul sangvin nu suferă nici un fel de modificări statistic semnificative în GNA sindrom nefritic și în GNA sindrom nefrotic SS perioada manifestărilor clinice, comparativ cu grupul de control.

Nivelul CTGF în serul sangvin în sindromul nefrotic SR a crescut de 1,5 ori, față de valorile de referință. Modificări pregnante ale nivelului CTGF în serul sangvin au fost semnalate în GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, în cadrul căreia nivelul CTGF a crescut de 2,0 ori (până la  $7,02 \pm 0,73$  ng/ml), față de  $3,49 \pm 0,39$  ng/ml în grupul de control.

În perioada de remisiune valorile CTGF se deosebeau cu puțin de cele înregistrate în grupul de control, cu excepția GNC forma nefrotică, în care nivelul CTGF în serul sangvin rămâne crescut ( $p > 0,05$ ).

Studiile demonstrează că creșterea nivelului de CTGF în podocite este asociată cu creșteri rapide ale proteinuriei [276] și poate exacerba proteinuria și expansiunea mezangială [375].

Tabelul 4.8. Nivelul CTGF în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | CTGF, ng/ml                 |       |                             |       |
|----------------------|-----------------------------|-------|-----------------------------|-------|
|                      | acutizare                   | %     | remisiune                   | %     |
| GNA sindrom nefritic | 3,83±0,67                   | 109,7 | 3,17±0,34<br>$p_1 > 0,05$   | 90,8  |
| GNA SNSS             | 4,19±0,55                   | 120,1 | 3,04±0,34<br>$p_1 > 0,05$   | 87,1  |
| GNA SNSR             | 5,19±0,37**<br>$p_2 > 0,05$ | 148,7 | -                           | -     |
| GNC forma nefrotică  | 7,02±0,73***                | 201,1 | 5,13±0,42**<br>$p_1 > 0,05$ | 146,9 |
| Control              | 3,49±0,39                   | 100,0 | 3,49±0,39                   | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$  – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromului nefrotic SR.

Expresia CTGF a fost depistată ca fiind crescută, fapt ce este legat de afectarea podocitelor la pacienții cu FSGS. Cu progresarea GSFS, fibroza se dezvoltă atât în regiunea glomerulară, cât și în cea tubulointerstițială. Implicarea CTGF la această etapă este similară altor patologii renale însoțite de fibroză cu creșterea expresiei CTGF în regiunile glomerulare și tubulointerstițiale [321].

Celulele responsabile de producerea CTGF sunt miofibroblastele, numărul cărora corelează cu gradul de lezare. Rolul primordial al CTGF în fibroza renală este demonstrat de multiple studii care au relatat, că inhibarea CTGF blochează fibroza renală [375].

Factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF) este unul dintre numeroșii factori de creștere, sau proteine care reglează creșterea și diviziunea celulară și care joacă un rol semnificativ în formarea și creșterea vaselor de sânge (angiogeneză).

Conform datelor din tabelul 4.7, nivelul PDGF în urină practic nu s-a modificat în GNA sindrom nefritic perioada manifestărilor clinice. Nivelul PDGF în urină a crescut de 3,5-3,7 ori în sindromul nefrotic SS și sindromul nefrotic SR perioada de debut, față de grupul de control. În

perioada remisiunii, nivelele PDGF în urină au atins nivelul de control în GNA sindromul nefritic și GNC forma nefrotică, și au rămas crescute în sindromul nefrotic SS și sindromul nefrotic SR, deși s-au diminuat în raport cu valorile înregistrate în acutizare.

O serie de studii au analizat rolul inhibiției PDGF în modelele de GN mezangioproliferativă și crescentică sau alte boli glomerulare. Unele studii au inițiat tratamentul cu întârziere după inducerea bolii, adică la un moment în care boala glomerulară a progresat la un prejudiciu tubulointerstițial. Cu toate acestea, nici unul dintre aceste studii nu ar putea distinge în mod clar efectele inhibării PDGF în glomeruli, în raport de tubulointerstițiu. Câteva studii experimentale au abordat rolul PDGF în modele de fibroză tubulointerstițială [57, 130].

Funcția principală și cea mai bine descrisă a PDGF, în special PDGFR- $\beta$ /PDGF-BB și DD, este acțiunea mitogenică asupra celulelor mezangiale. Rolul PDGF în activarea mezangială către un fenotip profibrotic, adică în scleroza mezangială, a fost sugerat în studii intervenționale. Hiper celularitatea mezangială și scleroza se întâlnesc în multe boli glomerulare incluzând nefropatia IgAN, diabetul zaharat, GNM și hipertensiunea arterială. Celălalt rol major al PDGF este acțiunea profibrotică. Ambii receptori PDGF- $\alpha$  și - $\beta$  par să fie implicați în proliferarea și activarea fibroblastelor interstițiale. Surprinzător, totuși, acest lucru este insuficient descris în comparație cu rolul PDGF în proliferarea mezangială [262].

Astfel, determinarea concentrației factorilor de creștere în urină reprezintă markeri relevanți pentru determinarea severității procesului patologic, evaluarea modificărilor sclerotice în rinichi, precum și aprecierea eficacității tratamentului aplicat.

#### **4.3. Semnificația clinică a markerilor stresului oxidativ în evoluția clinică a glomerulonefritei la copii**

Ca o urmare a proceselor metabolice în normă se formează speciile reactive ale oxigenului (SRO) – radicalul superoxid, peroxidul de hidrogen și radicalul hidroxil; aceștia pot influența negativ diferite procese patogenetice din patologia renală. Unul dintre radicalii liberi cu efecte foarte nocive este peroxidul de hidrogen, care la nivel renal produce cel mai frecvent leziuni, fie direct, fie indirect, ca sursă de radical hipocloros. Acesta este format în prezența clorului de către mieloperoxidaza (MPO) din neutrofilele polinucleare granulocitare.

Este cunoscut faptul că procesele de oxidare cu radicali liberi afectează important compoziția chimică a membranelor biologice, permeabilitatea, activitatea ansamblurilor enzimatice, precum și alte caracteristici funcționale ale celulei.

SRO de asemenea, provoacă modificări oxidative ale proteinelor, care includ carbonilarea oxidativă, S-nitrozilarea, S-sulfonarea, S-glutationilarea și formarea de disulfuri.

Aceste modificări pot fi clasificate în două categorii: modificări ireversibile și modificări reversibile. În afară de efectele nocive sau dăunătoare ale modificărilor oxidative ale proteinelor, ele pot exercita și diverse efecte benefice, protectoare, fapt ce ar permite dezvoltarea unor noi abordări terapeutice în prevenția și combaterea diferitor boli [184].

În studiul prezent a fost evaluată dinamica parametrilor stresului oxidativ la pacienții cu diferite variante ale GN prin estimarea nivelului de AGE, PPOA, isoprostan-8, metaboliți NO și alți parametri, în serul sangvin și urină (tabelele 4.9 - 4.12).

Tabelul 4.9. Concentrația markerilor stresului oxidativ în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | AGE, $\mu\text{mol/l}$         |                                           | PPOA, $\mu\text{mol/l}$                       |                                               |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                      | acutizare                      | remisiune                                 | acutizare                                     | remisiune                                     |
| GNA sindrom nefritic | 338,2 $\pm$ 21,58***<br>184,4% | 147,5 $\pm$ 10,19<br>80,4%, $p_1 < 0,001$ | 35,2 $\pm$ 4,30***<br>275,0%                  | 13,4 $\pm$ 0,92<br>104,7%,<br>$p_1 < 0,01$    |
| GNA SNSS             | 414,9 $\pm$ 41,73***<br>226,2% | 202,4 $\pm$ 8,05<br>110,4%, $p_1 < 0,001$ | 29,8 $\pm$ 1,14***<br>232,8%                  | 19,0 $\pm$ 3,33<br>148,4%,<br>$p_1 < 0,05$    |
| GNA SNSR             | 299,6 $\pm$ 22,22***<br>163,4% |                                           | 46,6 $\pm$ 3,14***<br>364,1%,<br>$p_2 < 0,05$ |                                               |
| GNC forma nefrotică  | 374,8 $\pm$ 63,63*<br>204,4%   | 224,0 $\pm$ 21,22<br>122,1%, $p_1 < 0,05$ | 54,5 $\pm$ 2,99***<br>425,8%                  | 23,9 $\pm$ 2,9***<br>186,7%,<br>$p_1 < 0,001$ |
| Control              | 183,4 $\pm$ 15,61              |                                           | 12,8 $\pm$ 0,68                               |                                               |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$  – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Estimarea componentelor stresului oxidativ în serul sangvin a demonstrat prezența unor diferențe semnificative ale indicilor AGE și PPOA în toate loturile studiate. Conform tabelului 4.9, concentrația AGE în serul sangvin a crescut semnificativ în toate variantele clinice ale GNA și GNC în perioada de acutizare.

În GNA sindrom nefrotic SS, perioada de debut, concentrația AGE în serul sangvin a crescut de 2,3 ori, pe când în sindromul nefrotic SR s-a majorat de 1,6 ori, comparativ cu grupul de control. În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, concentrația AGE în serul sangvin a crescut de 2 ori față de valorile înregistrate în grupul de control [10].



Cercetările efectuate de noi demonstrează prezența dereglărilor profunde ale valorilor PPOA în serul sangvin în toate grupurile de pacienți. Astfel, în GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, concentrația PPOA în serul sangvin a crescut de 2,8 ori (până la  $35,2 \pm 4,30$ , față de  $12,8 \pm 0,68$   $\mu\text{mol/l}$  în grupul de control.

Modificări exprimate ale concentrației PPOA în serul sangvin au existat în GNA sindrom nefrotic SR perioada de debut. La acești pacienți valorile PPOA au crescut de 3,6 ori (până la  $46,6 \pm 3,14$   $\mu\text{mol/l}$ ), pe când în GNA sindrom nefrotic SS numai de 2,3 ori (până la  $29,8 \pm 1,14$   $\mu\text{mol/l}$ ), comparativ cu valorile grupului de control.

În perioada de remisiune, în GNA sindrom nefritic concentrația PPOA în serul sangvin a reușit să se normalizeze atingând nivelul grupului de control. Cele mai pronunțate majorări ale PPOA au fost înregistrate în GNC formă nefrotică perioada de acutizare, unde valorile indicelui au crescut de 4,3 ori (până la  $54,5 \pm 2,99$   $\mu\text{mol/l}$ ), micșorându-se de aproape 2 ori ( $23,9 \pm 2,9$   $\mu\text{mol/l}$ ) în perioada de remisiune, dar fără a atinge nivelul valorilor de control.

S-au atestat corelații directe de intensitate medie între nivelul AGE și PPOA ( $r_{xy} = 0,622$ ,  $p < 0,05$ ); între nivelul AGE și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = 0,598$ ,  $p < 0,05$ ). Au existat de asemenea legături corelative puternice între nivelul AGE și nivelul de s-nitrosothioli ( $r_{xy} = 0,987$ ,  $p < 0,01$ ); între nivelul AGE și MIP-1 $\alpha$  ( $r_{xy} = 0,892$ ,  $p < 0,01$ ). În GNC forma mixtă, perioada de acutizare, au fost atestate corelații inverse foarte puternice între nivelul AGEs și MIP-1 $\alpha$  ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ); legături corelative medii directe între AGE și CTGF ( $r_{xy} = 0,611$ ,  $p < 0,05$ ).

Conform unor date recente, progresia maladiilor renale prin întârzierea turnover-ului proteinelor și accelerarea stresului oxidativ conduce spre formarea și acumularea de AGE [245]. Această majorare a AGE se datorează nu numai proceselor de glicare neenzimatică a proteinelor, dar și exacerbarii stresului oxidativ care se produce în diferite variante ale GN la copii [23].

AGE sunt asociați cu modificări renale structurale, ce favorizează progresia BCR concomitent cu creșterea concentrației de AGE [69]. În diabet, s-a constatat o corelație patogenică dintre formarea și depozitarea AGE și nefropatie [55]. Receptorul pentru AGE (receptor for advanced glycation end products - RAGE) se află la baza dezvoltării glomerulosclerozei și contribuie la activarea podocitelor în dinamica nefropatiei diabetice. Practic toate structurile renale sunt susceptibile spre acumularea de AGE, inclusiv membrana bazală, celulele mezangiale, endoteliale, podocitele și tubii renali [370]. Datorită circulației extracelulare și interacțiunii cu receptorii RAGE și alte proteine de transport, AGE contribuie la modificările celulelor renale [62, 287].

AGE modifică direct integritatea structurilor tisulare, prin cross-linking excesiv cu moleculele matricei extracelulare (MEC), cum ar fi colagenul, prin distrugerea interconexiunilor

celulare ale MEC. Rinichii joacă un rol important în clearance-ul și metabolismul AGE, iar concentrațiile serice crescute ale acestora în BRC se datorează parțial intensificării stresului oxidativ și carbonilic [144, 194, 245]. AGE produc injurii celulare printr-o cascadă de evenimente receptor-dependente și nondependente care includ generarea intracelulară de specii reactive de oxigen (SRO) și un process prin care AGE și SRO își sporesc reciproc producția.

Datele din tabelul 4.10 reflectă concentrația markerilor stresului oxidativ în urină la copiii cu glomerulonefrită la diferite etape clinice evolutive. Ele indică o creștere concludentă a concentrației PPOA în urină în toate grupurile de pacienți.

Tabelul 4.10. Concentrația markerilor stresului oxidativ în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu   | PPOA,<br>(nM/mM creatinină)                    |                                                                         | Isoprostan-8.<br>(nM/mM creatinină)               |                                               |
|---------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                     | acutizare                                      | remisiune                                                               | acutizare                                         | remisiune                                     |
| GNA SNSS            | 31,4±2,80**<br>251,2%                          | 16,15±2,21<br>129,2%<br>p <sub>1</sub> <0,01                            | 56,7±3,83<br>150,4%                               | 43,5±4,06<br>115,4%,<br>p <sub>1</sub> >0,05  |
| GNA SNSR            | 46,3±2,78***<br>370,4%<br>p <sub>2</sub> <0,01 | 25,6±2,56**<br>204,8%<br>p <sub>1</sub> <0,001;<br>p <sub>2</sub> <0,05 | 129,3±8,80***<br>343,0%,<br>p <sub>2</sub> <0,001 | 65,9±4,85<br>174,8%,<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| GNC formă nefrotică | 22,1±1,38***<br>176,8%                         | 12,4±0,84<br>99,2%, p <sub>1</sub> <0,01                                | 214,2±14,86***<br>568,2%                          | 78,9±6,51<br>209,3%,<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| GNC formă mixtă     | 28,5±2,33***<br>228,0%<br>p <sub>3</sub> >0,05 | 21,7±3,07*<br>173,6%<br>p <sub>1</sub> >0,05                            | 131,7±13,15***<br>349,3%,<br>p <sub>3</sub> <0,01 | 79,7±6,51<br>211,4%,<br>p <sub>1</sub> <0,01  |
| Control             | 12,5±1,67                                      |                                                                         | 37,7±1,26                                         |                                               |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub>–autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare; p<sub>2</sub>–autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR; p<sub>3</sub>- autenticitatea indicilor la compararea GNC forma nefrotică cu GNC forma mixtă.

Concentrația PPOA în urină a fost mai mare în sindromul nefrotic SR în perioada de debut, comparativ cu sindromul nefrotic SS. Astfel, în sindromul nefrotic SS concentrația PPOA în urină a crescut de 2,5 ori (până la 31,4±2,80 ng/mM creatinină), pe când în sindromul nefrotic SR creșterea a fost mai pronunțată – de 3,7 ori (până la 46,3±2,78 ng/mM creatinină, față de 12,5±1,67 ng/mM creatinină) în grupul de control. În perioada remisiunii concentrația PPOA în

urină rămâne majorată în sindromul nefrotic SR și practic s-a normalizat la pacienții cu sindrom nefrotic SS.

În GNC forma mixtă, în perioada acutizării, concentrația PPOA în urină a crescut de 2,3 ori (până la  $28,5 \pm 2,33$  ng/mM creatinină), pe când în GNC formă nefrotică a crescut de numai 1,8 ori (până la  $22,1 \pm 1,38$  ng/mM creatinină), comparativ cu grupul de control.

În perioada remisiunii concentrația PPOA în urină practic s-a normalizat în GNC forma nefrotică, pe când în GNC forma mixtă, deși s-a redus, rămâne totuși crescută de 1,7 ori față de grupul de control [83].

Studiile noastre se află în concordanță cu datele unor cercetători, care au stabilit că nivelele plasmatice ale PPOA se majorează semnificativ odată cu progresia insuficienței renale, atât la pacienții cu BRC [209], cât și la cei cu diabet zaharat [328]. S-a demonstrat că acumularea de PPOA contribuie la apoptoza podocitelor și suprimarea acestora printr-o cascadă de evenimente de semnalizare legate de stresul oxidativ intracelular. Mai mult decât atât, Zhou L.L. și coautorii au constatat că PPOA se colocalizează și interacționează cu receptorul produșilor finali de glicozilare avansată (RAGE) pe podocite.

Blocarea RAGE de către anti-RAGE- imunoglobulina G sau silențierea prin ARN protejează în mod semnificativ apoptoza podocitelor indusă de PPOA, atât in vitro, cât și in vivo, ameliorând albuminuria provocată de PPOA în experiențe pe șoareci. Astfel, PPOA interacționează cu RAGE pentru a induce apoptoza podocitelor și care ar putea contribui la progresia BRC [380].

Un studiu prospectiv de cohortă demonstrează că nivelul plasmatic crescut al PPOA în IgAN stadiul precoce reprezintă unul dintre cei mai importanți factori de risc pentru evoluția nefavorabilă și inițierea hemodializei [104]. Prin urmare PPOA poate servi ca marker prețios de prognostic nefavorabil în IgAN, iar nivelul plasmatic crescut al PPOA în stadiul incipient al bolii poate indica o evoluție agresivă a bolii.

Studiile efectuate pe culturi de celule și animale arată că majoritatea celulelor renale rezidente sunt afectate de către PPOA. Mai mult decât atât, acumularea PPOA cauzează activarea SRAA în celulele tubulare [68]. În plus, PPOA reglează expresia fibronectinei și colagenului I în celulele mezangiale cultivate în prezența NADPH-oxidazei dependente de producția de  $O_2$  [356]. Atunci când celulele endoteliale ale rinichilor sunt stimulate de către PPOA, are loc eliberarea mediatorilor proinflamatori [147].

Aceste evenimente celulare negative cauzate de PPOA duc în final la perturbări funcționale renale, cum ar fi creșterea excreției urinare de proteine, scăderea clearance-ului creatininei, cu progresia glomerulosclerozei și fibrozei interstițiale [306].

Un studiu recent a demonstrat că majorarea nivelului PPOA plasmatice în modelul de rinichi restant a dus la progresia accelerată a afectării renale, evidențiată prin creșterea marcantă a fibrozei tubulare și glomeruloscleroză, agravată prin proteinurie și disfuncție renală.

Rolul patogenetic al PPOA este susținut și de faptul că administrarea acestor proteine modificate conduce la creșterea pronunțată a proteinuriei la șobolanii operați convențional, cu toate că fibroza și disfuncția renală nu au fost observate în timpul perioadei de studiu [209]. Aceste rezultate sugerează că PPOA ar putea fi implicate în patogeneza hipertrofiei și remodelării masei renale, precum și în procesele fibrogenice ulterioare din rinichii restanți [158].

Studiile clinice oferă dovezi convingătoare referitoare la asocierea dintre nivelele crescute de PPOA și leziunile renale, sugerând că PPOA pot fi predictorii importanți ai prognosticului bolii renale [147, 381].

În concluzie, PPOA reprezintă un marker important pentru evaluarea stresului oxidativ în GN, deoarece, atunci când există un exces de radicali liberi de oxigen (RLO), crește semnificativ producția de PPOA prin oxidarea unor proteine.

PPOA au efecte lezionale, deoarece pot induce un lanț de reacții care se autoperpetuează și care, prin diferite mecanisme, pot duce la progresarea leziunilor renale. Astfel, PPOA pot reacționa cu receptorii RAGE ai podocitelor, ceea ce rezultă cu apoptoza lor printr-o cascadă de semnalizare, iar blocarea RAGE ar putea reduce într-o anumită măsură lezarea podocitelor.

Isoprostanii sunt compuși asemănători prostaglandinelor care se formează *in vivo* în urma peroxidării nonenzimatică a acizilor grași esențiali (acidului arachidonic etc.) de către radicali liberi ai oxigenului și azotului. Acești compuși posedă activitate biologică puternică și sunt considerați markeri sensibili ai stresului oxidativ.

Conform rezultatelor redată în tabelul 4.10, concentrația isoprostanului-8 (Iso-8) în urină s-a majorat în toate grupele de pacienți. Totodată, s-au înregistrat valori medii ale Iso-8 mai mari în GNC, comparativ cu GNA. Concentrația Iso-8 în urină de asemenea a fost mai mare în sindromul nefrotic SR în perioada de debut, comparativ cu sindromul nefrotic SS.

Astfel, valorile Iso-8 în urină au crescut de 3,4 ori (până la  $129,3 \pm 8,80$  ng/mM creatinină) în sindromul nefrotic SR, iar în sindromul nefrotic SS s-au majorat de numai 1,5 ori (până la  $56,7 \pm 3,83$  ng/mM creatinină față de  $37,7 \pm 1,26$  ng/mM creatinină) în grupul de control.

În perioada remisiunii concentrația Iso-8 în urină rămâne crescută (aproape de 2 ori) în sindromul nefrotic SR. S-a semnalat o creștere de 3,5 ori (până la  $131,7 \pm 13,15$  ng/mM creatinină) a concentrației Iso-8 în urină în GNC forma mixtă în perioada acutizării, pe când în GNC forma nefrotică acest indice s-a majorat de 5,7 ori (până la  $214,2 \pm 14,86$  ng/mM creatinină), comparativ cu grupul de control.

În perioada remisiunii, nivelul Iso-8 în urină în ambele grupuri, deși a scăzut, rămâne crescut, aproape dublu față de valorile de control, ceea ce denotă persistența procesului cronic renal.

Studiul nostru a demonstrat rolul stresului oxidativ în glomerulonefrită prin măsurarea isoprostanului-8 în urină la diferite etape clinico-evolutive ale maladiei.

Isoprostanii se formează în rezultatul stresului oxidativ și reprezintă markeri sensibili ai peroxidării lipidelor și ai stresului oxidativ la bolnavii cu BRC [273]. Conform altor studii, se atestă o creștere a concentrației isoprostanilor în BRC stadiul terminal, o altă condiție asociată cu creșterea stresului oxidativ [361]. Creșteri marcante ale biomarkerilor stresului oxidativ au fost raportate la pacienții cu BRC stadiul 3, cu toate că stresul oxidativ este prezent și în stadiile precoce ale declinului funcției renale. Nivelele de isoprostani în urină au fost reduse semnificativ la pacienții cu BRC în timpul tratamentului cu nefroprotectoare [230, 249].

Creșterea intensității stresului oxidativ la pacienții cu SN contribuie la hiperlipidemie și hipoalbuminemie. Conform unui studiu [108], nivelele plasmatice ale isoprostanului F2 au corelat invers cu albumina serică la pacienții cu SN. În studiul nostru, concentrația isoprostanului-8 în urină a fost mai mare la pacienții cu forme cronice ale glomerulonefritei, pe când în lotul de pacienți sindrom nefrotic SS, perioada de debut, valorile isoprostanului au crescut nesemnificativ, comparativ cu martorul, atingând valori normale în perioada de remisiune. În GNC și sindromul nefrotic SR, perioada de remisiune, concentrația isoprostanului rămâne a fi sporită, ceea ce denotă persistența stresului oxidativ la acești pacienți.

Majoritatea studiilor actuale asupra acțiunilor biologice ale F<sub>2</sub>-isoprostanilor se limitează la -F<sub>2t</sub>-isoprostan, care este un vasoconstrictor renal puternic. La animale, F<sub>2</sub>-isoprostanii reduc rata de filtrare glomerulară și debitul sangvin renal cu 40-45%. Isoprostanii au activități biologice vasoconstrictoare puternice și anumite proprietăți inflamatorii. Prin urmare, aprecierea concentrației produșilor de peroxidare lipidică a fost utilizată pentru evaluarea estimativă cauzată de stresul oxidativ [92, 331].

Determinarea concentrației de isoprostan-8 paralel cu dozarea PPOA în urină reprezintă biomarkeri prețioși, noninvazivi pentru evaluarea gradului de stres oxidativ la pacienții cu glomerulonefrită, prognozarea complicațiilor la distanță și monitorizarea eficienței strategiilor terapeutice menite să reducă intensitatea stresului oxidativ celular și să contribuie la prevenirea leziunii renale asociate.

Sistemul de oxidare cu radicali liberi a fost apreciat și prin estimarea nivelului metaboliților oxidului nitric NO<sub>2</sub> și NO<sub>3</sub> în urină la copii cu diferite variante ale glomerulonefritei.

Studii anterioare au evidențiat relația dintre stresul oxidativ și producerea oxidului nitric (NO) în rinichi în condiții normale și patologice [244, 260]. Oxidul nitric – un vasodilatator puternic endogen care reglează funcțiile renale – este produs din L-arginină de către nitric oxid sintaza endotelială (eNOS). Radicali liberi, cum ar fi radicalul superoxid ( $O_2^-$ ), pot interacționa cu NO cu formarea peroxinitritului ( $ONOO^-$ ), epuizând astfel biodisponibilitatea acestei molecule importante.

Datele prezentate în tabelul 4.11 sugerează modificări ale conținutului sumar de  $NO_2+NO_3$  în urină care a crescut în toate loturile de pacienți.

Tabelul 4.11. Concentrația metaboliților NO (suma  $NO_2+NO_3$  și nivelul de  $NO_2$ ) în urină la copiii cu glomerulonefrită ( $\mu M/mM$  creatinină)

| Grupuri de studiu    | Suma $NO_2+NO_3$                          |                                               | $NO_2$                                     |                                                         |
|----------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                      | acutizare                                 | remisiune                                     | acutizare                                  | remisiune                                               |
| GNA sindrom nefritic | 144,1 $\pm$ 15,98***<br>344,7%            | 111,6 $\pm$ 2,8***<br>267,0%,<br>$p_1>0,05$   | 7,5 $\pm$ 0,51<br>105,6%                   | 9,3 $\pm$ 1,16<br>131,0%,<br>$p_1>0,05$                 |
| GNA SNSS             | 161,4 $\pm$ 20,87***<br>386,1%            | 170,5 $\pm$ 29,33**<br>407,9%,<br>$p_1>0,05$  | 16,2 $\pm$ 2,99*<br>228,2%                 | 12,1 $\pm$ 2,66<br>170,4%,<br>$p_1>0,05$                |
| GNA SNSR             | 104,4 $\pm$ 20,13**<br>249,8%, $p_2>0,05$ | 188,2 $\pm$ 16,59***<br>450,2%,<br>$p_1<0,01$ | 10,1 $\pm$ 0,54**<br>142,3%,<br>$p_2>0,05$ | 9,2 $\pm$ 0,54<br>129,6%,<br>$p_1>0,05$ ;<br>$p_2>0,05$ |
| GNC forma nefrotică  | 58,6 $\pm$ 2,38<br>140,2%                 | 91,1 $\pm$ 10,51**<br>217,9%,<br>$p_1<0,01$   | 5,5 $\pm$ 0,29<br>77,5%                    | 3,8 $\pm$ 0,12<br>53,5%,<br>$p_1<0,01$                  |
| Control              | 41,8 $\pm$ 4,51                           |                                               | 7,1 $\pm$ 0,89                             |                                                         |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$  – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Astfel, în GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, suma  $NO_2+NO_3$  în urină a crescut de 3,4 ori și a corelat cu nivelul de  $NO_2$  ( $r_{xy}=0,832$ ,  $p<0,001$ );  $NO_3$  ( $r_{xy}=0,996$ ,  $p<0,001$ ), reducându-se în perioada de remisiune până la 111,6 $\pm$ 2,8  $\mu M/mM$  creatinină. Totodată, s-a înregistrat o majorare mai pronunțată a conținutului sumar al metaboliților oxidului nitric ( $NO_2+NO_3$ ) în sindromul nefrotic SS perioada de debut, comparativ cu sindromul nefrotic SR. Astfel, suma  $NO_2+NO_3$  în urină a crescut de 3,9 ori în sindromul nefrotic SS și de 2,5 ori în

sindromul nefrotic SR. În perioada de remisiune în sindromul nefrotic SS suma  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$  în urină rămâne practic la același nivel înregistrat la etapa precedentă, pe când în sindromul nefrotic SR a crescut cu 84% comparativ cu etapa inițială de cercetare.

Suma  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$  în urină în GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, s-a majorat neimportant, dar a crescut practic de 2 ori în perioada de remisiune.

Nivelul  $\text{NO}_2$  a crescut de 2,3 ori (până la  $16,2 \pm 2,99 \mu\text{M}/\text{mM}$  creatinină) în sindromul nefrotic SS perioada de debut, pe când în sindromul nefrotic SR s-a majorat numai de 1,4 ori până la  $10,1 \pm 0,54 \mu\text{M}/\text{mM}$  creatinină, față de  $7,1 \pm 0,89 \mu\text{M}/\text{mM}$  creatinină în grupul de control. În perioada remisiunii în ambele grupuri nivelul  $\text{NO}_2$  în urină scade pentru ca să nu mai difere de cel înregistrat în grupul de control.

Rezultatele de evaluare a modificărilor nivelului  $\text{NO}_3$  și a raportului  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  în urină la copiii cu glomerulonefrită sunt prezentate în tabelul 4.12.

S-a înregistrat o creștere a nivelului de  $\text{NO}_3$  în urină în toate loturile de pacienți. Acest metabolit se formează la acțiunea excesului de RLO asupra oxidului nitric.

Tabelul 4.12. Modificările nivelului  $\text{NO}_3$  și a raportului  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | $\text{NO}_3$ ( $\mu\text{M}/\text{mM}$ creatinină) |                                                                   | Raportul $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ |                                                |
|----------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
|                      | acutizare                                           | remisiune                                                         | acutizare                          | remisiune                                      |
| GNA sindrom nefrotic | $136,56 \pm 16,02^{***}$<br>350,2%                  | $102,3 \pm 2,45^{***}$<br>262,3%, $p_1 < 0,05$                    | $20,3 \pm 3,31^{**}$<br>303,0%     | $13,2 \pm 1,96^*$<br>197,0%, $p_1 > 0,05$      |
| GNA SNSS             | $145,2 \pm 18,46^{***}$<br>372,3%                   | $158,4 \pm 28,70^{***}$<br>406,2%, $p_1 > 0,05$                   | $12,4 \pm 1,74^{***}$<br>185,1%    | $20,0 \pm 5,85^*$<br>298,5%, $p_1 > 0,05$      |
| GNA SNSR             | $94,0 \pm 20,58^*$<br>241,0%, $p_2 > 0,05$          | $179,0 \pm 16,05^{***}$<br>459,0%, $p_1 < 0,01$ ;<br>$p_2 > 0,05$ | $14,3 \pm 1,56^{***}$<br>213,4%    | $19,1 \pm 0,62^{***}$<br>285,1%, $p_1 < 0,05$  |
| GNC forma nefrotică  | $53,3 \pm 2,22^{**}$<br>136,7%                      | $87,3 \pm 10,61^{**}$<br>223,8%, $p_1 < 0,01$                     | $10,1 \pm 0,53^{**}$<br>150,7%     | $24,26 \pm 3,53^{***}$<br>362,1%, $p_1 < 0,01$ |
| Control              | $39,0 \pm 3,83$                                     |                                                                   | $6,7 \pm 0,84$                     |                                                |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control:  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$  – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Cele mai înalte valori ale  $\text{NO}_3$  în urină le-am depistat în sindromul nefrotic SS perioada de debut, unde la pacienții în cauză acest indice a crescut de 3,7 ori (până la  $145,2 \pm 18,46 \mu\text{M}/\text{mM}$

creatinină), pe când în sindromul nefrotic SR a crescut de 2,4 ori (până la  $94,0 \pm 20,58 \mu\text{M}/\text{mM}$  creatinină), față de  $39,0 \pm 3,83 \mu\text{M}/\text{mM}$  creatinină în grupul de control.

În sindromul nefrotic SS, perioada de remisiune, concentrația  $\text{NO}_3$  nu numai că a rămas la același nivel sporit, dar a și crescut nesemnificativ în raport cu etapa precedentă. Totodată, au fost înregistrate modificări pronunțate în sindromul nefrotic SR, unde valorile  $\text{NO}_3$  au crescut notabil în remisiune, atât în raport cu etapa precedentă (de acutizare), cât și cu valorile grupului de control.

Acumularea speciilor reactive ale oxigenului și a oxidului nitric în organism, stabilită în cercetările noastre, constituie un mecanism important în patogeneza leziunilor renale la copiii cu GN. Raportul  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  în urină a crescut de 3,0 ori (până la  $20,3 \pm 3,31 \mu\text{M}/\text{mM}$  creatinină) în GNA sindrom nefritic perioada manifestărilor clinice, față de  $6,7 \pm 0,84 \mu\text{M}/\text{mM}$  creatinină în grupul de control.

A existat o majorare mai pronunțată (aproape dublă) a raportului  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  în sindromul nefrotic SR perioada de debut, pe când în sindromul nefrotic SS a crescut doar de 1,5 ori. Perturbările înregistrate s-au accentuat și mai mult în perioada de remisiune în care am constatat o creștere aproape triplă a raportului  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  în urină, atât în sindromul nefrotic SR, cât și în cel nefrotic SS, comparativ cu grupul de control.

Există tot mai multe dovezi că NO, un vasodilatator puternic, este unul dintre cei mai importanți modulatori paracrini și mediatorii în controlul funcțiilor renale, cum ar fi fluxul renal sangvin global și regional, autoreglarea renală, filtrarea glomerulară, secreția de renină și excreția de sare [80]. NO joacă un rol important în patogeneza mai multor stări de boală renală, inclusiv nefropatia diabetică, boala inflamatorie glomerulară, insuficiența renală acută și nefrotoxicitatea unor preparate farmacologice [79].

NO joacă atât un rol protector important în ischemia renală, preîntâmpinând dezintegrarea metabolismului celular și funcțiile organului în perioada postischemică, cât și un rol negativ, toxic, contribuind la agravarea leziunilor ischemice. Mecanismele acțiunii toxice ale excesului de NO sunt legate de mai mulți factori. Cel mai important dintre ei îl constituie interacțiunea NO cu speciile reactive ale oxigenului (SRO), producerea cărora în ischemie și reperfuzie se activează semnificativ, ceea ce poate duce la formarea peroxinitritului care are proprietăți oxidative înalte și din această cauză este deosebit de toxic pentru celulă; peroxinitritul poate produce nitrozilarea diferitor componente celulare – structurilor proteice, enzimelor, acizilor nucleici, contribuind astfel la dezintegrarea metabolismului celular. Un alt mecanism al toxicității NO este proprietatea acestuia de a inhiba reversibil citocromoxidaza mitocondrială, ceea ce conduce, pe de o parte, la inhibiția respirației celulare, iar pe de altă parte, la generarea de SRO de înseși mitocondrii [80].



NO este un activator puternic al neutrofilelor polimorfonucleare, iar creșterea concentrației lui poate contribui la intensificarea efectelor citotoxice ale acestora. Se știe că unul din factorii care contribuie la afectarea țesutului renal în ischemie și infecțiile renale este migrația în parenchimul organului a leucocitelor neutrofile care generează SRO în cantități enorme. Alt mecanism negativ al NO este proprietatea acestui radical de a influența asupra apoptozei celulare. Excesul de NO induce apoptoza – moartea celulară atât la nivelul celulelor endoteliale, cât și al celor epiteliale [79]. Rezultatele studiului nostru au evidențiat semnificația diagnostică a determinării markerilor stresului oxidativ în diagnosticul și monitorizarea GN.

Conchidem, că stresul oxidativ care se manifestă printr-un dezechilibru între sistemele generatoare de radicali liberi ai oxigenului, pe de o parte, și sistemele endogene enzimatiche protectoare antioxidante, pe de altă parte, este un element patogenic important în autoîntreținerea și exacerbara răspunsului inflamator sistemic cu potențial de generare a sindromului de disfuncție organică multiplă.

Acest aspect al speciilor reactive de oxigen generat în condițiile alterării ischemice a endoteliului și în cooperare cu rețeaua complexă de mediatori ai reacției inflamatorii sistemice nespecifice din infecția renourinară reprezintă calea finală comună în generarea leziunii celulare și distrucției tisulare ce stau la baza sindromului de disfuncție organică multiplă. Speciile reactive ale oxigenului pot degrada acidul hialuronic și colagenul din membrana bazală glomerulară, producând leziuni glomerulare. De asemenea, ele stimulează formarea de substanțe chemotactice și citotoxice din lipide, cu creșterea statusului proinflamator care poate propaga leziunea spre nefroscleroză.

#### **4.4. Importanța diagnostică a sistemului antioxidant în evoluția clinică a glomerulonefritei la copii**

SRO produc oxidarea unor componente esențiale pentru structura și funcția celulei, cum sunt, de exemplu, acizii grași polienici nesaturați din structura membranelor, iar peroxizii lipidici formați se descompun, formând compuși citotoxici, în special aldehide, cum ar fi 4 – hidroxinonenalul și dialdehida malonică, care contribuie la activarea bacteriostatică și bactericidă a fagocitului. Protecția granulocitului însuși împotriva acestor specii distructive este necesară și posibilă, întrucât acesta este înzestrat cu mecanisme de detoxifiere a radicalilor liberi. Toate organismele au mecanisme bine dezvoltate de protejare împotriva acelor forme de oxigen care sunt potențial dăunătoare pentru lipide, proteine, acizii nucleici. Aceste mecanisme includ: sistemul de protecție antioxidantă care poate încetini oxidarea lipoproteinelor și preveni acțiunea citotoxică a acestui proces.

Reieșind din obiectivele de cercetare ale studiului de față, pentru aprecierea modificărilor indicilor sistemului antioxidant, bolnavii cu GN au fost examinați la diferite etape clinico-evolutive ale maladii. A fost cercetată valoarea diagnostică a diferitor biomarkeri ai sistemului antioxidant: activitatea antioxidantă totală (AAT), glucoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PDH), S-nitrozothioli, peptidele histidinice și acizii uronici în serul sangvin.

În tabelul 4.13 sunt prezentate datele despre modificările sistemului antioxidant în serul sangvin la copiii cu GN la diferite etape clinico-evolutive ale maladii. Studiile efectuate au relevat creșterea activității enzimelor sistemului antioxidant în serul sangvin în toate variantele clinice ale GN în perioada manifestărilor clinice.

În GNA sindrom nefritic în perioada manifestărilor clinice, AAT determinată prin metoda cu ABTS în serul sangvin a crescut de 2,7 ori (până la  $77,0 \pm 4,64 \mu\text{M/l}$ ), față de ( $28,01 \pm 4,03 \mu\text{M/l}$ ) în grupul de control. Concomitent, am stabilit corelații directe de intensitate medie între AAT și S-nitrozothioli ( $r_{xy}=0,528$ ,  $p<0,001$ ); între AAT și G-S-T ( $r_{xy}=0,641$ ,  $p<0,01$ ); între AAT și LDH ( $r_{xy}=0,528$ ,  $p<0,01$ ); între AAT și LAP ( $r_{xy}=0,541$ ,  $p<0,01$ ).

Tabelul 4.13. Activitatea antioxidantă totală (AAT) și nivelul S-nitrozotiolilor în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | Indicii studiați                |                            |                                              |                                              |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                      | AAT, $\mu\text{M/L}$            |                            | S-nitrosotoli, $\mu\text{mol/l}$             |                                              |
|                      | acutizare                       | remisiune                  | acutizare                                    | remisiune                                    |
| GNA sindrom nefritic | $77,0 \pm 4,64^{***}$<br>274,9% | $21,3 \pm 2,01$<br>76,04%  | $1,9 \pm 0,5^{***}$<br>271,4%                | $0,98 \pm 0,18$<br>140,0%, $p_1 > 0,05$      |
| GNA SNSS             | $40,8 \pm 3,97^*$<br>145,7%     | $36,8 \pm 3,59$<br>131,4%  | $2,3 \pm 0,13^{***}$<br>328,6%               | $1,3 \pm 0,20^{**}$<br>185,7%, $p_1 < 0,01$  |
| GNA SNSR             | $84,3 \pm 5,95^{***}$<br>301,0% | -                          | $2,6 \pm 0,25^{***}$<br>371,4%, $p_2 > 0,05$ | -                                            |
| GNC forma nefrotică  | $50,4 \pm 7,91^*$<br>179,9%     | $33,9 \pm 3,11$<br>121,02% | $2,0 \pm 0,08^{***}$<br>285,7%               | $1,8 \pm 0,17^{***}$<br>257,1%, $p_1 > 0,05$ |
| Control              | $28,01 \pm 4,03$                |                            | $0,7 \pm 0,11$                               |                                              |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$  – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Valorile AAT în serul sangvin au crescut de 3,0 ori (până la  $84,3 \pm 5,95 \mu\text{M/l}$ ) în GNA sindrom nefrotic SR perioada de debut, față de ( $28,1 \pm 4,03 \mu\text{M/l}$ ) în grupul de control. În GNC forma nefrotică perioada acutizării AAT în serul sangvin a crescut de 1,8 ori (până la  $50,4 \pm 7,91 \mu\text{M/l}$ ) cu reducerea ei în perioada remisiunii, cu excepția GNA sindrom nefritic. La pacienții în

cauza nivelul AAT s-a redus cu 24,0%. În GNC forma mixtă, perioada de acutizare, am stabilit corelație inversă foarte puternică între nivelul AAT și MIP-1 $\alpha$  ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ). În perioada remisiunii, valorile AAT rămân crescute, cu excepția pacienților cu GNA sindrom nefritic la care s-a atestat normalizarea acestui indice.

După cum rezultă din tabelul 4.13, nivelul S-nitrozotiolilor în serul sangvin crește relevant în diferite variante ale GN.

Studiile efectuate de noi au stabilit creșterea statistic semnificativă a concentrației S-nitrosotiolilor în serul sangvin în toate variantele clinice ale GN. Cele mai exprimate valori ale concentrației S-nitrosotiolilor în serul sangvin s-au atestat în GNA sindrom nefrotic SR perioada de debut, unde valorile acestui indice au crescut de 3,7 ori (până la  $2,6 \pm 0,25 \mu\text{mol/l}$ ), iar în sindromul nefrotic SS au crescut de 3,3 ori (până la  $2,3 \pm 0,13 \mu\text{mol/l}$ ) față de  $0,7 \pm 0,11 \mu\text{mol/l}$  în grupul de control).

În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, s-a notat o creștere practic de 3 ori (până la  $2,0 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$ ) a concentrației S-nitrosotiolilor în serul sangvin care continue să fie majorată și în perioada de remisiune.

Au existat corelații inverse de intensitate medie între concentrația S-nitrosotiolilor și MIP 1 $\alpha$  ( $r_{xy} = -0.644$ ,  $p < 0,01$ ) în GNC forma nefrotică perioada de acutizare. Acest fapt s-ar putea datora supresiei sau inhibiției forței catalitice a denitrozilazelor – S-nitrozoglutation reductazei și tioredoxinei, enzime care mediază denitrozilarea cisteinei din catena laterală a proteinelor. Anume, aceste enzime prin multiple căi de semnalizare reglează funcția anumitor receptori și influențează diverse răspunsuri celulare [227].

De notat că S-nitrozotiolii ca donatori de NO sunt capabili să declanșeze sau să suprimă apoptoza celulelor imune, iar S-nitrozoglutation reductaza, prin reglarea S-nitrozilării și apoptozei, poate exercita un rol protectiv în dezvoltarea sistemului imunitar.

Prezența stresului oxidativ în insuficiența renală este bine demonstrată și câteva studii au arătat nivelul scăzut al tiolilor în BRC. Creșterea producției de SRO la acești pacienți duce la consumul grupelor de tioli disponibili. Studiile, de asemenea, au arătat prezența unei corelații negative dintre creatinina serică și tiolii proteici, indicând consumul sporit de SH-grupe proteice cu creșterea severității insuficienței renale [177].

Albumina furnizează cea mai mare parte din totalul tiolilor serici și pierderea cu urina a albuminei la pacienții cu BRC, logic, ar trebui să crească nivelul grupelor tiolice în urină. Contrar la aceasta, un studiu a arătat nivele semnificativ de joase a tiolilor proteici în urină [184].

La pacienții cu BRC, conform unor studii, are loc o scădere semnificativă a albuminei serice și a SH-grupelor proteice. Aceste rezultate sugerează că albumina excretată în urină este

săracă în grupe tiolice. Scăderea de tioli proteici în urina pacienților cu BCR s-ar putea datora oxidării sporite a grupelor tiolice legate de albuminele serice. Excreția acestor albumine, sărace în forme reduse de grupe tiolice, constituie cauza principală a reducerii nivelului de tioli în urină. Are loc o scădere însemnată a tiolilor urinari cu proteinurie și aceasta variază în funcție de cantitatea proteinei excretate în urină.

A fost, de asemenea, înregistrată o scădere importantă a nivelului plasmatic de tioli proteici în cadrul SN la copii, maladiilor primare glomerulare, BRC terminale [177].

Rezultatele evaluării privind nivelul peptidelor histidinice (Phis) și a acizilor uronici în urină la copiii cu glomerulonefrită primară sunt reflectate în tabelul 4.14.

Tabelul 4.14. Nivelul peptidelor histidinice și acizilor uronici în urină la copiii cu glomerulonefrită acută și cronică

| Grupuri de studiu    | Peptidele histidinice, $\mu\text{M}/\text{mM}$ creatinină |                           | Acizii uronici, $\text{mg}/\text{mM}$ creatinină |                               |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------|
|                      | acutizare                                                 | remisiune                 | acutizare                                        | remisiune                     |
| GNA sindrom nefritic | 20,3 $\pm$ 3,65<br>83,9%                                  | 21,4 $\pm$ 3,26<br>88,4%  | 123,1 $\pm$ 9,55<br>97,1%                        | 115,8 $\pm$ 12,73<br>91,3%    |
| GNA SNSS             | 26,6 $\pm$ 7,31<br>109,9%                                 | 17,1 $\pm$ 2,57<br>70,7%  | 142,6 $\pm$ 15,17<br>112,5%                      | 98,0 $\pm$ 1,70<br>77,3%      |
| GNA SNSR             | 20,4 $\pm$ 3,50<br>84,3%                                  | 32,9 $\pm$ 1,61<br>135,9% | 140,7 $\pm$ 11,96<br>111,0%                      | 135,7 $\pm$ 2,93<br>107,0%    |
| GNC forma nefrotică  | 18,9 $\pm$ 2,77*<br>78,1%                                 | 24,9 $\pm$ 9,92<br>102,9% | 161,0 $\pm$ 19,39<br>127,0%                      | 148,1 $\pm$ 26,93<br>116,8%   |
| GNC forma mixtă      | 19,7 $\pm$ 4,46<br>81,4%                                  | 18,5 $\pm$ 4,36<br>76,4%  | 114,1 $\pm$ 17,58<br>90,0%                       | 501,9 $\pm$ 91,09**<br>395,8% |
| Control              | 24,2 $\pm$ 1,82<br>100%                                   |                           | 126,8 $\pm$ 8,36<br>100%                         |                               |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Din grupa peptidelor histidinice fac parte anserina și carnosina, dipeptide formate din  $\beta$ -alanină și histidină, cu un înalt potențial antioxidant.

