

ANGELA CIUNTU, NINEL REVENCO, JANA BERNIC

## FACTORUL STROMAL DERIVAT- 1 ȘI CD 40 ÎN URINĂ LA COPIII CU GLOMERULONEFRITĂ

*IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu",  
IMSP Institutul Mamei și Copilului, Departamentul Pediatrie*

### SUMMARY

#### STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 AND CD 40 IN URINE SAMPLE IN CHILDREN WITH GLOMERULONEPHRITIS

The aim of this study was to study the concentration of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and CD 40 in urine sample in 65 children with primary glomerulonephritis of clinical different evolutionary stages. Data from the study revealed that SDF-1 levels in urine increased 4,5-4,2 times (up to  $3,13 \pm 0,96$  ng / mM creatinine) in steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) and steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) versus the control group ( $0,69 \pm 0,16$  ng / mM creatinine). In the nephrotic form of chronic glomerulonephritis (CGN), the increase period was 1,8 times (up to  $1,22 \pm 0,16$   $\mu$ g / mM creatinine) of the SDF-1 level in the urine, and a practically twice reduction during remission (up to  $0,35 \pm 0,05$  ng / mM creatinine) compared to  $0,69 \pm 0,16$  ng / mM creatinine in the control group. Regarding the CD-40 level in the urine, in the onset of both – SSNS and SRNS, there is a marked increase, which exceeded 3.3-2.4 times the values recorded in the control group. During the remission period the partial recovery of the given index is registered, which demonstrates the persistence of the renal pathological process. Determination of SDF-1 and CD 40 levels in urine are non-invasive markers for the assessment of renal injury, differential diagnosis of clinical evolutionary stages, disease monitoring and, also, development of new strategies for renal protection treatment in glomerulonephritis in children.

**Keywords:** stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), CD 40, glomerulonephritis, chemokines, children.

### РЕЗЮМЕ

#### СТРОМАЛЬНЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ФАКТОР-1 И CD 40 В МОЧЕ У ДЕТЕЙ С ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

Было изучено концентрации фактора 1 стромальных клеток (SDF-1) и CD 40 в моче у 65 детей с первичным гломерулонефритом в различные клинические стадии развития заболевания. Данные исследования показали, что уровень SDF-1 в моче повышается в 4,5-4,2 раза (до  $3,13 \pm 0,96$  нг / мм креатинина) при стероид-чувствительном нефротическом синдроме (СЧНС) и стероид-резистентном нефротическом синдроме (СРНС) в сравнении с контрольной группой ( $0,69 \pm 0,16$  нг / мм креатинина). При нефротической форме хронического гломерулонефрита (ХГН) в период обострения уровень SDF-1 в моче повысился в 1,8 раза (до  $1,22 \pm 0,16$  мкг / мм креатинина) и практически вдвое снижался во время ремиссии (до  $0,35 \pm 0,05$  нг / мм креатинина) по сравнению с контрольной группой. Уровень CD-40 в моче в дебюте, как СЧНС, так и СРНС превышает в 3,3-2,4 раза значения, зарегистрированные в контрольной группе. В период ремиссии регистрируется частичное восстановление данного показателя, что свидетельствует о сохранении патологического процесса почек. Определение SDF-1 и CD 40 в моче может быть использовано в качестве неинвазивного метода для прогнозирования активности заболевания и мониторинга различных форм ГН, а также для разработки эффективных дифференцированных терапевтических стратегий у этих больных.

**Ключевые слова:** стромальный клеточный фактор 1 (SDF-1), CD 40, гломерулонефрит, хемокины, дети.

**Introducere.** Sindromul nefrotic (SN) reprezintă una dintre cele mai frecvente afecțiuni glomerulare la copii, după malformațiile congenitale ale rinichiilor și ale tractului urinar. În SN se atestă proteinurie masivă (raportul proteină urinară/creatinină  $\geq 2000$  mg/g ( $\geq 200$  mg/

mmol) sau proteină +++ la testul urinar "dipstick", hipoalbumemie  $\leq 25$  g/l și edeme [7]. Conform studiilor recente incidența SN la copii constituie 1,5 până la 16,9 cazuri, iar prevalența -16 cazuri la 100 000 de copii [2,8].

În prezent, cercetările științifice ne oferă beneficiile legate de evaluarea noilor biomarkeri care sunt folosiți atât pentru diagnostic, cât și pentru inițierea unui tratament țintit al maladiilor renale la copii. Printre diverși biomarkeri prezumtivi, 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 diagnostic și curativ al diverselor boli renale la copii, depistarea precoce, prognozarea pacienților cu risc crescut de a dezvolta boala renală cronică (BRC)[1,9].