Datorită proprietăților hidrofile ele sunt capabile de a neutraliza radicalii liberi de oxigen, azot și peroxinitrit cu proprietăți citotoxice extrem de puternice. Din aceste motive studiul modificărilor conținutului de PHis în urină la pacienții cu GN prezintă un interes major.

Analiza rezultatelor obținute relevă o tendință de reducere nesemnificativă a nivelului PHis în urină la pacienții cu GNA sindrom nefritic și GNA sindrom nefrotic SR în perioada manifestărilor clinice.

În perioada de remisiune nivelul PHis în urină se menține la valori reduse, cu excepția sindromului nefrotic SR, în cadrul căruia se atestă creșterea lor, ceea ce ar putea influența asupra potențialului antioxidant la acești pacienți.

Analiza datelor obținute relevă o reducere a nivelului PHis în urină în GNC perioada acutizării, comparativ cu grupul de control. În perioada remisiunii nivelul PHis în urină s-a normalizat la pacienții cu GNC formă nefrotică.

Din datele tabelului 4.14 rezultă că în GNC forma nefrotică nivelul acizilor uronici în urină s-a majorat neînsemnat în perioada de acutizare, pe când în forma mixtă s-a redus discret. În perioada remisiunii se atestă o creștere veridică ( $p < 0,05$ ) de aproape 4 ori a concentrației de acizi uronici în urină în GNC forma mixtă.

Analiza datelor prezentate în tabelul 4.14 atestă o creștere neînsemnată statistic neconcludentă a nivelului acizilor uronici în urină în SNSS și SNSR, perioada manifestărilor clinice. În perioada remisiunii s-a semnalat o tendință slabă de reducere a nivelului acizilor uronici, comparativ cu grupul de control.

Un rol important în protecția antioxidantă a celulelor și menținerea statutului redox celular, atât în condiții fiziologice, cât și în diverse patologii, îi revine glutatationului și enzimelor sistemului glutatationic.

Starea funcțională a enzimelor ciclului glutatationic în serul sangvin s-a studiat prin aprecierea activității GR, GRO și G-S-T la copiii cu glomerulonefrită în dinamica maladiei.

Un efect protector puternic au și enzimele antioxidante – catalaza și glutatationperoxidaza (GPO), care înlătură peroxidul de hidrogen. O dietă deficitară în seleniu (Se) determină reducerea expresiei GPO (această enzimă fiind Se-dependentă) și o agravare a tulburărilor funcționale și structurale renale postischemice.

Aceasta înseamnă că, în afară de superoxid și peroxidul de hidrogen, are efect toxic renal și anionul hidroxil, care rezultă din primele, prin reacția Haber-Weiss. Ca atare și substanțele care înlătură hidroxi-anionul au efect benefic (dimetisulfoxid – DMSO, glutatationul redus – GSH), precum și chelatorii de  $Fe^{2+}$ , care previn formarea acestui radical liber (desferioxamina). GSH are, în parte, acest efect benefic și prin generarea glicinei, care este un agent citoprotector.

Datele privind estimarea modificărilor enzimelor ciclului glutatationic în serul sangvin la copiii cu GN sunt expuse în tabelul 4.15.

Studiile efectuate au relevat creșteri statistic semnificative ale activității GR în serul sangvin în toate variantele clinice ale GN în perioada manifestărilor clinice. Activitatea GR în serul sangvin a crescut de 3,5 ori (până la  $336,5 \pm 32,9$  nM/s.l) în GNA sindromul nefrotic SR perioada de debut, față de ( $97,01 \pm 5,82$  nM/s.l) în grupul de control.

Tabelul 4.15. Dinamica modificărilor enzimelor ciclului glutationic în serul sangvin la copii cu glomerulonefrită acută și cronică

| Grupuri de studiu    | GR, nM/s.l.                   |                                               | GRO, nM/s.l.                |                                             | G-S-T, nM/s.l.              |                                            |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------|
|                      | acutizare                     | remisiune                                     | acutizare                   | remisiune                                   | acutizare                   | remisiune                                  |
| GNA sindrom nefritic | $295,9 \pm 20,7$<br>***305,0% | $92,7 \pm 10,1$<br>95,6%,<br>$p_1 < 0,01$     | $101,7 \pm 3,2$<br>***43,8% | $219,4 \pm 17,4$<br>94,4%,<br>$p_1 < 0,001$ | $19,4 \pm 1,1$ ***<br>61,2% | $29,8 \pm 1,2$<br>94,0%,<br>$p_1 > 0,05$   |
| GNA SNSS             | $330,5 \pm 35,2$<br>***340,7% | $136,4 \pm 15,8^*$<br>140,6%,<br>$p_1 < 0,05$ | $144,7 \pm 10,8$<br>**62,3% | $186,9 \pm 19,5$<br>80,4%,<br>$p_1 > 0,05$  | $15,64 \pm 1,0$<br>***49,2% | $26,52 \pm 2,85$<br>83,6%,<br>$p_1 > 0,05$ |
| GNA SNSR             | $336,5 \pm 32,9$<br>***346,9% | —                                             | $154,5 \pm 14,9^*$<br>66,5% | —                                           | $12,4 \pm 1,1$<br>***39,1%  | —                                          |
| GNC forma nefrotică  | $203,3 \pm 18,8$<br>***209,6% | $94,2 \pm 4,0$<br>97,1%,<br>$p_1 < 0,01$      | $90,6 \pm 5,0$ ***<br>39,0% | $190,9 \pm 20,0$<br>82,1%,<br>$p_1 < 0,01$  | $21,2 \pm 1,6$ ***<br>66,9% | $27,8 \pm 1,1$<br>87,7%,<br>$p_1 > 0,05$   |
| Control              | $97,01 \pm 5,8$               |                                               | $232,4 \pm 25,3$            |                                             | $31,7 \pm 1,91$             |                                            |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$ —autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare.

Modificări statistice concludente s-au înregistrat și în sindromul nefrotic SR, în cadrul căruia indicii s-au normalizat în perioada remisiunii, cu excepția sindromului nefrotic SS, în care activitatea GR continuă să fie crescută de 1,4 ori, comparativ cu grupul de control.

Evaluarea activității GRO și G-S-T în serul sangvin a demonstrat reducerea lor semnificativă în toate loturile de pacienți. Cea mai pronunțată reducere a activității GRO s-a înregistrat în GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, în care activitatea enzimei s-a redus cu -61,0% (până la  $90,6 \pm 5,0$  nM/s.l), față de  $232,4 \pm 25,3$  nM/s.l în grupul de control.

În GNA sindromul nefrotic SS și SR, perioada de debut, activitatea GRO s-a redus cu 37,7 % și, respectiv, 33,5%, comparativ cu valorile de control.

În perioada remisiunii activitatea GRO practic atinge nivelul grupului martor în GNA sindrom nefritic, pe când în alte grupuri rămâne redusă.

Cele mai exprimate modificări ale activității G-S-T în serul sangvin au fost consemnate în GNA sindrom nefrotic SR perioada de debut, în care activitatea enzimei s-a redus cu 60,9%, pe

când în sindromul nefrotic SS acest indice a scăzut cu 50,8%, comparativ cu valorile de control. În perioada remisiunii are loc normalizarea activității G-S-T în serul sangvin în GNA sindrom nefritic. Studii recente au demonstrat că G-S-Ts ar putea fi, de asemenea, utilă în detectarea fibrozei tubulointerstițiale la pacienții cu BRC și diabet zaharat [157].

Într-un studiu, efectuat de Bienias B. și coautorii s-a demonstrat importanța determinării izoformelor G-S-T în SN; în acest caz s-au stabilit valori crescute ale excreției urinare a izoformei alfa-GST și excreția urinară normală a izoenzimei pi-GST [46]. Acest fapt ar putea fi explicat prin aceea că, la copiii cu sindrom nefrotic SD și sindrom nefrotic SR, afectarea tubulară renală începe în regiunea tubilor proximali.

În concluzie, rezultatele studiului sugerează că fibroza tubulointerstițială se dezvoltă timpuriu în cadrul SN, desigur, nu numai la pacienții rezistenți la steroizi, dar, de asemenea, și în sindromul nefrotic SD, inițial fără afectarea funcției renale.

Estimarea rezultatelor evaluării G-6-PDH în serul sangvin a demonstrat diferențe semnificative în toate grupele de pacienți cu GN în perioada manifestărilor clinice (tabelul 4.16).

Glucoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PDH) este implicată în calea fosfat pentozică, sau șuntul pentozic. Șuntul pentozic este responsabil de aprovizionarea celulelor cu riboză, necesară pentru sinteza acizilor nucleici, el este principala sursă de NADPH pentru glutathion reductază – enzimă responsabilă pentru reciclarea glutathionului redus în țesuturi [29]. După cum se știe, afectarea G-6-PDH rezultă cu formarea stresului oxidativ celular, legat de creșterea SRO și reducerea nivelului antioxidanților, cum ar fi glutathionul, forma redusă.

Tabelul 4.16. Activitatea G-6-PDH în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită

| Grupele de studiu    | G-6-PDH, nmol.s.l                    |       |                                     |       |
|----------------------|--------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
|                      | acutizare                            | %     | remisiune                           | %     |
| GNA sindrom nefritic | 54,5±4,57***                         | 246,6 | 29,7±3,33*<br>p <sub>1</sub> <0,001 | 134,4 |
| GNA SNSS             | 32,4±4,06*                           | 146,6 | 25,8±3,90<br>p <sub>1</sub> >0,05   | 116,7 |
| GNA SNSR             | 49,8±4,58***<br>p <sub>2</sub> <0,05 | 225,3 | -                                   | -     |
| GNC forma nefrotică  | 36,8±3,99***                         | 166,5 | 25,9±2,08<br>p <sub>1</sub> >0,05   | 117,2 |
| Control              | 22,1±0,99                            | 100,0 | 22,1±0,99                           | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub> – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare; p<sub>2</sub> – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Cele mai exprimate modificări ale G-6-PDH în serul sangvin au fost consemnate în GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, unde nivelul G-6-PDH a crescut de 2,5 ori ( $54,5 \pm 4,57$  nmol/s.l).

În GNA sindrom nefrotic SS, perioada de debut, activitatea G-6-PDH a crescut de 1,5 ori, pe când în GNA sindrom nefrotic SR de 2,3 ori comparativ cu grupul de control.

În perioada remisiunii activitatea G-6-PDH în serul sangvin atinge practic nivelul valorilor de control.

Modificările depistate ale activității G-6-PDH pot fi privite drept manifestarea reacției adaptativ-compensatorii, orientate spre menținerea nivelului de NADPH redus, care joacă un rol cardinal în sistemul de protecție antioxidantă.

Astfel, enzimele ciclului glutationic și ale sistemului de protecție antioxidantă pot servi drept indicatori ai gradului de alterare tisulară renală și pot fi folosite pentru aprecierea fazei procesului, eficienței tratamentului aplicat, prognozarea complicațiilor și a exodului bolii.

#### **4.5. Concluzii la capitolul 4**

1. Cercetările nivelului moleculelor de semnalizare celulară (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , CD 40) în urină la copiii cu glomerulonefrită a demonstrat o creștere a acestora în diferite variante ale GN în funcție de varianta clinică, activitatea procesului renal. Determinarea concentrației urinare a moleculelor de semnalizare celulară la copiii cu GN reprezintă markeri neinvazivi relevanți pentru determinarea severității procesului patologic, evaluarea modificărilor sclerotice în rinichi, precum și aprecierea eficacității tratamentului aplicat.

2. Studiul concentrației factorilor de creștere (VEGF, FGF- $\beta$ , CTGF, PDGF-BB) în urină a demonstrat majorarea nivelului a acestor factori la copiii cu GN în funcție de activitatea procesului renal, sensibilitatea la steroizi și reprezintă markeri neinvazivi pentru aprecierea și cuantificarea gradului de dezvoltare și progresie al glomerulosclerozei și fibrozei tubulointerstițiale.

3. În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, s-au înregistrat corelații statistic veridice directe între MCP-1 și FGF- $\beta$  ( $r_{xy}=0,810$ ,  $p<0,001$ ), iar în GNC forma mixtă perioada de acutizare au fost stabilite corelații inverse foarte puternice între MIP-1 $\alpha$  și MCP-1 ( $r_{xy}=-1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și VEGF ( $r_{xy}=-1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și FGF- $\beta$  ( $r_{xy}=-1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și CTGF ( $r_{xy}=-1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și IL-1 $\beta$  ( $r_{xy}=-1,0$ ,  $p<0,001$ ); între MIP-1 $\alpha$  și IL-6 ( $r_{xy}=-1,0$ ,  $p<0,001$ ), care demonstrează implicarea acestor chemokine în procesele de fibrozare renală.

4. Studiul markerilor stresului oxidativ (AGE, PPOA, isoprostanului-8, metaboliților NO, S-nitrozotiolilor, G-6-P-DH) în ser și urină a relevat creșterea concentrației acestora în diferite variante clinice ale GN în funcție de activitatea procesului patologic. Determinarea concentrației



markerilor stresului oxidativ reprezintă biomarkeri, noninvazivi pentru evaluarea gradului de stres oxidativ în glomerulonefrită, prognozarea complicațiilor la distanță, monitorizarea eficienței strategiilor terapeutice menite să reducă intensitatea stresului oxidativ celular și să contribuie la prevenirea leziunii renale asociate.

5. Studiul markerilor sistemului antioxidant a evidențiat reducerea activității enzimelor antioxidante GPO, G-S-T și creșterea GR la copiii cu GN în funcție de activitatea procesului patologic, varianta clinică, sensibilitatea față de steroizi. Datele evaluării enzimelor ciclului glutationic și ale sistemului de protecție antioxidantă pot servi drept indicatori fideli ai gradului de alterare tisulară renală, care pot fi folosiți pentru aprecierea fazei procesului, prognozarea complicațiilor și exodului bolii.

6. Mecanismele progresiei fibrozei tubulointerstițiale spre BRC au inclus: faza activării și injuriei renale cu participarea ET-1, MCP-1, faza semnalizării fibrogenice – ET-1, CTGF, PDGF-BB, FGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, faza fibrogenică și a distrucției renale – PDGF-BB.

## 5. PARTICULARITĂȚILE MODIFICĂRILOR UNOR INDICI AI HOMEOSTAZII ENZIMATICE BIOCHIMICE LA COPIII CU GLOMERULONEFRITĂ PRIMARĂ

### 5.1. Dinamica și activitatea enzimelor ciclului adenilic și arginazei în evoluția clinică a glomerulonefritei la copii

După cum se știe, printre numeroși factori care reglează intensitatea reacțiilor metabolice, un loc deosebit le revine enzimelor metabolismului nucleotidelor adenilice. Enzimele citozolice adenozinmonofosfat–dezaminaza (AMP-aza) și adenozindezaminaza (ADA-aza) – catalizează dezaminarea AMP-lui și adenozinei, și în așa mod, controlează nivelul de AMP și adenozină în țesuturi. Catabolismul nucleotidelor adeninice participă la modularea proceselor energo-dependente din celule [173].

În studiul de față ne-am propus să evaluăm starea funcțională a ciclului adenilic prin aprecierea activității ADA-azei și AMP-azei în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită primară în dinamica maladiei. În tabelele 5.1 și 5.2 sunt expuse rezultatele evaluării activității ADA-azei și AMP-azei în serul sangvin la copiii cu GNA și GNC.

Tabelul 5.1. Activitatea enzimelor ciclului adenilic în serul sangvin la copiii cu GNA

| Grupuri de studiu    | ADA-aza, nM/s.l                               |                                             | AMP-aza, nM/s.l                             |                                             |
|----------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                      | acutizare                                     | remisiune                                   | acutizare                                   | remisiune                                   |
| GNA sindrom nefritic | 2,78±1,20*<br>226%                            | 1,27±0,23<br>103,3%<br>p <sub>1</sub> >0,05 | 2,25±0,52<br>136,4%                         | 2,85±0,67<br>172,7%<br>p <sub>1</sub> >0,05 |
| GNA SNSS             | 3,91±0,86**<br>317,9%                         | 2,94±0,60**<br>239%<br>p <sub>1</sub> >0,05 | 2,11±0,45<br>127,9%                         | 2,33±0,56<br>141,2%<br>p <sub>1</sub> >0,05 |
| GNA SNSR             | 5,13±1,28**<br>417,1%<br>p <sub>2</sub> >0,05 | 5,99±2,79<br>487%<br>p <sub>1</sub> >0,05   | 2,16±0,57<br>130,9%<br>p <sub>2</sub> >0,05 | 1,96±0,90<br>118,8%<br>p <sub>1</sub> >0,05 |
| Control              | 1,23±0,15<br>100%                             |                                             | 1,65±0,20<br>100%                           |                                             |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub> – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare; p<sub>2</sub> – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

În dinamica activității enzimelor ciclului adenilic în diferite variante ale GN s-au înregistrat unele particularități. Studiile efectuate au relevat creșteri exprimate ale activității ADA-zei în serul sangvin în toate variantele clinice ale GNA în perioada manifestărilor clinice. Cele mai mari valori

ale activității ADA-zei în serul sangvin s-au înregistrat în sindromul nefrotic SR, în cadrul căruia activitatea enzimei date a crescut de 4,2 ori, comparativ cu grupul martor. Modificări statistic concludente ( $p < 0,01$ ) s-au semnalat în sindromul nefrotic SS și SR, comparativ cu valorile grupului de control.

Tabelul 5.2. Activitatea enzimelor ciclului adenilic în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | ADA-aza, nM/s.l        |                                      | AMP-aza, nM/s.l     |                                       |
|---------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
|                     | acutizare              | remisiune                            | acutizare           | remisiune                             |
| GNC forma nefrotică | 2,72±0,43***<br>221,1% | 2,14±0,13*<br>174%, $p_1 > 0,05$     | 1,74±0,31<br>105,4% | 1,71±0,20<br>103,6%,<br>$p_1 > 0,05$  |
| GNC forma mixtă     | 3,56±1,18*<br>289,4%   | 2,31±1,72<br>187,8%,<br>$p_1 > 0,05$ | 2,42±1,36<br>146,7% | 1,88±0,19*<br>113,9%,<br>$p_1 > 0,05$ |
| Control             | 1,23±0,15<br>100%      |                                      | 1,65±0,20<br>100%   |                                       |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare.

ADA-aza, care este prezentă în rinichi, catalizează dezaminarea hidrolitică ireversibilă a adenozei la inozină, epuizând astfel nivelul producției de adenzină. Totodată, creșterea activității ADA-zei înregistrată de noi în GN ar putea duce la o scădere a nivelului de adenzină, o moleculă renoprotectoare extracelulară importantă.

Datele literaturii atestă că menținerea la valori sporite a funcționalității ADA-zei influențează negativ asupra concentrației extracelulare de adenzină în țesuturi, iar adenzina, prin intermediul receptorilor adenzinici – A1AR, A2AAR, A2BAR și A3AR, mediază numeroase căi de semnalizare intracelulară, inclusiv reacțiile imune, funcțiile celulelor endoteliale, răspunsul inflamator sistemic etc.

Mai multe studii au implicat nivelele de adenzină în hipoxie, inflamație și injuria renală acută [47, 172]. De asemenea, ADA-aza, nu numai că participă la degradarea adenozei, dar și stimulează eliberarea de aminoacizi excitanti și este necesară pentru cuplarea receptorilor de adenzină A1 cu proteinele G heterotrimerice.

Pe de altă parte, deficitul de ADA-ază duce la fibroză pulmonară [326], ceea ce sugerează că expunerea cronică la nivele ridicate de adenzină poate exacerba reacțiile inflamatorii, într-o măsură mai pronunțată, decât suprimarea acestei enzime.

De asemenea, s-a demonstrat că activitatea ADA-azei este majorată în inima de șoarece care supraexpunează factorul de inducere a hipoxiei-1 $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ), fapt ce explică nivelele atenuate de adenzină în inimă în timpul stresului ischemic.

Studii recente implică adenzina – o moleculă de semnalizare endogenă, în protecția funcției renale, iar producția enzimatică de adenzină din moleculele precursorare ATP și AMP, precum și reglarea nivelului ADA-azei joacă un rol critic în atenuarea leziunilor renale și păstrarea funcției renale în intoxicația cu metale grele [172].

Prin urmare, inhibarea activității ADA-azei ar putea fi o abordare terapeutică eficientă pentru managementul / prevenirea disfuncției renale. Este interesant de remarcat faptul că tratamentul asociat cu curcumină a fost în măsură să prevină o creștere a activității ADA-azei la șobolani intoxicați cu cadmiu (Cd).

Aceste date sugerează că acest remediu are rol protector în intoxicația cu Cd, iar mecanismul probabil ar putea fi explicat prin efectul inhibitor al lui asupra activității ADA-azei renale, ceea ce duce la o creștere a nivelului de adenzină în rinichi.

Studii anterioare au implicat nivelele de adenzină prin modularea sistemului purinergic în diverse stări patologice, cum ar fi boala Alzheimer, diabetul zaharat, accidentul vascular cerebral, hipertensiunea arterială și inflamația [172].

Evaluarea activității AMP-azei în serul sangvin demonstrează creșterea activității enzimei date la copiii cu GNA sindrom nefritic în perioada manifestărilor clinice. Conform datelor obținute la pacienții cu GNA sindrom nefrotic, atât în perioada manifestărilor clinice, cât și în remisiune, nivelul funcțional al AMP-azei s-a majorat neînsemnat, comparativ cu valorile martorului.

Activitatea ADA-azei în serul sangvin a crescut de 2,2-2,9 ori în GNC forma nefrotică și, mixtă în perioada acutizării, respectiv, comparativ cu valorile de control. În perioada remisiunii activitatea ADA-azei în GNC forma nefrotică și forma mixtă indică valori crescute, ceea ce denotă persistența procesului patologic în rinichi și reabilitarea incompletă a pacienților.

În cadrul studiului, s-a semnalat o creștere de 1,5 ori a activității AMP-azei în GNC forma mixtă în perioada acutizării, comparativ cu grupul martor. În perioada remisiunii activitatea AMP-azei în GNC forma nefrotică a atins practic nivelul martorului.

Rezultatele obținute sugerează că ambele căi paralele ale degradării AMP, la care participă AMP-aza și ADA-aza, sunt activate în condiții patologice, probabil, cu scopul de a depăși sinteza compensatorie a adenilatilor și de a asigura depleția promptă a fondului de adenilați și reducerea sarcinii energetice adenilat în diverse organe, inclusiv rinichi.

Deși funcția principală a ADA-azei este dezvoltarea și menținerea sistemului imunitar la om, ea este, de asemenea, implicată în diferențierea celulelor epiteliale și monocitelor, precum și în procesele de neurotransmitere și întreținerea gestației [172].

AMP-aza poate fi implicată în diverse procese fiziologice, cum ar fi conversia bazei purinice adenina la inozină sau guanină, stabilizarea sarcinii energetice adenilat, precum și în diferite reacții ale nucleotidelor ciclului purinic. Creșterea semnificativă a funcționalității AMP-azei și ADA-azei a fost depistată în modele de leziuni hepatotoxice – intoxicația acută cu amoniac și hepatita indusă de CCl<sub>4</sub> [172].

În așa fel, la copiii cu GN au loc manifestări biochimice ale tulburărilor stării funcționale a rinichilor – dereglări ale funcționalității AMP-azei și ADA-zei, enzime care controlează nivelul de AMP și adenzină în țesuturi, catabolismul nucleotidelor adeninice, participă la modularea proceselor energo-dependente din celule. Rezultatele obținute de noi vin să confirme rolul enzimelor metabolismului nucleotidelor adeninice în mecanismele patogenice ale GN la copii.

Un rol important în realizarea funcției renale îl joacă arginaza, enzima care catalizează hidroliza argininei la ornitină și uree. Dinamica activității arginazei în urină la pacienții cu glomerulonefrită este prezentată în tabelul 5.3.

Tabelul 5.3. Nivelul arginazei în urină și în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu   | Arginaza urinară, nmol/s./mM creatinină        |                                                                        | Arginaza serică, nmol/s.l                      |                                               |
|---------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                     | acutizare                                      | remisiune                                                              | acutizare                                      | remisiune                                     |
| GNA SNSS            | 0,82±0,23*<br>455,6%                           | 0,20±0,03<br>111,1%, p <sub>1</sub> <0,05                              | 2,12±0,23*<br>70,4%                            | 2,91±0,36<br>96,7%,<br>p <sub>1</sub> >0,05   |
| GNA SNSR            | 0,12±0,02<br>66,7%<br>p <sub>2</sub> <0,05     | 0,16±0,04<br>88,9%, p <sub>1</sub> >0,05                               | 1,14±0,20***<br>37,9%,<br>p <sub>2</sub> <0,05 | 2,57±0,39<br>85,4%,<br>p <sub>1</sub> <0,01   |
| GNC forma nefrotică | 0,25±0,10<br>138,9%                            | 0,28±0,07<br>155,5%, p <sub>1</sub> >0,05                              | 1,01±0,15***<br>33,6%                          | -                                             |
| GNC forma mixtă     | 0,53±0,09**<br>294,4%,<br>p <sub>3</sub> >0,05 | 0,34±0,04*<br>188,9%,<br>p <sub>1</sub> >0,05;<br>p <sub>3</sub> >0,05 | 0,87±0,17***<br>28,9%,<br>p <sub>3</sub> >0,05 | 2,13±0,30*<br>70,8%,<br>p <sub>1</sub> <0,001 |
| Control             | 0,18±0,04                                      |                                                                        | 3,01±0,24                                      |                                               |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub> – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare; p<sub>2</sub> – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR; p<sub>3</sub> – autenticitatea indicilor la compararea GNC forma nefrotică cu GNC forma mixtă.

Această enzimă concurează cu nitric oxid sintaza endotelială (eNOS) pentru același substrat – L-arginina, cu transformarea acestui aminoacid în uree și L-ornitină [181].

Sunt cunoscute două izoforme ale arginazei (tipurile I și II), care diferă după localizare, reactivitate imunologică și funcție fiziologică. Izoforma II se află în mitocondrii, fiind exprimată în țesuturile extrahepatice, în special în rinichi. Rolul fiziologic al acestei izoforme nu este până în prezent elucidat. Se consideră că ea este implicată în sinteza prolinei și poliaminelor.

Este de remarcă că activitatea arginazei în urină în diferite variante clinice ale GN, suferă modificări de orientare și intensitate diferită. Rezultatele obținute în cadrul prezentului studiu atestă că în sindromul nefrotic SS, perioada de debut, nivelul arginazei în urină a crescut de 4,5 ori (până la  $0,82 \pm 0,23$  nmol/mM creatinină) și a corelat cu nivelul AAT ( $r_{xy} = 0,808$ ,  $p < 0,01$ ), pe când în sindromul nefrotic SR activitatea arginazei s-a redus până la  $0,12 \pm 0,02$  nmol/mM creatinină, diferențele dintre aceste două grupuri fiind statistic veridice ( $p < 0,05$ ).

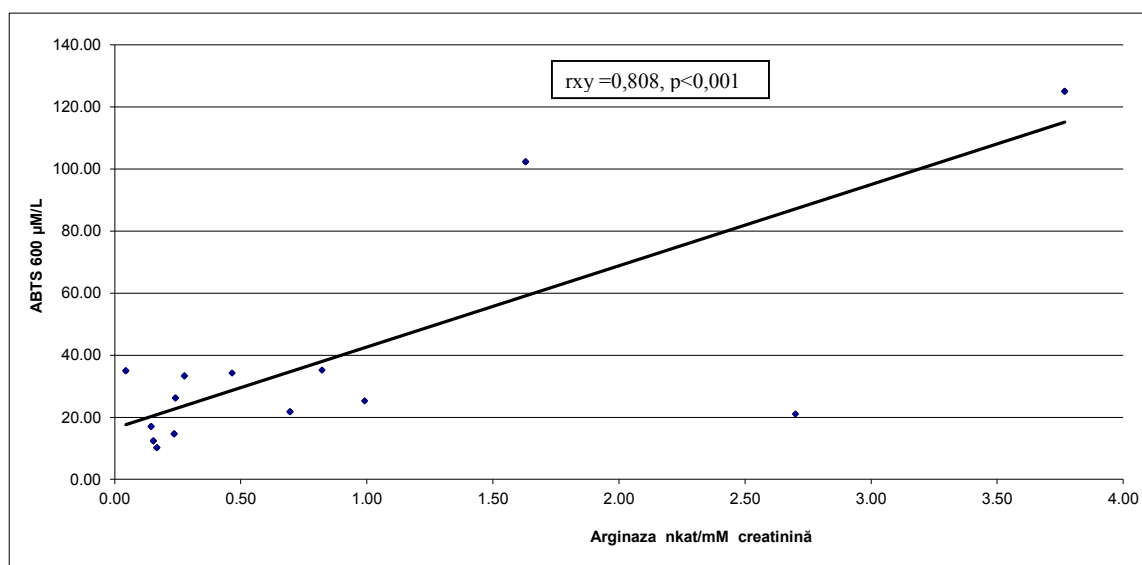


Figura 5.1. Corelația între nivelul arginazei în urină și ABTS în GNA sindrom nefrotic SS în debutul bolii

În sindromul nefrotic SS și sindromul nefrotic SR în perioada remisiunii nivelul arginazei în urină s-a redus practic până la valorile grupului de control. În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, nivelul arginazei nu se modifică, pe când în GNC forma mixtă, perioada acutizării, nivelul funcțional al arginazei în urină s-a majorat de 2,9 ori (până la  $0,53 \pm 0,09$  nmol/s·mM creatinină), față de  $0,18 \pm 0,04$  nmol/s·mM în grupul de control, iar în perioada remisiunii s-a redus

practic de 1,5 ori (până la  $0,34 \pm 0,04$  nmol/s·mM creatinină), depășind aproape dublu valorile grupului de control ( $p < 0,05$ ) [84].

În GNC forma nefrotică perioada de acutizare s-a înregistrat o corelație puternică directă între nivelul arginazei în urină și AAT cu ABTS ( $r_{xy} = 0,893$ ,  $p < 0,001$ ); între nivelul arginazei în urină și AGE ( $r_{xy} = 0,977$ ,  $p < 0,01$ ); între nivelul arginazei în urină și S-nitrosotoli ( $r_{xy} = 0,855$ ,  $p < 0,01$ ); între nivelul arginazei în urină și PPOA ( $r_{xy} = 0,632$ ,  $p < 0,05$ ); între nivelul arginazei în urină și MIP-1 $\alpha$  ( $r_{xy} = 0,883$ ,  $p < 0,001$ ); între nivelul arginazei în urină și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = 0,625$ ,  $p < 0,05$ ). În GNC forma mixtă, perioada de acutizare, au existat corelații puternice directe între nivelul arginazei în urină și AAT cu ABTS ( $r_{xy} = 0,642$ ,  $p < 0,05$ ) și între nivelul arginazei în urină și S-nitrosothioli ( $r_{xy} = 0,851$ ,  $p < 0,001$ ). Totodată, în GNC forma mixtă, perioada de acutizare, au fost semnalate corelații inverse foarte puternice între nivelul arginazei în urină și MIP- $\alpha$  ( $r_{xy} = -1,000$ ,  $p < 0,001$ ).

Activitatea arginazei în urină, în diferite variante clinice ale GN, suferă modificări diferite, fapt ce influențează asupra expresării iNOS – nitric oxid sintazei inductibile, care la rândul ei, este responsabilă de persistența procesului inflamator în rinichi.

Rezultatele evaluării activității arginazei în serul sangvin la copiii cu GN sunt expuse în tabelul 5.3. Astfel, notăm o reducere a activității arginazei în serul sangvin în toate variantele clinice ale GN. În GNA sindrom nefrotic SS, perioada de debut, activitatea arginazei s-a redus cu 29,6%, pe când în sindromul nefrotic SR cu 62,1%, comparativ cu grupul de control. O reducere de 66,4% a indicelui menționat s-a consemnat în GNC forma nefrotică, perioada de acutizare. În perioada de remisiune activitatea arginazei în serul sangvin a crescut practic de 2 ori, comparativ cu valorile inițiale, dar nu a atins valorile controlului.

În rinichi, creșterea activității arginazei poate reduce, prin urmare, disponibilitatea L-argininei pentru eNOS, provocând o scădere a producției de NO și creșterea radicalilor de superoxid din cauza decuplării eNOS [181]. Activitatea arginazică crescută a fost asociată cu mai multe probleme vasculare, inclusiv hipertensiunea, ateroscleroza, tulburări pronunțate în stadiul terminal al BRC [256, 264].

Studii efectuate anterior au demonstrat că inhibarea arginazei contribuie la reducerea expansiunii mezangiale și hiper celularității glomerulare în diabetul zaharat, indicând o posibilă contribuție a arginazei în inițierea și/sau progresia fibrozei renale diabetice, iar studiile imunohistochimice au identificat expresia arginazei-2 în tubii proximali și colectori [310]. Alterarea funcției endoteliale este un eveniment de bază comun pentru anomaliile vasculare la pacienții cu diabet zaharat rezistenți la insulină, intoleranță la glucoză [277], hipertensiune arterială, boli vasculare periferice [256, 264].

Disfuncția endotelială, caracterizată prin biodisponibilitate redusă a NO și creșterea stresului oxidativ, este un semn distinctiv al diabetului zaharat și nefritei diabetice. NO este produs din arginină prin NOS. În condiții de nivel scăzut de arginină sau hiperglicemie, NOS endotelial poate deveni necuplat, producând specii reactive de oxigen în locul NO [113].

Studiile anterioare au arătat că prezența disfuncției vasculare în diabetul zaharat experimental [143, 264, 310] sau la pacienții diabetici [48] este asociată cu creșterea arginazei-1 [48, 264] sau arginazei-2 [143], iar funcția vasculară poate fi normalizată prin inhibarea activității arginazei sau ablație genetică a arginazei-2 [143, 310]. Studii efectuate care au evaluat rolul posibil al arginazei-2 în disfuncția vasculară în special în rinichi, au indicat la rolul arginazei-2 în reglarea biodisponibilității NO în rinichi [79]. Au fost raportate, de asemenea, creșterea expresiei eNOS și iNOS și nivele plasmatiche scăzute de L-arginină. Totuși, administrarea de L-arginină cu apa de băut la șobolani ameliorează scăderea RFG și, respectiv, atenuează creșterea exagerată a tensiunii arteriale, dar este asociată cu creșterea excreției urinare de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, precum și cu reduceri semnificative ale volumului interstițial, infiltratelor monocitare și depunerilor de collagen tip IV [376].

În baza acestor studii s-a postulat că reducerea sintezei NO din cauza scăderii disponibilității de substrat (L-arginină) poate juca un rol patogenic în modelul experimental al bolii renale [210]. Una dintre caracteristicile principale ale leziunii renale mediate imun este inducerea locală a iNOS și, ca rezultat, producerea unor cantități mari de NO. Expresia crescută a ARNm și iNOS proteină a fost înregistrată în glomerulonefrita mezangioproliferativă, granulomatoza Wegener, nefrita lupică și rețetul de transplant renal, fiind corelată cu semnele histologice ale leziunilor renale și pierderea funcției renale.

Studii recente au raportat că deficiența de arginază-2 conferă protecție țesutului renal în modelul experimental de diabet zaharat și că arginază-2 reprezintă un mecanism important în inducerea eNOS, ceea ce contribuie la atenuarea stresului oxidativ și răspunsurilor inflamatorii [280]. În același timp, creșterea activității arginazei poate induce sinteza de prolină, esențială pentru formarea și depunerea de collagen – o componentă majoră a matricei extracelulare. Deoarece arginaza-2 se co-localizează în mitocondrii, s-a sugerat că ea ar fi izoforma preferențială implicată în producția de prolină, în timp ce co-localizarea arginazei-1 și ornitindecarboxilazei (ODC) ar favoriza sinteza de poliamină [232]. Conform datelor studiului, metabolismul argininei este perturbat în nefropatia obstructivă experimentală. Inducerea arginazei-2 ar putea duce la activarea căii de formare a prolinei în locul unei sinteze de poliamine, fapt ce ar rezulta în final cu accelerarea sintezei / depozitării de collagen [187].



Aceste rezultate sugerează faptul că arginază-2 joacă un rol major în inducerea leziunii renale diabetice, iar blocarea activității sau expresiei arginazei-2 ar putea fi o nouă abordare terapeutică în tratamentul nefropatiei diabetice [225].

Cercetările experimentale [152] au demonstrat că blocarea farmacologică sau deficiența genetică a arginazei-2 conferă protecție renală la modelarea diabetului zaharat. Astfel, inhibarea arginazei mediază protecția tisulară renală în nefropatia diabetică printr-un mecanism eNOS-dependent și care are un efect eNOS independent asupra recrutării de macrofage în rinichi. În mod analogic, într-un studiu clinic [372] a fost cercetat rolul inhibării arginazei în prevenirea progresiei nefropatiei diabetice. Efectele inhibării arginazei au fost comparate cu tratamentul cu IECA (captopril) care au fost administrate precoce și tardiv în nefropatia diabetică. Tratamentul precoce cu captopril a redus nivelul de albuminurie, modificările histologice și infiltrarea de macrofage în rinichi fără a afecta alți parametri, pe când tratamentul tardiv cu captopril a fost inefficient. Aceste date demonstrează importanța inhibării arginazei ca un nou potențial de intervenție terapeutică în stadiile precoce și tardive ale leziunii renale diabetice.

## **5.2. Rolul modificărilor pseudocolinesterazei în evoluția clinică, prognozarea complicațiilor glomerulonefritei la copii**

Printre multiplele probleme legate de diversitatea clinică, prognostic-evolutivă a maladiilor renale, se evidențiază studierea rolului unor parametri biochimici ce caracterizează starea ficatului la bolnavii cu GN, rolul lor în patogenia complicațiilor.

Determinarea activității pseudocolinesterazei (PCE) și-a găsit o largă răspândire, prin rolul ei în metabolismul esterilor colinei în organism. PCE este o enzimă serică sintetizată în ficat cu masa moleculară mare – 400 kDa, ce servește ca test care reflectă starea funcțională a ficatului, funcția proteosintetică a acestuia.

În tabelul 5.4 sunt expuse rezultatele obținute la evaluarea activității PCE în serul sangvin la copiii cu GNA și GNC în dinamica maladiei.

Studiile efectuate demonstrează o creștere statistic concludentă a activității PCE în serul sangvin în toate variantele clinice ale GNA.

Cele mai pronunțate modificări ale activității PCE în ser au fost consemnate în GNA sindrom nefrotic SR în perioada manifestărilor clinice, când activitatea enzimei a crescut practic de 1,8 ori în raport cu valorile matorului. Dimpotrivă, în GNA sindromul nefritic practice nu s-au înregistrat modificări veridice ale activității PCE serice în raport cu valorile de control.

O creștere autentică de 1,4 ori a indicelui menționat s-a consemnat în GNC forma nefrotică în perioada acutizării (până la  $281,8 \pm 19,06 \mu\text{M/s.l}$ ,  $p < 0,01$ ), cu o reducere discretă (cu 18,2%) față de valorile inițiale în perioada remisiunii.

Tabelul 5.4. Activitatea PCE în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | PCE, $\mu\text{mol/s.l}$                |       |                                   |       |
|----------------------|-----------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
|                      | acutizare                               | %     | remisiune                         | %     |
| GNA sindrom nefritic | $171,4 \pm 22,61$                       | 87,1  | $225,5 \pm 19,71$<br>$p_1 > 0,05$ | 114,6 |
| GNA SNSS             | $318,6 \pm 65,84^*$                     | 161,9 | $207,3 \pm 30,01$<br>$p_1 > 0,05$ | 105,3 |
| GNA SNSR             | $350,0 \pm 26,34^{***}$<br>$p_2 > 0,05$ | 177,8 | $277,0 \pm 36,18$<br>$p_1 < 0,05$ | 140,8 |
| GNC forma nefrotică  | $281,8 \pm 19,06^{**}$                  | 143,2 | $246,1 \pm 24,21$                 | 125,0 |
| GNC forma mixtă      | $225,6 \pm 6,06^{***}$                  | 114,6 | $194,6 \pm 35,76$                 | 98,9  |
| Control              | $196,8 \pm 10,56$                       | 100,0 | $196,8 \pm 10,56$                 | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control:  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare,  $p_2$  – autenticitatea la compararea SNSS cu SNSR.

Creșterea activității PCE în serul sangvin la pacienții cu GN este legată de intensificarea proceselor biosintetice în ficat, și poartă un caracter compensator-adaptiv ca răspuns la pierderile excesive pe cale renală ale proteinelor plasmei sangvine. Deoarece se sintetizează în ficat și apoi se elimină în sânge, activitatea PCE oferă informații despre funcția globală a ficatului, fiind utilizată ca test screening al funcției hepatice împreună cu  $\gamma$ -GTP, ALAT și ASAT.

Valorile PCE cresc în caz de sindrom nefrotic, hipertiroidie, icter obstructiv, dar și la pacienții cu obezitate. Din cauza timpului redus de înjumătățire, unii autori consideră că PCE serică poate fi utilizată drept marker nutrițional și de prognostic, care se modifică rapid în raport cu starea clinică generală și ale stării de nutriție.

Nivelele PCE sunt puternic influențate de inflamație, și anume: scădere în faza inflamatorie acută și creștere promptă atunci când inflamația se atenuează [73].

Rezultatele testării a markerului afectării permeabilității glomerulare – PCE în urină, în evoluția clinică a glomerulonefritei sunt prezentate în tabelul 5.5.

Studiul nostru a demonstrat o creștere de 2,8 ori (până la  $18,03 \pm 2,45 \text{ nM/s.mM}$  creatinină) a markerului afectării permeabilității glomerulare – PCE în urină în GNA sindrom nefritic perioada manifestărilor clinice.

Tabelul 5.5. Activitatea PCE în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | PCE, nM/mM creatinină                |       |                                       |       |
|----------------------|--------------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
|                      | acutizare                            | %     | remisiune                             | %     |
| GNA sindrom nefritic | 18,03±2,45***                        | 277,4 | 20,9±2,43***<br>p <sub>1</sub> >0,05  | 321,5 |
| GNA SNSS             | 26,85±3,33***                        | 413,1 | 11,93±1,34**<br>p <sub>1</sub> <0,01  | 183,5 |
| GNA SNSR             | 20,9±2,40***<br>p <sub>2</sub> >0,05 | 321,5 | 17,51±1,53***<br>p <sub>1</sub> >0,05 | 269,4 |
| GNC forma nefrotică  | 15,8±2,70**                          | 243,1 | 4,8±0,30<br>p <sub>1</sub> <0,01      | 73,8  |
| Control              | 6,5±0,53                             | 100,0 | 6,5±0,53                              | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub> – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare; p<sub>2</sub> – autenticitatea indicilor la compararea SNSS cu SNSR.

În sindromul nefrotic SS, perioada de debut, activitatea PCE în urină a crescut de 4,1 ori (până la 26,85±3,33 nM/s.mM creatinină), pe când în sindromul nefrotic SR s-a majorat de 3,2 ori (până la 20,9±2,4 nM/s.mM creatinină) comparativ cu valorile normative.

În perioada remisiunii activitatea PCE în urină s-a redus discret față de valorile inițiale, dar a rămas majorată, comparativ cu grupul de control. În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, activitatea PCE în urină s-a majorat de 2,4 ori și s-a redus în perioada remisiunii.

Au existat corelații, mai precis, s-a înregistrat o legătură corelativă pozitivă puternică între markerul afectării permeabilității glomerulare – PCE din urină și MIP-1α ( $r_{xy}=1,0$ , p<0,001); o corelație inversă puternică între PCE și VEGF ( $r_{xy}=-0,823$ , p<0,01); între PCE și CTGF ( $r_{xy}=-0,828$ , p<0,01) și o corelație inversă medie între PCE și FGF-β ( $r_{xy}=-0,644$ , p<0,05).

Evaluarea activității PCE în serul sangvin la copiii cu GNA și GNC permite nu numai de a determina gradul de alterare tisulară renală, dar și servește ca un indicator de apreciere a fazei procesului, de prognozare a complicațiilor și a exodului maladiei.

Cele mai propunțate creșteri ale excreției PCE ca rezultat al modificării permeabilității selective a filtrului glomerular și tulburărilor reabsorbției tubulare a proteinelor s-au înregistrat preponderent în sindromul nefrotic SS și sindromul nefrotic SR.

Considerăm, că cauza apariției markerului afectării permeabilității glomerulare – PCE în urină, este ischemia și hipoxia tisulară renală care, în complex cu intoxicația endogenă exprimată, are ca efect o reducere a sintezei de heparan-sulfat-proteoglicani, a collagenului IV și lamininei

din peretele MBG. Toate aceste fenomene contribuie la creșterea permeabilității filtrului glomerular. Aprecierea enzimei date în urină poate servi drept confirmare a faptului că în GNA și GNC la copii este însoțită de sindromul permeabilității glomerulare crescute.

### **5.3. Importanța diagnostică a enzimelor plasmatice, proteolitice, lizosomale în patologia glomerulonefritei la copii**

În ultimii ani, o atenție mare se acordă cercetării activității enzimelor nefroteliului în diferite boli ale sistemului urinar la adulți și copii.

După datele unor cercetători, o informativitate înaltă posedă markerii urinari ai afectării țesutului tubular interstițial al rinichilor, la care se referă enzimele epiteliului canaliculelor proximale și distale ( $\gamma$ -GTP, fosfataza alcalină (FA), NAG- $\beta$  și alte enzime lizosomale). Repartizarea enzimelor organelor celulelor epiteliale ale canaliculelor renale este neuniformă. Membrana plasmatică a epiteliului conține  $\gamma$ -glutamiltransferază ( $\gamma$ -GTP), fosfatază alcalină,  $\alpha$ -glucozidază neutră. În citoplasmă se găsesc enzimele glicolitice – hexokinaza, LDH, MDH; în lizosomi – arilsulfataza A și B,  $\beta$ -galactozidaza,  $\beta$ -glucozidaza,  $\beta$ -glucuronidaza, N-acetyl- $\beta$ -glucozaminidaza (NAG- $\beta$ ) [228, 263]. În general, enzimele lizosomale și enzimele „marginii în perie” ( $\gamma$ -GTP, FA și alaninaminopeptidaza) sunt prezente în tubii proximali, iar enzimele glicolitice sunt localizate în nefronul distal. De menționat, că eliberarea plasmatică crescută a acestor enzime este exprimată și la nivel urinar în leziunile glomerulare [73].

Practic lipsesc studii privind cercetarea clinico-diagnostică a importanței modificărilor profilului enzimatic în diferite forme clinico-evolutive ale GN, referitor la aprecierea nivelului și gradului de afectare al elementelor structural-funcționale ale nefronului.

Rămâne insuficient cercetată informativitatea markerilor enzimatici pentru depistarea timpurie a afectării diferitor elemente ale unității funcțional-structurale ale nefronului aparatului glomerular și canicular, tubular al rinichilor în GN.

Pentru selectarea celor mai informativi indici și pentru depistarea factorilor generali latenți care explică legăturile dintre indicii cercetați și evaluați a fost efectuată analiza factorială prin metoda componentelor principale cu folosirea procedurii rotirea sistemului de coordonate (varimax-rotirea ortogonală), care produce minimizarea cantității variabilelor cu o înaltă încărcătură factorială.

Mai multe surse contribuie la apariția enzimelor celulare în urină. Cea mai mare parte a enzimelor urinare derivă din țesutul renal. Celulele tubulare renale conțin activități ridicate ale multor enzime, în scopul de a-și îndeplini numeroasele funcții biochimice. Procesele de reînnoire

fiziologică permanentă a celulelor tubulare renale, precum și modificările permeabilității membranelor celulare sunt cauzele care explică excreția renală a unor enzime celulare în urină.

În condiții normale, doar puține activități enzimatică care apar în urină prin filtrare glomerulară derivă din serul sangvin. Enzimele care au o masă moleculară ce depășește 70 kDa nu trec prin filtrul renal, fiind excretate în urină doar în cantități neimportante în condiții fiziologice. Astfel, enzimele urinare provin, cu excepția enzimelor cu masa moleculară redusă, cum ar fi amilaza și lizozimul, în principal, din celule tubulare renale.

Activitățile enzimatică măsurate în urină reflectă cantitățile de enzime eliberate din celulele tubulare, precum și influența inhibitorilor și/sau activatorilor asupra activității și stabilității enzimelor în urină, după eliberarea lor din celule[263].

Enzima gama-glutamil transpeptidaza ( $\gamma$ -GTP) catalizează transportul fragmentului  $\gamma$ -glutamil spre aminoacizi, cu formarea glutamil-aminoacizilor, care sunt translocați în celulă. Această enzimă este implicată în transferul aminoacizilor prin membrana celulară. De asemenea, este implicată în metabolismul glutatationului prin transferul fragmentului glutamil la o varietate de molecule acceptor inclusiv apa, anumiți L-aminoacizi și peptide. Enzima  $\gamma$ -GTP joacă un rol-cheie în ciclul gamma-glutamilic, este o cale pentru sinteza și degradarea glutatationului și detoxifierea xenobioticelor. Există dovezi care indică faptul că  $\gamma$ -GTP poate exercita, de asemenea, un rol prooxidant, cu efecte de reglare la diferite nivele în transducția semnalului celular și fiziopatologia celulară [263].

Această enzimă este situată, în principal, în membranele celulare din mai multe țesuturi, inclusiv ficat, rinichi, canalele biliare, pancreas, splină, creier și veziculele seminale. În rinichi, enzima este prezentă în celulele tubilor contorți proximali, fiind localizată în membrana cu „marginea în perie” și parțial în aparatul Golgi. Activitatea  $\gamma$ -GTP urinare crește la pacienții cu tulburări renale tubulare [263].

Rezultatele evaluării activității  $\gamma$ -GTP în urină, enzima localizată în membranele plasmatică ale epitelului canaliculelor proximale ale nefronului la copiii cu glomerulonefrită primară sunt reflectate în tabelul 5.6.

Analiza rezultatelor obținute a demonstrat o creștere a activității  $\gamma$ -GTP în urină în toate grupurile de pacienți în perioada acutizării maladii. Astfel, s-a înregistrat o majorare semnificativă de 5,4 ori a activității  $\gamma$ -GTP în urină în GNA sindrom nefrotic SS, și de 1,6 ori în sindromul nefrotic SR, comparativ cu valorile de control.

În perioada remisiunii s-a semnalat o tendință de reducere a activității  $\gamma$ -GTP în urină, dar care însă rămânea înaltă față de control, cu excepția grupului cu GNA sindrom nefrotic SR, la care activitatea  $\gamma$ -GTP în urină a crescut veridic de 4,7 ori ( $p < 0,05$ ), comparativ cu valorile grupului de control.

Tabelul 5.6. Activitatea enzimei membranelor plasmatiche -  $\gamma$ -GTP în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | $\gamma$ -GTP, nM/s.mM creatinina |       |                           |       |
|----------------------|-----------------------------------|-------|---------------------------|-------|
|                      | acutizare                         | %     | remisiune                 | %     |
| GNA sindrom nefritic | 2,8±0,49***                       | 104,5 | 3,60±2,44<br>$p_1>0,05$   | 134,3 |
| GNA SNSS             | 14,6±6,97**                       | 544,8 | 4,87±3,95<br>$p_1>0,05$   | 181,7 |
| GNA SNSR             | 4,4±2,50*<br>$p_2>0,05$           | 164,2 | 12,65±0,23*<br>$p_1<0,01$ | 472,0 |
| GNC forma nefrotică  | 7,97±4,33***                      | 297,4 | 2,53±1,16<br>$p_1>0,05$   | 94,4  |
| GNC forma mixtă      | 4,03±1,40*                        | 150,4 | 5,86±3,13<br>$p_1>0,05$   | 218,7 |
| Control              | 2,68±1,78                         | 100,0 |                           | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare;  $p_2$  – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Totodată, s-a înregistrat o creștere de 3 ori (până la  $7,97 \pm 4,3$  nM/s.mM creatinină,  $p<0,001$ ) a activității  $\gamma$ -GTP în GNC forma nefrotică, perioada acutizării, pe când în forma mixtă activitatea  $\gamma$ -GTP în urină a crescut numai de 1,5 ori ( $p<0,05$ ), comparativ cu valorile de control.

Au fost înregistrate corelații directe foarte puternice între activitatea  $\gamma$ -GTP și PCE ( $r_{xy}=1,0$ ,  $p<0,001$ ); între activitatea  $\gamma$ -GTP și MIP -1 $\alpha$  ( $r_{xy}=1,0$ ,  $p<0,001$ ) în GNC formă nefrotică, perioada acutizării. Cercetările efectuate au stabilit prezența unor corelații inverse puternice între activitatea  $\gamma$ -GTP și VFGF ( $r_{xy}=-0,758$ ,  $p<0,01$ ); între activitatea  $\gamma$ -GTP și FGF- $\beta$  ( $r_{xy}=-0,621$ ,  $p<0,05$ ); între activitatea  $\gamma$ -GTP și CTGF ( $r_{xy}=-0,748$ ,  $p<0,01$ ).

În perioada remisiunii are loc o reducere până la valorile normale a  $\gamma$ -GTP la copiii cu GNC forma nefrotică, cu excepția pacienților cu forma mixtă, la care nivelul  $\gamma$ -GTP în urină a crescut de 2,2 ori ( $5,86 \pm 3,13$  nM/s.mM creatinină).

Astfel, datele obținute demonstrează că în GNC are loc afectarea pronunțată a canaliculelor contorte proximale, mai ales la pacienții cu GNC forma mixtă, și o afectare moderată la pacienții cu GNC forma nefrotică. În GNA sindromul nefritic s-a semnalat afectarea neînsemnată a tubilor proximali. Activitatea  $\gamma$ -GTP corelează cu activitatea procesului patologic în rinichi, deoarece acest ferment este parțial localizat în membrana citoplasmatică și aparatul Golgi. Totodată, creșterea activității  $\gamma$ -GTP reflectă apariția modificărilor patologice în stadiul precoce al lezării rinichilor la nivelul membranelor citoplasmatiche.

Aprecierea enzimelor proteolitice în urină a inclus determinarea activității chimotripsinei și leucinaminopeptidazei (LAP). Chimotripsina este o enzimă proteolitică care aparține superfamiliei de serin proteaze și conține în centrul activ aminoacidul serina. Molecula de chimotripsină are masa moleculară de circa 25 kDa. Ea hidrolizează legăturile peptidice la formarea cărora participă aminoacizii aromatici (fenilalanina, tirozină și triptofanul). Datorită masei moleculare joase ea trece ușor prin filtrul renal, fiind captată în canaliculele renale și ulterior degradată [73, 263].

Rezultatele evaluării a activității chimotripsinei în urină la copii cu glomerulonefrită primară sunt reflectate în tabelul 5.7.

Remarcăm că activitatea chimotripsinei în urină suferă schimbări de diferit grad și sens. Astfel, cea mai înaltă activitate a chimotripsinei în urină s-a înregistrat la pacienții cu GNA sindrom nefrotic SS, perioada manifestărilor clinice, la care s-a atestat o creștere semnificativă de 2,2 ori a activității chimotripsinei în urină ( $0,86 \pm 0,16$  nM/s.mM creatinină,  $p < 0,01$ ) și la cei cu GNA sindrom nefritic (creștere de 2,0 ori, până la  $0,79 \pm 0,16$  nM/s.mM creatinină), față de  $0,39 \pm 0,06$  nM/s.mM creatinină în grupul de control.

Tabelul 5.7. Activitatea enzimelor proteolitice în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | Chimotripsină, nM/s.mM creatinină |                             | LAP, nM/s.mM creatinină         |                           |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------|
|                      | acutizare                         | remisiune                   | acutizare                       | remisiune                 |
| GNA sindrom nefritic | $0,79 \pm 0,16^*$<br>202,6%       | $0,18 \pm 0,11$<br>46,2%    | $1,37 \pm 0,23^*$<br>201,5%     | $0,74 \pm 0,15$<br>108,8% |
| GNA SNSS             | $0,86 \pm 0,16^{**}$<br>220,5%    | $0,25 \pm 0,04$<br>64,1%    | $1,86 \pm 0,56^{***}$<br>273,5% | $0,89 \pm 0,15$<br>130,9% |
| GNA SNSR             | $0,57 \pm 0,12$<br>146,2%         | $1,03 \pm 0,09^*$<br>264,1% | $1,82 \pm 0,70^{**}$<br>267,6%  | $0,57 \pm 0,14$<br>83,8%  |
| GNC forma nefrotică  | $0,59 \pm 0,13$<br>151,3%         | $0,34 \pm 0,06$<br>87,2%    | $0,76 \pm 0,12$<br>111,8%       | $0,71 \pm 0,11$<br>104,4% |
| GNC forma mixtă      | $0,75 \pm 0,15^*$<br>192,3%       | $0,38 \pm 0,13$<br>97,4%    | $1,25 \pm 0,27^*$<br>183,8%     | $1,01 \pm 0,25$<br>148,5% |
| Control              | $0,39 \pm 0,06$<br>100%           |                             | $0,68 \pm 0,05$<br>100%         |                           |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control:  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .

În perioada remisiunii s-a constatat o creștere de 2,6 ori a chimotripsinei în urină în GNA sindrom nefrotic SR și o reducere cu 36,0 % în sindrom nefrotic SS, cu 54,0 % în GNA sindrom

nefritic, comparativ cu valorile normale. Creșterea activității chimotripsinei în urină la copiii cu diferite forme clinico-evolutive ale GN reflectă prezența tulburărilor reabsorbției tubulare a proteinelor.

Leucinaminopeptidaza (LAP) este o aminopeptidază prezentă aproape în toate țesuturile, cele mai mari concentrații fiind depistate în intestinul subțire, rinichi și ficat. În rinichi LAP este enzima principală a tubilor contorți proximali și un element constitutiv integrant al membranei cu „marginea în perie”. Practic lipsește în celelalte sectoare ale nefronului. Analiza excreției acestei enzime cu urina arată că ea este supusă ritmului circadian, excreția LAP fiind cea mai mare dimineața (orele 8 – 12). Activitatea urinară a LAP este un indicator sensibil al funcției tubulare renale [263].

Rezultatele obținute în studiul de față demonstrează majorarea activității LAP – enzimei membranare în toate variantele clinice ale GNA (tabelul 5.7). Astfel, în GNA sindrom nefrotic SS și SR perioada manifestărilor clinice a existat o creștere veridică a activității LAP în urină de 2,7 ori, comparativ cu grupul de control. În perioada remisiunii s-a constatat o reducere discretă a enzimuriei cu 16,0 % la pacienții cu sindrom nefrotic SR.

După cum rezultă din tabelul 5.7, activitatea chimotripsinei și a LAP în urină crește neconcludent în GNC în perioada acutizării, comparativ cu grupul de control. S-a notat o creștere de 1,5 – 1,9 ori a activității chimotripsinei în urină în forma nefrotică și cea mixtă ale GNC, perioada acutizării și reducerea până la valorile normale în perioada remisiunii. Modificările activității LAP în GNC forma mixtă perioada acutizării, de asemenea, se prezintă prin nivele crescute de 1,8 ori în raport cu martorul, cu o reducere până la valorile normale în perioada de remisiune.

Creșterea activității LAP – enzimei membranare (atașate la membrana nefroteliului) – denotă prezență tulburărilor funcționale ale nefroteliului în GN. Rezultatele obținute de noi demonstrează utilitatea determinării nivelului LAP în urină în calitate de metodă neinvazivă de laborator pentru aprecierea tulburărilor funcționale la nivelul aparatului tubular la etapele clinico-evolutive ale GN, pentru urmărirea eficienței tratamentului aplicat.

Beta-2 – microglobulina ( $\beta$ 2-MG) este o polipeptidă nonglicozilată cu masa moleculară mică (11,6 kDa) fiind constituită din 100 aminoacizi. Aceasta este lanțul invariant al moleculelor MHC clasa I de pe suprafața celulară a tuturor celulelor nucleate. Rolul ei constă în stabilizarea structurii terțiare a lanțului- $\alpha$  al moleculelor MHC clasa I. Deoarece este necovalent asociată cu lanțul- $\alpha$  și nu are nici-o legătură directă cu membrana celulară,  $\beta$ 2-MG, în condiții fiziologice,



poate trece ușor în plasma sanguină, fiind apoi eliminată prin filtrația glomerulară și în continuare reabsorbită în tubii contorți proximali și apoi catabolizată [263].

Datele obținute la evaluarea concentrației  $\beta_2$ -microglobulinei în urină la copiii cu glomerulonefrită primară sunt reflectate în tabelul 5.8. Conform rezultatelor studiului, concentrația  $\beta_2$ -microglobulinei în urină a crescut de 2,8-2,7 ori în GNA sindrom nefrotic SS și SR în perioada manifestărilor clinice, comparativ cu grupul de control.

S-a semnalat o reducere neconcludentă a nivelului  $\beta_2$ -microglobulinei în urină în GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice. În perioada remisiunii, nivelul  $\beta_2$ -microglobulinei în urină s-a redus semnificativ comparativ cu valorile inițiale în ambele grupuri.

Creșterea nivelului  $\beta_2$ -microglobulinei în urină la copiii cu diferite forme clinico-evolutive ale GN reflectă disfuncția elementelor celulare ale aparatului tubular renal, în special, prezența tulburărilor reabsorbției tubulare a proteinelor.

Rezultatele obținute demonstrează utilitatea determinării concentrației  $\beta_2$ -microglobulinei în urină în calitate de metodă neinvazivă de laborator pentru depistarea timpurie a tulburărilor funcționale la nivelul aparatului tubular proximal.

Tabelul 5.8. Nivelul  $\beta_2$ -microglobulinei în urină la copiii cu glomerulonefrită acută

| Grupuri de studiu    | $\beta_2$ -microglobulina, ng/mM creatinină |        |                                    |       |
|----------------------|---------------------------------------------|--------|------------------------------------|-------|
|                      | acutizare                                   | %      | remisiune                          | %     |
| GNA sindrom nefritic | 13,83±3,22                                  | 71,5%  | 10,6±0,47*<br>p <sub>1</sub> >0,05 | 54,8% |
| GNA SNSS             | 54,15±11,06**                               | 279,8% | 16,37±9,99<br>p <sub>1</sub> <0,01 | 84,6% |
| GNA SNSR             | 51,71±13,63*<br>p <sub>2</sub> >0,05        | 267,2% | 10,97±9,29<br>p <sub>1</sub> <0,05 | 56,7% |
| Control              | 19,35±3,61                                  | 100,0  | 19,35±3,61                         | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub>– autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare; p<sub>2</sub> – autenticitate la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR

Lactatdehidrogenaza (LDH) este o enzimă citozolică prezentă în toate organele, inclusiv în rinichi unde este distribuită uniform de-a lungul tractului urinar și al nefronului, în special în porțiunea descendentă a ansei Henle [263].

Datele obținute privind activitatea LDH în urină la copiii cu glomerulonefrită sunt prezentate în tabelul 5.9.

Studiul activității enzimei citoplastice LDH în urină a evidențiat o creștere de 2 ori în GNA sindrom nefritic. S-a înregistrat o corelație directă puternică între LDH și suma  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$  ( $r_{xy} = 0,717$ ,  $p < 0,001$ ),  $\text{NO}_2$  ( $r_{xy} = 0,864$ ,  $p < 0,001$ ),  $\text{NO}_3$  ( $r_{xy} = 0,670$ ,  $p < 0,001$ ); LAP ( $r_{xy} = 0,684$ ,  $p < 0,001$ ). Activitatea LDH în urină a crescut de 4,5 ori în sindromul nefrotic SS în perioada de debut, cu o regresie până la  $2,21 \pm 0,36$  nM/mM creatinină în sindromul nefrotic SR în raport cu valorile de control. În perioada remisiunii în sindromul nefrotic SS, activitatea LDH în urină s-a redus practic de 2 ori, dar a crescut de 2,5 ori în sindromul nefrotic SR, comparativ cu valorile de control.

S-a semnalat o creștere de 2 ori a activității LDH în GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, și o reducere concludentă a activității LDH în perioada remisiunii față de valorile de control. Sporirea activității LDH – enzimă citoplasmatică cu masa moleculară medie de cca 140 kDa, ne indică o hipoxie tisulară marcantă, cu o creștere pronunțată a permeabilității membranelor celulare, nu se exclude, ca rezultat al dezintegrării lor parțiale, și o instabilitate metabolică renală.

Tabelul 5.9. Activitatea LDH în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | LDH, nM/s.mM creatinină            |       |                                        |       |
|----------------------|------------------------------------|-------|----------------------------------------|-------|
|                      | acutizare                          | %     | remisiune                              | %     |
| GNA sindrom nefritic | $6,83 \pm 0,66^{***}$              | 195,7 | $10,05 \pm 1,40^{***}$<br>$p_1 > 0,05$ | 288,0 |
| GNA SNSS             | $15,62 \pm 1,80^{***}$             | 447,6 | $6,61 \pm 0,92^{**}$<br>$p_1 < 0,01$   | 189,4 |
| GNA SNSR             | $2,21 \pm 0,36^*$<br>$p_2 < 0,001$ | 63,3  | $8,80 \pm 1,32^{**}$<br>$p_1 < 0,01$   | 252,1 |
| GNC forma nefrotică  | $7,27 \pm 0,70^{***}$              | 208,3 | $2,21 \pm 0,33^*$<br>$p_1 < 0,01$      | 63,3  |
| Control              | $3,49 \pm 0,51$                    | 100,0 | $3,49 \pm 0,51$                        | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$  – autenticitatea indicilor la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

Determinarea LDH în urină poate fi folosită ca indicator noninvaziv, sensibil de leziune renală și apreciere a activității bolii. Se cunoaște, că în patogenia multor boli participă cu rol important aparatul lizozomal al celulei cu complexul său puternic de hidrolaze acide, de aceea am

considerat rațional efectuarea unui studiu privind evaluarea modificărilor acestor enzime în sânge și urină la copiii cu GN primară.

Rolul hidrolazelor lizosomale în fiziopatogenia GN a fost studiat prin determinarea arilsulfatazei A și B, C,  $\beta$ -galactozidazei,  $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucuronidazei, NAG- $\beta$  în dinamica maladiei.

Rezultatele determinării arilsulfatazei A și B, C în serul sangvin în GNA și GNC sunt expuse în tabelul 5.10.

Datele obținute arată că activitatea arilsulfatazei A și B în serul sangvin s-a majorat notabil în toate variantele clinice ale GNA în perioada manifestărilor clinice. Astfel, în GNA sindrom nefritic acest indicator s-a majorat de 2,3 ori (până la  $3,6 \pm 0,78$  nM/s.l,  $p < 0,05$ ) față de ( $1,6 \pm 0,12$  nM/s.l) în grupul de control. Activitatea arilsulfatazei A și B în serul sangvin a crescut de 1,6 ori în sindromul nefrotic SS, și de 1,9 ori în sindromul nefrotic SR, respectiv, comparativ cu valorile de control.

Tabelul 5.10. Activitatea arilsulfatazei A și B și arilsulfatazei C în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită acută

| Grupuri de studiu    | Arilsulfataza A și B, nM/s.l  |                          | Arilsulfataza C, nM/s.l  |                           |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                      | acutizare                     | remisiune                | acutizare                | remisiune                 |
| GNA sindrom nefritic | $3,6 \pm 0,78^*$<br>225,0%    | $3,2 \pm 1,35$<br>200,0% | $2,6 \pm 0,48$<br>108,3% | $6,2 \pm 4,26$<br>258,3%  |
| GNA SNSS             | $2,5 \pm 0,38^*$<br>156,3%    | $1,7 \pm 0,38$<br>106,3% | $1,8 \pm 0,36$<br>75,0%  | $0,8 \pm 0,21^*$<br>33,3% |
| GNA SNSR             | $3,0 \pm 0,64^{**}$<br>187,5% | $2,7 \pm 0,22$<br>168,8% | $2,6 \pm 0,40$<br>108,3% | $3,1 \pm 0,75$<br>129,2%  |
| Control              | $1,6 \pm 0,12$<br>100%        |                          | $2,4 \pm 0,50$<br>100%   |                           |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control:  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .

Analiza activității  $\beta$ -galactozidazei în serul sangvin la pacienții cu GNA în perioada manifestărilor clinice a evidențiat valori crescute comparativ cu valorile de control (tabelul 5.11).

Astfel, cele mai pronunțate modificări ale activității enzimei date s-au constatat în sindromul nefrotic SR ( $p < 0,01$ ) atestând o creștere de 1,9 ori, pe când în sindromul nefrotic SS acest indicator a crescut de 1,7 ori, cu normalizarea activității  $\beta$ -galactozidazei în serul sangvin în perioada de remisiune în GNA sindrom nefrotic SS, dar cu menținerea activității enzimatice

majorate în celelalte variante ale GNA. Activitatea  $\beta$ -glucozidazei în serul sangvin s-a modificat neînsemnat în toate grupele de pacienți cu GNA în perioada manifestărilor clinice.

Tabelul 5.11. Activitatea  $\beta$ -galactozidazei și  $\beta$ -glucozidazei în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită acută

| Grupele de studiu    | $\beta$ -galactozidaza, nM/s.l |                          | $\beta$ -glucozidaza nM/s.l |                          |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                      | acutizare                      | remisiune                | acutizare                   | remisiune                |
| GNA sindrom nefritic | 3,8 $\pm$ 0,47*<br>165,2%      | 3,8 $\pm$ 0,42<br>165,2% | 3,4 $\pm$ 0,41<br>94,4%     | 3,4 $\pm$ 0,47<br>94,4%  |
| GNA SNSS             | 3,9 $\pm$ 0,51*<br>169,6%      | 2,5 $\pm$ 0,26<br>108,7% | 3,7 $\pm$ 0,64<br>102,8%    | 2,2 $\pm$ 0,28<br>61,1%  |
| GNA SNSR             | 4,3 $\pm$ 0,51**<br>187,0%     | 3,9 $\pm$ 0,08<br>169,6% | 3,8 $\pm$ 0,60<br>105,6%    | 3,8 $\pm$ 0,18<br>105,6% |
| Control              | 2,3 $\pm$ 0,32<br>100%         |                          | 3,6 $\pm$ 0,57<br>100%      |                          |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Beta-glucuronidaza face parte din familia de glicozidaze lizosomale care catalizează hidroliza resturilor de acid  $\beta$ -D-glucuronic de la capătul nereducător al glicozaminoglicanilor. Rezultatele obținute atestă o creștere a activității  $\beta$ -glucuronidazei în serul sangvin în toate variantele clinice ale GNA în perioada manifestărilor clinice (tabelul 5.12).

Tabelul 5.12. Activitatea  $\beta$ -glucuronidazei și N-acetil-beta-D-glucozaminidazei (NAG –  $\beta$ ) în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită acută

| Grupuri de studiu       | $\beta$ -glucuronidaza, nM/s.l |                          | NAG – $\beta$ , nM/s.l         |                             |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
|                         | acutizare                      | remisiune                | acutizare                      | remisiune                   |
| GNA sindrom nefritic    | 5,4 $\pm$ 0,56*<br>122,7%      | 4,3 $\pm$ 1,17<br>97,7%  | 127,2 $\pm$ 12,49*<br>122,9%   | 119,5 $\pm$ 16,56<br>115,5% |
| GNA sindrom nefrotic SS | 5,8 $\pm$ 0,87<br>131,8%       | 3,8 $\pm$ 6,78*<br>86,4% | 138,8 $\pm$ 14,22**<br>134,1%  | 100,8 $\pm$ 11,43<br>97,4%  |
| GNA sindrom nefrotic SR | 7,7 $\pm$ 0,80**<br>175,0%     | 5,9 $\pm$ 0,04<br>134,1% | 162,6 $\pm$ 22,53***<br>157,1% | 145,3 $\pm$ 6,43*<br>140,4% |
| Control                 | 4,4 $\pm$ 0,7; 100%            |                          | 103,5 $\pm$ 10,78; 100%        |                             |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Cea mai înaltă activitate enzimatică a  $\beta$ -glucuronidazei în serul sangvin s-a semnalat în GNA sindrom nefrotic SR, în cadrul căreia activitatea enzimei date a crescut de 1,7 ori (până la  $7,7 \pm 0,80$  nM/s.l,  $p < 0,01$  față de  $4,4 \pm 0,7$  nM/s.l în grupul de control) și o reducere a activității enzimei date în perioada remisiunii în toate loturile, cu excepția GNA sindrom nefrotic SR.

Sporirea activității arilsulfatazei A și B,  $\beta$ -galactozidazei și  $\beta$ -glucuronidazei în serul sangvin în GNA este rezultatul exocitozei acestor enzime în urma creșterii permeabilității membranelor celulare, și, nu se exclude, consecința dezintegrării lor parțiale din cauza hipoxiei tisulare și a stresului oxidativ caracteristice GN.

N-acetil-beta-D-glucozaminidaza (NAG- $\beta$ ) este o enzimă lizosomală care se află abundant în epiteliul tubular renal și este responsabilă de degradarea mucopolizaharidelor și glicoproteinelor. Conform datelor tabelului 5.12, activitatea NAG- $\beta$  în serul sangvin s-a majorat veridic în toate grupele de pacienți cu GNA în perioada manifestărilor clinice. Cele mai exprimate modificări ale activității enzimatice s-au semnalat în sindromul nefrotic SR, înregistrând o creștere veridică de aproape 1,6 ori, comparativ cu valorile de control. Perioada de remisiune s-a caracterizat prin menținerea la un nivel înalt a activității NAG- $\beta$  în sindromul nefrotic SR.

Determinarea activității NAG- $\beta$  în serul sangvin în GNA poate fi utilă pentru aprecierea gradului de exocitoză legată de creșterea permeabilității membranelor celulare și dezintegrarea lor parțială din cauza hipoxiei tisulare și a stresului oxidativ caracteristice GN. S-au constatat majorări de 2,6-1,3 ori ale activității arilsulfatazei A și B în serul sangvin în GNC forma mixtă și forma nefrotică, comparativ cu grupul de control cu o normalizare a indicilor în perioada de remisiune (tabelul 5.13).

Tabelul 5.13. Activitatea enzimelor lizosomale în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | Arilsulfataza A și B nM/s.l |                            | Arilsulfataza C, nM/s.l  |                         |
|---------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
|                     | acutizare                   | remisiune                  | acutizare                | remisiune               |
| GNC forma nefrotică | $2,1 \pm 0,23$<br>131,3%    | $1,5 \pm 0,21$<br>93,8%    | $2,2 \pm 0,35$<br>91,7%  | $2,0 \pm 0,88$<br>83,3% |
| GNC forma mixtă     | $4,2 \pm 1,89^*$<br>262,5%  | $1,6 \pm 0,21^*$<br>100,0% | $2,6 \pm 0,67$<br>108,3% | $1,2 \pm 0,08$<br>50,0% |
| Control             | $1,6 \pm 0,12$ ; 100%       |                            | $2,4 \pm 0,50$ ; 100%    |                         |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Rezultatele obținute relevă faptul că în GNC, perioada acutizării are loc o creștere statistic veridică a activității  $\beta$ -galactozidazei în serul sangvin în toate loturile de pacienți. Astfel, a avut

loc o creștere veridică de 1,7-1,9 ori a activității  $\beta$ -galactozidazei în GNC forma nefrotică și cea mixtă în perioada acutizării și o reducere în perioada remisiunii în GNC forma mixtă, dar cu o creștere de 2,2 ori în forma nefrotică.

Datele tabelului 5.14 indică o creștere de 1,3 ori a activității  $\beta$ -glucozidazei în serul sangvin în GNC forma mixtă, comparativ cu valorile grupului martor. Perioada remisiunii se caracterizează prin diminuarea veridică cu 47,0 % ( $p < 0,05$ ) a activității enzimatice în grupul dat.

Tabelul 5.14. Activitatea enzimelor lizosomale în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | $\beta$ -galactozidaza, nM/s.l |                            | $\beta$ -glucozidaza, nM/s.l |                          |
|---------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|
|                     | acutizare                      | remisiune                  | acutizare                    | remisiune                |
| GNC forma nefrotică | 3,8 $\pm$ 0,26**<br>165,2%     | 5,1 $\pm$ 0,72**<br>221,7% | 3,7 $\pm$ 0,21*<br>102,8%    | 4,0 $\pm$ 0,54<br>111,1% |
| GNC forma mixtă     | 4,4 $\pm$ 0,64*<br>191,3%      | 2,1 $\pm$ 0,06<br>91,3%    | 4,7 $\pm$ 0,93<br>130,6%     | 1,9 $\pm$ 0,11*<br>52,8% |
| Control             | 2,3 $\pm$ 0,32; 100%           |                            | 3,6 $\pm$ 0,57; 100%         |                          |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

S-au semnalat modificări semnificative ( $p < 0,01$ ) ale activității  $\beta$ -glucuronidazei în serul sangvin în GNC forma nefrotică perioada acutizării. În perioada remisiunii, nivelul enzimei date se reduce comparativ cu valorile inițiale, dar nu atinge nivelul grupului de control.

Nivelul NAG- $\beta$  în serul sangvin s-a majorat de 1,5 ori în GNC forma mixtă perioada acutizării, comparativ cu valorile de control, cu reducerea activității cu 20,5% în perioada remisiunii. Activitatea NAG- $\beta$  în serul sangvin a rămas practic la valorile inițiale în GNC forma nefrotică perioada de remisiune.

Tabelul 5.15. Activitatea enzimelor lizosomale în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | $\beta$ -glucuronidaza, nM/s.l |                         | NAG- $\beta$ , nM/s.l        |                            |
|---------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|
|                     | acutizare                      | remisiune               | acutizare                    | remisiune                  |
| GNC forma nefrotică | 5,6 $\pm$ 0,41**<br>124,4%     | 5,3 $\pm$ 0,90<br>117,8 | 131,9 $\pm$ 9,86**<br>127,4% | 127,9 $\pm$ 12,3<br>123,6% |
| GNC forma mixtă     | 6,7 $\pm$ 0,28<br>148,9%       | 3,1 $\pm$ 0,36<br>68,9% | 157,6 $\pm$ 4,47*<br>152,3%  | 82,3 $\pm$ 0,42<br>79,5%   |
| Control             | 4,5 $\pm$ 0,70<br>100%         |                         | 103,5 $\pm$ 10,78<br>100%    |                            |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Astfel, la copiii cu GNC au loc turburări pronunțate ale stării funcționale a aparatului lizosomal care se manifestă prin creșterea activității enzimelor lizosomale în serul sangvin ca rezultat al creșterii permeabilității membranelor celulare, nu se exclude, consecința dezintegrării lor parțiale din cauza hipoxiei tisulare și a stresului oxidativ caracteristice GN.

Un marker prețios al afectării integrității epitelului canalicular este apariția în urină a  $\alpha$ -glicozidazei neutre.  $\alpha$ -glicozidazele neutre reprezintă o grupă heterogenă de enzime care au funcții intracelulare diverse. Unele de origine animală și umană participă în scindarea oligozaharidelor și a glicogenului, altele în procesul de biosinteză a proteinelor.

Alfa-Glucozidaza neutră care scindează glicogenul, dextrinele macromoleculare, dizaharidele cu legături glicozidice  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 și  $\alpha$ -1,6 este localizată în microsomi și hialoplasmă, având activitate maximală la pH-ul 6,0-7,0. Activitatea sa în rinichi este mult mai înaltă comparativ cu cea din alte țesuturi [263].

Alfa-glucozidaza neutră renală aparține unei grupe mari de hidrolaze, localizate în membrana celulelor epiteliale cu “marginea în perie” a tubilor contorți renali și a mucoasei intestinale;  $\alpha$ -glucozidaza neutră a “marginii în perie” a celulelor epiteliale renale umane, ca și alte hidrolaze, constituie un ferment hidrofob, principala parte a moleculei căreia, inclusiv centrul activ, se găsesc pe suprafața externă a membranei “marginii în perie”, și doar o porțiune neînsemnantă a moleculei proteice, capătul N-terminal hidrofob, penetrează membrana [202].

Alfa-glucozidaza neutră are o localizare celulară dublă: marea parte a ei se află în membrana microvilozităților “marginii în perie” ( $\alpha$ -glucozidaza membrano-dependentă), iar o parte ( $\approx 10\%$ ) a activității fermentului se depistează în citozol ( $\alpha$ -glucozidaza solubilă). Formele  $\alpha$ -glucozidazei neutre, depistate în rinichii umani,  $\alpha$ -glucozidaza 1 și  $\alpha$ -glucozidaza 2, se găsesc de asemenea și în urină. În urina persoanelor clasificate convențional în prima grupă se găsește  $\alpha$ -glucozidaza 1, însă lipsește  $\alpha$ -glucozidaza 2, în timp ce în urina persoanelor grupei 2 sunt prezente ambele forme ale fermentului [202].

Rezultatele obținute în urma evaluării a activității  $\alpha$ -glicozidazei neutre sunt redată în tabelul 5.16 din care rezultă că activitatea  $\alpha$ -glicozidazei neutre în urină crește semnificativ în toate variantele clinice ale GNA.

Astfel, cele mai profunde schimbări s-au înregistrat în GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice la care activitatea  $\alpha$ -glicozidazei în urină a crescut veridic de 2,8 ori (până la  $0,91 \pm 0,31$  nM/s.mM creatinină,  $p < 0,05$ ), față de  $0,32 \pm 0,04$  nM/s.mM creatinină în grupul de control.

Tabelul 5.16. Nivelul  $\alpha$ -glicozidazei neutre în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | $\alpha$ -glicozidaza neutră, nM/s.mM creatinină |        |                                  |       |
|----------------------|--------------------------------------------------|--------|----------------------------------|-------|
|                      | acutizare                                        | %      | remisiune                        | %     |
| GNA sindrom nefritic | 0,91 $\pm$ 0,31*                                 | 284,4  | 0,54 $\pm$ 0,14<br>$p_1 > 0,05$  | 168,8 |
| GNA SNSS             | 0,63 $\pm$ 0,07**                                | 196,9  | 0,38 $\pm$ 0,06<br>$p_1 > 0,05$  | 118,8 |
| GNA SNSR             | 0,83 $\pm$ 0,23**<br>$p_2 > 0,05$                | 259,4  | 0,51 $\pm$ 0,07<br>$p_1 > 0,05$  | 159,4 |
| GNC forma nefrotică  | 0,86 $\pm$ 0,14***                               | 268,8% | 0,55 $\pm$ 0,13<br>$p_1 > 0,05$  | 171,9 |
| GNC forma mixtă      | 0,43 $\pm$ 0,10<br>$p_2 < 0,05$                  | 134,4% | 0,48 $\pm$ 0,04*<br>$p_1 > 0,05$ | 150,0 |
| Control              | 0,32 $\pm$ 0,04                                  | 100,0  | 0,32 $\pm$ 0,04                  | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare;  $p_2$  – autenticitate la compararea sindromului nefrotic SS cu sindromul nefrotic SR.

În GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, s-a înregistrat o corelație negativă de intensitate medie între activitatea  $\alpha$ -glicozidazei în urină și activitatea AAT ( $r_{xy} = -0,701$ ,  $p < 0,01$ ); CTGF ( $r_{xy} = -0,478$ ,  $p < 0,05$ ); între activitatea  $\alpha$ -glicozidazei în urină și suma  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$  ( $r_{xy} = 0,510$ ,  $p < 0,05$ ); între activitatea  $\alpha$ -glicozidazei în urină și concentrația  $\text{NO}_3$  ( $r_{xy} = 0,502$ ,  $p < 0,05$ ).

De notat că activitatea  $\alpha$ -glicozidazei neutre în sindromul nefrotic SS s-a majorat de 2 ori, pe când în sindrom nefrotic SR de 2,6 ori, comparativ cu valorile de control. În perioada remisiunii, nivelul  $\alpha$ -glicozidazei neutre în urină scade în toate grupurile de pacienți, dar nu atinge nivelul grupului martor.

În GNC forma nefrotică, perioada acutizării, s-a stabilit majorări concludente de 2,7 ori (până la 0,86 $\pm$ 0,14 nM/s.mM creatinină,  $p < 0,001$ ) ale activității  $\alpha$ -glicozidazei în urină comparativ cu grupul martor, fiind atestate corelații de intensitate medie între concentrațiile urinare ale  $\alpha$ -glicozidazei și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = 0,588$ ,  $p < 0,05$ ); LDH ( $r_{xy} = -0,555$ ,  $p < 0,05$ );  $\text{NO}_2$  ( $r_{xy} = 0,566$ ,  $p < 0,05$ ).

În GNC forma mixtă, perioada de acutizare, au existat corelații foarte puternice inverse între concentrațiile urinare ale  $\alpha$ -glicozidazei și MIP-1 $\alpha$  ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ). În perioada remisiunii activitatea enzimei date s-a menținut majorată în toate grupele de pacienți, comparativ cu valorile inițiale.



În rinichii umani  $\alpha$ -glucozidaza se localizează exclusiv în epiteliocitele tubilor contorți proximali și în ansa Henle, fiind absente în glomeruli și alte țesuturi ale rinichiului. Din acest motiv depistarea activității  $\alpha$ -glucozidazei în urina umană are importanță diagnostică în injuria renală, în particular, afectarea tubilor contorți proximali și ansei Henle, fapt ce permite de a diagnostic localizarea procesului patologic la nivelul segmentului nefronului.

Prezența interconexiunii dintre activitatea  $\alpha$ -glucozidazei neutre în urină și starea funcțională a rinichilor reflectă gradul de severitate al afectării renale în GN, iar determinarea activității enzimei date în urină are o importanță majoră pentru diagnosticarea leziunilor renale și controlul eficienței tratamentului aplicat.

Aprecierea activității enzimelor lizosomale în urină a inclus determinarea nivelului funcțional al arilsulfatazei A, B și C,  $\beta$ -galactozidazei,  $\beta$ -glucozidazei,  $\beta$ -glucuronidazei, NAG- $\beta$ , lizocimei, fosfatazei acide.

Remarcăm că activitatea enzimelor lizosomale în urină la copiii cu GNA suferă schimbări de diferit grad și sens (tabelele 5.17 -5.20). Datele studiului efectuat relevă o creștere de 2,4 ori a activității arilsulfatazei C în urină în GNA sindrom nefritic, comparativ cu grupul de control.

Tabelul 5.17. Activitatea arilsulfatazei A și B și arilsulfatazei C în urină la copiii cu glomerulonefrită acută

| Grupuri de studiu    | Arilsulfataza A și B,<br>pM/s.mM creatinină |                                     | Arilsulfataza C,<br>pM/s.mM creatinină |                                     |
|----------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
|                      | acutizare                                   | remisiune                           | acutizare                              | remisiune                           |
| GNA sindrom nefritic | 204,4±51,43**<br>224,4%                     | 25,6±9,80*<br>28,1%, $p_1 < 0,01$   | 299,1±54,36***<br>244,8%               | 174,3±48,66<br>142,7%, $p_1 > 0,05$ |
| GNA SNSS             | 543,6±162,77***<br>596,7%                   | 42,7±5,63*<br>46,9%, $p_1 < 0,01$   | 268,3±40,07**<br>219,6%                | 164,1±9,21<br>134,3%, $p_1 < 0,05$  |
| GNA SNSR             | 373,5±92,08***<br>409,9%                    | 218,7±25,58<br>240,1%, $p_1 > 0,05$ | 373,5±92,08***<br>305,7%               | 218,7±25,98<br>178,9%, $p_1 > 0,05$ |
| Control              | 91,1±19,32                                  |                                     | 122,18±13,46                           |                                     |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare

Cele mai profunde modificări ale activității enzimei date s-au constatat în sindromul nefrotic SR, la care activitatea enzimei date a crescut de 3,1 ori, pe când în sindromul nefrotic SS s-a semnalat o creștere de numai 2,2 ori față de grupul de control. În perioada remisiunii activitatea arilsulfatazei C se reduce, dar nu atinge valorile grupului de control.

Nivelul enzimooactivității arilsulfatazei A și B relevă profunzimea lezării țesutului renal și, totodată, gradul de lezare al canaliculelor distale. Posibil că aceste modificări sunt condiționate de

eliberarea enzimelor lizosomale – arilsulfatazelor A și B, C din celule în spațiul extracelular ca rezultat al proceselor de liză a celulelor și exocitozei, reflectând atât stadiul funcțional, cât și cel al lezării elementelor structurale ale rinichilor. Lezarea glomerulilor și canaliculelor renale duce la creșterea permeabilității membranelor celulare și la distrugerea celulelor, ceea ce, la rândul său, condiționează excreția enzimelor din celulele renale în urină.

Activitatea  $\beta$ -galactozidazei în urină a crescut notabil la pacienții cu GNA sindrom nefritic și SN, în perioada manifestărilor clinice, comparativ cu grupul martor (tabelul 5.18).

Astfel, activitatea  $\beta$ -galactozidazei în urină în GNA sindrom nefritic a crescut de 3,6 ori (până la  $327,4 \pm 102,9$  pM/s.mM creatinină,  $p < 0,05$ ), față de ( $91,4 \pm 16,85$  pM/s.mM creatinină) în grupul de control. De remarcat că activitatea  $\beta$ -galactozidazei în urină a fost mai înaltă în sindromul nefrotic SS, comparativ cu sindromul nefrotic SR. Astfel, în sindromul nefrotic SS, perioada de debut, activitatea  $\beta$ -galactozidazei s-a majorat de 3,5 ori, pe când în sindromul nefrotic SR de 2,8 ori, comparativ cu grupul de control. În perioada remisiunii s-a constatat o descreștere a enzimuriei, cu excepția sindromului nefrotic SR, unde s-a semnalat o creștere de 4,2 ori, față de valorile de control. Studiul dat a relevat o creștere statistic semnificativă a activității  $\beta$ -glucozidazei în urină în GNA în perioada manifestărilor clinice.

Tabelul 5.18. Activitatea  $\beta$ -galactozidazei și  $\beta$ -glucozidazei în urină la copiii cu glomerulonerită acută

| Grupuri de studiu    | Parametrii studiați                        |                                               |                                                |                                            |
|----------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                      | $\beta$ -galactozidaza, pM/s.mM creatinină |                                               | $\beta$ -glucozidaza, pM/s.mM creatinină       |                                            |
|                      | acutizare                                  | remisiune                                     | acutizare                                      | remisiune                                  |
| GNA sindrom nefritic | $327,4 \pm 102,9^*$<br>358,2%              | $177,8 \pm 67,05$<br>$194,5\%, p_1 > 0,05$    | $449,0 \pm 81,2^{**}$<br>$195,6\%, p_1 > 0,05$ | $349,5 \pm 97,6$<br>$152,3\%, p_1 > 0,05$  |
| GNA SNSS             | $318,6 \pm 71,79^{**}$<br>348,6%           | $121,2 \pm 17,51$<br>$132,6\%, p_1 < 0,05$    | $576,8 \pm 56,5^{***}$<br>251,3%               | $205,4 \pm 17,9^*$<br>$89,5\%, p_1 < 0,05$ |
| GNA SNSR             | $255,1 \pm 70,09^*$<br>279,1%              | $387,0 \pm 145,38^*$<br>$423,4\%, p_1 > 0,05$ | $351,0 \pm 38,6^{**}$<br>152,9%                | $500,3 \pm 57,7$<br>$218\%, p_1 < 0,05$    |
| Control              | $91,4 \pm 16,85$<br>100%                   |                                               | $229,5 \pm 20,11$<br>100%                      |                                            |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control:  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare.

Cele mai pronunțate majorări ale activității  $\beta$ -glucozidazei în urină s-au atestat la pacienții cu sindromul nefrotic SS, la care nivelul  $\beta$ -glucozidazei în urină a crescut de 2,5 ori ( $p < 0,001$ ),

pe când în sindromul nefrotic SR a crescut de numai 1,5 ori ( $p<0,001$ ), comparativ cu valorile de control. În perioada remisiunii activitatea enzimei date se reduce, cu excepția sindromului nefrotic SR, la care activitatea enzimei date a crescut de 2,2 ori, comparativ cu valorile de control.

Conform datelor expuse în tabelul 5.19, activitatea  $\beta$ -glucuronidazei în urină a crescut semnificativ, la pacienții cu GNA în perioada manifestărilor clinice. Astfel, în GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, activitatea  $\beta$ -glucuronidazei a crescut de 2,5 ori, comparativ cu valorile de control.

S-au notat majorări de 2,3 ori ale activității  $\beta$ -glucuronidazei în sindromul nefrotic SS și în sindromul nefrotic SR, cu o reducere a activității  $\beta$ -glucuronidazei în perioada remisiunii comparativ cu valorile inițiale, cu excepția lotului cu GNA sindrom nefrotic SR, în care activitatea enzimei date a rămas crescută (până la  $200,6\pm 13,6$  nM/s.mM creatinină), comparativ cu valorile grupului martor.

Tabelul 5.19. Activitatea  $\beta$ -glucuronidazei și NAG- $\beta$  în urină la copiii cu glomerulonerită acută

| Grupuri de studiu    | Parametrii studiați                        |                                       |                                           |                               |
|----------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|
|                      | $\beta$ -glucuronidaza, pM/s.mM creatinina |                                       | NAG- $\beta$ , nM/s.mM creatinină         |                               |
|                      | acutizare                                  | remisiune                             | acutizare                                 | remisiune                     |
| GNA sindrom nefritic | $309,9\pm 81,0^*$<br>254,9%                | $102,9\pm 17,8$<br>84,6%, $p_1<0,01$  | $10,8\pm 3,53^{**}$<br>450,0%, $p_1<0,01$ | $2,5\pm 1,01$<br>104,2%       |
| GNA SNSS             | $281,5\pm 60,9^{**}$<br>231,5%             | $95,8\pm 9,3$<br>78,8%, $p_1<0,05$    | $9,6\pm 2,24^{**}$<br>400,0%, $p_1<0,01$  | $2,20\pm 0,47$<br>91,7%       |
| GNA SNSR             | $279,8\pm 51,6^*$<br>230,1%                | $200,6\pm 13,6^*$<br>165%, $p_1>0,05$ | $11,1\pm 2,85^{**}$<br>462,5%, $p_1>0,05$ | $10,5\pm 4,42^{**}$<br>437,5% |
| Control              | $121,6\pm 15,3$<br>100%                    |                                       | $2,4\pm 0,47$<br>100%                     |                               |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ;  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare

$\beta$ -Glucuronidaza este o enzimă a cărei excreție urinară crește într-o varietate de boli renale, inclusiv GNA, proteinuria severă, pielonefrita acută, rețetul de transplant, afectarea nefrotoxică. Creșterea excreției urinare a enzimelor lizosomale (NAG- $\beta$ ,  $\beta$ -glucuronidaza și arilsulfataza A)

denotă afectare mai severă; creșterea urinară a proteinelor citosolice de tip ligandină marchează necroza celulară [202, 263].