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 prezentă în multe țesuturi și tipuri de celule, inclusiv rinichi, fiind indusă de o multitudine de stimuli proinflamatori, cum ar fi lipopolizaharide, TNF- $\alpha$  și IL-1. CXCL12 mediază efectele sale biologice prin intermediul receptorilor CXCR-4 și CXCR-7, care pot forma hetero- sau monodimeri și exercită o varietate de efecte biologice diferite. CXCR-4 este receptorul factorului derivat din celula stromală-1 (SDF-1) și reprezintă o moleculă cu o activitate chemotactică puternică pentru limfocite [13].

Efectele biologice majore ale SDF-1 sunt: inducerea motilității, reacțiile chemotactice, adeziunea celulară și cea crescută către molecula-1 vasculară de adeziune celulară, molecula 1 de adeziune intercelulară, fibrinogenul, inducerea metaloproteinazelor și a factorilor angiopoietici, precum proliferarea și păstrarea funcțiilor și structurilor celulare [13].

Printre moleculele de semnalizare implicate în dezvoltarea reacțiilor imune și a inflamației, un loc important îi revine sistemului de receptori CD40-CD40 ligand (CD40-CD40L). CD 40 prezintă o glicoproteină membranară care aparține superfamiliei receptorilor factorului de necroză tumorală. Expresarea CD40 și / sau CD40L a fost detectată în limfocite, monocite, trombocite, celulele endoteliale și musculare netede, fibroblaste, adipocite și alte tipuri de celule.

S-a demonstrat că interacțiunea dintre CD-40 și ligandul CD-40 (CD-40L) sporește expresia citokinelor, chemokinelor, metaloproteinazelor matriceale, factorilor de creștere și moleculelor de adeziune, în principal, prin stimularea factorului nuclear kappa B (NF-kB), participând astfel în numeroase căi inflamatorii, și contribuie la dezvoltarea mai multor procese fiziopatologice [4].

**Scopul studiului** constă în evaluarea concentrației SDF-1 și CD 40 în urină la copii cu glomerulonefrită la etapele clinico-evolutive ale bolii.

**Material și metode de investigație.** Au fost analizate prospectiv datele la 65 pacienți cu glomerulone-

frită primară, inclusiv 30 copii cu sindrom nefrotic steroid-sensibil (SNSS), 15 copii cu sindrom nefrotic steroid-rezistent (SNSR) și 20 copii cu glomerulonefrită cronică (GNC) forma nefrotică. Grupul de control l-au constituit 20 copii practic sănătoși.

Cercetările s-au efectuat la IMSP Institutul Mamei și Copilului (IM și C) și în Laboratorul Biochimie al IP USMF „Nicolae Testemițanu” pe baza probelor biologice colectate conform principiilor contemporane de cercetare, aprobate de Comitetul de Etică a Cercetării al IP USMF „Nicolae Testemițanu”. Vârsta medie a pacienților cu SN a constituit  $6,52 \pm 0,66$  ani, iar a pacienților cu GNC forma nefrotică -  $8,9 \pm 0,67$  ani.

Sindromul nefrotic steroid-sensibil (SNSS) a fost dominat de normalizarea analizei de urină în decursul a 4 săptămâni, mai rar 8 săptămâni, după administrarea glucocorticoizilor și instalarea remisiunii complete. Sindromul nefrotic steroid-rezistent (SNSR) a fost determinat în cazul menținerii proteinuriei până la un nivel  $< 3$  g/dl pe parcursul a 6-8 săptămâni de tratament cu prednisolon în doză de 2 mg/kg/24 h și efectuarea ulterioară a pulsterapie cu prednisolon în doză 20-30 mg/kg/24 h nr. 3[7].

Metoda de cuantificare a concentrației SDF-1, CD 40 în urină, s-a bazat pe procedeul ELISA-sandwich al firmei PeptoTech (SUA), conform protocoalelor oferite de producător. Pentru aprecierea diferenței statistice dintre indicii studiați ai loturilor investigate au fost utilizate metode cu aprecierea mărimii aritmetice medii [X], devierii medii pătrate, erorii medii a mărimii aritmetice medii  $[\pm m]$ . De asemenea, s-a utilizat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație  $p < 0,05$ .

**Rezultatele investigațiilor.** Manifestările clinice la pacienții cu SN, au constat în prezența edemelor generalizate, a micțiunilor rare, cefalee, vomă, macrohematurie, sindrom algic abdominal, dureri în regiunea lombară, ca rezultat al leziunii renale acute. Datele paraclinice au arătat că nivelul proteinelor serice totale, al albuminei, colesterolului, lipidelor totale,  $\beta$ -lipoproteidelor, proteinuriei au fost mai exprimate în SNSR, comparativ cu SNSS, date similare cu rezultatele altor studii [12].