Rezultatele cercetărilor denotă o majorare a activității NAG- $\beta$  în urină la pacienții cu GNA în perioada manifestărilor clinice. Cele mai pronunțate modificări ale activității NAG- $\beta$  în urină s-au înregistrat în GNA sindrom nefrotic SR în perioada manifestărilor clinice, la care nivelul enzimuriei a crescut de 4,6 ori (până la  $11,1 \pm 2,85$  nM/s.mM creatinină), pe când în sindromul nefrotic SS s-a majorat de 4,0 ori (până la  $9,6 \pm 2,24$  nM/s.mM creatinină) față de ( $2,4 \pm 0,47$  nM/s.mM creatinină) în grupul de control.

S-a semnalat o creștere de 4,5 ori a activității NAG- $\beta$  în urină în GNA sindrom nefritic perioada manifestărilor clinice care a corelat cu nivelul endotelinei-1 ( $r_{xy} = 0,603$ ,  $p < 0,01$ ); FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = -0,605$ ,  $p < 0,01$ ).

În perioada remisiunii, activitatea NAG- $\beta$  în urină s-a redus în toate variantele clinice ale GNA cu excepția GNA sindrom nefrotic SR, în care s-a semnalat o majorare de 4,4 ori a activității enzimei date comparativ cu valorile de control.

Considerăm că majorarea activității NAG- $\beta$  în urină în GNA este cauzată de lezarea celulelor parenchimului renal, și anume de afectarea lizosomilor epiteliului tubular. Rezultatele studiului demonstrează că, cu cât activitatea procesului patologic este mai înaltă, cu atât nivelul NAG- $\beta$  excretat cu urină este mai mare.

Studiul efectuat demonstrează că activitatea NAG- $\beta$  în urină a fost mai redusă la pacienții cu schimbări morfologice minimale, comparativ cu cei care prezentau schimbări proliferative, membranoproliferative și membranoase ale GN.

La nivel renal NAG- $\beta$  este localizată în lizosomi și mai puțin în microzomii celulelor tubulare epiteliale. Concentrația tisulară renală este mai mare, comparativ cu tractul urinar. NAG- $\beta$  urinară este de origine în principal tubulară, fiind distribuită de-a lungul aparatului tubular al nefronilor, cu cea mai înaltă activitate în tubii proximali, cu excepția proteinuriei glomerulare, când poate apărea în urină prin ultrafiltrare.

Majorarea activității NAG- $\beta$  în urină, posibil, este legată de schimbările structurale pronunțate ale segmentului glomerular și tubular al nefronului [202]. Creșterea NAG- $\beta$  urinare precede manifestările de laborator și clinice în GNA, SN, nefropatia obstructivă, nefropatia diabetică și nefrotoxicitate [44, 228].

Rezultatele evaluării activității fosfatazei acide în urină la copiii cu GN sunt reflectate în statistica tabelului 5.20.

Tabelul 5.20. Activitatea fosfatazei acide și nivelul lizozimei în urină la copiii cu glomerulonerită acută

| Grupuri de studiu    | Parametrii studiați                 |                                                 |                            |                                            |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|
|                      | Fosfataza acidă, nM/s.mM creatinină |                                                 | Lizozima, ng/mM creatinină |                                            |
|                      | acutizare                           | remisiune                                       | acutizare                  | remisiune                                  |
| GNA sindrom nefritic | 436,8±146,20***<br>395,8%           | 156,1±46,4<br>141,4%<br>p <sub>1</sub> <0,05    | 101,5±20,8<br>75,6%        | 57,7±11,6<br>43,0%<br>p <sub>1</sub> >0,05 |
| GNA SNSS             | 382,4±87,6***<br>346,5%             | 154,9±50,2<br>140,4%<br>p <sub>1</sub> <0,05    | 272,5±21,8<br>203,1%       | 57,5±9,1<br>42,8%<br>p <sub>1</sub> <0,01  |
| GNA SNSR             | 519,92±113,5***<br>471,1%           | 367,0±48,0***<br>332,5%<br>p <sub>1</sub> >0,05 | 125,3±32,3<br>93,4%        | 55,5±25,5<br>41,4%<br>p <sub>1</sub> <0,05 |
| Control              | 110,36±14,63<br>100%                |                                                 | 134,2±31,7                 |                                            |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. p<sub>1</sub>—autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare.

Conform datelor obținute, activitatea fosfatazei acide în urină s-a majorat în toate grupurile de pacienți cu GNA în perioada manifestărilor clinice. Cele mai pronunțate modificări ale activității fosfatazei acide în urină s-au atestat la pacienții cu sindromul nefrotic SR, la care activitatea enzimei date a crescut de 4,7 ori, pe când la cei cu sindromul nefrotic SS s-a majorat de 3,5 ori, comparativ cu grupul de control. Nivelul funcțional al fosfatazei acide în urină la pacienții cu GNA sindrom nefritic a crescut practic de 4 ori în raport cu valorile de referință.

În perioada remisiunii activitatea fosfatazei acide în urină se reduce cu excepția grupului de pacienți cu GNA sindrom nefrotic SR, la care activitatea enzimei date a continuat să fie majorată de 3,3 ori (p<0,001), în raport cu valorile grupului de control.

În continuarea cercetărilor descrise mai sus a fost evaluată concentrația lizozimei. Lizozima, de asemenea, cunoscută sub numele de muramidază, este prezentă în lizozomi și în cele mai multe fluide extracelulare, în special în secreția exocrină. Este bactericidă și produsă de granulocite și monocite, dar nu de către limfocite. Enzima, ca proteină cu masa moleculară joasă, este filtrată prin glomeruli, dar aproape toată este reabsorbită și, apoi catabolizată în tubii renali, deci dozarea lizozimei în urină poate fi utilizată pentru testarea funcției tubulare renale [263].

Rezultatele obținute privind modificările nivelului de lizozimă în urină la copiii cu GN sunt prezentate în tabelul 5.20. Din cele înregistrate investigațional reiese că concentrația lizozimei în urină la copiii cu GNA suferă schimbări de diferit grad. Astfel, nivelul lizozimei în urină la pacienții cu SN s-a majorat autentic, pe când în GNC concentrația enzimei, dimpotrivă, manifestă o tendință de reducere. Remarcăm că, în GNA sindrom nefritic în perioada manifestărilor clinice s-a înregistrat o reducere a concentrației lizozimei în urină cu 24,0% (până la  $101,5 \pm 20,8$  ng/nm creatinină) față de ( $134,2 \pm 31,7$  ng/mM creatinină) în grupul de control.

Concentrația lizozimei a crescut de 2 ori (până la  $272,5 \pm 21,8$  ng/mM, creatinină) în GNA sindrom nefrotic SS perioada manifestărilor clinice, comparativ cu valorile grupului de control. În perioada remisiunii nivelul lizozimuriei s-a redus practic în toate variantele GNA în raport cu valorile normale.

În condiții normale, prin membrana glomerulară intactă trec numai enzimele cu masa moleculară mai mică de 70 kDa. Lizozima reprezintă una dintre enzimele cu masa moleculară joasă (<70 kDa) și de aceea ea trece ușor în urină din serul sangvin prin filtrul renal, iar în canaliculele renale este parțial reabsorbită. Prin urmare, activitatea ei în urină corelează cu capacitatea de reabsorbție a epiteliului segmentelor proximale și distale ale nefronului.

În tabelele 5.21-5.25 sunt expuse rezultatele privind activitatea enzimelor lizosomale în urină la copiii cu GNC incluși în studiu. Datele expuse au relevat o creștere a activității enzimelor lizosomale în urină în toate loturile de pacienți.

Tabelul 5.21. Activitatea arilsulfatazei A și B și arilsulfatazei C în urină la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | Arilsulfataza A și B, pM/s.mM creatinină |                                                   | Arilsulfataza C, pM/s.mM creatinină |                                              |
|---------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|
|                     | acutizare                                | remisiune                                         | acutizare                           | remisiune                                    |
| GNC forma nefrotică | $244,2 \pm 54,52^*$<br>268,1%            | $101,2 \pm 6,92$<br>111,1%,<br>$p_1 > 0,05$       | $178,8 \pm 36,35$<br>146,3%         | $139,2 \pm 16,28^*$<br>114%, $p_1 > 0,05$    |
| GNC forma mixtă     | $213,8 \pm 44,39^{**}$<br>234,7%         | $290,4 \pm 63,48^{**}$<br>318,8%,<br>$p_1 > 0,05$ | $174,3 \pm 54,38$<br>142,6%         | $300,4 \pm 62,12$<br>245,8%,<br>$p_1 > 0,05$ |
| Control             | $91,1 \pm 19,32$<br>100%                 |                                                   | $122,2 \pm 13,46$<br>100%           |                                              |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$ —autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare.

Activitatea arilsulfatazei A și B în urină a crescut de 2,7 ori ( $p<0,05$ ) în GNC forma nefrotică în perioada acutizării, pe când în GNC formă mixtă a crescut veridic de 2,3 ori, ( $p<0,01$ ) în raport cu valorile normale.

În perioada remisiunii, activitatea enzimei date s-a redus practic până la valorile de control în GNC forma nefrotică, pe când în GNC forma mixtă s-a majorat de 3,2 ori ( $p<0,01$ ). În perioada remisiunii, activitatea arilsulfatazei C în urină s-a majorat de 2,5 ori în GNC formă mixtă, pe când în forma nefrotică a GNC practic s-a normalizat, atingând nivelul grupului de control.

Cele mai pronunțate modificări ale activității  $\beta$ -galactozidazei în urină au fost consemnate în GNC forma nefrotică perioada de acutizare, când activitatea enzimei date a crescut semnificativ – de 4 ori ( $p<0,01$ ), pe când în GNC forma mixtă s-a majorat de numai 1,9 ori, comparativ cu valorile de control.

În perioada remisiunii funcția enzimei date a continuat să manifeste o creștere de 4,5 ori ( $p<0,001$ ) în GNC forma nefrotică și o majorare de 2,1 ori în GNC forma mixtă, comparativ cu grupul de control.

Tabelul 5.22. Activitatea  $\beta$ -galactozidazei în urină la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | $\beta$ -galactozidaza, pM/s.mM creatinină |       |                                    |       |
|---------------------|--------------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|
|                     | acutizare                                  | %     | remisiune                          | %     |
| GNC forma nefrotică | 369,0 $\pm$ 164,74**                       | 403,7 | 408,8 $\pm$ 88,53***<br>$p_1>0,05$ | 447,3 |
| GNC forma mixtă     | 171,6 $\pm$ 41,24                          | 187,7 | 189,8 $\pm$ 21,32<br>$p_1>0,05$    | 207,7 |
| Control             | 91,4 $\pm$ 16,85                           | 100,0 | 91,4 $\pm$ 16,85                   | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare.

Activitatea  $\beta$ -glucozidazei în urină s-a majorat în toate variantele clinice ale GNC perioada acutizării (tabelul 5.23).

Cele mai pronunțate majorări s-au semnalat în lotul cu GNC forma mixtă, unde activitatea enzimei date a crescut semnificativ – de 2,2 ori, ( $p<0,001$ ), pe când în GNC forma nefrotică s-a majorat de 1,7 ori ( $p<0,01$ ), comparativ cu grupul martor.

În perioada remisiunii activitatea enzimei date a continuat să rămână crescută în GNC forma mixtă, dar s-a redus în GNC forma nefrotică.

Tabelul 5.23. Activitatea  $\beta$ -glucozidazei și  $\beta$ -glucuronidazei în urină la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | $\beta$ -glucozidaza, pM/s.mM creatinină |                                           | $\beta$ -glucuronidaza, pM/s.mM creatinină |                                            |
|---------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                     | acutizare                                | remisiune                                 | acutizare                                  | remisiune                                  |
| GNC forma nefrotică | 392,0 $\pm$ 46,2**<br>170,8%             | 214,4 $\pm$ 24,1<br>93,4%, $p_1 < 0,05$   | 207,2 $\pm$ 36,6<br>170,4%                 | 119,9 $\pm$ 22,5<br>98,6%, $p_1 < 0,05$    |
| GNC forma mixtă     | 496,5 $\pm$ 62,7***<br>216,3%            | 405,1 $\pm$ 113,5<br>176,5%, $p_1 > 0,05$ | 313,4 $\pm$ 77,8**<br>257,7%               | 327,8 $\pm$ 80,6**<br>269,6%, $p_1 > 0,05$ |
| Control             | 229,5 $\pm$ 20,1<br>100%                 |                                           | 121,6 $\pm$ 15,3<br>100%                   |                                            |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare.

Totodată, s-a înregistrat o creștere mai pronunțată a activității  $\beta$ -glucuronidazei în urină în GNC forma mixtă, comparativ cu GNC forma nefrotică. Astfel, activitatea enzimatică în GNC forma mixtă în perioada acutizării a crescut de 2,6 ori, ( $p < 0,01$ ), pe când în GNC nefrotică de numai 1,7 ori, comparativ cu grupul martor. În perioada remisiunii, activitatea  $\beta$ -glucuronidazei continuă să rămână la valori ridicate la pacienții cu forma mixtă, comparativ cu valorile inițiale.

Remarcăm că modificările activității NAG- $\beta$  în GNC forma nefrotică au fost mai exprimate (tabelul 5.24).

Tabelul 5.24. Activitatea NAG- $\beta$  și nivelul lizozimei în urină la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | NAG- $\beta$ , nM/s, mM creatinină |                                            | Lizozima, ng/mM creatinină |                                           |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
|                     | acutizare                          | remisiune                                  | acutizare                  | remisiune                                 |
| GNC forma nefrotică | 9,8 $\pm$ 2,26<br>408,3%           | 3,1 $\pm$ 0,84<br>129,2%<br>$p_1 < 0,05$   | 123,8 $\pm$ 30,0<br>92,3%  | 81,2 $\pm$ 14,10<br>60,5%<br>$p_1 > 0,05$ |
| GNC forma mixtă     | 8,0 $\pm$ 2,26<br>333,3%           | 9,4 $\pm$ 1,10**<br>391,7%<br>$p_1 > 0,05$ | 123,1 $\pm$ 27,1<br>91,7%  | 94,3 $\pm$ 16,5<br>70,3%<br>$p_1 > 0,05$  |
| Control             | 2,4 $\pm$ 0,47<br>100%             |                                            | 134,2 $\pm$ 31,7<br>100%   |                                           |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare.

Astfel, în GNC forma nefrotică perioada acutizării maladii, activitatea NAG- $\beta$  în urină a crescut de 4,0 ori (până la 9,8 $\pm$ 2,26 nM/s.mM creatinină), pe când în GNC forma mixtă activitatea enzimei date a crescut de 3,3 ori (până la 8,0 $\pm$ 2,26 nM/s.mM creatinină), comparativ cu grupul de



control ( $2,4 \pm 0,47$  nM/s.mM creatinină), fiind atestate corelații puternice între activitatea NAG- $\beta$  și MIP -1 $\alpha$  ( $r_{xy} = -1,0, p < 0,001$ ).

Modificările date denotă despre leziunile structurale profunde ale nefronului la pacienții cu GNC forma nefrotică și mixtă. În perioada de remisiune, nivelul funcțional al acestei enzime în urină la pacienții cu GNC forma mixtă continuă să rămână la valori crescute, depășind de 3,9 ori valorile de referință ale controlului, ceea ce indică persistența procesului patologic în rinichi.

Concentrația lizozimei în urină în GNC, perioada acutizării, s-a micșorat statistic neconcludent, comparativ cu valorile grupului de control. În perioada remisiunii concentrația lizozimei în urină s-a redus și mai pronunțat, comparativ cu valorile inițiale.

Considerăm că gradul de exprimare al lizozimuriei în glomerulonefrită este determinat atât de dereglările de reabsorbție în canaliculele proximale, cât și de eliberarea lizozimei din macrofage în cazul lezării canaliculelor sau a țesutului renal. Pe de altă parte, micșorarea gradului de lizozimurie poate fi condiționată și de reducerea intensității biosintezei la nivel ribosomal și poate indica o scădere a rezistenței nespecifice a organismului în GNC.

Rezultatele de determinare a activității fosfatazei acide în urină la copiii cu glomerulonefrită cronică sunt redate în tabelul 5.25.

Tabelul 5.25. Activitatea fosfatazei acide în urină la copiii cu glomerulonefrită cronică

| Grupuri de studiu   | Fosfataza acidă, nM/s.mM creatinină |       |                                   |       |
|---------------------|-------------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
|                     | acutizare                           | %     | remisiune                         | %     |
| GNC forma nefrotică | $534,6 \pm 105,3^{***}$             | 484,2 | $196,4 \pm 121,0$<br>$p_1 < 0,05$ | 178,0 |
| GNC forma mixtă     | $222,5 \pm 26,0^*$                  | 201,5 | $123,8 \pm 44,2$<br>$p_1 > 0,05$  | 112,1 |
| Control             | $110,4 \pm 14,63$                   | 100,0 | $110,4 \pm 14,63$                 | 100,0 |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $p_1$  – autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat în acutizare

Cel mai înalt nivel de enzimoactivitate s-a înregistrat la pacienții cu GNC forma nefrotică, perioada de acutizare, când activitatea enzimei date a crescut de 4,8 ori ( $p < 0,001$ ), pe când în forma mixtă a GNC s-a majorat de numai 2 ori ( $p < 0,05$ ), comparativ cu grupul de control.

Activitatea fosfatazei acide în urina a continuat să fie majorată și în perioada remisiei în grupul GNC forma nefrotică, dar practic s-a normalizat în grupul cu forma mixtă.

Astfel, cercetările efectuate au demonstrat că la copii cu GNA și GNC are loc creșterea activității tuturor enzimelor lizosomale studiate în urină. În GNC modificările activității enzimelor

lizosomale (arilsulfatazei C,  $\beta$ -galactozidazei, fosfatazei acide) au fost mai pronunțate, comparativ cu GNA, ceea ce indică la leziuni mai pronunțate ale aparatului tubular al nefronului în GNC. Majorarea activității enzimelor lizosomale este legată de eliberarea lor din celulele epiteliale ale tubilor proximali ale nefronului, de exocitoza provocată de creșterea permeabilității membranelor celulare și destabilizarea lizosomilor lor sub acțiunea toxinelor microbiene și dereglărilor homeostazice care conduc la afectarea țesutului renal.

Activitatea enzimelor lizosomale redă profunzimea lezării țesutului renal și, totodată, gradul de lezare al canaliculelor renale. Posibil că aceste modificări sunt condiționate de eliberarea enzimelor lizosomale din celule în spațiul extracelular în rezultatul proceselor de liză a celulelor și a exocitozei, reflectând atât stadiul funcțional, cât și cel al lezării elementelor structurale ale rinichilor. Lezarea glomerulilor și canaliculelor renale duce la creșterea permeabilității membranelor celulare și la distrugerea celulelor, ceea ce, la rândul lor, facilitează excreția enzimelor din celulele renale în urină.

Pentru o lungă perioadă de timp lizosomii au fost considerați ca fiind „incineratoare” implicate în degradarea și reciclarea deșeurilor celulare. Cu toate acestea, există acum dovezi convingătoare care indică faptul că lizosomii au o funcție mult mai largă și că aceștia sunt implicați în procese fundamentale, cum ar fi secreția, repararea membranei plasmactice, procesele de semnalizare și metabolismul energetic. Mai mult decât atât, rolul esențial al lizosomilor în autofagie pune aceste organite la intersecția mai multor procese celulare, cu implicații semnificative în condiții fiziologice și patologice. Identificarea unei gene, factorului de transcriere EB, care reglează biogeneza lizosomală și autofagia, a permis de a dezvălui modul în care lizosomii se adaptează la condițiile de mediu și sugerează noi strategii terapeutice pentru modularea funcției lizosomale în bolile umane [298].

Metodele de laborator la care ne referim reușesc într-o măsură variabilă punerea în evidență a modificărilor clinico-biochimice ce permit de a aprecia gradul lezării elementelor structurale funcționale ale nefronului, concretizarea localizării procesului patologic în rinichi și, în sfârșit, aprecierea prognosticului maladiei.

Determinarea activității enzimelor lizosomale în urină în dinamica procesului patologic poate servi drept criteriu precoce de diagnostic neinvaziv al diferitor variante ale GN. Prin urmare, aprecierea activității enzimelor lizosomale în dinamica glomerulonefritei acute și cronice reprezintă un criteriu precoce de diagnostic al gravității și destabilizării membranelor celulare, inclusiv în țesutul renal, ceea ce permite prognozarea procesului activ, servește drept criteriu de apreciere a eficacității terapiei hormonale și imunosupresive.

Cele mai propunțate modificări ale afectării tuturor sectoarelor nefronului, provocate de creșterea excreției enzimelor cu localizare celulară diferită în rezultatul modificărilor permeabilității filtrului glomerular și tulburărilor reabsorbției tubulare a proteinelor, s-au înregistrat preponderent în sindromul nefrotic SR.

Creșterea activității enzimelor membranare (atașate la membrana nefroteliului) – FA și  $\gamma$ -GTP, enzimei citozolice (LDH) și, de asemenea, PCE – care reflectă afectarea permeabilității filtrului glomerular a fost semnalată în GNA și într-un grad mai pronunțat, în GNC. Astfel, la copiii cu GN au loc modificări biochimice ale tulburării stării funcționale a rinichilor – creșterea excreției uroenzimelor cu localizare celulară diferită.

La efectuarea analizei corelative au fost înregistrate anumite interrelații dintre nivelul uroenzimelor excretate și caracteristicile histomorfologice obținute la analiza bioptatelor renale și care determină gradul de exprimare și modificările structural – funcționale ale canaliculelor proximale. Gradul disfuncției elementelor celulare ale aparatului tubular și glomerular renal diferă, ceea ce dictează necesitatea depistării ei timpurii cu ajutorul metodelor neinvazive funcționale de laborator. Prezența legăturilor corelative ale manifestărilor disfuncțiilor epiteliului tubilor contorți proximali cu biomarkerii afectării aparatului tubular și glomerular denotă utilizarea adecvată a metodologiei aplicate pentru aprecierea severității tulburărilor funcției parenchimului renal în GN.

Rezultatele evaluării conținutului de microelemente în diferite variante ale GN a relevat modificări statistic concludente ale nivelului acestora la pacienții cu GN (tabelul 5.26).

Astfel, nivelul de Zn în serul sangvin s-a redus în toate variantele clinice ale GN, pe când conținutul de Cu a crescut comparativ cu valorile grupului de control. Modificări mai pronunțate ale nivelului Zn s-au înregistrat la pacienții cu GNA sindrom nefrotic SR perioada de debut, în cadrul căruia concentrația acestui element s-a redus de 3,4 ori (până la  $4,5 \pm 0,38 \mu\text{mol/l}$ ), pe când în sindromul nefrotic SS s-a redus de 2,8 ori (până la  $5,4 \pm 0,80 \mu\text{mol/l}$ ) față de ( $15,2 \pm 0,77 \mu\text{mol/l}$ ) în grupul de control. În perioada de remisiune nivelul Zn în serul sangvin a crescut comparativ cu valorile inițiale, dar a rămas totuși inferior valorilor martorului.

Studiile efectuate au demonstrat creșterea nivelului de Cu în serul sangvin în toate variantele clinice ale GN în perioada de acutizare. Modificări statistic semnificative ale concentrației de Cu seric s-au înregistrat în GNA sindrom nefrotic SR, comparativ cu sindromul nefrotic SS. Astfel, în sindromul nefrotic SR, perioada de debut, nivelul de Cu în serul sangvin s-a majorat de 4,2 ori, pe când în sindromul nefrotic SS a crescut de 2,8 ori în raport cu valorile grupului de control. În GNA sindrom nefrotic perioada manifestărilor clinice nivelul Cu în serul sangvin a sporit de 3,1 ori față de valorile martorului.

În perioada remisiunii, nivelul Cu în ser practic se normalizează în toate variantele clinice ale GN [7].

Tabelul 5.26. Nivelul oligoelementelor în serul sangvin la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu    | Zinc, $\mu\text{mol/l}$                                       |                                                               | Cupru, $\mu\text{mol/l}$                                  |                                                              |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                      | acutizare                                                     | remisiune                                                     | acutizare                                                 | remisiune                                                    |
| GNA sindrom nefritic | 8,7 $\pm$ 0,95***<br>57,2%                                    | 11,1 $\pm$ 0,50***<br>73,0%,<br>$p_1 < 0,05$                  | 33,1 $\pm$ 3,7***<br>309,3%                               | 11,6 $\pm$ 0,09<br>108,4%,<br>$p_1 < 0,001$                  |
| GNA SNSS             | 5,4 $\pm$ 0,80***<br>35,5%,<br>$p_3 > 0,05$                   | 9,9 $\pm$ 0,81***<br>65,1%,<br>$p_1 < 0,01$ ;<br>$p_3 < 0,01$ | 29,8 $\pm$ 4,6**<br>278,5%, $p_3 > 0,05$                  | 11,1 $\pm$ 1,12<br>103,7%<br>$p_1 < 0,001$ ;<br>$p_3 > 0,05$ |
| GNA SNSR             | 4,5 $\pm$ 0,38***<br>29,6%,<br>$p_2 > 0,05$ ;<br>$p_3 < 0,01$ | –                                                             | 44,5 $\pm$ 0,4***<br>415,9%, $p_2 < 0,05$<br>$p_3 < 0,01$ | –                                                            |
| GNC forma nefrotică  | 8,6 $\pm$ 1,40**<br>56,6%                                     | 13,3 $\pm$ 0,98<br>87,5%,<br>$p_1 < 0,01$                     | 24,0 $\pm$ 4,7**<br>224,3%                                | 11,3 $\pm$ 1,4<br>105,6%,<br>$p_1 < 0,05$                    |
| Control              | 15,2 $\pm$ 0,77                                               |                                                               | 10,7 $\pm$ 1,2                                            |                                                              |

**Notă:** diferență statistic semnificativă în raport cu valorile grupului de control: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .  $p_1$ –autenticitatea indicilor în comparație cu indicele respectiv înregistrat la etapa de acutizare;  $p_2$ –autenticitatea indicilor la compararea GNA sindrom nefrotic SS cu GNA sindrom nefrotic SR;  $p_3$ –autenticitatea indicilor la compararea GNC forma nefrotică cu GNA sindrom nefrotic SS și GNA sindrom nefrotic SR.

În acest studiu am obținut valori semnificativ scăzute ale Zn seric în toate variantele clinice ale GN, comparativ cu lotul de control, rezultate similare cu alte studii. Astfel, Dwivedi J. și coautorii au raportat nivele scăzute de zinc, în timpul fazei active a sindromului nefrotic, cu o creștere semnificativă ulterioară ca urmare a tratamentului antioxidant aplicat [114]. După cum se știe, zincul este implicat în cele mai diverse procese metabolice fapt ce se explică prin prezența lui în mai mult de 300 de enzime. Aceste enzime intervin în metabolismul proteinelor, glucidelor, lipidelor, sinteza și degradarea acizilor nucleici.

Într-un alt studiu, efectuat de Mumtaz A. și coautorii, a fost demonstrat că nivelul Zn seric și nivelul de Cu în SN au fost statistic semnificativ reduse comparativ cu controlul [237]. Conform studiului, nivelul de Zn seric a avut o corelație negativă cu proteina urinară timp de 24 h, care a fost statistic semnificativă ( $r = -0.442$ ,  $p = 0,021$ ). Astfel, dacă proteinuria crește, nivelul zincului seric scade. Cel mai probabil, acest fapt se datorează pierderii de proteine care leagă metalele (metals binding proteins). Observații similare au fost făcute de Tulpar S și coautorii [341].

Conform studiului [227], nivelul Zn s-a redus, pe când nivelul Cu a crescut la copiii cu SN, dar fără diferență statistică în perioada activă și în remisiune.

În studiul dat am obținut date care demonstrează creșterea marcantă a valorilor Cu seric în faza de acutizare cu revenirea la normal în remisiune în toate loturile de pacienți. Acest fapt s-ar putea explica prin aceea că în exacerbară procesului inflamator crește nivelul proteinelor fazei acute, inclusiv a ceruloplasminei deosebit de bogate în cupru. Aceste menționări concordă cu datele unor autori care au observat nivele serice crescute ale cuprului în recidive, în contrast cu constatările anterioare de scădere a cuprului seric la pacienții cu SN [227, 237].

Nivelele de cupru se pot modifica dinamic în timpul fazei acute a bolii. Nivelele de cupru scăzut, raportate anterior, pot avea loc în faza precoce a bolii, din cauza pierderii de ceruloplasmină cu urina. Nivelele plasmatică crescute ar putea reflecta stresul oxidativ, deoarece cuprul joacă un rol decisiv în producerea de SRO și provoacă oxidarea hidrochinonei la benzochinonă citotoxică [192].

Conform datelor acestor autori, cuprul a scăzut ulterior, în mod semnificativ în remisiune pe termen lung. Mai mult decât atât, s-a observat că dialdehida malonică (MDA) și cuprul au arătat o scădere semnificativă în remisiune, comparativ cu faza acută, indicând la reducerea stresului oxidativ [227]. O altă cauză a hipo-zinc-emie stabilite în cercetările noastre s-ar putea datora pierderilor de acest microelement pe cale urinară.

Multe studii au arătat pierderi crescute urinare de Zn. Potrivit lui Shah K.N. și coautorii pierderile urinare de Zn au loc chiar și în absența proteinuriei, ceea ce înseamnă că modificările secreției tubulare renale sau reabsorbției pot contribui la creșterea pierderilor de Zn [299]. Este demonstrat că 90% din cupru este legat de ceruloplasmină (sursă majoră de proteine de legare a Cu) și 10% cu albumina. Ito S. și coautorii au sugerat că în sindromul nefrotic hipocupremia a fost consecința pierderii ceruloplasminei cu urina [166].

Concentrația redusă a nivelului de Zn plasmatic la pacienții cu SN poate fi, eventual, din cauza aportului alimentar restricționat. Recent s-a observat că suplimentarea în monoterapie sau în combinația cu seleniu și zinc la șobolanii diabetici a îmbunătățit statusul antioxidant și a condiționat scăderea peroxidării lipidelor, atât în ficat, cât și în țesuturile renale [342]. Mai mult decât atât, s-a observat că suplimentarea cu Zn reduce numărul de recidive în SN la copii [37, 305], ceea ce se explică prin faptul că acest oligoelement este implicat în procesele imune, deficitul de Zn influențează în primul rând asupra limfocitelor T.

S-a constatat, că zincul în concentrații milimolare crește proliferarea limfocitară și răspunsul la diferiți mitogeni la animalele cu deficit experimental de Zn. Deficitul de Zn duce la scăderea activității 5'-nucleotidazei limfocitare în limfocitele B umane.

Un mecanism prin care zincul ar putea influența funcțiile imunitare este legat de acțiunea sa asupra metabolismului acizilor grași polinesaturați, precursori de eicosanoizi. Se consideră că deficitul de Zn ar putea afecta răspunsul imun prin reducerea sintezei de prostaglandina  $E_1$  și a altor eicosanoizi.

#### 5.4. Concluzii la capitolul 5

1. Studiul activității AMP-azei și ADA-zei în serul sangvin a relevat creșterea enzimelor date în funcție de varianta clinică, activitatea procesului renal, fapt, cea ce confirmă rolul enzimelor metabolismului nucleotidelor adenilice în mecanismele patogenice ale GN la copii. S-a semnalat reducerea activității arginazei în serul sangvin și creșterea activității în urină în toate variantele clinice ale GN. În GNC forma nefrotică perioada de acutizare s-a înregistrat o corelație puternică directă între nivelul arginazei în urină și AAT ( $r_{xy} = 0,893$ ,  $p < 0,001$ ); AGE ( $r_{xy} = 0,977$ ,  $p < 0,01$ ); S-nitrosotoli ( $r_{xy} = 0,855$ ,  $p < 0,01$ ); MIP-1 $\alpha$  ( $r_{xy} = 0,883$ ,  $p < 0,001$ ).
2. Determinarea activității PCE în urină reprezintă marker al filtrului glomerular și tulburărilor reabsorbției pentru evaluarea activității, prognozarea complicațiilor și a exodului maladiei.
3. S-a semnalat creșterea activității enzimelor proteolitice (chimotripsinei, LAP,  $\beta_2$  microglobulinei) în urină în toate variantele clinice ale GN în perioada acutizării și reducerea în perioada de remisiune, fapt ce permite utilizarea lor în calitate de markeri neinvazivi pentru depistarea tulburărilor la nivelul aparatului tubular la copiii cu glomerulonefrită.
4. La copiii cu GN s-a semnalat o majorare mai pronunțată a activității  $\gamma$ -GTP în urină în GNA, comparativ cu GNC și o creștere de 5,4 ori în SNSS și de 1,6 ori în SNSR, comparativ cu valorile de control, cea ce denotă prezența leziunilor la nivelul membranelor citoplastice ale canaliculelor contorte proximale. În GNC forma mixtă s-au înregistrat corelații puternice între  $\gamma$ -GTP și PCE ( $r_{xy} = 1,0$ ,  $p < 0,001$ ); între  $\gamma$ -GTP și MIP 1 $\alpha$  ( $r_{xy} = 1,0$ ,  $p < 0,001$ ); între  $\gamma$ -GTP și VFGF ( $r_{xy} = -0,758$ ,  $p < 0,01$ ); între  $\gamma$ -GTP și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = -0,621$ ,  $p < 0,05$ ); între  $\gamma$ -GTP și CTGF ( $r_{xy} = -0,748$ ,  $p < 0,01$ ).
5. La copiii cu GNA și GNC are loc creșterea activității tuturor enzimelor lizosomale studiate în urină. În GNC, modificările activității enzimelor lizozomale (arilsulfataza C,  $\beta$ -galactozidaza, fosfataza acidă) au fost mai pronunțate, comparativ cu GNA, ceea ce atestă la prezența leziunilor mai severe ale aparatului tubular al nefronului în GNC.
6. Studiul efectuat permite de determina următoarele sindroame ale lezării țesutului renal: sindromul lezării epiteliului cu „marginea în perie” (evaluarea activității fosfatazei alcaline și  $\gamma$ -GTP), sindromul creșterii permeabilității citomembranelor epiteliului tubular (evaluarea activității NAG- $\beta$ , LDH), sindromul afectării membranelor lizozomale (evaluarea activității arilsulfatazei A și B).

7. Nivelul zincului seric s-a redus în toate variantele clinice ale GN, perioada de acutizare, pe când nivelul cuprului în aceeași perioadă a crescut, comparativ cu grupul de control. Cea mai pronunțată reducere a Zn seric s-a determinat în sindromul nefrotic SR, perioada de acutizare, cu o creștere mai pronunțată a Cu seric în sindromul nefrotic SR, perioada de acutizare.
8. Gradul disfuncției elementelor celulare ale aparatului tubular și glomerular renal diferă, ceea ce dictează necesitatea depistării ei cu ajutorul metodelor neinvazive funcționale de laborator. Prezența legăturilor corelative ale manifestărilor disfuncțiilor epiteliului tubilor contorți proximali cu biomarkerii afectării aparatului tubular și glomerular permite utilizarea adecvată a metodologiei aplicate pentru aprecierea severității tulburărilor funcției parenchimului renal în GN.
9. Pentru selectarea celor mai informativi indicatori și pentru depistarea factorilor generali latenți care explică legăturile dintre indicii cercetați și evaluați este necesar de a efectua analiza factorială prin metoda componentelor principale cu folosirea procedurii de rotirea sistemului de coordonate (varimax–rotirea ortogonală), care produce minimizarea cantității variabilelor cu o înaltă încărcătură factorială.

## 6. MODIFICĂRILE HISTOLOGICE ȘI CARACTERISTICA UNOR CORELAȚII CLINICO - PARACLINICE, BIOCHIMICE ÎN EVOLUȚIA GLOMERULONEFRITEI LA COPII

### 6.1. Caracteristica clinico-paraclinică a modificărilor histopatologice la copiii cu glomerulonefrită primară

Studiul histologic a inclus 12 pacienți cu glomerulonefrită primară, cu vârsta medie de  $7,50 \pm 1,64$  ani și o durată a bolii de  $2,03 \pm 0,50$  ani. Sexul masculin a constituit  $58,3 \pm 14,2\%$ , comparativ cu sexul feminin –  $41,70 \pm 14,2\%$ . Pacienții cu vârsta de 0-5 ani au constituit ( $41,7 \pm 14,2\%$ ), 5-10 ani –  $33,3 \pm 13,6\%$  pacienți și 10-17 ani –  $25,0 \pm 12,5\%$ .

Tabelul 6.1. Repartiția după sex și vârstă a copiilor cu GN

| Sex, vârsta | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES \%$ |
|-------------|-------------------|---------------------|
| Fete        | 5                 | $41,7 \pm 14,2$     |
| Băieți      | 7                 | $58,3 \pm 14,2$     |
| 0-5 ani     | 5                 | $41,7 \pm 14,2$     |
| 5-10 ani    | 4                 | $33,3 \pm 13,6$     |
| 10-17 ani   | 3                 | $25,0 \pm 12,5$     |

A existat o prevalență a sexului masculin, ceea ce este în conformitate cu datele altor studii [170]. Vârsta medie a pacienților cu SN înregistrați de noi a fost de  $7,50 \pm 1,64$  ani, ceea ce diferă de datele altor studii, care relevă o vârstă mai mică a debutului SN la copii [170]. O vârstă medie similară a fost raportată într-un studiu efectuat de Mubarak M. și coautorii [235]. Conform diagnosticului histopatologic, cea mai mare vârstă medie la momentul debutului bolii în studiul nostru s-a atestat în GSFS.

Tabelul 6.2. Vârsta medie și durata bolii în funcție de varianta histopatologică, (ani)

| Parametrii           | Total           | GSFS             | SNSM            |
|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Vârsta de debut a SN | $7,50 \pm 1,64$ | $12,80 \pm 1,98$ | $3,83 \pm 1,08$ |
| Durata bolii         | $2,03 \pm 0,50$ | $2,60 \pm 0,81$  | $1,72 \pm 0,74$ |

Conform rezultatelor altor studii [170], sexul masculin a fost predominant în toate subtipurile patologice, cu excepția GNM. Cel mai mare raport dintre băieți și fete a fost observat la pacienții cu SNSM. Date similare au raportat și alți cercetători. Astfel, Gulati S și coautorii au menționat o proporție mai mare la băieți cu SNSM [146], comparativ cu studiul lui Javadilarijani F., care a atestat cel mai mare raport în GNM [170].



În tabelul 6.3 sunt prezentate modificările histopatologice depistate la pacienții cu glomerulonefrită primară.

Tabelul 6.3. Modificările histologice la copiii cu glomerulonefrită primară

| Varianta histologică | Numărul de cazuri | %    |
|----------------------|-------------------|------|
| GSFS                 | 6                 | 50,0 |
| SNSM                 | 5                 | 41,7 |
| GNMzP                | 1                 | 8,3  |

Conform unor date recente, SNSM reprezintă cea mai frecventă cauză a SN la copii pe parcursul ultimelor trei decenii, incidența variază de la 77 la 90%, în diferite studii [56], pe când în studiul de față ea a constituit 41,7 % cazuri. Studii efectuate de Bonilla-Felix M. și coautorii, au atestat o creștere semnificativă a incidenței GSFS în baza biopsiei renale – de la 22 % până la 47% la copiii cu SN pe parcursul a 20 ani [56]. Alte studii efectuate de Seif E. I. și coautorii relatează că incidența GSFS constituie 30,2 % cazuri [294]. Datele raportate de Obiagwu P.N. și coautorii relevă o creștere a incidenței GSFS până la 54,5 % cazuri, ceea ce coincide cu datele obținute de studiul nostru (50,0% cazuri) [250]. Incidență GNMzP, conform studiilor realizate de Bonilla-Felix M., constituie 25 % [56], iar datele raportate de Mubarak M. și coautorii, indică 10,2 % cazuri [236]. Diferențele observate între frecvențele diferitor subtipuri histopatologice în SNSR conform datelor diferitor studii pot fi atribuite diferențelor etnice, de mediu și genetice [170]. Leziunile precoce ale GSFS nu pot fi detectate la examenele histopatologice inițiale [236]. Studii recente au demonstrat efectul semnificativ al factorilor etnici și geografici privind răspunsul la steroizi și tipurile histopatologice ale SNI. Mai mult decât atât, potrivit diverselor studii, pacienții cu SNSR ale căror biopsii renale au indicat inițial SNSM în stadiile timpurii ale bolii, ulterior au dezvoltat GSFS [145]. Astfel putem concluziona că ambele leziuni sunt tipuri progresive ale unuia și aceluși proces.

Tabelul 6.4. Manifestările clinice depistate la copiii cu glomerulonefrită

| Parametrii clinici | Numărul de cazuri | $\bar{X} \pm ES$ % |
|--------------------|-------------------|--------------------|
| Edeme              | 10                | 100,0 $\pm$ 0,08   |
| Hematurie          | 6                 | 50,0 $\pm$ 5,19    |
| HTA                | 5                 | 41,7 $\pm$ 5,12    |
| BCR                | 2                 | 16,7 $\pm$ 10,8    |
| Dializă            | 1                 | 8,3 $\pm$ 1,0      |
| Deces              | 1                 | 8,3 $\pm$ 1,0      |

Cele mai frecvente manifestări clinice au fost edemele – 100,0±0,08%, urmate de hematurie – 50,0±5,19 %, HTA – 41,7± 5,12%, BRC gr. V – 16,7±1,8%. Rezultatele obținute în cadrul studiului de față sunt similare altor studii [170].

Tabelul 6.5. Manifestările clinice atestate la copiii cu diferite variante histologice ale GN

| Parametrii clinici | GSFS | GNMzP | SNSM | p                              |
|--------------------|------|-------|------|--------------------------------|
| Edeme              | 4    | 1     | 5    | $\chi^2=0,887$<br>gl=2, p>0,05 |
| Hematurie          | 6    | -     | -    | $\chi^2=0,466$<br>gl=2, p>0,05 |
| BRC gr.V           | 2    | -     | -    | $\chi^2=0,186$<br>gl=2, p>0,5  |
| Dializa            | 2    | -     | -    | $\chi^2=0,186$<br>gl=2, p>0,05 |
| Deces              | 1    | -     | -    | $\chi^2=0,466$<br>gl=2, p>0,05 |
| Vârsta             | -    | 1     | 4    | $\chi^2=0,078$<br>gl=4, p>0,05 |
| Sexul,<br>fete     | 4    | -     | 1    | $\chi^2=0,068$<br>gl=2         |
| băieți             | 1    | 1     | 5    | p>0,05                         |

Modificările paraclinice au fost determinate de hipoproteinemie – 52,07±3,44 g/l, hiperlipidemie – (colesterolul – 10,17±1,15 mmol/l,  $\beta$ -lipoproteide – 110,75±7,02 u.c.), proteinurie timp 24 h – 5,68±1,83 g/l. Conform datelor prezentate în tabelul 6.6, pacienții prezentau creatininemie până la 0,104±0,42 mmol/l în GSFS, modificări mai exprimate ale lipidelor totale în serul sangvin în GSFS comparativ cu SNSM.

Tabelul 6.6. Modificările paraclinice stabilite la copiii cu GN în funcție de varianta histologică

| Parametrii biochimici       | Total       | GSFS        | SNSM         |
|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|
| Proteina totală, g/l        | 52,07±3,44  | 56,8±3,12   | 48,63±3,64   |
| Ureea, mmol/l               | 5,41±0,84   | 5,62±1,25   | 5,23±1,23    |
| Creatinină, mmol/l          | 0,077±0,22  | 0,104±0,42  | 0,049±0,006  |
| Colesterol, mmol/l          | 10,17±1,15  | 9,90±1,92   | 9,92±1,78    |
| Lipide totale, mmol/l       | 5,8±2,04    | 8,7±0,63    | 3,96±3,02    |
| $\beta$ -lipoproteide, u.c. | 110,75±7,02 | 106,60±9,16 | 111,50±12,21 |

RFG<90 ml/min/1,73m<sup>2</sup> a fost atestată în 25 % cazuri. În tabelul 6.7 sunt prezentate rezultatele sumarului urinei la copiii cu GN în funcție de varianta histologică.

Tabelul 6.7. Sumarul urinei la copiii cu GN în funcție de varianta histologică

| Parametrii studiați               | Total     | GSFS      | SNSM      |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Eritrocite în sumarul urinei, c/v | 36,20±2,1 | 45,33±4,5 | 22,20±2,5 |
| Proteina în sumarul urinei, g/l   | 5,27±1,38 | 3,18±0,87 | 6,76±2,59 |
| Proteina în urină timp 24 h, g/l  | 5,68±1,83 | 8,56±3,75 | 3,07±0,72 |

Conform datelor tabelului 6.7. în sedimentul urinar s-a semnalat hematurie până la 45,33±4,5 c/v în GSFS, comparativ cu SNSM – 22,20±2,5 c/v. Proteina în urină timp 24 h a constituit – 8,56±3,75 g/l în GSFS, comparativ cu 3,07±0,72 g/l în SNSM.

## 6.2. Modificările histologice la copiii cu glomerulonefrită

Lotul de studiu clinico-morfologic a inclus 12 pacienți, care au constituit lotul principal de studiu. În lotul de control s-au inclus biopstatele renale prelevate prin metoda deschisă în 5 cazuri de decese survenite la copii de aceeași vârstă, cauzate de patologii extrarenale și în lipsa simptomatologiei urologice și nefrologice.

În cadrul explorărilor histomorfologice s-a atestat prezența leziunilor glomerulare de diversă intensitate, estimate în funcție de structura anatomică a biopstatului, coraportul diferitelor elemente nefroniale, numărul accesibil de glomeruli și complexitatea manifestărilor morfopatologice – distribuția, forma, caracterul tinctorial al elementelor celulare.

De asemenea, un test optimal pentru examinările histomorfologice fiind apreciat biopstatul care a inclus minimul de glomeruli, nu mai puțin de 7-8 în câmpul de vedere. Aspectul microscopic al glomerulilor în testul nativ era caracterizat prin prezența punctelor roșietice cu fenomen congestiv generalizat sau parțial [13]. În același timp s-au atestat și glomeruli ce manifestau o congestie mai redusă, având un aspect pal-roz sau pal-albicios, uneori fiind depistați și glomeruli unici cu aspect pal-suriu (figurile 6.1 – 6.2). Deja la microscopia biopstatului nativ, s-a stabilit prezența unor modificări, dat fiind faptul că reducerea aspectului roșiatic congestiv sau lipsa acestuia indică prezența unor leziuni de scleroză.

Ca rezultat al testării primare a biopstatelor, în (10) 83,3% din cazuri s-au obținut biopstate întregi, informative ce au cuprins câte 6-8 glomeruli morfologic modificați, în mare parte având aspectul pestriț congestiv, ceea ce reflectă natura vasculară a glomerulului (figurile 6.3 – 6.4).

În 2 (1,7%) din cazuri, după cum s-a menționat, s-au efectuat PBR repetate, motivul fiind biopstatul fragmentat cu prezența a 2-3 glomeruli. Biopstatele repetate s-au obținut cu particularități microscopice calitative. Vom menționa că în cadrul PBR efectuate de noi nu au existat accidente sau complicații, cu excepția unui caz în care s-a atestat un sindrom dolor de scurtă durată survenit în cadrul puncției. În funcție de rezultatele atestate în cadrul testării în ambele loturi, s-a constatat,

că atât testările din lotul de control precum și în cadrul biopstatelor testate din lotul principal de studiu, prezentau aspecte de normă convențională, dar cu mici devieri de formă microarhitectonică.

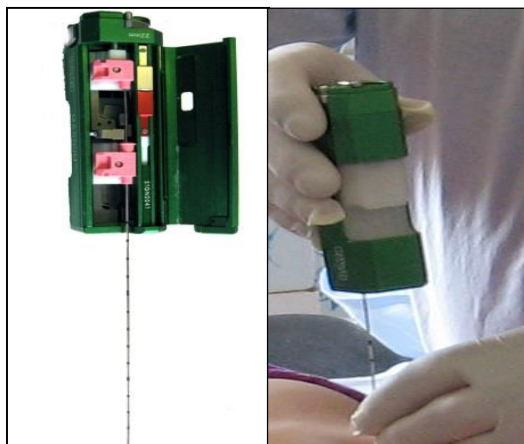


Figura 6.1. Biopsie renală cu dispozitiv Bard Magnum Biopsies

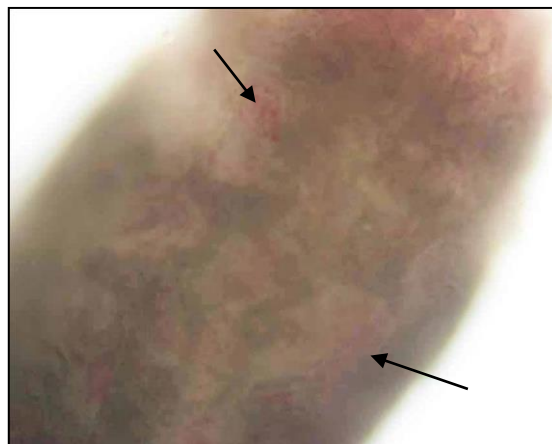


Figura 6.2. Biopat nativ cu prezența a 9 glomeruli – testați după aspectul congestiv al ghemului vascular  $\times 100$

Ca prototip în evaluarea modificărilor lezionale s-au utilizat aspectele microanatomice testate și luate în studiu ca variantă de normă convențională, prelevate din grupul de control (figurile 6.5-6.6): nefronul fiind constituit din 2 elemente microanatomice morfo-funcționale principale: corpusul renal și elementul tubular cu segmentele respective.

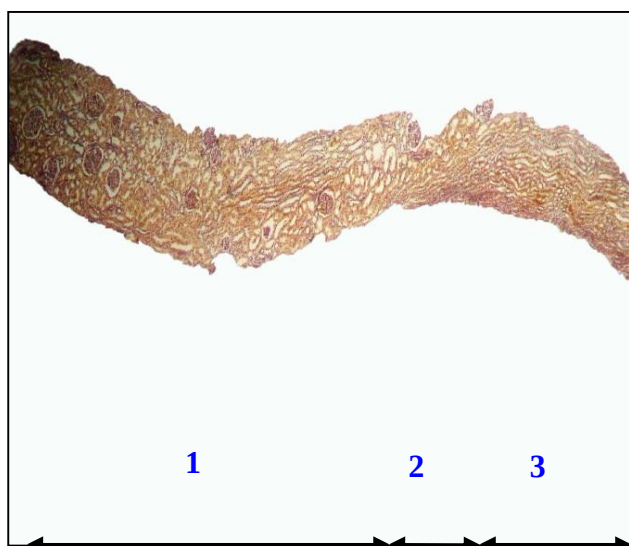


Figura 6.3. Test histologic al parenchimului renal informativ cu 15 glomeruli: 1) zona corticală; 2) zona juxtamedulară; 3) segment din zona medulară  $\times 25$ . Colorație Van Geison

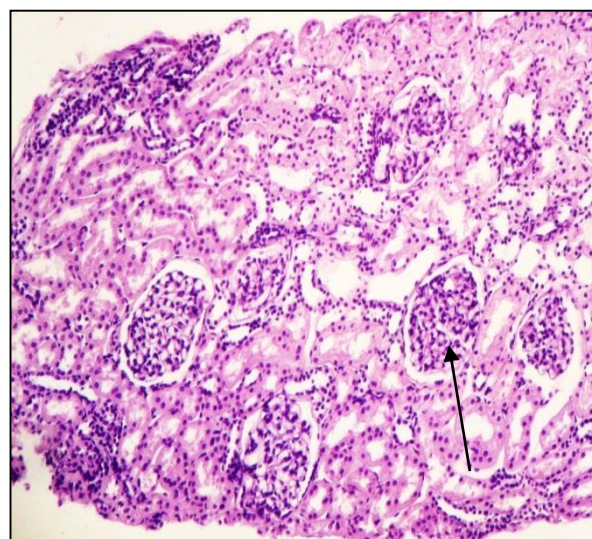


Figura 6.4. Test histologic; segment a zonei corticale cu 8 glomeruli la diverse nivele  $\times 100$ . Colorația H&E

Corpusculul renal se caracteriza prin aspectul de buclă vasculară (glomerulul) și capsulă Bowman. Glomerulul prezintă o structură din 4 tipuri de celule distincte: endoteliale, mezangiale, epiteliale viscerale și epitelial parietale. Cele epitelial viscerale și parietale fiind ușor de diferențiat. Celulele mezangiale sunt mai greu de diferențiat de cele endoteliale, deaceia în microscopia fonică prin metode convenționale se utilizează termenul comun de celule endocapilare. Elementul tubular al nefronului era bine diferențiat, în unele cazuri cu o dilatare nesemnificativă a celui contort proximal, capsula fiind prezentată de o membrană fină bine evidențiată în colorația cu tricrom Masson și nesemnificativ în cea cu picrofuxină - Van Geizon. Ambele metode au atestat o structură glomerulară bine diferențiată cu evidențierea ghemului vascular, componenta celulară realizată omogen, matricea mezenchimală cu densitate mică slab diferențiată, spațiul periglomerular cu aspect de fisură nesemnificativă sau accentuată. Țesutul conjunctiv mai bine evidențiat în colorația cu tricrom Masson, fiind foarte fin la nivel de capsulă și nesemnificativ la nivel de vase.

În cadrul explorărilor histomorfologice prin metoda de colorație cu H&E în structura biopatelor s-a atestat o gamă largă microanatomică a nefronului, fiind caracterizată prin aspecte glomerulare convențional normale și în divers raport cu manifestări lezionale de diversă intensitate și caracter.

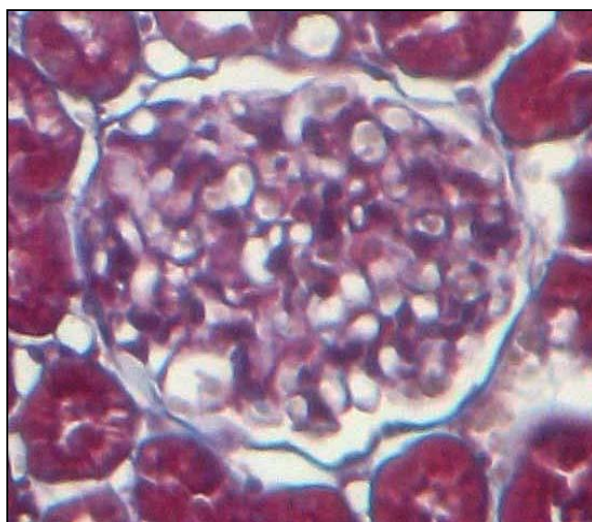


Figura 6.5. Varianta de normă convențională a glomerulului și tubilor contorți, ghem glomerular ușor în semilună, spațiu periglomerular în fisură nesemnificativă  $\times 200$ . *Colorație tricrom Masson*

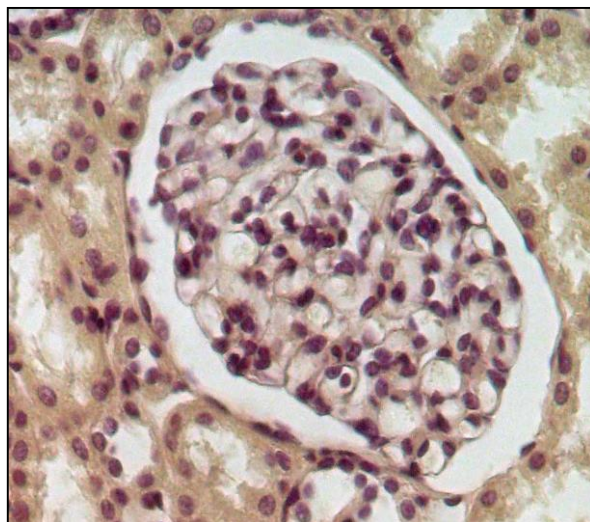


Figura 6.6. Varianta de normă convențională a componentei glomerulare și tubulointerstițiale; glomerul cu normocelularitate, spațiul periglomerular în fisură accentuată  $\times 100$ . *Colorație VG*

Ultimele au fost estimate la microscopia fonică (MF) în baza criteriilor cuantificate mai sus, diagnosticul fiind axat pe determinarea numărului și procentului de glomeruli cu modificări

lezionale, evaluarea severității și activității leziunilor, precum și determinarea modificărilor fibrotice sclero-cicatriceale ireversibile.

De asemenea, s-au depistat și unele particularități ale nefronului tubular și componente interstițiale, ca cele de formă, îngroșări ale membranei bazale, edemul interstițial, infiltratul celular, acestea fiind nesemnificativ atestate cu o repartizare focală sau în aspect de mozaic în aria biopsatului.

Astfel, atestarea criteriilor cuantificate cu divers raport de implicare a glomerulilor și mai puțin a componente tubulare a evidențiat faptul că din punct de vedere histopatologic, în SN la copii se depistează cu predilecție prezența afectării glomerulare și, în divers raport, glomerular-tubulare. Aspectele lezionale se manifestă printr-o gamă largă de modificări ale componentelor structural-celulare, asamblajul cărora caracterizează diverse aspecte morfo-funcționale glomerulare apreciate ca glomerulopatii. În baza datelor obținute, în cadrul examinărilor histopatologice și corelate cu datele clinice, la copiii cu simptomatologia sindromului nefrotic, conform leziunilor detectate, s-a atestat prezența a trei forme de glomerulopatii histomorfologice, care în funcție de particularitățile clinico-morfopatologice au fost clasate ca nefropatii glomerulare cu SN (tabelul 6.8).

Tabelul 6.8. Repartiția afecțiunilor renale în funcție de formele histomorfologice și clinico-morfologice

| Forme               |                                                   |                                                                |                                                        |
|---------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Histomorfologice    | Glomerulopatie „cu leziuni minime” (GLM)          | Glomerulopatie cu scleroză focală și segmentară (GSFS)         | Glomerulopatie membrano (mezangio)-proliferativă (GMP) |
| Clinico-morfologice | Nefropatie glomerulară „cu leziuni minime” (NGLM) | Nefropatie glomerulară cu scleroză focal și segmentară (NGSFS) | Nefropatie glomerulară mezangio-proliferativă (NGMzP)  |

Glomerulopatia cu „leziuni minime” (minimal change), sau NGLM, s-a atestat în 5 (41,7%) cazuri; glomerulopatia cu scleroză segmentară (GSFS) sau NGSFS a constituit ponderea majoră, fiind atestată în 6 (50%) cazuri și într-un caz (8,3%) s-a constatat prezența glomerulopatiei membrano-proliferative (GMP) sau NGMzP. Numărul de glomeruli cu modificări patologice atestați în coraport cu numărul de glomeruli prezenți ce au constituit o medie într-un biopsat în funcție de forma clinico-morfologică este reflectat în tabelul 6.9.



Tabelul 6.9. Repartiția în funcție de glomerulii afectați

| Numărul de glomeruli prezenți și afectați |                       |                       |                                   |                             |
|-------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Formele clinico-morfologice               | nr. pacienți          | nr. bioptate          | Glomeruli prezenți într-un biopat | Glomeruli afectați în medie |
|                                           | <i>cifre absolute</i> | <i>cifre absolute</i> | <i>cifre absolute</i>             | <i>cifre absolute</i>       |
| GLM / NGLM                                | 5                     | 6                     | 12                                | 5                           |
| GSFS / NGSFS                              | 6                     | 7                     | 10                                | 7                           |
| GMzP / NGMzP                              | 1                     | 1                     | 11                                | 9                           |

Conform datelor comparative ale glomerulopatiilor atestate histomorfologic și estimate statistic prin metoda variațională, în funcție de afecțiunile clinico-morfologice (NGLM, NGSFS, NGMzP) stabilite și de numărul de glomeruli afectați detectați într-un biopat, am obținut următoarele date statistice: *numărul* de glomeruli cu modificări lezionale în NGLM a constituit  $0,3 \pm 0,06^*$ ; în NGSFS –  $0,7 \pm 0,06$  și NGMzP –  $0,8 \pm 0,15$  (\* -  $p < 0,01$ ) (figura 6.7).

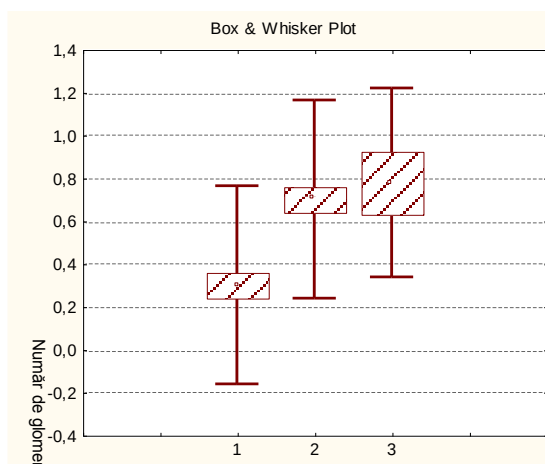


Fig. 6.7. Datele comparative ale numărului de glomeruli cu particularități histopatologice lezionale atestate, unde 1 – NGLM, 2 -NGFS, 3 – GNMzP.



Fig. 6.8. Datele comparative ale gradului lezional histopatologic în glomerulopatii, unde 1 – NGLM, 2 – NGFS, 3 – NGMzP.

Evaluarea matematică, în funcție de *gradul* lezional apreciat histopatologic conform scării de apreciere elaborate în dependență de formele clinico-morfologice, a evidențiat că modificările lezionale în NGLM au constituit  $1,3 \pm 0,1^*$ ; comparativ cu NGSFS –  $2,1 \pm 0,1$  și NGMP –  $2,1 \pm 0,3$  (\* -  $p < 0,01$ ) (figura 6.8).

Astfel, am constatat că la nivelul microscopiei fotonice în NGLM predomină leziunile

de gr.1 (modificări morfopatologice minime), ceea ce constituie specificul morfopatologic al glomerulopatiei date, pe când în NGFS și NGMzP au predominat glomerulopatiile cu leziuni de gradul 2, cu un grad moderat de agresivitate, având o semnificație statistică la nivel de 1% ( $p < 0,01$ ). În funcție de caracterul și gradul de intensitate, agresivitate al leziunilor relevate histomorfologic, cazurile clasate în baza datelor histomorfologice ca glomerulopatii cu „leziuni minime”(GLM) și forma clinico-morfologică de NGLM au manifestat frecvent la microscopia fonică particularități caracteristice aspectului de normă convențională, reflectată în figurile 6.5 - 6.6.

Totuși, la o amplificare optică mai mare, s-au atestat glomeruli cu modificări apreciate ca lezionare atestate după gradație ca minime și medii fiind vizibil realizate sub aspect mai mult haotic sau de mozaic printre glomerulii cu aspect structurizat „normal”. Modificările caracterizate ca minime în microscopia fonică prezentau un glomerul cu ghem vascular conturat cu rețea vasculară congestivă, cu aspect de rigiditate vasculară, uneori cu pseudoanevrisme mici și o celularitate normală, în unii fiind observate aspecte exsudative focare nesemnificative la suprafața ghemului vascular (figura 6.9). Spațiile periglomerulare prezentau frecvent aspect de fisură, dar accentuată.

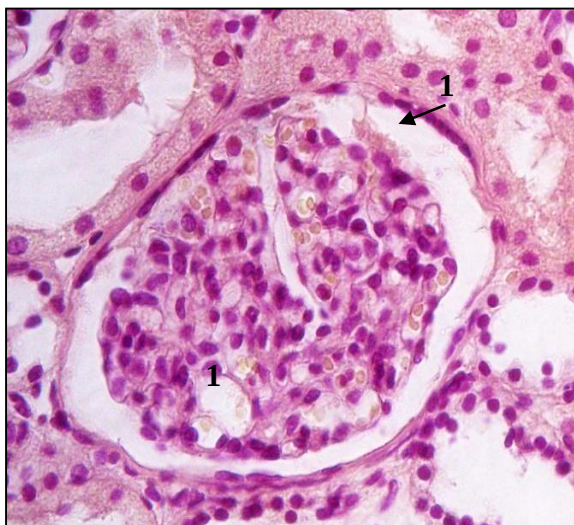


Figura 6.9. Glomerulopatie cu leziuni de gradație minime: 1) aspect congestiv vascular cu microanevrism, 2) exsudat în spațiul periglomerular  $\times 200$ . Colorație H&E

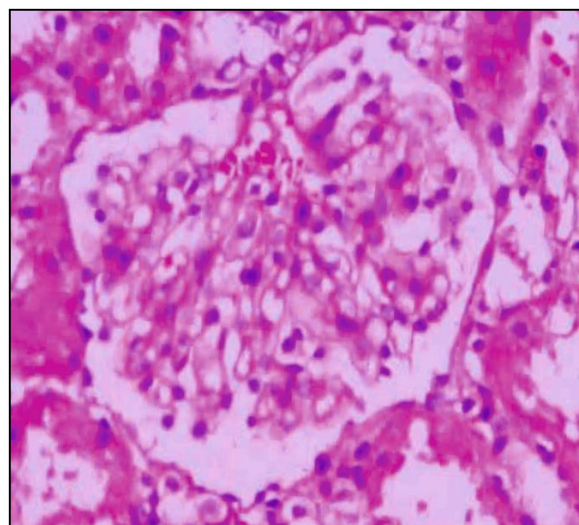


Figura 6.10. Glomerulopatie cu leziuni de gradație minimă cu normocelularitate, aspect congestiv, dezintegrarea periferică  $\times 200$ . Colorație H&E

Printre modificările de grad minim au fost și aspectele de accentuare a componentei celulare cu aspecte de intumescență sau hipertrofie nucleară (figura 6.10.) precum și dezintegrarea periferică a ghemului vascular. În ceea ce privește modificările cu grad moderat specific doar



acestui tip de glomerulopatii, le-am desemnat condiționat. Acestea erau manifestate într-un caz prin prezența aspectului fin al anșelor capilare, dar comparativ cu norma erau mult mai subțiri, având aspect de hiper celularitate discretă, întumescență celulară și hipertrofie nucleară dispersă cu o ușoară pseudolobulație, uneori interstițial s-a atestat prezența unor proliferații endoteliale vasculare (figura 6.11).

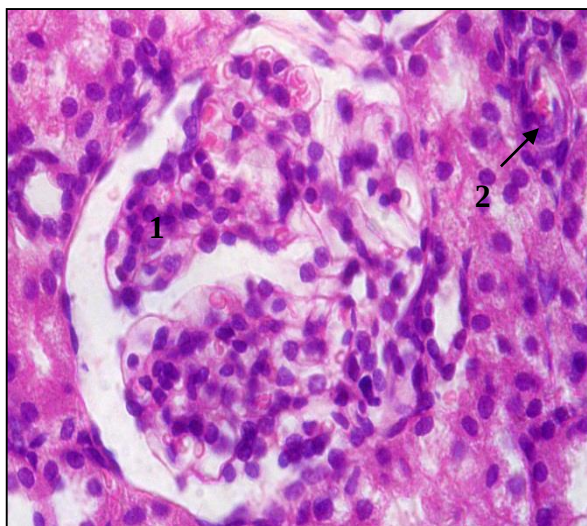


Figura 6.11. Glomerulopatie cu leziuni moderate.1) aspect de pseudolobulație, cu hipertrofie nucleară, 2) proliferarea focală a endoteliului în rețeaua vasculară  $\times 200$ .  
Colorație H&E

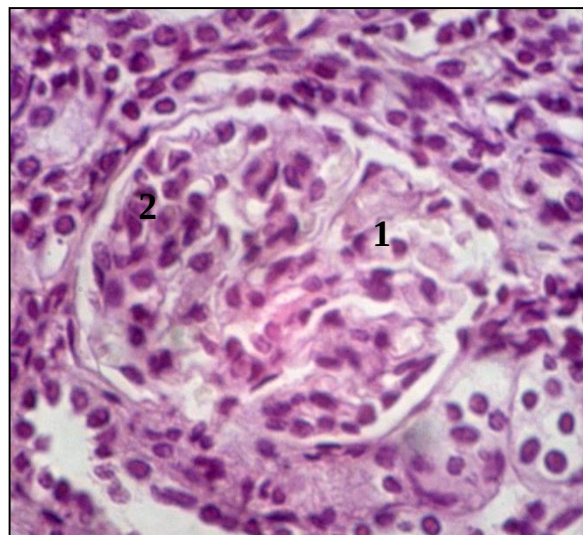


Figura 6.12. Glomerulopatie cu leziuni moderate.1) normocelularitate la 90% din glomeruli și 2) întumescență celulară cu hipertrofie nucleară focală  $\times 200$ . Colorație H&E

În 2 cazuri s-a atestat, la nivelul tubilor contorți o distrofie lipidică slab diferențiată având aspect de celule unice. Interstițiul în marea majoritate a bioptatului era cu discreție vizibil la testarea componentei conjunctive în colorația cu picrofuxină. În 2 cazuri întumescența celulară și hipertrofia nucleară aveau o structură mai mult focală a endoteliocitelor, ansele vasculare fiind cu o congestie diminuată, colabate ușor sau moderat și cu îngroșarea peretelui cu aspect ușor întumescențat. Pe unele arii s-a atestat prezența unei infiltrații discrete limfocitare la nivel interstițial (figura 6.12)

Este de menționat că în bioptatele cu atestarea modificărilor glomerulare descrise mai sus, nefronii tubulari, în special cei contorți s-au caracterizat frecvent prin aspecte de dilatare ușoară cu persistarea epiteliului uneori ușor atenuat, precum și cu prezența în 3 cazuri a unor modificări distrofice granulare sau vacuolare slab diferențiate, frecvent în focare.

Conform datelor examenului morfologic, în prezența manifestărilor clinice și paraclinice ale SN, la copiii cu glomerulonefrită cu „leziuni minime”, cu ajutorul microscopiei fotonice pot

fi depistați atât glomeruli cu structură convențional „normală” cât și cu aspect mixt, în asociere cu leziuni nesemnificative focar-segmentare sau difuze ale morfologiei celulare și ale peretelui anselor ghemului glomerular, însă fără modificarea aspectului componentelor nefronului tubular și a componentei interstițial-vasculare.

Rezultatele examenului morfopatologic prin microscopia optică au arătat că în cadrul nefropatiei glomerulare cu *leziuni minime* la copii, se pot distinge convențional două tipuri de glomerulopatii preexistente în perioada manifestărilor clinice ale SN: glomerulopatia cu anse capilare (membrana bazală subțiată) și glomerulopatia cu reacții celulare focal-segmentare sau difuze.

Ca rezultat al estimării microscopice, am stabilit că NGLM este o patologie ce antrenează doar un anumit grup de glomeruli și nu marchează o implicare generalizată. Aceste particularități lezionale în aspect morfopatologic convențional relevă totuși prezența unei diversități a intensității modificărilor atestate care fiind cuantificate în studiul nostru după sistemul de gradație, reflectă prezența unor leziuni de grad variabil al glomerulopatiei în evoluția NGLM.

Astfel, ținând cont de opinia că leziunile minime ale glomerulilor pot evolua la pacienții cu SN sub tratament, ca și de ipoteza despre reversibilitatea sau ireversibilitatea acestor modificări după efectuarea tratamentului, conchidem că aceste afirmații contravin realității. De asemenea, este de menționat că modificările atestate la nivelul microscopiei fotonice prin metode convenționale nu sunt particularități ce ar estima cert o variantă specifică a glomerulonefritelor sau alta, dar servesc drept criterii morfologice orientative ale prezenței glomerulopatiei cu particularități neproliferative ce caracterizează glomerulonefrita cu „leziuni minime.”

În cadrul studiului de față, analiza modificărilor histologice în NGSFS atestate în evoluția SN a evidențiat predominarea la nivel de glomerul, a modificărilor caracterizate printr-un aspect lezional heterogen și nu doar prezența celor strict sclerozante-hialine sau cicatriceale estimate în diferite rapoarte din literatura de specialitate.

O particularitate este și implicarea asincronă în procesul lezional a glomerulilor, atât în ce privește numărul de glomeruli afectați cât și intensitatea și caracterul leziunilor prezente în aria glomerulilor precum și în coraport cu capsula Bowman, inclusiv cu zonele structurale ale biotatului, parenchimului renal.

În funcție de severitatea proceselor sclero-hialine, acestea au manifestat o variație largă, de la focale nesemnificative la segmentare, inclusiv la forma globală a sclero-hialinozei glomerulului sau a glomerulilor. De menționat că în paralel cu glomerulii modificați frecvent s-a atestat prezența glomerulilor cu aspect optic normal sau cu aspect histoarhitectonial nesemnificativ deviat, dar morfofuncțional fiind atestate ca variantă de normă.

Printre glomerulii cu aspect la limita normei convenționale, leziunile morfologice aspectual minime s-au manifestat prin congestie capilară, accentuare nesemnificativă lobulară și dezordonarea zonei juxtaglomerulare, pe unele arii fiind ușor desemnată densitatea mezangiului cu o fibroză ușoară (figura 6.13), unii glomeruli manifestau aspecte histologice caracteristice celor descrise în cadrul GLM și reflectate în figura 6.12.

Printre modificările moderate s-au înscris cele de reducere a componentei celulare, accentuarea focală a țesutului conjunctiv sclerogenizat la nivel de membrană cu implicare segmentară a glomerulilor, capsula Bowman și membrana bazală tubulară păstrându-și aspectul normal (figura 6.14).

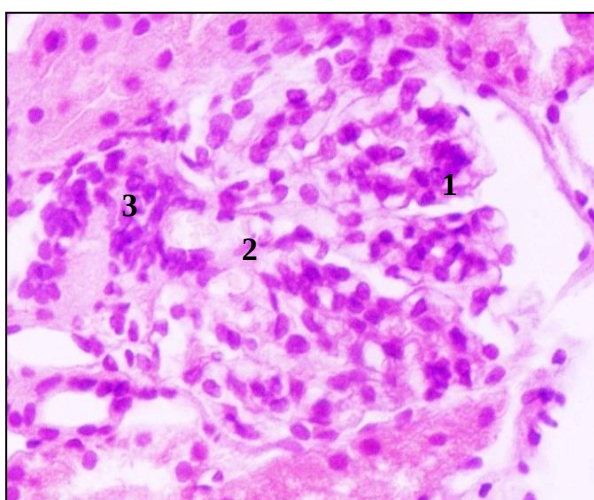


Figura 6.13. Glomerul cu aspect morfo-funcțional la limita normei. 1) accentuarea lobulară cu hipercelularizare focală; 2) dezorganizare nesemnificativă a zonei juxtaglomerulare  $\times 200$ . *Colorație H&E*

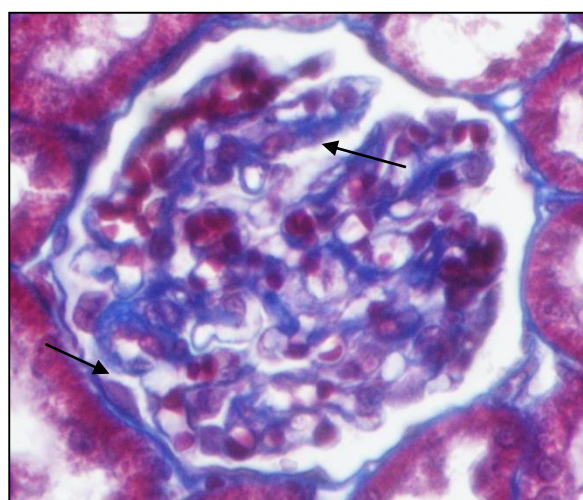


Figura 6.14. Glomerul cu scleroză focală (săgeată) moderat accentuată și hipocelularitate  $\times 200$ . *Colorație tricrom Masson*

Pe lângă prezența reacțiilor sclerogene sau a sclerozei focal-segmentare s-au desemnat și glomeruli cu proliferări celulare endocapilare (endotelial-mezangiale), proliferări celulare epiteliale parietale ale capsulei și aspect de semilună epitelial-celulare cu diversă intensitate a componentei sclerozive ce frecvent sugerau tabloul histologic al unei glomerulopatii rapid progresive. Ca rezultat al proceselor proliferative ale componentei celulare pe diverse arii atât la nivelul glomerulilor cât și al capsulei, s-a atestat prezența proceselor aderențiale în aspecte mici și în platouri glomerulo-capsulare, uneori asociate cu dilatări ale vaselor aferente (figurile 6.15-6.16). Capsula în cazurile respective a marcat o hipercelularitate variabilă pe contul accentuării proliferative și al infiltrației limfocitare.



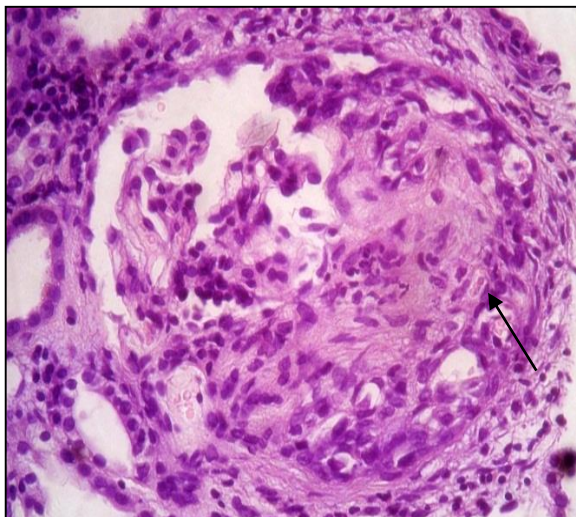


Figura 6.15. Glomerulopatie sclerozantă segmentară cu proliferarea elementelor celulare ale capsulei, formarea aderențelor glomerulo-capsulare  $\times 200$ . Colorație

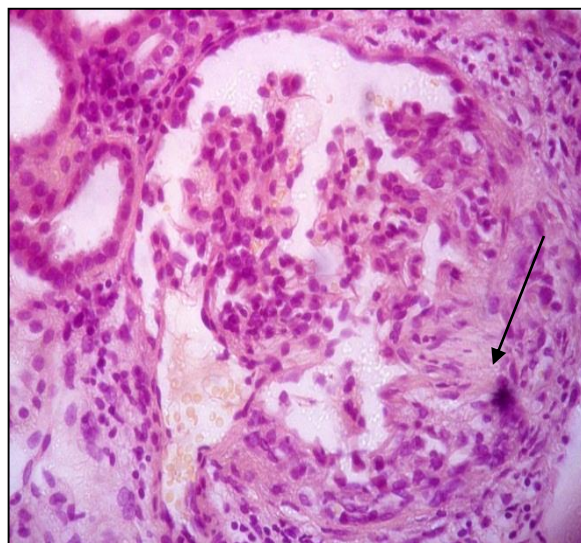


Figura 6.16. Glomerulopatie segmentară aderențială glomerulo-capsulară în platouri cu dilatarea vasului aferent  $\times 200$ . Colorație H&E

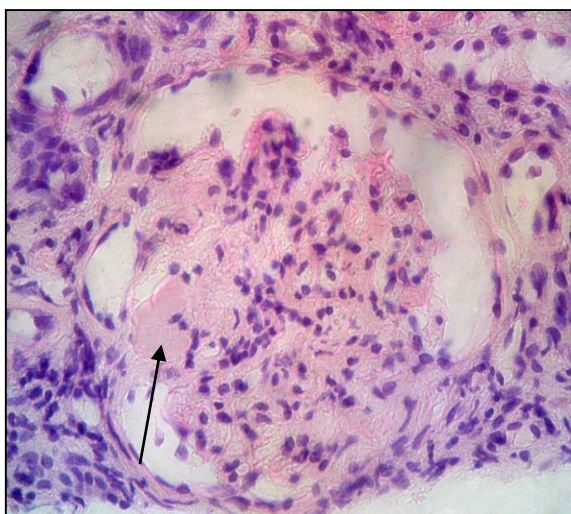


Figura 6.17. Glomerulopatie sclerozantă segmentară cu trombi hialini în rețeaua vasculară  $\times 200$ . Colorație H&E

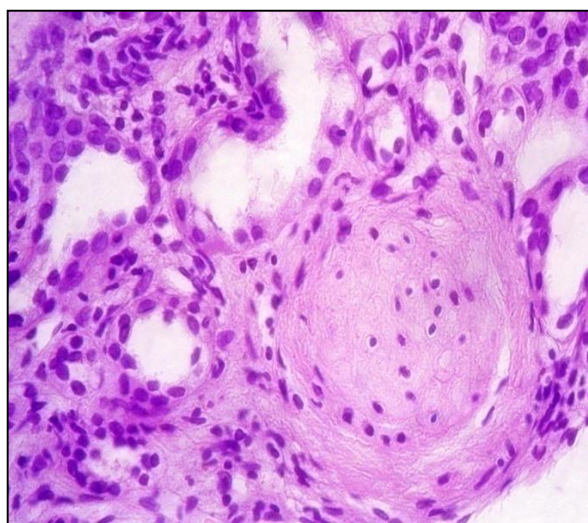


Figura 6.18. Glomerulopatie sclero-hialină globală (totală), dilatarea și atrofia moderată a tubilor  $\times 150$ . Colorație H&E

La nivel de capsulă Bowman și glomerul, de asemenea, erau prezente aderențe cu localizare adiacent hilului glomerular sau la nivelul zonei apicale. În unele cazuri la nivelul glomerulilor cu modificări sclerogene intraglomerulare și aderențiale glomerularo-capsulare erau prezente și vase cu trombi de hialină (figura 6.17).

De asemenea, în 2 cazuri în cadrul glomerulopatiei focal-segmentare sclerogene sau sclero-hialine s-a atestat prezența glomerulilor unici cu scleroză și hialinoză globală, sferică, cu prezența unor elemente celulare endocapilar-mezangiale dispersate (figura 6.18).

Concomitent cu modificările lezionale ale glomerulilor, s-au depistat și modificări ale nefronului tubular, acesta fiind ușor sau moderat dilatat, în special cel contrort cu divers grad de atrofie al nefroteliului tubular. Interstițial era de asemenea prezent un proces infiltrativ inflamator limfocitar sau limfo-plasmocitar discret sau moderat. În paralel cu procesele inflamatorii de divers grad s-a atestat și o reacție sclerogenă la nivel de interstițiu. În focar erau prezente și îngroșări sclerotice fusiforme la nivelul membranei bazale a nefronului tubular.

O particularitate, atestată cu o frecvență de 2 (16,7%) din cazuri, au constituit leziunile caracterizate de prezența unor modificări, cu predilecție la nivelul glomerulilor din zona juxtamedulară, comparativ cu zona corticală, aspecte ce nu au fost observare în cazurile precedente.

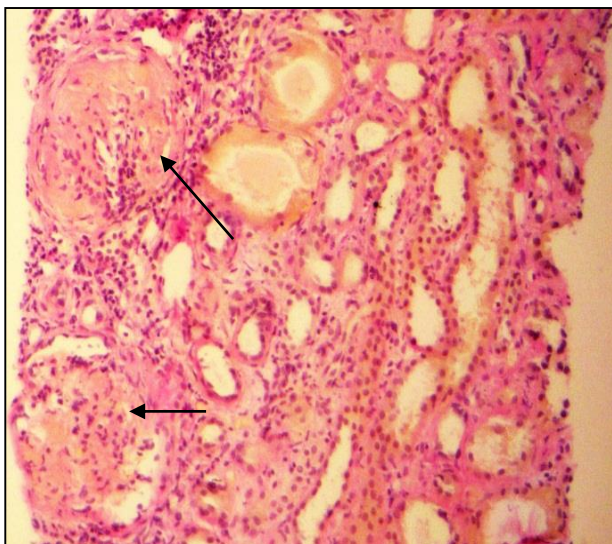


Figura 6.19. Glomerulopatie sclero-hialină focal-segmentară subglobală  $\times 200$ .  
Colorație H&E

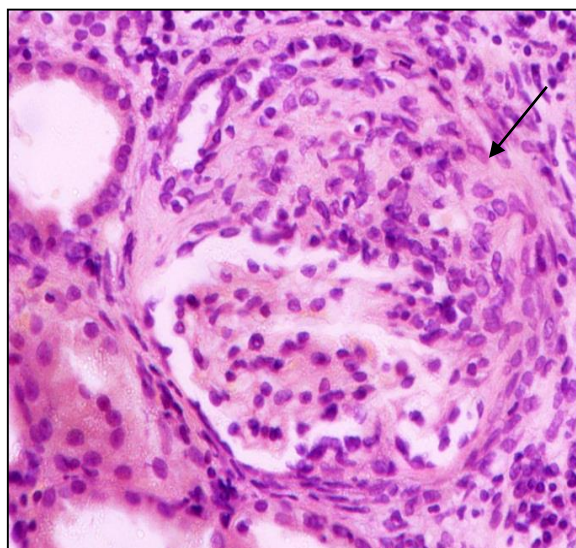


Figura 6.20. Glomerulopatie segmentară fibroziv-sclerogenă cu hiperceluaritate moderată endotelială  $\times 200$ . Colorație H&E H&E

Printre glomerulii modificați s-au atestat și zone cu implicarea a 70-80% din structura glomerulilor pe contul sclerozei periferice. La acest nivel glomerulii aveau un aspect sclerozant marcant la periferie cu prezența proceselor aderentiale la nivel de capsulă, circulația sangvină existând doar la nivelul central și în regiunea hilului cu o proliferare endotelial-mezenchimală moderată (figura 6.19). Cei din zona corticală manifestau aspecte sclerogene segmentare, concomitent cu aderențe



glomerulo-capsulare și cu o celularitate endotelială mai accentuată (figura 6.20). Modificările de tip glomerulopatie sclerozantă focar-segmentară cu leziuni de intensitate moderată și pronunțată s-au atestat cu predilecție la vârsta adolescenței.

Este de remarcat faptul că prezența glomerulilor cu modificare sclerotică globală cu aspect retractil la copii nu reprezintă un criteriu de diagnostic al unei glomerulopatii specifice și nici nu este caracteristic pentru diagnosticul NGSFS. La unii copii sunt prezenți glomeruli unici sclero-hialinizați preexistenți, fiind consecința unor accidente în ontogeneza intrauterină. Ei pot persista pe parcursul vieții fără anumite manifestări clinice legate de patologii renale.

Scleroză focală globală se mai poate evidenția prin implicații a mai multor glomeruli. Ea se deosebește de scleroza segmentală și focală fiind întâlnită la copii mici și are o evoluție mai bună sub tratament. Cu o frecvență de 8,3%, în studiul nostru, am depistat pacienții cu glomerulopatia proliferativă difuză cu hipercelularitate endotelial-mezenchimală. NGMzP era caracterizată

histomorfologic prin implicarea unui număr semnificativ de glomeruli, comparativ cu formele precedente. Aspectul lezional al glomerulilor, ca și în cazurile precedente, a variat după intensitate fiind prezenți glomeruli cu aspect optic normal, dar mai frecvent cu accentuarea componentei celulare, inclusiv a desenului lobular ale glomerulului de la ușor la pronunțat. În cazurile respective era prezentă o proliferare celulară cu aspect de hipertrofie și hiper Cromatoză nuclear-celulară, cu expansiunea ușoară sau moderată a matricei mezangiale ce caracterizează prezența glomerulopatiei mezangio-proliferative având semnificație morfopatologică pentru această boală (figurile 6.21-6.22).

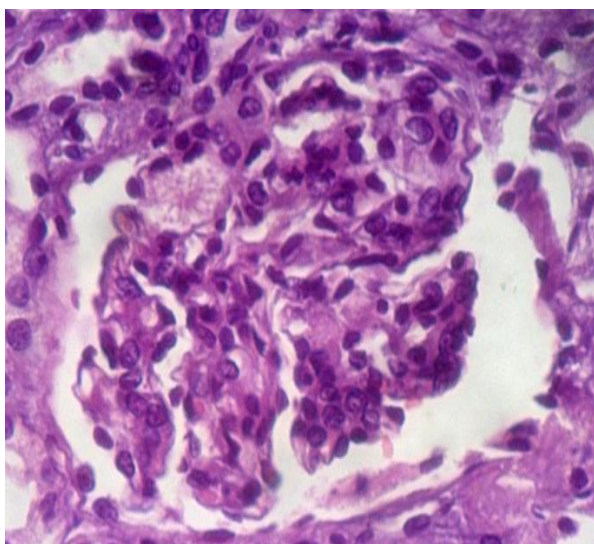


Figura 6.21. Glomerulopatie proliferativă cu accentuarea aspectului lobulat, hipertrofie celulară și nuclee hiperchrome  $\times 200$ . Colorație H&E

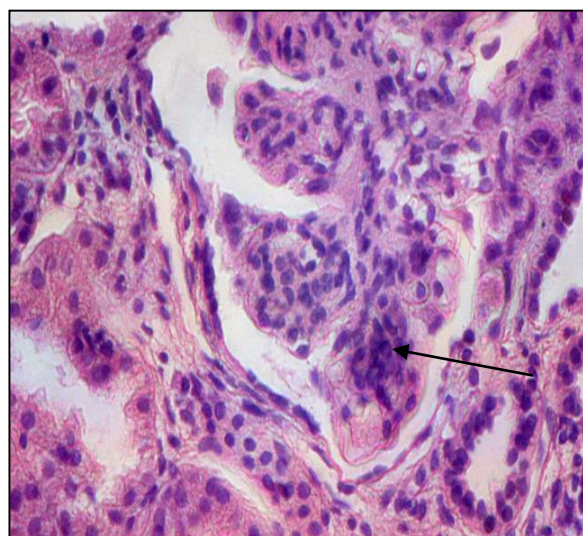


Figura 6.22. Glomerulopatie proliferativă endothelial-mezangială cu hipercelularitate în porțiunea centrolobară, capilare ectaziate la periferie  $\times 200$ . Colorație H&E

De asemenea printre modificările lezionale s-a atestat prezența glomerulilor cu aspecte proliferative endotelial-mezenchimale cu hiperplazie moderată și prezența unor glomeruli cu particularități proliferative și sclerogene, aderențe glomerulo-capsulare. În rețeaua capilară puteau fi observate limfocite unice, granulocite (figura 6. 23).

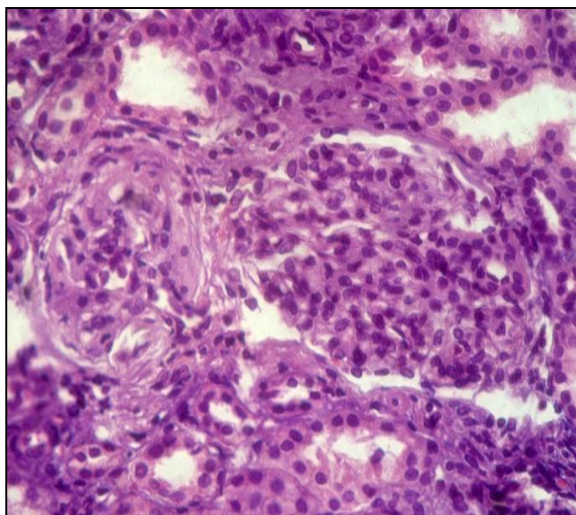


Figura 6.23. Glomerulopatie proliferativă endotelial mezangială în asociere cu un glomerul cu modificări sclerotice și hiper celularitate endotelial- mezangială focală  $\times 200$ . *Colorație H&E*

Ca rezultat al studiului efectuat, am constatat că la copiii cu SN au fost prezente trei forme histomorfologice de glomerulopatii cu predominarea glomerulopatie sclerozante focar-segmentare. Menționăm de asemenea că, în paralel cu procesele sclerozante s-au atestat glomeruli cu aspect normal și/sau afectați de procesul proliferativ. Acest fapt ne demonstrează că GSFS nu este o patologie de sine stătătoare, dar reprezintă mai frecvent o consecință a unor leziuni glomerulare suportate anterior sau a unor procese persistente, fapt demonstrat și prin prezența, în paralel cu procesele proliferative endotelial-mezenchimale ce caracteriziază GNMzP, a glomerulilor cu leziuni sclerogene.

Deci, modificările sclerogene pot apărea în cadrul unor glomerulopatii specifice marcând aspecte de vindecare-sclerozare a leziunilor suportate determinate de procesele de remisiune și acutizare.

Putem deci conchide că în evoluția SN la copii se întâlnesc mai frecvent nefropatiile glomerulare neproliferative, comparativ cu cele proliferative, ceea ce nu vine în contradicție cu datele de literatură care denotă că, în structura afecțiunilor renale ce evoluează cu SN se relevă prezența unei variații mult mai largi a formelor de glomerulopatie la copii. Evaluarea histologică a biopatelor, în studiul nostru, a fost în mare parte direcționată spre determinarea numărului de glomeruli implicați în diverse leziuni și estimarea severității leziunilor la nivel de glomeruli, afectarea cărora servește drept un factor predictiv în agresivitatea și durabilitatea afecțiunii SN

la copii. Astfel, prin utilizarea puncției-biopsiei a fost posibilă stabilirea originii, naturii și evoluției leziunilor glomerulare.

### 6.3. Corelații histopatologice și biochimice în evoluția glomerulonefritei la copii

Pentru determinarea și interpretarea statistică a repartiției procentuale în cadrul lotului de studiu a indicilor evaluați precum și pentru estimarea tendinței evoluției proceselor a fost utilizată analiza histogramelor de distribuție a glomerulilor afectați în baza gradului de afectare glomerulară și în funcție de forma clinico-morfologică.

Analiza histogramelor, a evidențiat că în lotul cu NGLM sub aspectul modificărilor lezionale de grad avansat au prevalat leziunile histopatologice de gradul 2, mai exact cazurile considerate ca moderate, care au înregistrat o frecvență de 33% (figura 6.24).

În comparație cu NGLM, în formele clinico-morfologice NGSFS și NGMzP, leziunile histopatologice glomerulare avansate au inclus predominarea preponderentă a modificărilor lezionale cu grad de severitate 2 și 3 ale afectărilor glomerulare, constituind 73% în NGSFS și 77% din cazuri în GNMzP (figurile 6.25- 6.26) .

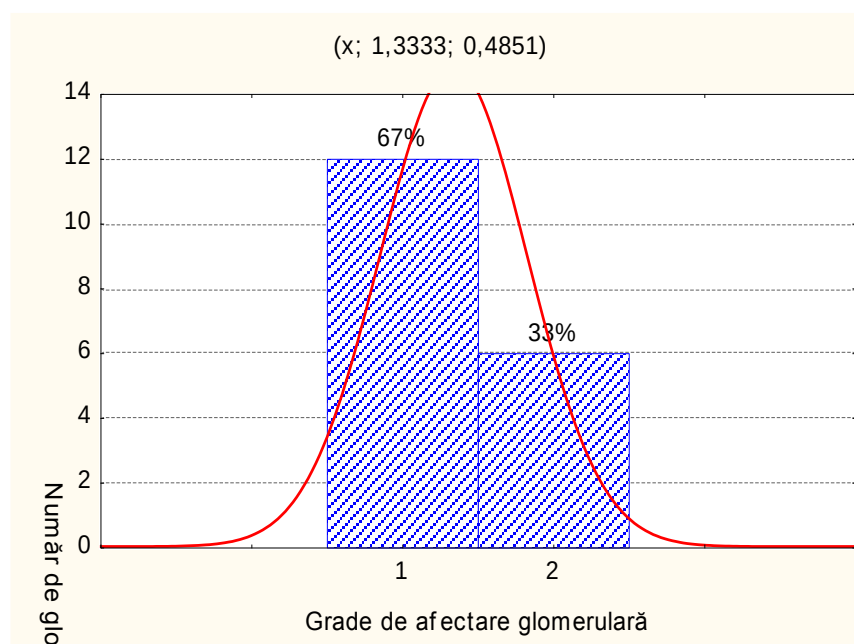


Figura 6.24. Histograma de distribuție a glomerulilor afectați în baza gradului de afectare glomerulară în NGLM, unde 1 – gradul 1, 2 – gradul 2.



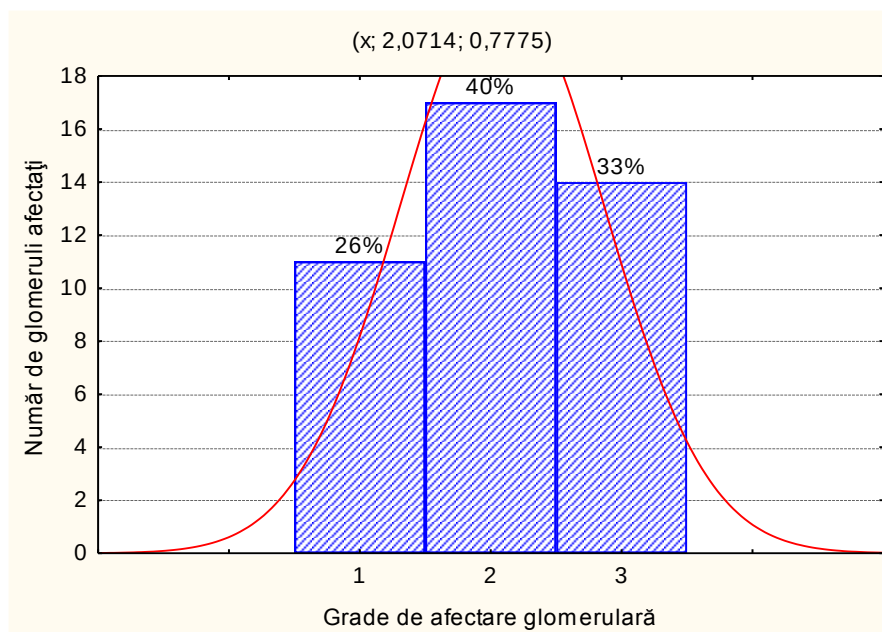


Figura 6.25. Histograma de distribuție a glomerulilor afectați în baza gradului de afectare glomerulară în NGFS, unde 1 – gradul 1, 2 – gradul 2, 3 – gradul 3.

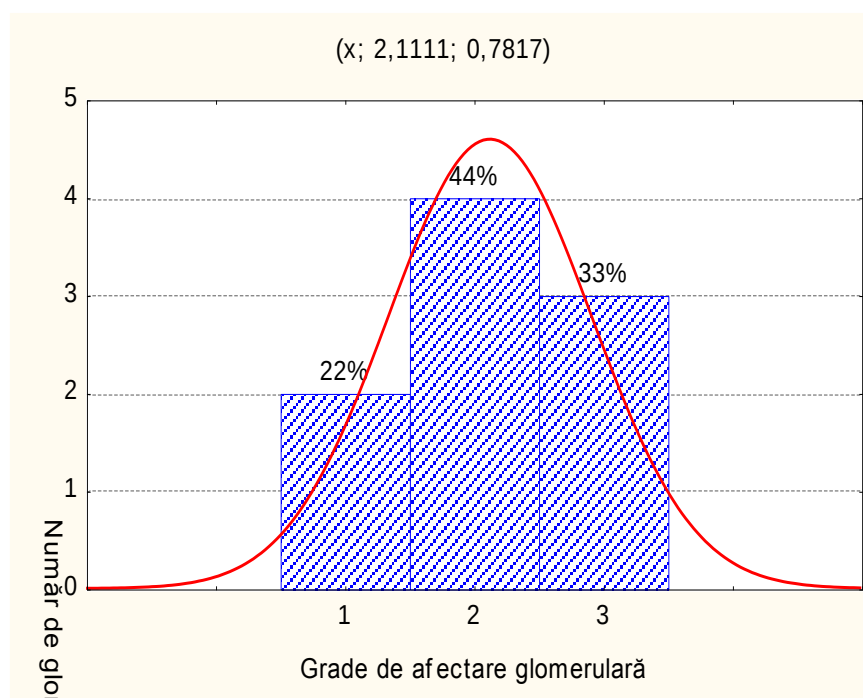


Figura 6.26. Histograma de distribuție a glomerulilor afectați în baza gradului de afectare glomerulară în NGMP, unde 1 – gradul 1, 2 – gradul 2, 3 – gradul 3.

Totodată, este de menționat că centrul de distribuție al frecvențelor în lotul NGLM manifestă o tendință de deplasare în direcția valorilor mici, pe când în loturile NGFS și NGMP – în direcția valorilor mari ale gradului lezional, ceea ce corespunde și reflectă predilecția unor leziuni histopatologice pronunțate în glomerulii renali. În aprecierea unei corelații clinico-morfologice s-a recurs la estimarea statistică corelațională dintre unii markeri biochimici și leziunile atestate morfologic. În calitate de markeri s-au utilizat datele biochimice și unii markeri de importanță diagnostică și clinică în funcție de formele histomorfologice atestate.

Astfel, ținând cont de valorile oscilante ale *NAG-β* (1), *MCP-1* (2), *IL-6* (3) și de numărul divers al glomerulilor renali afectați în funcție de forma clinico-morfologică a glomerulopatiei (NGLM, NGSFS și NGMzP) s-a efectuat analiza corelațională între valorile acestor parametri, cu excepția NGMzP, care s-a manifestat doar la un singur pacient.

De menționat că în NGLM, analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul *NAG-β*(1), *MCP-1* (2), *IL-6* (3) și *NGA* (4) nu ne-a furnizat date statistice relevante, cu excepția unei corelații foarte puternice între *IL-6* (3) și *NGA* (4) ( $r=0,85$ ) (tabelul 6. 10).

Tabelul 6.10. Analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul biochimic în urină și numărul de glomeruli afectați în NGLM

| Loturi | <i>NAG-β</i> | <i>MCP-1</i> | <i>IL-6</i> | <i>NGA</i> |
|--------|--------------|--------------|-------------|------------|
| 1      | 1,0          |              |             |            |
| 2      | 0,43         | 1,0          |             |            |
| 3      | 0,15         | 0,19         | 1,0         |            |
| 4      | -0,09        | -0,23        | 0,85        | 1,0        |

Comparativ cu NGLM, analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul *NAG-β*(1), *MCP-1* (2), *IL-6* (3) și *NGA* (4) în GSFS a stabilit o corelație medie între nivelul *NAG-β*(1) și *NGA* (4) ( $r=0,47$ ), corelații puternice între nivelul *MCP-1* (2) și *NGA* (4) ( $r=0,61$ ) și între *IL-6*(3) și *NGA* (4) ( $r=0,60$ ) (tabelul 6.11).

Tabelul 6.11. Analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul biochimic în urină și numărul de glomeruli afectați în GSFS

| Loturi | <i>NAG-β</i> | <i>MCP-1</i> | <i>IL-6</i> | <i>NGA</i> |
|--------|--------------|--------------|-------------|------------|
| 1      | 1,0          |              |             |            |
| 2      | 0,93         | 1,0          |             |            |
| 3      | 0,79         | 0,79         | 1,0         |            |
| 4      | 0,47         | 0,61         | 0,60        | 1,0        |

În urma analizei corelaționale a gradului de dependență între nivelul NAG- $\beta$ , MCP-1, IL-6 și NGA în GNLM și GSFS am stabilit că sporirea NGA va conduce la sporirea nivelului NAG- $\beta$ , MCP-1, IL-6. Lipsesc studii privind corelațiile între modificările histopatologice și activitatea enzimatică la pacienții cu glomerulonefrită. Studiile date se axează doar la nefrita indusă de medicamente, nefropatia Ig A [366, 373]. Activitatea NAG- $\beta$  urinară este un marker sensibil al toxicității tubulare în nefrita indusă medicamentos [366]. Nivelele crescute ale excreției NAG- $\beta$  la pacienții cu SN sunt datorate disfuncției tubulare proximale care este parțial afectată de albuminuria masivă. Studiile au demonstrat un grad semnificativ crescut al proteinuriei la pacienții cu SNSR (de circa 3 ori mai înalt), comparativ cu pacienții cu SNSS. Studii efectuate de Bazzi C. și coautorii au notat nivele mai înalte ale valorilor medii zilnice ale proteinuriei (7,3 g) în GSFS, comparativ cu SNSM (4,9 g) [44].

Nivelele mai înalte ale proteinuriei sunt cauza excreției crescute a NAG- $\beta$ , chiar și în absența leziunilor tubulare evidente în stadiile inițiale ale maladiei, probabil reflectând activitatea lizosomală crescută a acestor celule datorată aportului înalt al proteinelor filtrate. La rândul său excreția crescută NAG- $\beta$  reprezintă un indicator al statutului funcțional al tubilor renali, dar și al gradului leziunii. Conform altor studii, activitatea NAG- $\beta$  urinare poate fi considerată un marker de încredere a toxicității tubulare și a proteinuriei în stadiile incipiente ale GSFS și SNSM [44]. Nu a fost identificată nici o diferență între valorile medii ale NAG- $\beta$  urinar/creatinină în leziunile cu SNSM și non-SNSM. În SNSR, leziunile non-SNSM (GSFS) prezintă proteinurie mai importantă, comparativ cu SNSM, condiționând disfuncții tubulare mai severe, care în consecință, duc la nivele crescute ale NAG- $\beta$  urinar/creatinină [44, 228]. Conform studiului, nivelul urinar MCP-1 reflectă gradul de infiltrare al monocitelor interstițiale și reacția acută a celulelor epiteliale tubulare, reflectând astfel un proces inflamator continuu activ în rinichii afectați [21].

Așadar, ca rezultat al determinării și evaluării aspectelor histomorfologice atestate prin PBR, la copiii cu GN s-a stabilit prezența fundalului patologic preexistent la nivelul nefronului, cu predilecție glomerular, inclusiv a aspectelor cu potențial reversibil și ireversibil în funcție de numărul glomerulilor afectați și severitatea leziunilor. Ținând cont de modificările histomorfologice cuantificate la nivel de glomerul, s-a atestat prezența a trei tipuri de glomerulopatii: GLM, GSFS și GNMzP, cu o frecvență majoră în lotul de studiu a GSFS. În grupul cu GLM s-a evaluat prezența a 2 tipuri convenționale de glomerulopatii: glomerulopatia cu anse capilare (membrana bazală) subțiate și glomerulopatia cu reacții celulare focal-segmentare sau difuze. După gradul de severitate ale leziunilor, am înregistrat o frecvență de circa 33% a cazurilor

de glomeruli implicați, preexistenți la momentul PBR care sunt un factor predictiv pentru declanșarea SN și evoluția nefropatiei glomerulare cu ”leziuni minime”.

O altă particularitate atestată este detectarea aspectelor morfologice ale GSFS, prezente cu predilecție în perioada adolescenței, care se caracterizau prin procese nu doar sclerozante, dar și sclero-celulare. Diagnosticarea lor a permis alegerea soluției terapeutice optime, care era dictată de particularitatea cazului clinic și de modificările histomorfologice ale glomerulopatiei atestate. Conform datelor literaturii de specialitate, GSFS este o patologie neproliferativă, iar rezultatele cercetărilor noastre, sunt de importanță diagnostică, evidențiind atât incidența crescută a patologiei cât și numărul de glomeruli afectați – în  $0,7 \pm 0,06$ , și gradul de severitate ale leziunilor –  $2,1 \pm 0,1$ , înregistrând la copii o tendință spre valori mari ale gradului lezional glomerular, cu o pondere de 44% cazuri de gradul II și 33% de gradul III.

Cazuistică în acest studiu a fost detectarea unui caz de GMP/GNMzP care comparativ cu formele precedente, prin PBR a înregistrat manifestări prin leziuni atât proliferative cât și sclerogene cu un număr semnificativ de glomeruli modificați și un grad impresionant al agresivității leziunilor, cu tendință spre valori mari de gradele II și III – 77%, comparativ cu cele minime – 22%.

#### 6.4. Concluzii la capitolul 6

1. Rezultatele studiului histomorfopatologic al rinichilor au evidențiat că 50,0% cazuri pacienți prezentau modificări cu „leziuni minime”, în 41,7% cazuri – glomerulopatii proliferative capilare și mezangiale proliferative difuze și focal-segmentare cu tendință spre cronicizare, 8,3% – glomerulopatia proliferativă cu particularități extracapilare având o evoluție focală spre cronicizare și manifestându-se mai agresiv sub aspect morfopatologic.

2. Analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul *NAG-β*, *MCP-1*, *IL-6* în urină și numărul de glomeruli afectați (*NGA*) a relevat corelații foarte puternice între *IL-6* și *NGA* ( $r=0,85$ ) în nefropatia glomerulară cu leziuni minime (NGLM). În glomeruloscleroza focal segmentară, analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul *NAG-β*, *MCP-1*, *IL-6* în urină și *NGA* a stabilit corelații medii între nivelul *NAG-β* în urină și *NGA* ( $r=0,47$ ), corelații puternice între nivelul *MCP-1* în urină și *NGA* ( $r=0,61$ ) și între *IL-6* în urină și *NGA* ( $r=0,60$ ). Astfel, ca rezultat al analizei corelaționale a gradului de dependență între nivelul *NAG-β*, *MCP-1*, *IL-6* în urină și *NGA* în NGLM și GNFS s-a stabilit că sporirea *NGA* conduce la sporirea nivelului *NAG-β*, *MCP-1*, *IL-6* în urină.

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

### CONCLUZII GENERALE

1. Conform cercetărilor proprii am stabilit că variantele clinice, particularitățile fiziopatologice ale glomerulonefritei la copil, atipismul manifestărilor clinice, insuficiența mecanismelor adaptiv-compesatorii pe fundalul imaturității tisulare și imune sunt impedimente ce cauzează adresarea tardivă la medicul specialist nefrolog, ceea ce determină ponderea înaltă a complicațiilor, în special boala renală cronică terminală atestată în 21,9 % din cazuri.

2. Din studiul propriu am dedus că prin monitoringul informației examenului clinic, paraclinic, multimodal al glomerulonefritei primare a permis de a obiectiviza variantele clinico-paraclinice, etapele clinico-evolutive, caracterul complicațiilor glomerulonefritei. Estimarea markerilor biochimici, metabolici, bacteriologici, imagistici, histopatologici au permis de a argumenta geneza etiopatogenică, multifactorială, cât și prognosticul bolii. Analiza regresiei logistice a demonstrat, că coroborarea diferitor factori influențază direct dezvoltarea cronizării în special la copii cu vârsta de la 2- 6 ani și rezistența tratamentului cu steroizi.

3. Prin metodologia unui examen diagnostic complex cu utilizarea testelor screening, estimărilor markerilor biochimici în ser și urină, am stabilit modificări majore ale concentrației interleukinelor, factorilor de creștere, enzimelor lizosomale, plasmatic, oligoelementelor, markerilor stresului oxidativ și a datelor histopatologice. Diagnosticul biochimic ne-a permis completarea criteriilor de diagnostic, diagnostic diferențial, de evaluare a complicațiilor, a gradului lezării țesutului renal și argumentarea unui program de tratament medical complex, micșorând prin aceasta riscul complicațiilor precoce și la distanță.

4. Rezultatele obținute la investigarea copiilor cu glomerulonefrită prin evaluarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , CD 40, endotelina-1) în urină au evidențiat o creștere a acestora în dependență de varianta clinică, activitatea procesului patologic renal. Activarea sistemelor umorale și celulare, generatoare de leziuni celulare, precum și cele ce contribuie la intensificarea și extinderea procesului inflamator au un rol decisiv în fiziopatologia glomerulonefritei la copil. Determinarea nivelului moleculelor de semnalizare celulară în urină reprezintă markeri importanți noninvazivi pentru aprecierea injuriei renale, diferențierea diagnostică a diferitor variante ale maladiei, monitorizarea evoluției și elaborarea strategiilor noi de tratament renoprotector în glomerulonefrită la copii.

5. În baza investigațiilor efectuate în SNSS am stabilit corelații statistice puternice între nivelul TNF-  $\alpha$  în urină și IL-8 ( $r_{xy}=0,454$ ,  $p<0,001$ ); IL-6 ( $r_{xy}=0,400$ ,  $p<0,01$ ); proteina în urină ( $r_{xy}=-0,441$ ,  $p<0,001$ ), iar în SNSR s-au atestat corelații între nivelul TNF- $\alpha$  și IL-8 ( $r_{xy}=0,545$ ,

$p < 0,001$ ); între MCP-1 și VEGF ( $r_{xy} = 0,697$ ,  $p < 0,001$ ); între MCP-1 și endotelina-1 ( $r_{xy} = 0,816$ ,  $p < 0,001$ ); între MCP-1 și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = 0,656$ ,  $p < 0,001$ ). În GNC formă nefrotică perioada de acutizare s-au semnalat corelații statistic veridice directe între concentrațiile MCP-1 și FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = 0,810$ ,  $p < 0,001$ ), iar în GNC formă mixtă perioada de acutizare au fost stabilite corelații foarte puternice inverse între MIP-1 $\alpha$  și MCP-1 ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ); VEGF ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ); FGF- $\beta$  ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ); CTGF ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ); isoprostan-8 ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ); IL-1 $\beta$  ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ); și IL-6 ( $r_{xy} = -1,0$ ,  $p < 0,001$ ) care demonstrează valoarea lor ca biomarkeri importanți ai răspunsului imun, precum și a fibrozei renale.

6. Investigațiile funcțional biochimice au relevat nivele majore ale concentrației factorilor de creștere (VEGF, FGF- $\beta$ , CTGF, PDGF-BB) în urină la copiii cu glomerulonefrită în funcție de activitatea procesului renal și sensibilitatea la steroizi. Evaluarea în dinamică a concentrației factorilor de creștere reprezintă markeri care reflectă obiectiv gradul de alterare ale membranelor celulare, intensitatea procesului inflamator, cât și gradul de progresare al glomerulosclerozei, fibrozei renale și tubulointerstițiale.

7. Metodologia și dinamismul cercetării axat pe un complex de metode contemporane ne-a permis determinarea rolului fiziopatologic al markerilor stresului oxidativ (AGE, PPOA, isoprostanului-8, metaboliții NO, S-nitrosothiolilor, G-6-PDH) în ser și în urină. Studiul markerilor sistemului antioxidant a evidențiat reducerea GPO, G-S-T și creșterea GR, la copiii cu glomerulonefrită în funcție de gradul de activitate, varianta clinică și reprezintă biomarkeri noninvazivi pentru evaluarea gradului de stres oxidativ, prognozarea complicațiilor la distanță și monitorizarea eficienței strategiilor terapeutice menite să reducă intensitatea stresului oxidativ celular și să contribuie la prevenirea leziunii renale asociate.

8. La copiii cu glomerulonefrită are loc creșterea activității tuturor enzimelor lizosomale (arilsulfataza A și B, C,  $\beta$ -galactozidaza,  $\beta$ -glucozidaza,  $\beta$ -glucuronidaza, NAG- $\beta$ , fosfataza acidă), alfa-glucozidaza neutră, lizozima, enzimelor plasmatice, proteolitice (chimotripsinei, LAP,  $\beta_2$ -microglobulina), oligoelementelor în ser și urină în perioada acutizării și reducerea în perioada de remisiune, fapt ce permite utilizarea lor în calitate de markeri neinvazivi de apreciere a gradului lezării elementelor structurale funcționale ale nefronului, concretizarea localizării procesului patologic cât și aprecierea prognosticului maladiei.

9. Studiul activității AMP-azei și ADA-zei în serul sangvin a relevat creșterea enzimelor date în funcție de varianta clinică, activitatea procesului renal, fapt, cea ce confirmă rolul enzimelor metabolismului nucleotidelor adenilice în mecanismele patogenice ale glomerulonefritei la copii.

10. Rezultatele studiului histopatologic ne-au permis să constatăm că în 50,0% cazuri erau prezente modificări cu „leziuni minime”, în 41,7 % cazuri – glomerulopatii proliferative capilare

și mezangial proliferative având aspecte difuze și focal-segmentare cu tendință spre cronicizare. Cu o frecvență nesemnificativă de 8,3% s-a atestat glomerulopatia proliferativă. Analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul *IL-6* în urină și numărul de glomeruli afectați (*NGA*) a relevat corelații foarte puternice între *IL-6* și *NGA* ( $r=0,85$ ) în nefropatia glomerulară cu leziuni minime. În glomeruloscleroza focal segmentară analiza corelațională a gradului de dependență între nivelul *NAG-β*, *MCP-1*, *IL-6* în urină și *NGA* a stabilit corelații medii între nivelul *NAG-β* în urină și *NGA* ( $r=0,47$ ), corelații puternice între nivelul *MCP-1* în urină și *NGA* ( $r=0,61$ ) și între *IL-6* în urină și *NGA* ( $r=0,60$ ).

11. Prin utilizarea de tehnici paraclinice de mare subtilitate, de comun cu manifestările clinice, am obiectivizat unele particularități a evoluției glomerulonefritei și în baza lor am elaborat un algoritm de diagnostic și tratament, cât și o schemă patogenică de lucru în scopul restabilirii funcției și structurilor renale.

12. Problemele aplicative soluționate în cadrul studiului prezent constau în elaborarea unei metodologii de format propriu pentru aprecierea variantelor clinice ale glomerulonefritei, a modificărilor homeostaziei pentru care au fost definite abordări optime de diagnostic, diagnostic diferențial, de corecție medicală diferențiată, direcționate spre reducerea complicațiilor, recidivelor, restabilirea maximală a funcției renale și calității vieții viitorului adult.

## **RECOMANDĂRI PRACTICE:**

### **I. La nivel național:**

1. Elaborarea Registrului Național de Stat în glomerulonefrita primară la copii.
2. Susținerea proiectelor științifice în domeniul problemelor renale ale copilului, legate de glomerulonefrită, sindromul nefrotic, injuria cronică renală.

### **II. Pentru asistența medicală primară (medici de familie, pediatri în medicina primară):**

1. La nivelul medicinei primare, utilizarea algoritmilor de evaluare a copiilor cu glomerulonefrită prin monitorizarea markerilor clinici (tensiunii arteriale, sumarul urinei), utilizarea markerilor funcționali (ureea, creatinina serică, clearance-ul creatininei endogene, albuminuria, proteinuria), pentru stabilirea diagnosticului de glomerulonefrită.
2. Pentru obiectivizarea diagnosticului și argumentarea eficacității tratamentului medical la diferite etape clinico-evolutive ale glomerulonefritei este necesară evaluarea în dinamică a markerilor biochimici în ser și în urină (*NAG-β*, *GTP-γ*, *PCE*) în coroborare cu examinările paraclinice.

### III. Pentru nefrologi -pediatri:

1. Pentru stabilirea diagnosticului histomorfologic și elaborarea tacticii de tratament pacienții cu sindrom nefrotic steroid rezistent, steroid dependent, frecvent recidivant necesită efectuarea biopsiei renale.

2. Copiii care au suportat glomerulonefrită trebuie să fie evaluați în cadrul unui program follow-up prin utilizarea markerilor clinici, funcționali renali în vederea determinării periodice a injuriei renale.

3. În cazul unor modificări anormale, copiii sunt incluși în grupuri pentru supraveghere pe termen lung, pentru evaluarea diagnosticului, evoluției (monitorizare clinică, paraclinică) (Algoritm de diagnostic al copiilor cu glomerulonefrită).

4. Pentru evaluarea injuriei renale se recomandă determinarea markerilor în ser și în urină:

- *Biomarkeri ai răspunsului imun:* (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ );
- *Biomarkeri în diagnosticul și progresia GN la copii: inflamație și fibroză*-VEGF, FGF- $\beta$ , CTGF, PDGF-BB;
- *Biomarkeri ai fibrozei tubulointerstițiale* precoce – (GST);
- *Biomarkeri în diagnosticul și progresia GN precum și ai injuriei celulare:* RFG, proteinuria, NAG- $\beta$ ;
- *Biomarkeri ai disfuncției endoteliale* – endotelina-1;
- *Biomarkeri ai stresului oxidativ* – PPOA, AGE, isoprostan-8;
- *Biomarkeri de diferențiere diagnostică* a SNSS și SNSR – NAG- $\beta$ ,  $\gamma$  –GTP;
- *Biomarkeri de prognostic* – MCP-1, PPOA, isoprostan-8, AGE;
- *Markeri histologici ai SNSM, GSFS, GNMzP.*

5. Copiii care au suportat un episod de glomerulonefrită primară necesită supraveghere pe un termen îndelungat, iar tratamentul de reabilitare pentru corecția modificărilor metabolice va dura un interval de timp considerabil.



## BIBLIOGRAFIE

1. Bernic J. Infecțiile de tract urinar în uropatiile malformative la copil. Aspecte clinico-paraclinice și medico-chirurgicale. Autoreferatul tezei doc. hab. șt. med., Chișinău, 2008, 45 p.
2. Ceban E. Tratatamentul multimodal al nefrolitiaziei complicate. Autoreferatul tezei doc. hab. șt. med., Chișinău, 2014, 45 p.
3. Ciocâlțeu A. În: Tratat de nefrologie., București, 2006, 702 p.
4. Ciuntu A. Sindromul nefrotic la copii. Aspecte clinico-paraclinice și tratament. Chișinău: Tipografia „Paradis Media”, 2016, 165 p.
5. Ciuntu A. Rolul enzimelor plasmatice în urină în fiziopatogenia glomerulonefritei acute și cronice la copil. În: Curierul medical. Chișinău, 2012, vol. 327, nr. 3 p. 87-93.
6. Ciuntu A. Activitatea enzimelor proteolitice în urină la copiii cu glomerulonefrită. Al VI-lea Congres de Urologie, Dializă și Transplant Renal din Republica Moldova cu participare internațională. În: Arta Medica. Volum de rezumate. Chișinău, 2015, vol. 57, nr. 4, p. 112-114.
7. Ciuntu A. Importanța diagnostică a determinării nivelului zincului și cuprului seric la copii cu glomerulonefrită. În: Buletin de Perinatologie. Chișinău, 2016, vol. 72, nr. 4, p. 45-48.
8. Ciuntu A. Proteina monocitară inflamatorie 1 $\alpha$  în glomerulonefrită la copii. În: Buletin de Perinatologie. Chișinău, 2016, vol. 69, nr.1, p. 99-102.
9. Ciuntu A. Proteina-1 chemoattractantă monocitară -1 la copiii cu glomerulonefrită. În: Buletin de Perinatologie. Chișinău, 2016, vol. 69, nr. 1, p. 93-96.
10. Ciuntu A. Producția finală de glicare avansată în evoluția clinică a glomerulonefritei la copii. În: Buletin de Perinatologie. Chișinău, 2016, vol. 72, nr. 4, p. 49-52.
11. Gudumac V., Rîvneac V., Tagadiuc O., et al. Metode de cercetare a metabolismului hepatic. Elaborare metodică. Sub red. Valentin Gudumac. Chișinău: Tipografia „Tehnica-Info”, 2012. 162 p.
12. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V. et al. Investigații biochimice: Elaborare metodică. vol. II. Micrometode. Chișinău: Tipografia „Elena V. I.”, 2010. 97 p.
13. Fuior I., Petrovici V., Curajos B., et al. Biopsia prin puncție și rolul ei în diagnosticul morfofopatologic în cadrul afecțiunii renale. În: Buletin de Perinatologie. Chișinău, 2007, nr. 3, p. 68-73.
14. Abdel-Hafez M., Shimada M., Y-Lee PY., et. al. Idiopathic nephrotic syndrome and atopy: is there a common link ? In: Am J Kidney Dis., 2009, vol. 54, p. 945-953.
15. Abeyagunawardena A.S., Sebire N.J., Risdon R.A., et al. Predictors of long-term outcome of children with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. In: Pediatr Nephrol., 2007, vol. 22, p. 215-221.
16. Abrantes M.M., Cardoso L.S., Lima E.M., et al. Predictive factors of chronic kidney disease in primary focal segmental glomerulosclerosis. In: Pediatr Nephrol., 2006, vol. 21, p.1003-1012.
17. ACHI. Clasificarea statistică a bolilor și a problemelor de sănătate înrudite, revizia a zecea, modificările australiene (ICD-10-AM). In: Clasificarea Australiană a Intervențiilor de Sănătate (ACHI), 1 iulie 2010.
18. Adanze O., Asinobi Adebawale D., Ademola Clement A., et al. Trends in the histopathology of childhood nephrotic syndrome in Ibadan Nigeria: preponderance of

- idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. In: BMC Nephrology., 2015, vol. 16, p. 213
19. Afroz S., MA., Khan Hossain., Roy K.D., et al. Urinary Tract Infection (UTI) is associated with higher rate of relapse in children with nephrotic syndrome. In: DS (Child) H J., 2010, vol. 26, p. 82-86.
20. Agalou S., Ahmed N., Babaei-Jadidi R., et.al. Profound mishandling of protein glycation degradation products in uremia and dialysis. In: J Am Soc Nephrol., 2005, vol. 16, p. 1471-85.
21. Aizawa T., Imaizumi T., Tsuruga K., et al. Urinary fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 as possible predictors of disease activity of childhood glomerulonephritis. In: The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2013, vol. 231, nr. 4, p. 265-270.
22. Akchurin O., Reidy K. J. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: impact on podocyte pathobiology. In: Pediatr Nephrol., 2015, vol. 30 nr. 2, p. 221-33.
23. Alderson N.L., Chachich M.E., Frizzell N., et. al. Effect of antioxidants and ACE inhibition on chemical modification of proteins and progression of nephropathy in the streptozocin diabetic rat. In: Diabetologia, 2004, vol. 47, p. 1385-1395.
24. Ali el-T.M., Abdelraheem M.B., Mohamed R.M., et. al. Chronic renal failure in Sudanese children: aetiology and outcomes. In: Pediatr Nephrol., 2009, vol. 24, p. 349-353.
25. Ali S.H., Ali A.M., Najim A.H. The predictive factors for relapses in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. In: Saudi J Kidney Dis Transpl., 2016, vol. 27, p. 67-72.
26. Amy Fearn., Neil Stephen Sheerin. Complement activation in progressive renal disease. In: World J Nephrol., 2015, vol. 4, nr. 1, p. 31-40.
27. Ana Cristina Simões e Silva., André Barreto Pereira., Mauro Martins Teixeira. Chemokines as Potential Markers in Pediatric Renal Diseases. In: Disease Markers, 2014, Article ID 278715, p. 9.
28. Andersen R.F., Thrane N., Noergaard K., et al. Early age at debut is a predictor of steroid-dependent and frequent relapsing nephrotic syndrome. In: Pediatr Nephrol., 2010, vol. 25, p. 1299-304.
29. Anderson M.M., Heinecke J.M. Production of N epsilon-(carboxymethyl) lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase. A role of phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation ends products during inflammation. In: Diabetes, 2003, vol. 52, p. 2137-2143.
30. Andolino TP, Reid-Adam. Nephrotic syndrome. In: J Pediatr Rev., 2015, vol. 36, nr. 3, p. 117-25.
31. Anguiano L., Riera M., Pascual J., et al. Endothelin Blockade in Diabetic Kidney Disease. In: J Clin Med., 2015, vol. 4, nr. 6, p. 1171-1192.
32. Anita Mc Grogan., Casper F.M. Franssen., Corinne S. de Vries. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. In: Nephrol Dial Transplant., 2010, vol. 1 p. 17.
33. Annual report. Rockville, MD: In: The EMMES Corporation, 2008.
34. Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie. Effect of cytotoxic drugs in frequently relapsing nephrotic syndrome with and without steroid dependence. In: N Engl J Med., 1982, vol. 306, p. 451-454.
35. Ardissino G., Dacc V., Testa S., et al. Epidemiology of chronic renal failure in children: data

- from the ItalKid project. In: ItalKid Project Pediatrics., 2003, vol. 111, p. 382-387.
36. Arthur C. K., Chung Lui Y. Lan. Hemokines in Renal Injury. In: JASN., 2011, vol. 22, p. 5802-5809.
  37. Arun S., Bhatnagar S., Menon S., et al. Efficacy of zinc supplements in reducing relapses in steroid-sensitive nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2009, vol. 24, nr. 8, p. 1583-1586.
  38. Bacharier LB., Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. In: *J Allergy Clin Immunol.*, 2000, vol. 1052, p. S547-S558.
  39. Bagga A., Mantan M. Nephrotic syndrome in children. In: *Indian J Med Res.*, 2005, vol. 122, p.13-28.
  40. Barbado J., Martin D., Vega L., et al. MCP-1 in urine as biomarker of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. In: *Cytokine.*, 2012, vol. 60, p. 583-586.
  41. Barton M., Kohan DE. Endothelin in Renal Physiology and disease. *Contrib. Nephrol.* Basel. Karger., 2011, vol. 172, p. 35-49.
  42. Barton M., Sorokin A. Endothelin and the glomerulus in chronic kidney disease. In: *Semin Nephrol.*, 2015, nr. 2, p. 156-67.
  43. Barton Matthias, Pierre-Louis Tharaux. Endothelin and the podocyte. In: *Clin Kidney J.*, 2012, vol. 5, nr. 1, p. 17-27.
  44. Bazzi C., Rizza V., Olivieri G. et al. Tubular reabsorption of high, middle and low molecular weight proteins according to the tubulo-interstitial damage marker N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in glomerulonephritis. In: *J Nephrol.*, 2015, vol. 28, nr. 5, p. 541-548.
  45. Beata Banaszak., Paweł Banaszak. The increasing incidence of initial steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2012, vol. 27, nr. 6, p. 927-932.
  46. Beata Bieniaś., Małgorzata Zajączkowska., Halina Borzęcka., et al. Early Markers of Tubulointerstitial Fibrosis in Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome. In: *Medicine (Baltimore)*. 2015, vol. 94, nr. 42, p. 1746.
  47. Belderbos M.E., Gallington L.C., et al. The adenosine system modulates Toll-like receptor function: basic mechanisms, clinical correlates and translational opportunities. In: *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2011, vol. 9, nr. 2, p. 261-269.
  48. Beleznaï T., Feher A., Spielvogel D., et al. Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2011, vol. 300, nr. 3, p. H777-H783.
  49. Bernard AM., Amor AA., Goemaere-Vanneste J., et al. Microtransferrinuria is a more sensitive indicator of early glomerular damage in diabetes than microalbuminuria. In: *Clin Chem.*, 1988, vol. 34, nr. 9, p. 1920-1921.
  50. Bertelli R., Trivelli A., Magnasco A., et al. Failure of regulation results in an amplified oxidation burst by neutrophils in children with primary nephrotic syndrome. In: *Clin Exp Immunol.*, 2010, vol. 161, p. 151-158.
  51. Bertelli R., Bonanni A., Di Donato A. et al. Regulatory T cells and minimal change nephropathy: in the midst of a complex network. In: *Clin Exp Immunol.*, 2016, vol. 183, nr. 2, p. 166-174.
  52. Bierzynska A., Soderquest K., Koziell A. Genes and podocytes – new insights into mechanisms of podocytopathy. In: *Front Endocrinol.*, 2014, vol. 5, p. 226.
  53. Bobkova I. N., Chebotareva N.V., Kozlovskaja L.V., et al. Urine excretion of a monocytic

- chemotactic protein-1 and transforming growth factor beta1 as an indicator of chronic glomerulonephritis progression. In: Ter Arkh., 2006, vol. 78, p. 9-14.
54. Bockenhauer D. Over- or underfill: not all nephrotic states are created equal. In: *Pediatr Nephrol.*, 2013, vol. 28, p. 1153-1156.
  55. Bohlender J.M., Franke S., Stein G., et al. Advanced glycation end products and the kidney. In: *Am J Renal Physiol.*, 2005, p. 289, F645-F659.
  56. Bonilla-Felix M., Parra C., Dajani T., et.al. Changing patterns in the histopathology of idiopathic nephrotic syndrome in children. In: *Kidney Int.*, 1999, vol. 55, nr. 5, p. 1885-90.
  57. Boor P., Konieczny A., Villa L., et al. PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis. In: *Nephrol Dial Transplant.*, 2007, vol. 22, p. 1323-1331.
  58. Boyer O., Moulder J.K., Somers M.J. Focal and segmental glomerulosclerosis in children: a longitudinal assessment. In: *Pediatr Nephrol.*, 2007, vol. 22, nr. 8, p. 1159-1166.
  59. Brenner BM. Mechanisms of progression of renal disease. In: *Международный семинар по нефрологии. М.*, 1995, p. 127-134.
  60. Bromley S.K., Burack W.R., Johnson K.G., et al. The immunological synapse. In: *Annu Rev Immunol.*, 2001, vol. 19, p. 375-96.
  61. Bruschi M., Candiano G., Santucci L., et al. Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function. In: *Biochim Biophys Acta.*, 2013, vol. 1830, p. 5473-5479.
  62. Busch M., Franke S., Rüster C., Wolf G. Advanced glycation end-products and the kidney. In: *Eur J Clin Invest.*, 2010, vol. 40, nr. 8, p. 742-55.
  63. Buscher A.K., Kranz B., Buscher R., et al. Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. In: *Clin J Am Soc Nephrol.*, 2010, vol. 5, nr. 11, p. 2075-2084.
  64. Cadnapaphornchai M.A, Tkachenko O., Shchekochikhin D., et al. The nephrotic syndrome: pathogenesis and treatment of edema formation and secondary complications. In: *Pediatr Nephrol.*, 2014, vol. 29, nr. 7, p. 1159-1167.
  65. Cameron J. S. The enigma of focal segmental glomerulosclerosis. In: *Kidney Int.*, 1996, vol. 50, p. 119-131.
  66. Campanholle G., Ligresti G., Gharib S.A., et al. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. Novel mechanisms of kidney fibrosis. In: *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2013, vol. 304, nr.7, p. 591-603.
  67. Cao W., Xu J., Zhou M Z., et al. Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. In: *Antioxid Redox Signal.*, 2013, vol. 18, p. 19-35.
  68. Cao W., Hou F. F., Nie J. AOPPs and the progression of kidney disease. In: *Kidney Int. Suppl.*, 2014, vol. 4, nr. 1, p. 102-106.
  69. Cara-Fuentes G., Segarra A., Garin E.H. CD80 and angiopoietin-like 4 in glomerulopathies. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2015, vol. 26, p. 451A.
  70. Cara-Fuentes G., Clapp WL., Johnson RJ., et al. Pathogenesis of proteinuria in idiopathic minimal change disease: molecular mechanisms. In: *Pediatr Nephrol.*, 2016, vol. 31, nr. 12, p. 2179-2189.
  71. Cara-Fuentes G., Wei C., Segarra A., et al. CD80 and suPAR in patients with minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis: diagnostic and pathogenic

- significance. In: *Pediatr Nephrol.*, 2014, vol. 29, p. 1363-1371.
72. Chang J.W., Tsai H.L., Wang H.H., et al. Clinicopathological features and prognosis of Chinese children with idiopathic nephrotic syndrome between different age groups. In: *Eur J Pediatr.*, 2009, vol. 168, p. 1189-1194.
  73. Charles L. Edelstein. In: *Biomarkers of Kidney Disease*, Chapter 10 – Biomarkers in Glomerular Disease, 2011, p. 367-383.
  74. Charo I.F., Ransohoff R.M. Mechanisms of disease: the many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. In: *New England Journal of Medicine.*, 2006, vol. 354, nr. 6, p. 610-621.
  75. Chatzigeorgiou A., Liberi M., Chatzilymperis G., Neros A., Kamper E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. In: *Biofactors.*, 2009, vol. 35, nr. 6, p. 474-483.
  76. Chen Y.T., et al. Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis. In: *Kidney Int.*, 2011, vol. 80, nr. 11, p. 1170-1181.
  77. Cho M.H., Lee H.S., Choe B.H., et al. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. In: *Am J Nephrol.*, 2003, vol. 23, p. 260-266.
  78. Chou Y. H., Pan S. Y., Yang C. H., Lin S. L. Stem cells and kidney regeneration. In: *Journal of the Formosan Medical Association.*, 2014, vol. 113, nr. 4, p. 201-209.
  79. Chris Baylis. Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. In: *Nat Clin Pract Nephrol.*, 2006, vol. 2, nr. 4, p. 209-220.
  80. Chris Baylis. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. In: *Am J of Physiology.*, 2008, vol. 294, nr. 1, p. 1-9.
  81. Chugh S.S., Clement L.C., Mace C. New insights into human minimal change disease: lessons from animal models. In: *Am J Kidney Dis.*, 2012, vol. 59, p. 284-292.
  82. Churg J., Habib R., White R.H. Pathology of the nephrotic syndrome in children. In: *Lancet.*, 1970, vol. 20, p. 1299-1302.
  83. Ciuntu A. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in the development of glomerulonephritis in children. In: *International Research Journal. Ecaterinburg*, 2017, vol. 55, nr. 1, p. 178-181.
  84. Ciuntu A. Role of metabolites of nitric oxide and arginase in the pathogenesis of glomerulonephritis. In: *Current Health Sciences Journal (CHSJ). Craiova*, 2016, vol. 42, nr. 3, p. 221-225.
  85. Ciuntu A. Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of nephrotic syndrome in children. In: *International Research Journal. Ecaterinburg*, 2016, vol. 10, nr. 52, p. 110-112.
  86. Ciuntu A. Urinary endothelin in children with glomerulonephritis: prospective, descriptive study. In: *Moldovan Journal of Health Sciences. Chişinău*, 2016, vol. 9, p. 49-55.
  87. Clement L.C., Avila-Casado C., Mace C., et al. Podocyte-secreted angiopoietin-like-4 mediates proteinuria in glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. In: *Nat Med.*, 2011, vol. 17, p. 117-122.
  88. Clement L.C., Mace C., Avila-Casado C., et al. Circulating angiopoietin-like 4 links proteinuria with hypertriglyceridemia in nephrotic syndrome. In: *Nat Med.*, 2014, vol. 20, p.

37-46.

89. Cole M.B., Salinas-Madriral L. Acute Proliferative and Crescentic Glomerulonephritis. In: Avner ED, HollidayMA (eds.) *Pediatric Nephrology*, Williams & Wilkins, 1994, p. 697-716.
90. Colleoni S., Bottani E., Tessaro I., et al. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. In: *Veterinary Research Communications.*, 2009, vol. 33, nr. 8, p. 811-821.
91. Couser W.G., Johnson R.J. The etiology of glomerulonephritis: roles of infection and autoimmunity. In: *Kidney Int.*, 2014, vol. 86, p. 905-914.
92. Cracowski J. L., Durand T., Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. In: *Trends Pharmacol Sci.*, 2002, vol. 23, nr. 8, p. 360-366.
93. Culshaw G.J., MacIntyre I.M., Dhaun N., et al. Endothelin in nondiabetic chronic kidney disease: preclinical and clinical studies. In: *Semin Nephrol.*, 2015, vol. 35, nr. 2, p.176-87.
94. Czerska M., Zieliński M., Gromadzińska J. Isoprostanes - A novel major group of oxidative stress markers. In: *Int J Occup Med Environ Health.*, 2016, vol. 29, nr. 2, p. 179-190.
95. D'Agati V., Yan S.F., Ramasamy R., et al. RAGE, glomerulosclerosis and proteinuria: Roles in podocytes and endothelial cells. In: *Trends Endocrinol Metab.*, 2010, vol. 21, p. 55-56.
96. Daehn I., Casalena G., Zhang T., et al. Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. In: *J Clin Invest.*, 2014, vol. 124, nr. 4, p. 1608-1621.
97. D'Agati V. The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. In: *Kidney Int.*, 1994, vol. 46, p. 1223-1241.
98. D'Agati V., Fogo A.B., Bruijin J.A., et al. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: A working proposal. In: *Am J Kidney Dis.*, 2004, vol. 43, p. 368-382.
99. D'Amico G, Bazzi C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. In: *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 2003, vol. 12, nr. 6, p. 639-643.
100. Daniel L., Saingra Y., Giorgi R., et al. Tubular lesions determine prognosis of IgA nephropathy. In: *Am J Kidney Dis.*, 2000, vol. 35, nr. 1, p.13-20.
101. Davin JC. The glomerular 'permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2016, vol. 31, p. 207-215.
102. Delville M., Sigdel T.K., Wei C.L. et al. A circulating antibody panel for pretransplant prediction of FSGS recurrence after kidney transplantation. In: *Sci Transl Med.*, 2014, vol. 1, 6, nr. 256, p. 256ra136.
103. Deola S., Panelli M.C., Maric D., et al. Helper B cells promote cytotoxic Tcell survival and proliferation independently of antigen presentation through CD27/CD70 interactions. In: *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, p. 1362-1372.
104. Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V., Nguyen-Khoa T., et al. Early prediction of IgA nephropathy progression: proteinuria and AOPP are strong prognostic markers. In: *Kidney Int.*, 2004, vol. 66, p. 1606-1612.
105. Deschênes G., Leclerc A. Epidemiology of the idiopathic nephrotic syndrome. In: *Arch Pediatr.* 2010, vol. 17, nr. 6, p. 622-623.
106. Desideri G., Panichi V., Paoletti S., et al. Soluble CD40 ligand is predictive of combined cardiovascular morbidity and mortality in patients on haemodialysis at a relatively short-

- term follow-up. In: *Nephrology, Dialysis and Transplantation.*, 2011, vol. 26, nr. 9, p. 2983-2988.
107. Dnyanesh DK., Dnyanesh S., Shenoy V. A study of serum lipids in nephrotic syndrome in children. In: *IOSR-JDMS.*, 2014, vol. 13, nr. 3, p. 1-6.
  108. Dogra G., Ward N., Croft K.D. et al. Oxidant stress in nephrotic syndrome: comparison of F(2)-isoprostanes and plasma antioxidant potential. In: *Nephrol Dial Transplant.*, 2001, vol. 16, nr. 8, p. 1626-30.
  109. Dohi Y., Lüscher T.F. Endothelin in hypertensive resistance arteries. Intraluminal and extraluminal dysfunction. In: *Hypertension.*, 1991, vol. 18, nr. 4, p. 543-549.
  110. Doi K., Noiri E., Fujita T. Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease. In: *Curr Vasc Pharmacol.*, 2010, vol. 8, nr. 1, p. 122-128.
  111. Dossier C., Sellier-Leclerc A.L., Rousseau A., et al. Prevalence of herpesviruses at onset of idiopathic nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2014, vol. 29, p. 2325-2321.
  112. Durango N. M., Cristóbal A. F., Andrés E. C., et. al. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. In: *Int J Mol Sci.*, 2016, vol.17, nr. 7, p. 797.
  113. Durante W., Johnson F.K., Johnson R.A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 2007, vol. 34, nr. 9, p. 906-911.
  114. Dwivedi J., Sarkar P.D. Study of oxidative stress, homocysteine, copper & zinc in nephrotic syndrome: Therapy with antioxidant, minerals and B-complex vitamins. In: *J Biochem Tech.*, 2009, vol. 4, p. 104-107.
  115. Eddy AA., Symons JM. In: Nephrotic syndrome in childhood. In: *Lancet.*, 2003, vol. 362 (9384), p. 629-639.
  116. Eddy A.A., Fogo A.B. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. In: *JAm Soc Nephrol.*, 2006, vol. 17, p. 2999-3012.
  117. Eddy A.A. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. In: *Kidney Intern Suppl.*, 2014, vol. 4, issue 1, 5, p. 2-8.
  118. Edstrom Halling S., Soderberg M.P., Berg U.B. Predictors of outcome in paediatric IgA nephropathy with regard to clinical and histopathological variables (Oxford classification). In: *Nephrol Dial Transplant.*, 2012, vol. 27, nr. 2, p. 715-722.
  119. El Bakkali L., Rodrigues Pereira R., Kuik D.J., et al. Nephrotic syndrome in The Netherlands: a population-based cohort study and a review of the literature. In: *Pediatr Nephrol.*, 2011, vol. 26, p.1241.
  120. Ellis D. Pathophysiology, Evaluation, and Management of Edema in Childhood Nephrotic Syndrome. In: *Front Pediatr.*, 2016, vol. 11, nr. 3, p.111.
  121. El-Refaey A.M., Bakr A., Hammad A. et al. Primary focal segmental glomerulosclerosis in Egyptian children: A 10-year single-centre experience. In: *Pediatr Nephrol.*, 2010, vol. 25, p.1369-73.
  122. Hernandez T., Mayadas T.N. Immunoregulatory role of TNFalpha in inflammatory kidney diseases. In: *Kidney Int.*, 2009, vol. 76, nr. 3, p. 262-76.
  123. Esfahani S.T., Madani A., Asgharian F., et al. Clinical course and outcome of children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2011, vol. 26, nr.7, p.1089-1093.

124. ESPN/ERA-EDTA Registry (2010) ESPN/ERA-EDTA registry annual report 2008. [http://www.espn-reg.org/ESPN/ERA-EDTA registry](http://www.espn-reg.org/ESPN/ERA-EDTA_registry). European registry for children on renal replacement therapy. [www.espn-reg.org/index.jsp](http://www.espn-reg.org/index.jsp).
125. Fakhouri F., Bocquet N., Taupin P., et al. Steroid-sensitive nephrotic syndrome: from childhood to adulthood. In: *Am J Kidney Dis.*, 2003, vol. 41, nr. 3, p. 550-557.
126. Fan A., Jiang X., Mo Y., et al. Plasma levels of oxidative stress in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome and their predictive value for relapse frequency. In: *Pediatr. Nephrol.*, 2016, vol. 31, nr. 1, p. 83-88.
127. Ferrara N., Gerber H-P., Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. In: *Nat Med.*, 2003, vol. 9, nr. 6, p. 669-676.
128. Fine L.G., Bandyopadhyay D., Norman J.T. Is there a common mechanism for the progression of different types of renal disease other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. In: *Kidney Int.*, 2000, vol. 57, nr. 75, p. 22-26.
129. Fine L.G., Hammerman M.R., Abboud H.E. Evolving role of growth factors in the renal response to acute and chronic disease. In: *J Am Soc Nephrol.*, 1992, vol. 2, p. 1163-1170.
130. Floege Jürgen, Frank Eitner and Charles Alpers E. A New Look at Platelet-Derived Growth Factor in Renal Disease. In: *J Am Soc nephrol.*, 2008, vol. 19, p. 12-23.
131. Fogo A. Progression and potential regression of glomerulosclerosis. In: *Kidney Int.*, 2001, vol. 59, p. 804-819.
132. Fogo A., Icbikawa I. Angiogenic action of angiotensin II is important for the glomerular growth of maturing kidneys. In: *Kidney Int.*, 1991, vol. 39, nr. 32, p. 37-38.
133. Fogo A.B. Approach to Renal Biopsy. In: *Am J of Kidney Dis.*, 2003, vol. 42, p. 826-836.
134. Forstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. In: *Eur. Heart J.*, 2012, vol. 33, nr. 7, p. 829-837.
135. Gadegbeku C.A., Gipson D.S., Holzman L.B., et al. Design of the Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE) to evaluate primary glomerular nephropathy by a multidisciplinary approach. In: *Kidney Int.*, 2013, vol. 83, nr. 4, p. 749-756.
136. Garin E.H., Mu W., Arthur J.M, et.al. Urinary CD80 is elevated in minimal change disease but not in focal segmental glomerulosclerosis. In: *Kidney Int.*, 2010, vol. 78, nr. 3, p. 296-302.
137. Gee H.Y., Ashraf S., Wan X., et al. Mutations in EMP2 cause childhood-onset nephrotic syndrome. In: *Am J Hum Genet.*, 2014, vol. 94, nr. 6, p. 884-890.
138. Genovese G., Friedman D.J., Pollak M.R. APOL1 variants and kidney disease in people of recent African ancestry. In: *Nat Rev Nephrol.*, 2013, vol. 9, nr. 4, p. 240-244.
139. Gipson D.S., Chin H., Presler T.P. et al. Differential risk of remission and ESRD in childhood FSGS. In: *Pediatr Nephrol.*, 2006, vol. 21, nr. 3, p. 344-349.
140. Gipson D.S., Trachtman H., Kaskel F.J. et al. Clinical trial of focal segmental glomerulosclerosis in children and young adults. In: *Kidney Int.*, 2011, vol. 80, p. 868-878.
141. Goh S.Y., Cooper M.E. Clinical review: the role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. In: *J Clin Endocrinol Metab.*, 2008, vol. 93, p. 1143-1152.
142. Gordon C., N. Richardst, A. J. Howie, et al. Urinary IL-6: a marker for mesangial proliferative glomerulonephritis? In: *Clin. exp. Immunol.*, 1991, vol. 86, p.145-149.
143. Grönros J., Jung C., Lundberg J.O. et al. Arginase inhibition restores in vivo coronary



- microvascular function in type 2 diabetic rats. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2011, vol. 300, nr. 4, p. H1174-H1181.
144. Gugliucci A., Menini T. The axis AGE-RAGE-soluble RAGE and oxidative stress in chronic kidney disease. In: *Adv Exp Med Biol.*, 2014, vol. 824, p. 191-208.
  145. Gulati A, Bagga A, Gulati S., et al. Management of steroid resistant nephrotic syndrome. In: *Indian Pediatr.*, 2009, vol. 4, nr. 1, p. 35-47.
  146. Gulati S., Sengupta D., Sharma R.K., et al. Steroid resistant nephrotic syndrome: Role of histopathology. In: *Indian Pediatr.*, 2006, vol. 43, nr.1, p. 55-60.
  147. Guo Z. J., Niu H. X., Hou F. F., et al. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. In: *Antioxid Redox Signal.*, 2008, vol. 10, p. 1699-1712.
  148. Habib R. A story of glomerulopathies: a pathologist's experience. In: *Pediatr Nephrol.*, 1993, vol. 7, p. 336-346.
  149. Habig W.H. et al. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. In: *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, p. 7130-7139.
  150. Haisong Zhang., Shao-Cong Sun. NF- $\kappa$ B in inflammation and renal diseases. In: *Cell Biosci.*, 2015, vol. 5, nr. 63, p. 12.
  151. Han M.H., Kim Y.J. Practical Application of Columbia Classification for Focal Segmental Glomerulosclerosis. In: *Biomed Res Int.*, 2016, p. 1375-1753.
  152. Hanning You., Ting Gao., Timothy K Cooper., et al. Arginase inhibition mediates renal tissue protection in diabetic nephropathy by a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism. In: *Kidney International.*, 2013, vol. 84, nr. 6, p. 1189-1197.
  153. Harita Y., Ishizuka K., Tanego A., et al. Decreased glomerular filtration as the primary factor of elevated circulating suPAR levels in focal segmental glomerulosclerosis. In: *Pediatr Nephrol.*, 2014, vol. 29, p.1553-1560.
  154. Hattori S., Yosioka K., Honda M., et al. Japanese Society for Pediatric Nephrology The 1998 report of the Japanese National Registry data on pediatric end-stage renal disease patients. In: *Pediatr Nephrol.*, 2002, vol.17, p. 456-461.
  155. Hinkes B.G, Mucha B.,Vlangos C.N., et al. Arbeitsgemeinschaft für Paediatrische Nephrologie Study Group. Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). In: *Pediatrics.*, 2007, vol.119, nr.4, p. 907-919.
  156. Hirszel P., Yamase H.T., Carney W.R., et al. Mesangial proliferative glomerulonephritis with IgM deposits. Clinicopathologic analysis and evidence for morphologic transitions. In: *Nephron.*, 1984, vol. 38, nr. 2, p.100-108.
  157. Holmquist P., Torffvit O. Tubular function in diabetic children assessed by Tamm-Horsfall protein and glutathione S-transferase. In: *Pediatr Nephrol.*, 2008, vol. 3, p.1079-1083.
  158. Hong Yan Li., Hou Fan Fan., Zhang Xun., et al. Advanced Oxidation Protein Products Accelerate Renal Fibrosis in a Remnant Kidney Model. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2007, vol.18, p. 528 -538.
  159. Ichikawa I., Ma J., Motojima M., Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. In: *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 2005, vol. 14, p. 205-210.
  160. Il'yasova D., Spasojevic I., Base K., et al. Urinary F2-isoprostanes as a biomarker of reduced

- risk of type 2 diabetes. In: *Diabetes Care.*, 2012, vol. 35, nr. 1, p. 173-174.
161. Inaba A., Hamasaki Y., Ishikura K., et al. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome in children. In: *Pediatr Nephrol.*, 2016, vol. 31, nr. 3, p. 425-434.
  162. International Study of Kidney Disease in Children Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. In: *Kidney Int.*, 1978, vol. 13, p. 159-165.
  163. International Study of Kidney Disease in Children The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. In: *Pediatr.* 1981, vol. 98, p. 561-564.
  164. Ishikura K., Yoshikawa N., Nakazato H., et al. Morbidity in children with frequently relapsing nephrosis: 10-year follow-up of a randomized controlled trial. In: *Pediatr Nephrol.*, 2015, vol. 30, nr. 3, p. 459-468.
  165. Ishimoto T., Cara-Fuentes G., Wang H., et al. Serum from minimal change patients in relapse increases CD80 expression in cultured podocytes. In: *Pediatr Nephrol.*, 2013, vol. 28, nr. 9, p. 1803-1812.
  166. Ito S., Fujita H., Narita T., et al. Urinary copper excretion in type 2 diabetic patients with nephropathy. In: *Nephron.*, 2001, vol. 88, p. 307-312.
  167. Iturbe BR, Mezzano S. Acute post-infectious glomerulonephritis. In: *Pediatric Nephrology.* 6th edn., Springer, 2010, p. 743-750.
  168. Iyamu E.W., Asakura T., Woods G.M. A Colorimetric Microplate Assay Method for High Throughput Analysis of Arginase Activity in Vitro. In: *Anal. Biochem.*, 2008, vol. 383, nr. 2, p. 332-334.
  169. Jabara H.H., Ahern D.J., Vercelli D., et al. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. In: *J Immunol.*, 1991, vol. 147, p. 1557-1560.
  170. Javadilarijani F., Ahmadpanah A., Javadilarijani Fa., et al. Histopathologic Characteristics of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Children. In: *Iran J Ped. Nephrology.*, 2015, vol. 3, nr. 3, p. 100-103.
  171. Jhaveri K.D., Naber T.H., Wang X., et al. Treatment of recurrent focal segmental glomerular sclerosis post-transplant with a multimodal approach including high-galactose diet and oral galactose supplementation. In: *Transplantation.*, 2011, vol. 91, p. 35-36.
  172. Kaminsky Y., Kosenko E. AMP deaminase and adenosine deaminase activities in liver and brain regions in acute ammonia intoxication and subacute toxic hepatitis. In: *Brain Res.*, 2010, vol. 22, nr. 1311, p. 175-181.
  173. Kaneko K., Tsuji S., Kimata T. et al. Pathogenesis of childhood idiopathic nephrotic syndrome: a paradigm shift from T-cells to podocytes. In: *World J Pediatr.*, 2015, vol.11, p. 21.
  174. Kanemoto Katsuyoshi., Matsumura Ryutaro, Kanemoto., et al. Excretion of Interleukin-6 in Pediatric IgA Nephropathy Patients. In: *J Nephrol Therapeutic.*, 2014, p. S11-004.
  175. Kang D.H., Hughes J., Mazzali M., et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2001, vol. 12, nr. 7, p. 1448-1457.
  176. Kari JA., Bamagai A., Jala SM. Severe acute post streptococcal glomerulonephritis in an infant. In: *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, 2013, vol. 24, p. 546-548.
  177. Karthikeyan K., Sinha I., Prabhu K., et al. Plasma protein thiols and total antioxidant power

- in paediatric nephrotic syndrome. In: *Nephron Clin Pract.*, 2008, vol. 110, p.10-14.
178. Kemper M.J., Wolf G., Müller-Wiefel D.E. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. In: *N Engl J Med.*, 2001, vol. 344, nr. 5, p. 386-387.
  179. Kestila M., Lenkkeri U., Männikkö M., et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. In: *Mol Cell.* 1998, vol. 1, p. 575-582.
  180. Kidney Disease: Glomerulonephritis Work Group. Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO clinical practice guideline for Glomerulonephritis. In: *Kidney Int Suppl.*, 2012, vol. 2, p. 139-274.
  181. Kim JH., Bugaj LJ., Oh YJ., Bivalacqua TJ., et al. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. In: *J Appl Physiol.*, 2009, vol. 107, p. 1249-1257.
  182. Kim M. J., Tam F.W. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in renal disease. In: *Clin. Chim. Acta.*, 2011, vol. 412, p. 2022-2030.
  183. Kohan D.E. Introduction: basic biology of the renal endothelin system. In: *Semin Nephrol.*, 2015, vol. 35, p. 121-124.
  184. Ko-Lin Kuo., Der-Cherng Tarng. Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. In: *Adaptive Medicine.*, 2010, nr. 2, p. 87-94.
  185. Kopp J.B., Winkler C.A., Zhao X., et al. Clinical features and histology of apolipoprotein L1-associated nephropathy in the FSGS clinical trial. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2015, vol. 26, nr. 6, p. 1443-1448.
  186. Krishnaswamy D, Indumati V, Sathishkumar D, Vijay V, Shekanawar M. Serum proteins, initial and follow up lipid profile in children with nephritic syndrome. In: *J Applied Bio Pharma Tech.*, 2011, vol. 2, p. 59-64.
  187. Lacroix C., Caubet C., Gonzalez-de-Peredo A., et al. Label-free quantitative urinary proteomics identifies the arginase pathway as a new player in congenital obstructive nephropathy. In: *Mol Cell Proteomics.*, 2014, vol. 13, nr. 12, p. 3421-34.
  188. Letavernier B., Letavernier E., Leroy S., et al. Prediction of high-degree steroid dependency in pediatric idiopathic nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2008, vol. 23, nr. 16, p. 2221-2226.
  189. Lewis JB., Nielson EG. Glomerular diseases. In: *Principles of Internal Medicine.* 18th ed. New York, NY: McGraw Hill, 2012, p. 283.
  190. Lewis M.A., Shaw J., Sinha M.D., et.al. UK Renal Registry 12th Annual Report (December 2009): chapter 14: demography of the UK paediatric renal replacement therapy population in 2008. In: *Nephron Clin Pract.*, 2010, vol. 115, p. 279-288.
  191. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nature Reviews Immunology.*, 2007, vol. 7, nr. 9, p. 678-689.
  192. Li Y., Trush M.A. Oxidation of hydroquinone by copper chemical mechanism and biological effects. In: *Arch Biochem Biophys.*, 1993, vol. 300, p. 346-355.
  193. Lin J.N., Lin C.L., Yang C.H., et al. Risk of Nephrotic Syndrome following Enteroviral Infection in Children: A Nationwide Retrospective Cohort Study. In: *PLoS One.*, 2016, vol. 10, nr.11, p. e0161004.
  194. Linden E., Cai W., He J.C., et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of

- endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. In: Clin J Am Soc Nephrol., 2008, vol. 3, p. 691-698.
195. Liu S., Chen J. New insight in pathogenesis of podocyte dysfunction in minimal change disease. In: J of Zhejiang University, 2016, vol. 45, nr. 2, p. 214-218.
  196. Lotan D., Sheinberg N., Kopolovic J., et al. Expression of SDF-1/CXCR4 in injured human kidneys. In: Pediatr Nephrol., 2008, vol. 23, nr. 1, p.71-77.
  197. Lovric, S., Ashraf, S., Tan, W. et al. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? In: Nephrol. Dial. Transplant., 2016, vol. 31, nr. 11, p. 1802-1813.
  198. Lu Ma., Yinghe Gao., Guanglei Chen., et al. Relationships of Urinary VEGF/CR and IL-6/CR with Glomerular Pathological Injury in Asymptomatic Hematuria Patients. In: Med Sci Monit., 2015, vol. 21, p. 356-362.
  199. Ma J., Weisberg S.A., Griffin J.P., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against aldosterone-induced glomerular injury. In: Kidney Int., 2006, vol. 69, p. 1064-1072.
  200. Maas R.J., Deegens J.K.,Wetzels J.F. Serum suPAR in patients with FSGS: trash or treasure? In: Pediatr Nephrol., 2013, vol. 28, p. 1041-1048.
  201. MacKinnon M., Shurraw S., Akbari A., et al. Combination therapy with an angiotensin receptor blocker and an ACE inhibitor in proteinuric renal disease: a systematic review of the efficacy and safety data. In: Am J Kidney Dis., 2006, vol. 48, p. 8-12.
  202. MacMahon G.M., Waikar S.S. Biomarkers in Nephrology. In: Am J Kidney Dis., 2013, vol. 62, p.165-178.
  203. Maguire J., Davenport A.P. Endothelin receptors and their antagonists. In: Semin Nephrol., 2015, vol. 35, nr. 2, p.125-136.
  204. Mahmud S., Jahan S., Hossain MM. Hyperlipidemia in childhood idiopathic nephritic syndrome during initial remission and relapse. In: Mymensingh Med J., 2011, vol. 20, p. 402-406.
  205. Makita Z., Bucala R., Rayfield E.J., et al. Reactive glycosylation end products in diabetic uraemia and treatment of renal failure. In: Lancet.,1994, vol. 343, p. 1519-1522.
  206. Malvinder S. P. Acute Glomerulonephritis: Practice Essentials, Pathophysiology, Etiology. In: emedicine. medscape. com/article/239278-overview 4 aug. 2016.
  207. Mallipattu SK., Uribarri J. Advanced glycation end product accumulation: a new enemy to target in chronic kidney disease? In: Curr Opin Nephrol Hypertens. 2014, vol. 23, nr. 6, p. 547-554.
  208. Marinaki S., Skalioti C., Siasos G., et al. The Importance of Novel Inflammatory Biomarkers in Renal Disease. In: Curr Med Chem., 2015, vol. 22, nr. 23, p. 2786-800.
  209. Marsche G., Frank S., Hrzenjak A., et al. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. In: Circ Res., 2009, vol.104, nr. 6, p. 750-757.
  210. Martens C.R., Kuczmarski J.M., Lennon-Edwards S., et al. Impaired L-arginine uptake but not arginase contributes to endothelial dysfunction in rats with chronic kidney disease. In: J Cardiovasc Pharmacol., 2014, vol. 63, nr. 1, p. 40-48.
  211. Matsumoto K., Kanmatsuse K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in the urine of patients with minimal-change nephrotic syndrome. In: Clin. Nephrol., 2001, vol. 55, p. 269-274.

212. Matthew Eison., Bettina H. Ault., Deborah P. Jones et al. Post-streptococcal acute glomerulonephritis in children: clinical features and pathogenesis. In: *Pediatr Nephrol.*, 2011, vol. 26, p.165-180.
213. Maurer M., von Stebut E. Molecules in focus. Macrophage inflammatory protein-1. In: *Int. J. Biochem. Cell Biology.*, 2004, vol. 36, p. 1882-1886.
214. McCarthy H.J., Bierzynska A., Wherlock M., et al. Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome. In: *Clin J Am Soc Nephrol.*, 2013, vol. 8, nr. 4, p. 637-48.
215. McKinney P. A., Feltbower R. G., Brocklebank J. T., et al. Time trends and ethnic patterns of childhood nephrotic syndrome in Yorkshire, UK. In: *Pediatr Nephrol.*, 2001, vol. 16, nr. 12, p. 1040-1044.
216. MacHardy N., Miles P. V., Massengill S. F., et al. Management patterns of childhood-onset nephrotic syndrome. In: *Pediatric Nephrology*, 2009, vol. 24, nr. 11, p. 2193-2201.
217. McTaggart S., McDonald S., Henning P., Dent H. Paediatric report. ANZDATA Registry report 2009, Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry. South Australia: Adelaide, 2009.
218. Meerwaldt R., Zeebregts C.J., Navis G., et al. Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. In: *J Kidney Dis.*, 2009, vol. 53, nr. 1, p. 138-50.
219. Mekahli D., Liutkus A., Ranchin B., et al. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study. In: *Pediatr Nephrol.*, 2009, vol. 24, p. 1525-1532.
220. Meran S., Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. In: *Int J Exp Pathol.*, 2011, vol. 92, nr. 3, p. 158-167.
221. Merouani A., Levy E., Mongeau JG., et al. Hyperlipidemic profiles during remission in childhood idiopathic nephrotic syndrome. In: *Clinic Biochem.*, 2003, vol. 36, p. 571-574.
222. Metelskaya V.A., Gumanova N.G. Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites. In: *Клини.лабор. д-ка*, 2005, nr. 6, с. 15-18.
223. Mezzano S.A., Ruiz-Ortega M., Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. In: *Hypertension.*, 2001, vol. 38, nr. 3, p. 635-638.
224. Milne G.L., Yin H., Hardy K.D. et al. Isoprostane generation and function. In: *Chem. Rev.*, 2011, vol. 111, nr. 10, p. 5973-5996.
225. Ming X. F., Rajapakse A. G., Yepuri G., et al. Arginase II promotes macrophage inflammatory responses through mitochondrial reactive oxygen species, contributing to insulin resistance and atherogenesis. In: *J. Am. Heart Assoc.*, 2012, vol. 1, nr. 4, p. e000992.
226. Mironidou-Tzouveleki M., Tsartsalis S., Tomos C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of diabetic nephropathy of type 1 diabetes mellitus. In: *Curr Drug Targets.*, 2011, vol. 12, nr. 1, p. 107-114.
227. Mishra O.P., Gupta A.K., Prasad R., et al. Antioxidant status of children with idiopathic nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2011, vol. 26, nr. 2, p. 251-256.
228. Mishra OP., Jain P., Srivastava P., et al. Urinary N-acetyl-beta-D glucosaminidase (NAG) level in idiopathic nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2012, vol. 27, nr. 4, p. 589-596.
229. Mong Hiep T.T., Ismaili K., Collart F., et al. Clinical characteristics and outcomes of children with stage 3–5 chronic kidney disease. In: *Pediatr Nephrol.*, 2010, vol. 25, p. 935-940.

230. Montuschi P., Barnes P., Roberts L.J. 8-isoprostane (8-isoPGF<sub>2</sub>α) is a reliable marker and considered a gold standard for lipid peroxidation. Insights into oxidative stress: the isoprostanes. In: *Curr Med Chem.*, 2007, vol. 14, nr. 6, p. 703-717.
231. Moorani K.N. Infections are common a cause of relapse in children with Nephrotic syndrome. In: *Pak Paed J.*, 2011, vol. 35, p. 213-219.
232. Morris S. M., Jr Gao T., Cooper T. K., et al. Arginase-2 mediates diabetic renal injury. In: *Diabetes* 2011, vol. 60, nr. 11, p. 3015-3022.
233. Morrison A.B., Howard R.M. The functional capacity of hypertrophied nephrons: effect of partial nephrectomy on the clearance of inulin and PAH in the rat. In: *J Exp Med.*, 1966, vol. 123, p. 829-844.
234. Morrow J.D., Hill K.E., Burk R.F. et al. 2nd A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1990, vol. 87, nr. 23, p. 9383-9387.
235. Mubarak M., Kazi J. Study of nephrotic syndrome in children: Importance of light, immunofluorescence and electron microscopic observations to a correct classification of glomerulopathies. In: *Nefrologia.*, 2013, vol. 33, p. 237-242.
236. Mubarak M., Lanewala A., Kazi J.I., et al. Histopathological spectrum of childhood nephrotic syndrome in Pakistan. In: *Clin Exp Nephrol.*, 2009, vol. 13, p. 589-593.
237. Mumtaz A., Anees M., Fatima S., et al. Serum Zinc and Copper levels in nephrotic syndrome patients. In: *Pak J Med Sci.*, 2011, vol. 27, nr. 5, p. 1173-1176.
238. Musante L., Candiano G., Petretto A., et al. Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2007, vol. 18, nr. 3, p. 799-810.
239. Naicker S., Fabian J., Naidoo S., et al. Infection and glomerulonephritis. In: *Semin Immunopathol.*, 2007, vol. 29, p. 397-414.
240. Nakanishi K., Iijima K., Ishikura K., et al. Japanese Study Group of Renal Disease in Children. Two-year outcome of the ISKDC regimen and frequent-relapsing risk in children with idiopathic nephrotic syndrome. In: *Clin J Am Soc Nephrol.*, 2013, vol. 8, p. 756-762.
241. Nangaku M., Fujita T. Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. In: *Hypertens Res.*, 2008, vol. 31, nr. 2, p. 175-84.
242. Niaudet P., Boyer O. Idiopathic Nephrotic Syndrome in Children: Clinical Aspects. In: *Pediatric Nephrology*, 6th ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009, p. 667-692.
243. Nickavar A., Rahbar M. A. Clinicopathologic Study of Children with Idiopathic Focal Segmental Glomerulosclerosis. In: *Fetal Pediatr Pathol.*, 2016, vol. 35, nr. 3, p. 159-66.
244. Noble B, Ren K, Taverne J, et al. Mononuclear cells in glomeruli and cytokines in urine reflect the severity of experimental proliferative immune complex glomerulonephritis. In: *Clin Exp Immunol.*, 1990, vol. 80, p. 281-287.
245. Noordzij M.J., Lefrandt J.D., Smit A.J. Advanced glycation end products in renal failure: an overview. In: *J Ren Care.*, 2008, vol. 34, nr. 4, p. 207-12.
246. North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS). NAPRTCS Annual Reports. <https://web.emmes.com/study/ped/annlrept/annlrept.html>. Accessed December 23, 2015.
247. Nosratola D. Vaziri. Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: mechanisms and consequences. In: *Kidney Int.*, 2015, vol. 90, nr. 6, Issue 1, p. 41-52.

248. Novelli R., Gagliardini E., Ruggiero B., et al. Any value of podocyte B7-1 as a biomarker in human MCD and FSGS? In: *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2016, vol. 310, nr. 5, p. F335-41.
249. Oberg B.P., McMenamin E., Lucas F.L., et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. In: *Kidney Int.*, 2004, vol. 65, nr. 3, p. 1009-1016.
250. Obiagwu P.N., Aliyu A., Atanda A.T. Nephrotic syndrome among children in Kano: A clinicopathological study. In: *Niger J Clin Pract.*, 2014, vol. 17, p. 370-374.
251. Oikawa T., Freeman M. Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin angiotensin inhibition. In: *Kidney Int.*, 1997, vol. 51, p. 164-172.
252. Olowu W.A., Adelusola K.A., Adefehinti O. Childhood idiopathic steroid resistant nephrotic syndrome in Southwestern Nigeria. In: *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, 2010, vol. 21, p. 979-990.
253. Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J., et al. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. In: *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2006, vol. 7, nr. 5, p. 359-371.
254. Ortega Marta Ruiz, Mónica Rupérez, Vanesa Esteban, et.al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. In: *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2006, vol. 21, nr. 1, p. 16-20.
255. Otukesh H., Otukesh S., Mojtahedzadeh M., et al. Management and outcome of steroid-resistant nephrotic syndrome in children. In: *Iran J Kidney Dis.*, 2009, vol. 3, p. 210-217.
256. Ozaki M., Gotoh T., Nagasaki A. Expression of arginase II and related enzymes in the rat small intestine and kidney. In: *J. Biochem.*, 1999, vol. 125, nr. 3, p. 586-593.
257. Özlü S.G., Demircin G., Tökmeci N., et.al. Long-term prognosis of idiopathic nephrotic syndrome in children. In: *Ren Fail.*, 2015, vol. 37, nr. 4, p. 672-677.
258. Paik K.H., Lee B.H., Cho H.Y., et al. Primary focal segmental glomerular sclerosis in children: clinical course and prognosis. In: *Pediatr Nephrol.*, 2007, vol. 22, p. 389-95.
259. Pallini A., Hulter H.N., Muser J., et al. Role of endothelin-1 in renal regulation of acid-base equilibrium in acidotic humans. In: *Am J Physiol Renal physiology.*, 2012, vol. 303, p.991-999.
260. Pan Q, Wu J, Tao J, Chen Y, et al. Role of basophils in the pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome: A literature review. In: *Exp Ther Med.*, 2014, vol. 8, nr. 4, p. 1027-1031.
261. Pereira Wde F., Brito-Melo G.E., Guimarães F.T., et al. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. In: *Inflamm Res.*, 2014, vol. 63, nr. 1, p. 1-12.
262. Peter Boor., Tammo Ostendorf., Jürgen Floege. PDGF and the progression of renal disease. In: *Nephrology Dialysis Transplantation.*, 2013, vol. 29, issue suppl 1, p. i45-i54.
263. Piéroni L., Cristol J.P. Urinary biomarkers of kidney dysfunction. In: *Ann Biol Clin.*, 2015, vol.73, nr. 2, p.151-157.
264. Popolo A., Adesso S., Pinto A., et al. L-Arginine and its metabolites in kidney and cardiovascular disease. In: *Amino Acids.*, 2014, vol. 46, nr. 10, p. 2271-2286.
265. Qiangwei Fu., Sean P Colgan, Carl Simon Shelley. Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease. In: *Clin. Med Res.*, 2016, vol. 14, nr. 1, p. 15-39.

266. Quezada S.A., Jarvinen L.Z., Lind E.F., et al. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. In: *Annu Rev Immunol.*, 2004, vol. 22, p. 307-328.
267. Radko Komers., Horacio Plotkin. Dual inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system and endothelin-1 in treatment of chronic kidney disease. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2016, vol. 310, nr.10, p. R877-R884.
268. Raveh D., Shemesh O., Ashkenazi YJ., et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  blocking agent as a treatment for nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2004, vol. 19, p. 1281-1284.
269. Ray P.E., Onorio A., Sgromo J., et al. Basic role of fibroblast growth factor in the pathogenesis of classic hemolytic-uremic syndrome. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2002, vol. 13, p. 699-707,
270. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., et al. Antioxidant activity apply ingan improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, vol. 26, p. 1231-1237.
271. Reiser J., Mundel P. Danger signaling by glomerular podocytes defines a novel function of inducible B7-1 in the pathogenesis of nephrotic syndrome. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2004, vol. 15, p. 2246-2248.
272. Remuzzi G., Benigni A., Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. In: *J Clin Invest.*, 2006, vol. 116, nr. 2, p. 288-296.
273. Renke M., Knap N., Tylicki L., et al. Isoprostanes - important marker of the oxidative stress estimation in patients with chronic kidney disease. In: *Pol Merkur Lekarski.*, 2013, vol. 34, nr. 199, p. 14-17.
274. Rizvi M., Pathak D., Freedman J.E., Chakrabarti S. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. In: *Trends Mol.Med.*, 2008, vol. 14, nr. 12, p. 530-538.
275. Roberts I.S., Cook H.T., Troyanov S., et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. In: *Kidney Int.*, 2009, vol. 76, nr. 5, p.546-556.
276. Roestenberg P., et al. Temporal expression profile and distribution pattern indicate a role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2) in diabetic nephropathy in mice. In: *Renal Physiology.*, 2006, vol. 290, p. 1344-1354.
277. Romero MJ., Platt DH., Tawfik HE., et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. In: *Circ Res.*, 2008, vol. 102, nr. 1, p. 95-102.
278. Rona Dagan B., Roxana Cleper., Miriam Davidovits., et al. Post-Infectious Glomerulonephritis in Pediatric Patients over Two Decades: Severity-Associated Features. In: *IMAJ* , 2016, vol. 18, p. 336-340.
279. Roy RR., Islam MR., Jesmin T., et al. Prognostic Value of Biochemical and Hematological Parameters in Children with Nephrotic Syndrome. In: *J Shaheed Suhrawardy Med Coll.*, 2013, vol. 5, nr. 2, p. 95-98.
280. Rudolf Lucas. The role of arginase in endothelial dysfunction. In: *Front. Immunol.*, 2015, p.79-86.
281. Ruth E.M., Kemper M.J., Leumann E.P., et al. Children with steroid-sensitive nephrotic syndrome come of age: long-term outcome. In: *J Pediatr.*, 2005, vol. 147, nr. 2, p. 202-207.
282. Sadowski C.E., Lovric S., Ashraf S., et al. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2015, vol. 26, nr. 6, p. 1279-1289.



283. Sahali D., Sendeyo K., Mangier M., et al. Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome with relapse. In: *Semin Immunopathol.*, 2014, vol. 36, nr. 4, p. 421-429.
284. Saleem M.A., Kobayashi Y. Cell biology and genetics of minimal change disease. In: *F1000Research*, 2016, vol. 5, p. F1000 Faculty Rev-412.
285. Sampson M.G., Robertson C.C., Martini S., et al. Integrative genomics identifies novel associations with APOL1 risk genotypes in Black NEPTUNE subjects. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2016, vol. 27, nr. 3, p. 814-823.
286. Samuel N Uwaezuoke. Steroid-sensitive nephrotic syndrome in children: triggers of relapse and evolving hypotheses on pathogenesis. In: *Ital J Pediatr.*, 2015, vol. 41, p. 19.
287. Sarkany Z., Ikonen T.P., Ferreira-da-Silva F. et al. Solution structure of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). In: *J Biol Chem.*, 2011, vol. 286, nr. 43, p. 37525-37534.
288. Sarker M.N., Islam M.M., Saad T., et al. Risk factor for relapse in childhood nephrotic syndrome - A Hospital Based Retrospective Study. In: *Faridpur Med Coll J.*, 2012, vol. 7, nr. 19, p. 18-22.
289. Sato W., Tanabe K., Kosuqi T., et al. Selective Stimulation of VEGFR2 Accelerates Progressive Renal Disease. In: *Am J Pathol.*, 2011, vol. 179, nr. 1, p. 155-166.
290. Savin V.J., McCarthy E.T., Sharma R., et al. Galactose binds to focal segmental glomerulosclerosis permeability factor and inhibits its activity. In: *Transl Res.*, 2008, vol. 151, p. 288-292.
291. Sayyed S. G., Hägele H., Kulkarni O. P., et al. Anders Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. In: *Diabetologia*, 2009, vol. 52, p. 2445-2454.
292. Schwaderer P., Knüppel T., Konrad M., et al. Clinical course and NPHS2 analysis in patients with late steroid-resistant nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol.*, 2008, vol. 23, p. 251-256.
293. Schwartz G.J., Haycock G.B., Edelmann C.M., et al. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. In: *Pediatrics.*, 1976, vol. 58, p. 259-263.
294. Seif E.I., Ibrahim EA-S., Elhefnawy N.G., et al. Histological patterns of idiopathic steroid resistant nephrotic syndrome in Egyptian children: A single centre study. In: *Journal of nephropathology.*, 2013, vol. 2, nr. 1, p. 5360.
295. Selmeçi L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? In: *Free Radic Res.*, 2011, vol. 45, nr. 10, p. 1115-1123.
296. Senaldi G., Stolina M., Guo J., et al. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. In: *J Immunol.*, 2002, vol. 168, nr. 11, p. 5690-5698.
297. Seong Heon Kim., Se Jin Park., Kyoung Hee Han., et al. Pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome: an immunological concept. In: *Korean J Pediatr.*, 2016, vol. 59, nr. 5, p. 205-211.
298. Settembre C., Fraldi A., Medina D. L., et al. Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013, vol. 14, p.

283-296.

299. Shah KN., Yan AC. Acquired zinc deficiency acrodermatitis associated with nephrotic syndrome. In: *Pediatr Dermatol.*, 2008, vol. 25, p. 56-59.
300. Shah S.S., Akhtar N., Sunbleen F., et al. Histopathological patterns in paediatric idiopathic steroid resistant nephrotic syndrome. In: *J Ayub Med Coll Abbottabad.*, 2015, vol. 27, nr. 3, p. 633-636.
301. Shakeel S., Mubarak M., Kazi J.I. Frequency and clinicopathological correlations of histopathological variants of pediatric idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. In: *J. Nephrol.*, 2014, vol. 24, nr. 3, p.148-153.
302. Shalhoub R.J. Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of Tcell function. In: *Lancet.*, 1974, vol. 2, p. 556-560.
303. Sharma M., McCarthy E.T., Savin V.J., et al. Nitric oxide preserves the glomerular protein permeability barrier by antagonizing superoxide. In: *Kidney Int.*, 2005, vol. 68, nr. 6, p. 2735-2744.
304. Sharma K. Obesity, oxidative stress and fibrosis in chronic kidney disease. In: *Kidney Int Suppl.* 2014, vol. 4, nr. 1, p. 113-117.
305. Sherali A.R., Moorani K.N., Chishty S.H., et al. Zinc supplement in reduction of relapses in children with steroid sensitive nephrotic syndrome. In: *J Coll Physicians Surg Pak.*, 2014, vol. 24, nr. 2, p. 110-113.
306. Shi X.Y., Hou F.F., Niu H.X., et al. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. In: *Endocrinology.*, 2008, vol. 149, p. 1829-1839.
307. Shimada M., Araya C., Rivard C., et.al. Minimal change disease: a „two-hit" podocyte immune disorder? In: *Pediatr Nephrol.*, 2011, vol. 26, p. 645-649.
308. Shimamura T., Morrison A.B. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. In: *Am J Pathol.*, 1975, vol. 79, p. 95-106.
309. Shvetsov M.Iu., Zheng A., Kozlovskaja L.V., et.al. Urinary excretion of angiogenesis regulatory factors and renal injury markers in chronic glomerulonephritis: Significance in the assessment of progression. In: *Ter Arkh.*, 2015, vol. 87, nr. 6, p.75-82.
310. Sidney M. Morris., Jr., Ting Gao., Timothy K. Cooper., et al. Arginase-2 Mediates Diabetic Renal Injury. In: *Diabetes.*, 2011, vol. 60, nr. 11, p. 3015-3022.
311. Silverstein D.M., Craver R. Presenting features and short-term outcome according to pathologic variant in childhood primary focal segmental glomerulosclerosis. In: *Clin J Am Soc Nephrol.*, 2007, vol. 2, p. 700-707.
312. Sinha A., Hari P., Sharma P.K, et al. Disease course in steroid sensitive nephrotic syndrome. In: *Indian Pediatr.*, 2012, vol. 49, nr. 20, p. 881-887.
313. Souto M. F., Teixeira A.L., Russo R. C., et al., Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. In: *Pediatric Research.*, 2008, vol. 64, nr. 6, p. 637-642.
314. Sreenivasa B., Manjunatha B., Nivil Joseph. Comparative study of lipid profile abnormalities in first episode and relapse cases of childhood nephrotic syndrome. In: *J Contemp Pediatr.*, 2016, vol. 3, nr. 4, p. 1297-1300.
315. Srivastava RN., Bagga A. Nephrotic Syndrome. In: *Pediatric Nephrology*, 5th ed, New Delhi: Jaypee Brothers, Medical Publishers (P) Ltd, 2011, p. 195-234.

316. Srivastava T., Sharma M., Yew K.H. LPS and PAN-induced podocyte injury in an in vitro model of minimal change disease: changes in TLR profile. In: *J Cell Commun Signal.*, 2013, vol. 7, p. 49-60.
317. Stokes M.B., D'Agati V.D. Morphologic variants of focal segmental glomerulosclerosis and their significance. In: *Adv Chronic Kidney Dis.*, 2014, vol. 21, nr. 5, p. 400-407.
318. Stokman G., Stroo I., Claessen N., et al. SDF-1 provides morphological and functional protection against renal ischaemia/reperfusion injury. In: *Nephrol Dial Transplant.*, 2010, vol. 25, p. 3852-3859.
319. Straatmann C., Ayoob R., Gbadegesin R., et al. Treatment outcome of late steroid-resistant nephrotic syndrome: a study by the Midwest Pediatric Nephrology Consortium. In: *Pediatr Nephrol.*, 2013, vol. 28, nr. 8, p. 1235-1241.
320. Strutz F. The role of FGF-2 in renal fibrogenesis. In: *Tront Biosci (Scol Ed).*, 2009, vol. 1, p. 125-131.
321. Suzuki D., et al. Glomerular expression of connective tissue growth factor mRNA in various renal diseases. In: *Nephrology (Carlton.)*, 2003, vol. 8, p. 92-97.
322. Swarnalatha G., Ram R., Ismal K.M., et al. Focal and segmental glomerulosclerosis: does prognosis vary with the variants? In: *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, 2015, vol. 26, nr. 1, p. 173-81.
323. Tain Y., Chen T., Yang K.D. Implication of serum IgE in childhood nephrotic syndrome, In: *Pediatr Nephrol.*, 2003, vol. 18, p. 1211.
324. Takahiko Nakagawa., Waichi Sato., Tomoki Kosugi., et al. Uncoupling of VEGF with Endothelial NO as a Potential Mechanism for Abnormal Angiogenesis in the Diabetic Nephropathy. In: *Diabetes Res.*, 2013, p.184-139.
325. Taneda S., Honda K., Uchida K., et al. Histological heterogeneity of glomerular segmental lesions in focal segmental glomerulosclerosis. In: *Int Urol Nephrol.*, 2012, vol. 44, p. 183-96.
326. Taniguchin Y., Yorioka N., Oda H., et al. Platelet-derived growth factor, interleukin (IL)-1b, IL-6R and tumor necrosis factor-a in IgA nephropathy. An immunohistochemical study. In: *Nephron.*, 1996, vol. 74, nr. 4, p. 652-660.
327. Tarshish P., Tobin J.N., Bernstein J., et al. Prognostic significance of the early course of minimal change nephrotic syndrome: report of the International Study of Kidney Disease in Children. In: *J Am Soc Nephrol.*, 1997, vol. 8, nr. 5, p. 769-776.
328. Taylor E. M., Armstrong K. R., Perrett D., et al. Optimisation of an Advanced Oxidation Protein Products Assay: Its Application to Studies of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, 2015, ID 496271, p. 10.
329. Teeninga N., Kist-van Holthe J.E., van Rijswijk N., et al. Extending prednisolone treatment does not reduce relapses in childhood nephrotic syndrome. In: *J Am Soc Nephrol.*, 2013, vol. 24, nr. 1, p. 149-159.
330. Tejani A. Morphological transition in minimal change nephrotic syndrome. In: *Nephron.*, 1985, vol. 39, nr. 3, p. 157-159.
331. Tesar V., Zima T., Jirsa M. Jr., et al. Influence of losartan and enalapril on urinary excretion of 8-isoprostane in experimental nephrotic syndrome. In: *Med SciMonit.*, 2002, vol. 8, nr. 2, p. 69-74.
332. Testagrossa L.A., Malheiros D.M. Study of the morphologic variants of focal segmental

- glomerulosclerosis: A Brazilian report. In: J Bras Pathol Med Lab., 2012, vol. 48, p. 211-215.
333. Thomas D.B., Franceschini N., Hogan S.L., et al. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. In: Kidney Int., 2006, vol. 69, p. 920-926.
  334. Tobe S., Kohan D.E., Singarayer R. Endothelin Receptor Antagonists: New Hope for Renal Protection? In: Curr Hypertens Rep., 2015, vol.17, nr.7, p. 57.
  335. Togel F.E., Westenfelder C. Role of SDF-1 as a regulatory chemokine in renal regeneration after acute kidney injury (Review). In: Kidney Intern Supp., 2011, vol.1, nr. 3, p. 87-89.
  336. Tojo A., Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. In: Int J Nephrol., 2012, ID 481520, p.9.
  337. Toque H.A., Tostes R.C., Yao L., et al. Arginase II deletion increases corpora cavernosa relaxation in diabetic mice. In: J Sex Med., 2011, vol. 8, nr. 3, p. 722-733.
  338. Trautmann A., Bodria M., Ozaltin F. et al. Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet registry cohort. In: Clin J Am Soc Nephrol., 2015, vol. 10, nr. 4, p. 592-600.
  339. Tsuji S, Kimata T, Yamanouchi S., et al. Regulatory T cells and CTLA-4 in idiopathic nephrotic syndrome. In: Pediatr Int., 2017, vol. 59, nr. 5, p. 643-646.
  340. Tsukaguchi H. The genetic basis of nephrotic syndrome. In: Nihon Jinzo Gakkai Shi., 2015, vol. 57, nr. 4, p. 726-735.
  341. Tulpar S., Gunduz Z., Sahin U., et al. Trace elements in children suffering from idiopathic nephrotic syndrome. In: Eurasian J med., 2014, vol. 46, nr. 3, p. 187-191.
  342. Ukperoro J.U., Offiah N., Idris T., et al. Antioxidant effect of zinc, selenium and their combination on the liver and kidney of alloxan-induced diabetes in rats. In: Mediterr J Nutr Metab., 2010, vol. 3, p. 25-30.
  343. Usui J., Tawara-Iida T., Takada K. et al. Temporal Changes in Post-Infectious Glomerulonephritis in Japan (1976-2009). In: PLoS One., 2016, vol.11, nr.6, p. e0157356.
  344. Vachvanichsanong P., Dissaneewate P., McNeil E. Childhood chronic kidney disease in a developing country. In: Pediatr Nephrol., 2008, vol. 23, p. 1143-1147.
  345. Vafa A., Grover Ph., Pretlow T., et al. Study of activities of arginase, hexosaminidase and leucine aminopeptidase in prostate fluid. In: Urology., 1993, vol. 42, nr. 2, p. 138-143.
  346. van den Brand J.A., Hofstra J.M., Wetzels J.F. Low-molecular-weight proteins as prognostic markers in idiopathic membranous nephropathy. In: Clin J Am Soc Nephrol., 2011, vol. 6, p. 2846-2853.
  347. Vianna H. R., Soares C. M., Silveira K. D., et al. Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases. In: Pediatric Nephrology., 2013, vol. 28, nr. 3, p. 463-469.
  348. Villanueva S., Cespedes C., Gonzalez A., et al. Inhibition of bFGF-receptor type 2 increases kidney damage and suppresses nephrogenic protein expression after ischemic acute renal failure. In: Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2008, vol. 294, p. R819-R828.
  349. Villanueva S., Contreras F., Tapia A., et al. Basic fibroblast growth factor reduces functional and structural damage in chronic kidney disease. In: The Am J of Physiol-Renal Physiol., 2014, vol. 306, nr. 4, p. F430-F441.
  350. Viswanath D. Nephrotic syndrome in children. In: J Indian Acad Oral Med Radiol., 2013, vol. 25, p. 18-23.

351. Vivante A., Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. In: *Nat Rev Nephrol.*, 2016, vol.12, p.133-146.
352. Wada T., Furuichi K., Segawa-Takaeda C., et al. MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. In: *Kidney Int.*, 1999, vol. 56, p. 995-1003.
353. Waldherr R., Gubler M.C., Levy M., et al. The significance of pure diffuse mesangial proliferation in idiopathic nephrotic syndrome. In: *Clin Nephrol.*, 1978, vol. 10, nr. 5, p. 171-179.
354. Wang S.Y., Bu R., Zhang Q., et al. Clinical, Pathological, and Prognostic Characteristics of Glomerulonephritis Related to Staphylococcal Infection. In: *Medicine (Baltimore).*, 2016, vol. 95 nr.15, p.e3386.
355. Wasilewska A., Zoch-Zwierz W., Taranta-Janusz K. et al. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 excretion in children with glomerular proteinuria Scand. In: *J.Urol.Nephrology.*, 2011, vol. 45, nr.1, p.52-59.
356. Wei X. F., Zhou Q. G., Hou F. F., et al. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. In: *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2009, vol. 296, p. F427-F437.
357. White RH., Glasgow EF., Mills RJ. Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood. In: *Lancet.*, 1970, vol. 1, p. 1353-1359.
358. William Durante. Role of arginase in vessel wall remodeling. In: *Immunol. Front.*, 2013, vol. 4, p.111.
359. Wink D.A., Hines Harry B., Cheng Robert Y. S., et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. In: *J. Leukoc. Biol.*, 2011, vol. 89, nr.6, p. 873-891.
360. Wink, D. A., Kim, S., Coffin, D., et al. Detection of S-nitrosothiols by fluorometric and colorimetric methods. In: *Methods Enzymol.*, 1999, vol. 301, p. 201-211.
361. Wiswedel Ingrid., Hirsch Daniela., Carluccio Francesco., et al. F2-Isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. In: *Bio Factors.*, 2005, vol. 24, nr.1-4, p. 201-208.
362. Witko-Sarat V., Friedlander M., Capeillre-Blandin., et. al. Advanced oxidation protein products as novel marker of oxidative stress in uremia. In: *Kidney Int.*, 1996, vol. 49, p. 1304-1313.
363. Witko-Sarsat V., Gausson V., Nguyen A.T., et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. In: *Kidney Int.*, 2003, vol. 64, p. 82-91.
364. Wolf G., Meyer T.W., Toke A. The Renin-Angiotensin System and Progression of Renal Diseases. Hemodynamic Effects of Angiotensin II in the Kidney. In: *Contrib Nephrol.*, 2001, vol. 135, p. 34-46.
365. Wong W. Idiopathic nephrotic syndrome in New Zealand children, demographic, clinical features, initial management and outcome after twelve-month follow-up: results of a three-year national surveillance study. In: *J Paediatr Child Health.* 2007, vol. 43, nr. 5, p. 337-341.
366. Wu Y., Su T., Yang L., et al. Correlation between urinary biomarkers and pathological lesions in drug-induced tubulointerstitial nephritis. In: *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.*, 2010, vol. 49, nr. 7, p. 568-71.
367. Wu D.Q., Kan M.K., Sato G.H., et al. Characterization and molecular cloning of a putative

- binding protein for heparin-binding growth factors. In: J Biol Chem., 1991, vol. 266, p. 16778-16785.
368. Xin Wan., Wenkai Xia., Yasser Gendoo., et al. Upregulation of Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1) is Associated with Macrophage Infiltration in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. In: PLoS One., 2014, vol. 9, nr.12, p.e114564.
369. Xue-Hui Liu., Aigner A., Wellstein A., et al. Up-regulation of a fibroblast growth factor binding protein in children with renal diseases. In: Kidney Int., 2001, vol. 59, p. 1717-1728.
370. Yamagishi S., Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. In: Oxid Med Cell Longev., 2010, vol. 3, p. 101-108.
371. Yamagishi S.1., Maeda S., Matsui T., et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. In: Biochim Biophys Acta. 2012, vol. 1820, nr. 5, p. 663-671.
372. Yang Z., Ming X. F. Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation. In: Front Immunol., 2013, vol. 4, p. 149.
373. Yanhong Li., Jian Wang., Xueming Zhu., et al. Urinary protein markers predict the severity of renal histological lesions in children with mesangial proliferative glomerulonephritis. In: Nephrol., 2012, vol. 13, p. 29.
374. Yano T., Liu Z., Donovan J., et al. Stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 attenuates diabetes in mice and promotes pancreatic beta-cell survival by activation of the prosurvival kinase. In: Akt. Diabetes., 2007, vol. 56, p. 2946-2957.
375. Yokoi H., et al. Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. In: Kidney Int., 2008, vol. 73, p. 446-455.
376. You H., Gao T., Cooper T.K. et al. Arginase inhibition: a new treatment for preventing progression of established diabetic nephropathy. In: Am J Physiol Renal Physiol., 2015, vol. 309, nr. 5, p. F447-455.
377. Zagury A., Oliveira AL., Montalvao JA., et al. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children: long-term follow-up and risk factors for end-stage renal disease. In: J Bras Nefrol., 2013, vol. 35, nr. 3, p. 191-199.
378. Zhejiang Da Xue., Xue Bao Yi., Xue Ban. Long-term prognosis of idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Ren Fail., 2015, vol. 37, nr. 4, p. 672-677.
379. Zhong Y., Xu F., Li X., et al. The evolution of morphological variants of focal segmental glomerulosclerosis: a repeat biopsy-based observation. In: Nephrol Dial Transplant., 2016, vol. 31, nr.1, p. 87-95.
380. Zhou L. L., Cao W., Xie C., J. Tian., et al. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. In: Kidney Int., 2012, vol. 82, nr. 7, p. 759-770.
381. Zhou L.L., Hou F.F., Wang G.B., et al. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms. In: Kidney Int., 2009, vol. 76, p. 1148- 1160.
382. Zsuzsanna Gall., Carmen Duicu., Eva Kiss., et al. Clinical Features and Histopathological Spectrum in Adolescent Onset Nephrotic Syndrome in a Romanian Children Population. In: Acta Medica Marisiensis., 2014, vol. 60, nr. 4, p.146-150.
383. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. В: Наука, Москва: 1969, с. 275.
384. Бондарь И.А., Климонтов В.В., Парфентьева Е.М. Мочевая экскреция фиброгенных и

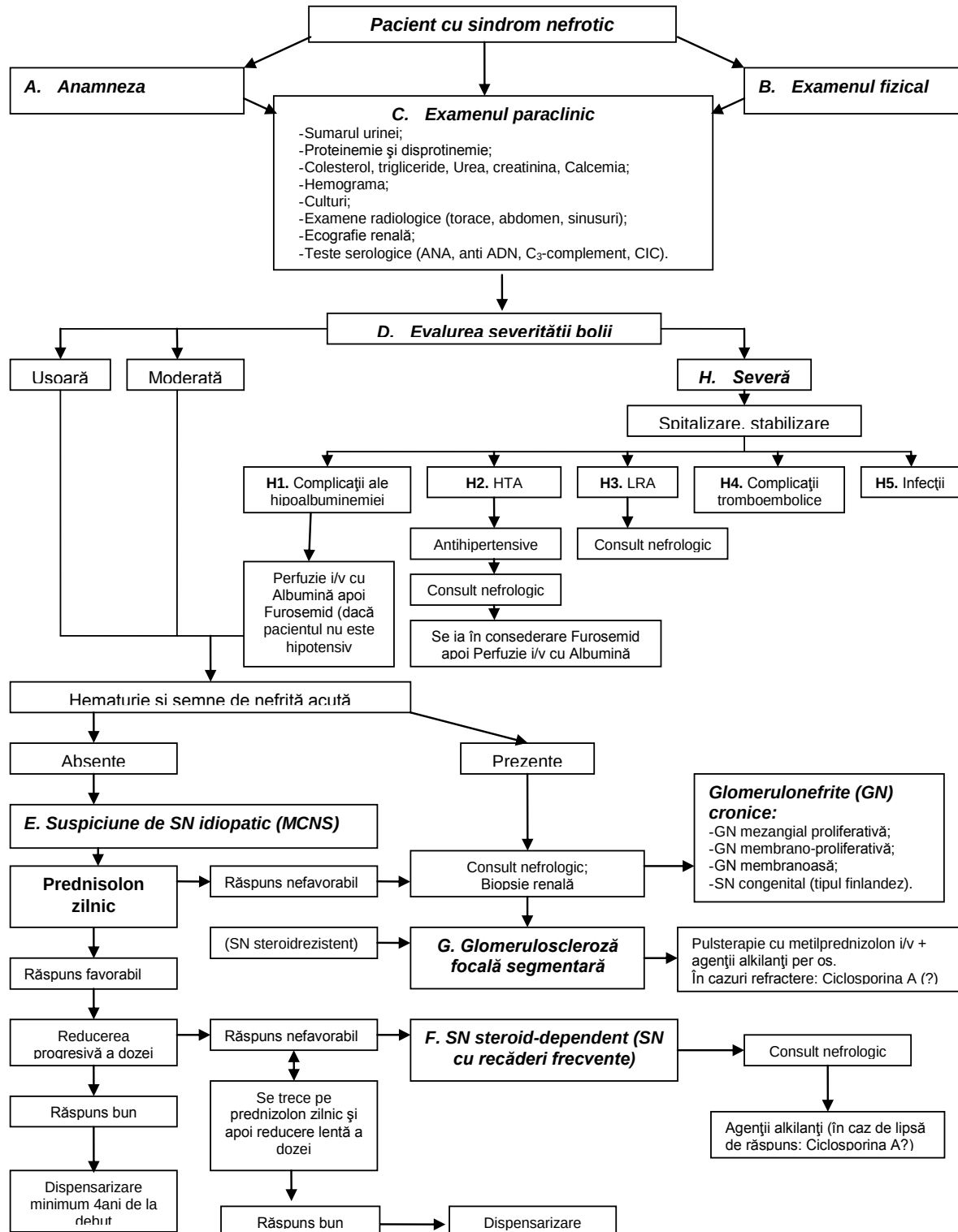
- антифиброгенных факторов роста: взаимосвязь с диабетической нефропатией. В: Терапевтический архив., 2012, т. 84, № 6, с. 36-40.
385. Карягина И.Ю., Зарембский Р.А., Балябина М.Д. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ,  $\alpha_1$ -анти-трипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина в гастроэнтерологической клинике. В: Лаб. Дело, 1990, № 2, с. 10-13.
386. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Система глутатиона. Часть II: Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции. В: Биомед. химия. 2009, т. 55, № 4, с. 365-379.
387. Кулинский В.И., Леонова А., Колесниченко Л.С. и др. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах. В: Биомед. химия. 2007, т. 53, № 1, с. 91-98.
388. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов. В: Практическая медицина, Москва, 2011, с. 477.
389. Леонтьев В. К., Гайдамак А. Н. Методы определения белковосвязанных углеводов в минерализованных тканях. В: Лабораторное дело. 1978, № 5, с.290-293.
390. Маслякова Г.Н., Россоловский А.Н., Напшева А.М. Эпителиально-мезенхимальная трансформация как фактор прогрессирования хронической болезни почек. В: Урология. ID: 2014, -01-1276-A-3333.
391. Северин С. Е. Практикум по биохимии. В: Москва: Изд. МГУ, 1989, с.191-195.
392. Тапбергенов С. О., Тапбергенова С. М. Диагностическое значение определения активности аденилатдезаминазы сыворотки крови. В: Лаб. дело. 1984, № 2, с. 104-106.
393. Чунту А. Фактор роста фибробластов-2 в моче у детей с гломерулонефритом. В: Research Journal of International Studies. Ecaterinburg, 2016, № 8, т. 50, с. 143-146.
394. Шараев П. Н., Гавдрахтеранова Н. К., Стрелкова Т. Н., и др. Способ определения активности N-ацетил- $\beta$ D-гексозаминидазы в моче. В: Клин. лабор. д-ка. 2004, № 5, с. 40-42.

# ANEXE



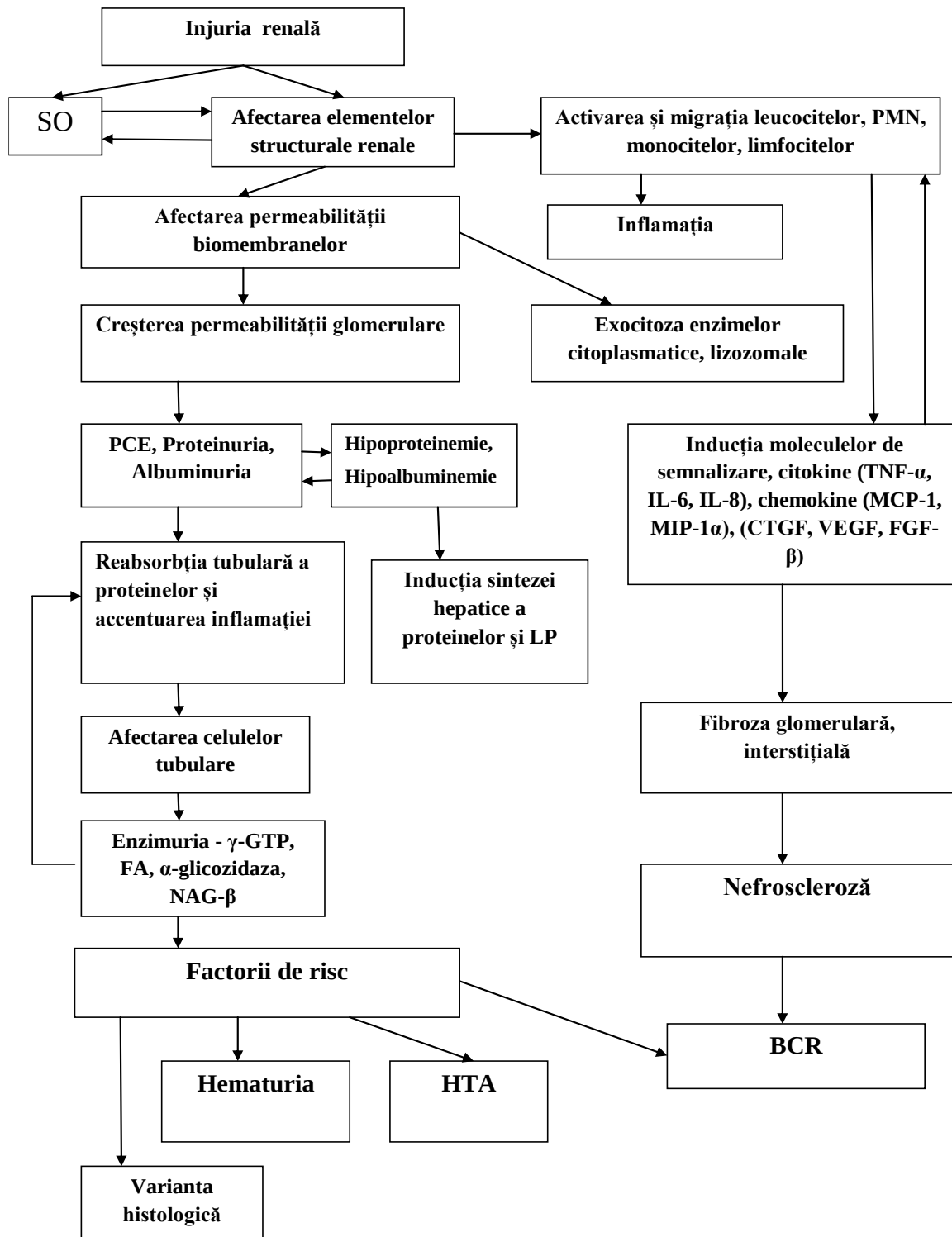
## ANEXA 1

### Algoritm de diagnostic în GN



## ANEXA 2

### Schema patogenică a GN la copii



Certificate de inovator

Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

**CERTIFICAT DE INOVATOR**

Nr. **5526**

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de determinare a AGE în serul sanguin  
ca marker clinic pentru monitorizarea evoluției  
glomerulonefritei la copii**

Inovația a fost înregistrată pe data de **07.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**

Data eliberării **11.07.2016**

L.Ș.

(Semnătura autorizată)





Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5527

Pentru inovația cu titlul  
**Metodă de determinare a arginazei în urină ca  
marker clinic non-invaziv pentru monitorizarea  
glomerulonefritei la copii.**

Inovația a fost înregistrată pe data de **07.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării **11.07. 2016**

L.S.

(Semnătură autorizată)







Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5528

Pentru inovația cu titlul  
**Metodă de determinarea endotelinei-1 în urină  
ca marker clinic non-invaziv pentru monitorizarea  
glomerulonefritei la copii.**

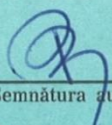
Inovația a fost înregistrată pe data de **07.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării **11.07. 2016**

  
(Semnătura autorizată)







Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5529

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de utilizare a FGFb ca marker  
non-invaziv pentru monitorizarea  
glomerulonefritei**

Inovația a fost înregistrată pe data de **10.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

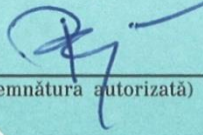
Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării

**11.07. 2016**

  
(Semnătură autorizată)





Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5530

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de utilizare a isoprostanului-8 (Iso-8) ca  
marker clinic non-invaziv pentru determinarea  
severității stresului oxidativ în glomerulonefrită  
la copii.**

Inovația a fost înregistrată pe data de **10.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării

L.S.

**11.07. 2016**

(Semnătura autorizată)



Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5531

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de determinarea MCP-1 în urină ca  
marker clinic non-invaziv pentru evaluarea  
severității procesului patologic în rinichi la  
copii cu glomerulonefrită.**

Inovația a fost înregistrată pe data de **10.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

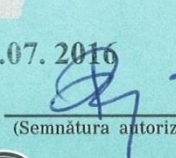
Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării

**11.07.2016**

  
(Semnătura autorizată)







Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5532

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de determinarea MIP-1α în urină ca  
marker clinic non-invaziv pentru monitorizarea  
procesului patologic în glomerulonefrită la copii.**

Inovația a fost înregistrată pe data de **15.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării

**22.07.2016**

(Semnătura autorizată)







Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5533

Pentru inovația cu titlul

**Metodă non-invazivă de aprecierea severității  
stresului oxidativ în glomerulonefrită la copii**

Inovația a fost înregistrată pe data de **15.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

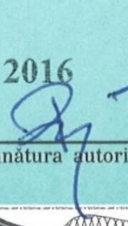
Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării

**22.07.2016**

  
(Semnătura autorizată)







Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5534

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de determinare a VEGF în urină ca  
marker clinic non-invaziv pentru monitorizarea  
evoluției bolii la copii cu glomerulonefrită**

Inovația a fost înregistrată pe data de **15.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**



Data eliberării

**22.07.2016**

**L.S.**

(Semnătura autorizată)





Republica Moldova  
Ministerul Sănătății

# CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5535

Pentru inovația cu titlul

**Metodă de determinarea Zn în serul sanguin  
ca marker clinic pentru monitorizarea glomeru-  
lonefritei la copii.**

Inovația a fost înregistrată pe data de **15.06.2016**  
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**Ciuntu Angela**

**22.07. 2016**

Data eliberării



L.S.

(Semnătura autorizată)



## Acte despre implementarea inovațională

APROB

Prorector pentru activitatea științifică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Prof. univ., dr. hab. șt. med.,

Gh. Rojnovceanu

2016

ACTUL nr.

### DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-didactic)

1. **Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de determinare a AGE în serul sanguin ca marker clinic pentru monitorizarea evoluției glomerulonefritei la copii.

2. **Autorii:** Ciuntu Angela

3. **Numarul inovației:** 5526

4. **Sursa de informație:**

-Gugliucci A, Menini T. The axis AGE-RAGE-soluble RAGE and oxidative stress in chronic kidney disease. Adv. Exp Med Biol. 2014;824:191-208.

-Meerwaldt R, Zeebregts CJ, Navis G et al. Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. J Kidney Dis. 2009, Jan;53(1):138-50.

-Noordzij MJ, Lefrandt JD, Smit AJ. Advanced glycation end products in renal failure: an overview. J Ren Care. 2008, Dec;34(4):207-12.

-Sarkany Z, Ikonen TP, Ferreira-da-Silva F. et al. Solution structure of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). J Biol Chem. 2011;286:37525-37534

5. **Unde și când a fost implementată:** Departamentul Pediatrie IP USMF “Nicolae Testemițanu”, 24.10.2016.

6. **Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a AGE în serul sanguin poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru determinarea severității procesului patologic, monitorizării complicațiilor, precum și de evaluare a eficacității tratamentului aplicat în glomerulonefrită la copii.

7. **Obiecții/propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Departamentul Pediatrie,  
Director Departament  
prof. univ., dr. hab. șt. med.



Ninel Revenco

Departamentul Știință,  
Șef Departament  
prof. univ., dr. hab. șt. med.



Ghenadie Curocichin



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL  
REPUBLICII MOLDOVA  
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ  
INSTITUTUL  
MAMEI ȘI COPILULUI  
(IMSP IMȘI C)

str. Burebista, 93  
MD-2062, mun. Chișinău  
Tel. +373 22 52-36-61;  
[www.mama-copilul.md](http://www.mama-copilul.md); e-mail: [mamsicop@gmail.com](mailto:mamsicop@gmail.com)



МИНИСТЕРСТВО  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА  
ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
ИНСТИТУТ МАТЕРИ И РЕБЕНКА  
(ИМСУ ИМР)

ул. Буребиста, 93  
MD-2062; мун/г Кишинэу,  
Тел. + 373 22 52-36-61;  
[www.mama-copilul.md](http://www.mama-copilul.md); e-mail: [mamsicop@gmail.com](mailto:mamsicop@gmail.com)

nr. \_\_\_\_\_  
La nr. \_\_\_\_\_

APROB  
Director general  
IMSP IM și C  
Dr.șt. med. Sergiu Gladun  
"20" \_\_\_\_\_ 2016

ACTUL nr.  
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI  
(în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de determinare a arginazei în urină ca marker clinic non-invaziv pentru monitorizarea glomerulonefritei la copii.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5527

**4. Sursa de informație:**

-Rudolf Lucas. The role of arginase in endothelial dysfunction. Front. Immunol., 17 November 2014 | <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00589>.

-Sidney M. Morris, Jr., Ting Gao, Timothy K. Cooper et al. Arginase-2 Mediates Diabetic Renal Injury Diabetes. 2011 ;60(11): 3015–3022.

-Toque HA, Tostes RC, Yao L et al. Arginase II deletion increases corpora cavernosa relaxation in diabetic mice. J Sex Med 2011;8(3):722–733.

-William Durante. Role of arginase in vessel wall remodeling, Front. Immunol. 2013;4:111.

-Yang Z., Ming X. F. Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation. Front Immunol. 2013;4:149.

**5. Unde și când a fost implementată:** Secția nefrologie IM și C, 07.10.2016.

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a arginazei în urină poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru diagnosticul timpuriu și diferențierii formelor clinice, aprecierii severității, prognozării evoluției bolii și evaluării eficacității tratamentului aplicat în diferite forme ale glomerulonefritei la copii.

**7. Obiecții/propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

IMSP IMȘI C  
Șef Secție Nefrologie

Gavriluța Valeriu

APROB

Prorector pentru activitatea științifică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Prof. univ., dr. hab. șt. med.

Gh. Rojnovanu

2016



ACTUL nr.  
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI  
( în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de determinare a endotelinei-1 în urină ca marker clinic non-invaziv pentru monitorizarea glomerulonefritei la copii.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5528

**4. Sursa de informație:**

-Barton M. Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. Nat Clin Pract Nephrol. 2008;4(9):490–501.

-Barton M, Sorokin A. Endothelin and the glomerulus in chronic kidney disease. Semin Nephrol. 2015;(2):156-67.

-Daehn I, Casalena G, Zhang T, Shi S et al. Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. J Clin Invest. 2014;124(4):1608–21.

-Culshaw GJ, MacIntyre IM, Dhaun N et al. Endothelin in nondiabetic chronic kidney disease: preclinical and clinical studies. Semin Nephrol. 2015;35(2):176-87.

**5. Unde și când a fost implementată:** Departamentul Pediatrie IP USMF “Nicolae Testemițanu”, 24.10. 2016.

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a endotelinei-1 în urină poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru determinarea severității procesului patologic, monitorizării complicațiilor, precum și de evaluare a eficacității tratamentului aplicat în glomerulonefrită la copii.

**7. Obiecții/propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Departamentul Pediatrie,  
Director Departament,  
prof.univ., dr. hab. șt. med.

Ninel Revenco

Departamentul Știință,  
Șef Departament,  
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Ghenadie Curocichin

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL  
REPUBLICII MOLDOVA  
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ  
INSTITUTUL  
MAMEI ȘI COPILULUI  
(IMSP IMȘIC)

str. Burebista, 93  
MD-2062, mun. Chișinău  
Tel. +373 22 52-36-61;  
[www.mama-copilul.md](http://www.mama-copilul.md); e-mail: [mamsicop@gmail.com](mailto:mamsicop@gmail.com)



МИНИСТЕРСТВО  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА  
ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
ИНСТИТУТ МАТЕРИ И РЕБЕНКА  
(ПМСУ ИММР)

ул. Буребиста, 93  
MD-2062; мун./г. Кишинэу,  
Тел. + 373 22 52-36-61;  
[www.mama-copilul.md](http://www.mama-copilul.md); e-mail: [mamsicop@gmail.com](mailto:mamsicop@gmail.com)

Nr. \_\_\_\_\_  
La nr. \_\_\_\_\_ din \_\_\_\_\_



APROB

Director IMSP IM și C  
Dr. șt. med. Sergiu Gladun

2016

#### ACTUL nr.

#### DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

( în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de utilizare a FGFb ca marker non-invaziv pentru monitorizarea glomerulonefritei.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5529

**4. Sursa de informație:**

-Chou Y. H., Pan S. Y., Yang C. H et al. Stem cells and kidney regeneration. Journal of the Formosan Medical Association. 2014;113(4):201-209.

-Meran S., Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. Int J Exp Pathol. 2011 Jun;92(3):158-67.

-Villanueva S., Contreras F., Tapia A. et al. Basic fibroblast growth factor reduces functional and structural damage in chronic kidney disease. The American Journal of Physiology- Renal Physiology. 2014;306(4):F430-F441.

**5. Unde și când a fost implementată:** Secția nefrologie IMSP IM și C, 07.10.2016.

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a FGFb în urină poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru diagnosticul timpuriu și diferențierii formelor clinice, aprecierii severității, prognozării evoluției bolii și evaluării eficacității tratamentului aplicat în diferite forme ale glomerulonefritei la copii.

**7. Obiecții/ propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

IMSP IM și C  
Șef Secție Nefrologie

Gavriluța Valeriu



APROB

Prorector pentru activitatea științifică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Prof. univ., dr. hab. șt. med.

Gh. Rojnovceanu

2016



ACTUL nr.

## DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

( în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de utilizare a isoprostanului-8 (Iso-8) ca marker clinic non-invaziv pentru determinarea severității stresului oxidativ în glomerulonefrită la copii.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5530

**4. Sursa de informație:**

- Barry Halliwell, Chung Yung J. Lee. Using Isoprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress: Some Rarely Considered Issues. *Antioxidants & Redox Signaling*. July 15, 2010: 145-156.

- Czerska M, Zieliński M, Gromadzińska J. Isoprostanes - A novel major group of oxidative stress markers. *Int J Occup Med Environ Health*. 2016;29(2):179-90.

- Il'yasova D, Wagenknecht LE, Spasojevic I et al. Urinary F2-isoprostanes and metabolic markers of fat oxidation. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:729191.

- Renke M, Knap N, Tylicki L et al. Isoprostanes - important marker of the oxidative stress estimation in patients with chronic kidney disease. *Pol Merkur Lekarski*. 2013;34(199):14-7.

**5. Unde și când a fost implementată:** Departamentul Pediatrie IP USMF “Nicolae Testemițanu”, 24.10.2016.

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a isoprostanului-8 în urină poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru diagnosticul timpuriu și diferențierii formelor clinice, aprecierii severității stresului oxidativ, prognozării evoluției bolii și evaluării eficacității tratamentului aplicat în diferite forme ale glomerulonefritei la copii.

**7. Obiecții/propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Departamentul Pediatrie,  
Director Departament  
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Ninel Revenco

Departamentul Știință,  
Șef Departament  
prof. univ., dr. hab. șt. med.

Ghenadie Curocichin



APROB  
Director general SCMC  
"V. Ignatenco"  
Holostenco Alexandru  
"28" 12 2016

**ACTUL nr.**

**DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI**  
( în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de determinarea MCP-1 în urină ca marker clinic non-invaziv pentru evaluarea severității procesului patologic în rinichi la copii cu glomerulonefrită.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5531

**4. Sursa de informație:**

-Ana Cristina Simões e Silva, André Barreto Pereira, Mauro Martins Teixeira. Chemokines as Potential Markers in Pediatric Renal Diseases. Disease Markers, 2014, Article ID 278715, 9 p.

-Kim M. J., Tam F.W. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in renal disease. Clin. Chim. Acta. 2011, vol. 412, p. 2022-2030.

-Vianna H. R., C. M. Soares, K. D. Silveira et al. Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases. Pediatric Nephrology, 2013, vol. 28, nr. 3, p. 463-469.

-Wasilewska A., Zoch-Zwierz W., Taranta-Janusz K. et al. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 excretion in children with glomerular proteinuria. Scand. J. Urol. Nephrology, 2011, vol. 45, nr. 1, p. 52-59.

**5. Unde și când a fost implementată:** Secția uronefrologie SCMC "V. Ignatenco", 01. 09. 2016.

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a MCP-1 în urină poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru aprecierea severității procesului patologic, monitorizării evoluției bolii și eficacității tratamentului aplicat în glomerulonefrită la copii.

**7. Obiecții/ propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

SCMC "V. Ignatenco  
Șef secție uronefrologie

Burianov Vasilisa



APROB  
Director general SCMC  
"V. Ignatenco"  
Holostenco Alexandru

2016

**ACTUL nr.**

**DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI**  
( în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de determinarea MIP-1α în urină ca marker clinic non-invaziv pentru monitorizarea procesului patologic în glomerulonefrită la copii.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5532

**4. Sursa de informație:**

-Arthur C. K., Chung, Lui Y. Lan. Hemokines in Renal Injury. JASN, 2011, vol. 22, p. 5802-5809.

-Charo I.F., Ransohoff R.M. Mechanisms of disease: the many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. New England Journal of Medicine. 2006, vol. 354, nr. 6, p. 610-621.

-Ransohoff R. M. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. Immunity. 2009, vol. 31, nr. 5, p. 711-721.

**5. Unde și când a fost implementată:** Secția uronefrologie SCMC "V. Ignatenco", 01.09.2016

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a MIP-1α în urină poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru aprecierea severității procesului patologic, monitorizării evoluției bolii și eficacității tratamentului aplicat în glomerulonefrită la copii.

**7. Obiecții/propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

SCMC "V. Ignatenco"  
Șef secție uronefrologie

Burianov Vasilisa

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL  
REPUBLICII MOLDOVA  
INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ  
INSTITUTUL  
MAMEI ȘI COPILULUI  
(IMSP IMȘIC)

str. Burebista, 93  
MD-2062, mun. Chișinău  
Tel. +373 22 52-36-61;  
www.mama-copilul.md; e-mail: mamsicop@gmail.com



МИНИСТЕРСТВО  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА  
ПУБЛИЧНОЕ МЕДИКО-САНИТАРНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
ИНСТИТУТ МАТЕРИ И РЕБЕНКА  
(ПМСУ ИМИР)

ул. Буребиста, 93  
MD-2062; мун/г Кишинэу,  
Тел. + 373 22 52-36-61;  
www.mama-copilul.md; e-mail: mamsicop@gmail.com

Nr. \_\_\_\_\_  
La nr. \_\_\_\_\_ din \_\_\_\_\_



APROB

Director IMSP IM și C  
Dr. st. med. Sergiu Gladun

2016

ACTUL nr.  
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI  
( în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă non-invazivă de aprecierea severității stresului oxidativ în glomerulonefrită la copii.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5533

**4. Sursa de informație:**

-Hong Yan Li, Fan Fan Hou, Xun Zhang, et al. Advanced Oxidation Protein Products Accelerate Renal Fibrosis in Remnant Kidney Model. J Am Soc Nephrol 18: 528–538, 2007.

-Cao W, Xu J, Zhou ZM, et al. Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. Antioxid Redox Signal. 2013;18:19–35.

-Zhou Q, Wu S, Jiang J, et al. Accumulation of circulating advanced oxidation protein products is an independent risk factor for ischaemic heart disease in maintenance haemodialysis patients. Nephrology, 2012;17:642–649.

-Zhou LL, Cao W, Xie C, et al. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. Kidney Int. 2012;82:759–770.

**5. Unde și când a fost implementată:** Secția nefrologie IMSP IM și C, 07.10.2016.

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a PPOA în urină poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru aprecierea severității stresului oxidativ, monitorizării evoluției bolii și eficacității tratamentului aplicat în glomerulonefrită la copii.

**7. Obiecții/propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

IMSP IM și C  
Șef Secție Nefrologie

Gavriluța Valeriu



**Prorector pentru activitatea științifică**  
**USMF „Nicolae Testemitanu”**

**Gh. Rojnovceanu**

2016



## DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI ( în procesul științifico-didactic)

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Me,



265



APROB  
Director general  
SCMC "V. Ignatenco"

Holostenco Alexandru

2016

**ACTUL nr.**

**DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI**

( în procesul științifico-didactic)

**1. Denumirea ofertei pentru implementare:** Metodă de determinarea Zn în serul sanguin ca marker clinic pentru monitorizarea glomerulonefritei la copii.

**2. Autorii:** Ciuntu Angela

**3. Numarul inovației:** 5535

**4. Sursa de informație:**

-Mishra OP, Gupta AK, Prasad R et al. Antioxidant status of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2011;26(2):251-6.

-Mumtaz A, Anees M, Fatima S et al. Serum Zinc and Copper levels in nephrotic syndrome patients. *Pak J Med Sci*, 2011;27(5):1173-1176.

-Sherali AR, Moorani KN, Chishty SH et al. Zinc supplement in reduction of relapses in children with steroid sensitive nephrotic syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2014;24(2):110-3.

-Tulpar S, Gunduz Z, Sahin U et al. Trace elements in children suffering from idiopathic nephrotic syndrome. *Eurasian J med*, 2014;46 (3):187-91.

**5. Unde și când a fost implementată:** Secția uronefrologie SCMC "V. Ignatenco", 01.09.2016.

**6. Eficacitatea implementării:** investigația biochimică a Zn în serul sanguin poate fi folosită ca marker clinic relevant pentru aprecierea severității procesului patologic, monitorizării evoluției bolii și eficacității tratamentului aplicat în glomerulonefrită la copii.

**7. Obiecții/propuneri:**

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

SCMC "V. Ignatenco"  
Șef secție uronefrologie

Burianov Vasilisa



Confederația  
Națională  
a Sindicatelor  
din Moldova



AGENȚIA DE STAT  
PENTRU PROPRIETATEA  
INTELECTUALĂ  
A REPUBLICII MOLDOVA



Uniunea Inventatorilor  
și Raționalizatorilor  
din Republica Moldova  
„Inovatorul”

# DIPLOMĂ

SE DECERNEAZĂ

**Dnei Angela CIUNTU,**

conferențiar universitar, Departamentul de Pediatrie, USMF „N. Testemițanu”

**LAUREAT AL CONCURSULUI REPUBLICAN  
„CEL MAI BUN RAȚIONALIZATOR AL ANULUI DIN REPUBLICA MOLDOVA”**



Oleg BUDZA, Președinte,  
Confederația Națională  
a Sindicatelor din Moldova

Lilia BOLOCAN, Director General,  
Agenția de Stat pentru Proprietatea Intelectuală  
a Republicii Moldova

23 iunie 2017, Chișinău



Nicanor SOLCAN, Președinte,  
Uniunea Inventatorilor și Raționalizatorilor  
din Republica Moldova „Inovatorul”





## CONFERINȚA NAȚIONALĂ de PEDIATRIE

URGENȚE PEDIATRICE. BOLI CRONICE LA COPIL.

București, 2-5 aprilie 2014

# DIPLOMA

Se acordă Premiul .....<sup>1</sup> pentru lucrarea (Comunicare Orală / Poster) cu titlul:  
P. NIVELUL NAG-B ÎN URINĂ LA COPII CU GLOMERULONEFRIȚ ACUTĂ.

Autori: ANGELA CIUNTU, JANA BERNIC, GAVRILOA VIERIU,  
RODICA ERENCIUC

susținută de Dl./Dna. RODICA ERENCIUC

În cadrul Conferinței Naționale de Pediatrie, București, 2-5 Aprilie 2014.

  
Prof. Dr. Marin BURLEA  
Președinte Societatea Română de Pediatrie



  
Prof. Dr. Adrian GEORGESCU  
Co-Președintele Conferinței





UMFT  
Universitatea de  
Medicină și Farmacie  
„Victor Babes”  
din Timișoara

## Premiul special

se acordă pentru lucrarea intitulată

ENZIMELE PLASMATICE ÎN URINĂ LA COPII CU GLOMERULONEFRITĂ ACUTĂ/SINDROM  
NETROTIC  
autorilor

REVENCO NINEL, CIUNTU ANGELA.

Președinte  
Societatea Română de Pediatrie  
Prof. Dr. Marin Burlea

951

Președinte  
Comitet de Organizare  
Prof. Dr. Liviu Pop

Timișoara 2-5 septembrie





KHARKIV NATIONAL  
MEDICAL UNIVERSITY

# DIPLOMA

is (are) awarded

*Chuntu A.D. Revenko N.E.*

*Bernik Zh. V.*  
for the best poster paper

at interregional scientific-practical conference  
of pediatricians

with international participation

**"Problems of diagnostics and treatment of children  
suffering from somatic pathology"**

devoted to 45th anniversary of organization  
of specialized hematological aid for children  
of Slobozhanschina

28th of March 2013 Kharkov

Rector Prof.



*[Signature]*  
Vladimir N. Lesovoy



SOCIETATEA ROMÂNĂ DE NEFROLOGIE

# DIPLOMĂ

Se acordă **Locul II**

D-lui/D-nei ..... *ANGELA CIUNTU* .....

pentru lucrarea prezentată în cadrul Sesiunii Postere,  
cu ocazia **Congresului Național de Nefrologie**,  
Iași, 15-17 octombrie 2015.

Prof. Dr. Adrian Covic  
PREȘEDINTE  
SOCIETATEA ROMÂNĂ DE NEFROLOGIE



## **DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII**

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Ciuntu Angela

Semnătura

Data



## CURRICULUM VITAE

**Ciuntu Angela**

**Data și locul nașterii:**

30 iulie 1965, Republica Moldova, r-nul Briceni, s. Berlinți

**Studii:**

- 1982-1989 Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Facultatea de Pediatrie, Chișinău 1989-1990
- Internatura la specialitatea Pediatrie, ICȘDOSM și C.



**Activitatea profesională:**

- 2011 Conferențiar universitar, Departamentul pediatrie, USMF „Nicolae Testemițanu”
- 2008-2011 Asistent universitar, Catedra Pediatrie a FPM, catedra Pediatrie nr.2, USMF „Nicolae Testemițanu”
- 1994-2008 Colaborator științific inferior, ICȘDOSM și C
- 1991-1992 Medic-specialist pediatru r-nul Cainari, s. Taraclia
- 1992-1994 Medic-specialist pediatru ato Sângera, Chișinău

**Stagieri și perfecționări profesionale:**

- 2002 Nefrologie pediatrică, USMF „Nicolae Testemițanu”;
- 2003 Actualități în procesul didactic, diagnostic și curativ în pediatrie. Patologia pulmonară a copilului. FPM catedra Pediatrie USMF „Nicolae Testemițanu”;
- 2004 Actualități în procesul didactic, diagnostic și curativ în pediatrie. Antibioticoterapia rațională în practica pediatrică. FPM catedra Pediatrie USMF „Nicolae Testemițanu”;
- 2005 Actualități în procesul didactic, diagnostic și curativ în pediatrie. Boli alergice la copii. FPM catedra Pediatrie USMF „Nicolae Testemițanu”;
- 2006 Actualități în procesul didactic, diagnostic și curativ în pediatrie. Tratamentul modern al maladiilor la copii. FPM catedra Pediatrie USMF „Nicolae Testemițanu”;
- 2010 Managementul maladiilor în baza Protocoalelor clinice în pediatrie. Chișinău;
- 2011 Stagiul profesional în nefrologie pediatrică, Cluj-Napoca, România;
- 2011 Training course on Pediatric Common Disease. Prevention and Treatment for Developing Countries, Changsha, China;
- 2011 Curs Suport Vital Avansat Pediatric (SVAP), Chișinău;
- 2012 Curs de formare a Formatorilor în Suportul Vital Avansat Pediatric (SVAP), Chișinău;
- 2014 Curs Suportul Vital Avansat Pediatric (SVAP), Chișinău;
- 2016 Curs de instruire „Urgențe Pediatriche în Nefrologie și utilizarea metodelor extracorporale de detoxicare”, Chișinău.

**Teza de doctor în științe medicale:** 2002, susținerea tezei de doctor în științe medicale cu tema: “Contribuții la elucidarea variantelor evolutive, tratamentului diferențiat și pronosticului glomerulonefritei primare la copii”.

**Domeniile de cercetare științifică:** Activitatea științifică a fost desfășurată în cadrul temelor științifice ale USMF "Nicolae Testemițanu", între anii 2003-2016, am studiat problemele legate de particularitățile clinico-evolutive ale glomerulonefritei la copii, metodele de diagnostic, tratament.

**Participări la foruri științifice internaționale:**

- Congresul V al igieniștilor, epidemiologilor și microbiologilor din Republica Moldova. Chișinău, Moldova, 2003;
- Congresul VI al Fiziologilor din Republica Moldova cu participare internațională. Chișinău, Moldova, 2005;
- International Congress Nephrology. Lion, Franța, 2008;
- Congresul V-lea al pediatriilor și neonatologilor din Republica Moldova cu participarea internațională. Chișinău, Moldova, 2009;
- Congresul III al Medicilor de Familie din Republica Moldova cu participare internațională. Chișinău, Moldova, 2012;
- Congresul V de Urologie, Dializă și Transplant Renal din Republica Moldova cu participare internațională. Chișinău, Moldova, 2011;
- IV Конгресс Педиатров стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развитие и питание». Lvov, Ucraina, 2012;
- The 4-th Congress of the Academy of Paediatric Societies. Istanbul, Turcia, 2012;
- XXV-a Conferință Națională Zilele Pediatriei Ieșene "N.N.Trifan", UMF "Gr.T.Popa". Iași, România, 2012;
- XII Российский Конгресс Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии. Moscova, Federația Rusă, 2013;
- VI-й Конгресс Педиатров и Неонатологов и V-й Конгресс Федерации Педиатров Стран СНГ. Chișinău, Moldova, 2013;
- Межрегиональная научно-рактическая конференция врачей-педиатров с международным участием «Проблемные вопросы диагностики и лечения детей с соматической патологией». Harcov, Ucraina, 2013;
- The XIX-th Session of the Balkan medical days and the second congress of emergency medicine of the Republic Moldova. Chișinău, Moldova, 2013;
- XII Российский Конгресс «Иновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». Moscova, Federația Rusă, 2013;
- Congresul VI a medicilor pediatri din țările CSE „Copilul și societatea: problemele sănătății, dezvoltarea și alimentația”. Minsk, Belarusia, 2014;
- Conferința Națională de Pediatrie. Urgențe în Pediatrie. Boli cronice în pediatrie. București, România, 2014;
- The 5<sup>th</sup> Congress of the European Academy of pediatric societies (EAPS). Barcelona, Spania, 2014;
- Conferința națională cu participare internațională „Actualități în pediatrie” consacrată celei de-a 70-a aniversări a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” Chisinau, Moldova, 2015;

- XII-lea Congres Național de Pediatrie cu participare Internațională. Timișoara, România, 2015;
- Congresul Național de Nefrologie. Iași, România, 2015;
- VI-lea Congres de Urologie, Dializă și Transplant Renal din Republica Moldova cu participare internațională. Chișinău, Moldova, 2015;
- Conferința Națională de Pediatrie. București, România, 2016;
- Conferința Națională de Nefrologie Interdisciplinară cu Participare Internațională. București, România, 2016;
- IV Конгресс Ассоциации нефрологов новых независимых государств (ANNIS) «Мультидисциплинарность и дифференциация направлений современной нефрологии». Minsc, Belorusia, 2016.

**Certificate de inovator:** 10

**Publicații la tema tezei:** La tema tezei au fost publicate 64 de lucrări științifice, inclusiv o monografie monoautor, 6 articole în reviste de circulație internațională, 18 articole în reviste naționale recenzate, 4 articole în culegeri științifice naționale, 12 comunicări rezumative în materialele congreselor internaționale, 13 teze la conferințe naționale, coautor a 2 manuale, 5 protocoale naționale, 3 îndrumări metodice, 36 din publicațiile menționate sunt cu titlu de monoautor.

**Afilieri:** Membru al Societății Urologilor și Nefrologilor din Republica Moldova  
 Membru al Societății Pediatrilor din Republica Moldova  
 Membru al Comisiei pe specialitatea Nefrologie al MS din Republica Moldova

**Cunoașterea limbilor:** Limba română, rusă, engleza – fluent.

**Date de contact:** Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”,  
 Departamentul de Pediatrie, str. Burebista 93, tel. 022523558, e-mail: angela.ciuntu@usmf.md