**Tabelul 1. Evaluarea markerilor biochimici în ser la pacienții cu SN în debut**

Parametrii biochimici	SNSS	SNSR
Proteină totală, g/l	$53,3 \pm 1,27$	$51,13 \pm 1,49$
Albumină, %	$35,72 \pm 3,56$	$20,76 \pm 2,63$
Ureea, mmol/l	$6,84 \pm 0,80$	$5,12 \pm 0,48$
Creatinină, mmol/l	$0,064 \pm 0,006$	$0,054 \pm 0,037$
Lipide totale, g/l	$9,20 \pm 1,13$	$12,56 \pm 1,49$
Colesterol total, mmol/l	$7,43 \pm 0,34$	$10,05 \pm 0,95$
$\beta$ -lipoproteide, u.c.	$95,07 \pm 3,64$	$107,23 \pm 6,88$
Protrombină, %	$92,95 \pm 1,096$	$92,50 \pm 1,71$
Fibrinogen, g/l	$4,59 \pm 0,38$	$6,69 \pm 1,88$

Din tabelul 1 reiese că la pacienții cu GNC forma nefro-

tică probele biologice ale sângelui au indicat hipoproteinemie până la  $52,7 \pm 1,95$  g/l, majorarea indicilor metabolismului lipidic (lipide totale -  $8,39 \pm 1,11$  g/l, colesterolul -  $8,11 \pm 0,81$  mmol/l,  $\beta$ -lipoproteidele -  $87,0 \pm 6,82$  u.c). Analiza sumarului urinei a evidențiat în SNSS proteinurie până la  $4,65 \pm 0,6$  g/l și până la  $7,15 \pm 0,09$  g/l în SNSR. În

GNC forma nefrotică analiza sumarului urinei a relevat proteinurie până la  $4,26 \pm 0,89$  g/l.

Datele expuse în tabelul 2, relevă că nivelul SDF-1 în urină a crescut de 4,5 -4,2 ori (până la  $3,13 \pm 0,96$  ng/mM creatinină) în SNSS și SNSR, față de  $0,69 \pm 0,16$  ng/mM creatinină în grupul de control.

Tabelul 2. Nivelul chemokinelor SDF-1 și CD 40 în urină la copiii investigați

Grupuri de studiu	SDF-1 (ng/mM creatinină)		CD 40 (ng/mM creatinină)	
	acutizare	remisiune	acutizare	Remisiune
GNA SNSS	$3,13 \pm 0,96^{***}$ 453,6%	$1,04 \pm 0,16$ 150,7%	$161,2 \pm 43,33^{**}$ 327,0%	$70,0 \pm 8,89$ 142,0%, $p_1 < 0,01$
GNA SNSR	$2,92 \pm 0,62^{***}$ 423,2%	-	$120,2 \pm 34,24^{**}$ 243,8%	$78,1 \pm 9,24$ 158,4%, $p_1 > 0,05$
GNC forma nefrotică	$1,22 \pm 0,16^{**}$ 176,8%	$0,35 \pm 0,05$ 50,7%	$51,1 \pm 5,21$ 103,7%	$27,0 \pm 2,83$ 54,8%, $p_1 < 0,01$
Control	$0,69 \pm 0,16$		$49,3 \pm 35,39$	

**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.

În GNC forma nefrotică, perioada de acutizare s-a atestat o creștere de 1,8 ori (până la  $1,22 \pm 0,16$  pg/mM creatinină) a nivelului SDF-1 în urină și o reducere practic de 2 ori (până la  $0,35 \pm 0,05$  ng/mM creatinină) în perioada remisiunii, față de  $0,69 \pm 0,16$  ng/mM creatinină în grupul de control. În același timp au fost semnalate corelații pozitive puternice între SDF-1 și CD-40 ( $r_{xy} = 0,989$ ,  $p < 0,001$ ).

Din datele tabelului 2 rezultă că, atât în perioada de debut în SNSS, cât și în SNSR, s-a atestat 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.

**Discuții.** 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 [13]. Cercetările recente relevă modelul de exprimare și funcțiile sistemului SDF-1/CXCR4 în rinichii normali, precum și după ischemie/reperfuție indusă de insuficiența renală acută [14]. Rezultatele obținute au demonstrat că SDF-1 (CXCL12) renal reprezintă un mediator important al migrării celulelor-CXCR4 prezente în rinichii afectați de procesul patologic. Totodată, aceste studii indică faptul că SDF-1 este un factor major implicat în reparația rinichilor prin recrutarea de celule implicate în regenerare, inclusiv celule endoteliale precursorare și celule stem progenitoare [13].

SDF-1 (CXCL12) susține integritatea vasculară, similar VEGF, induce angiogeneza, promovează supraviețuirea celulară. 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 2 și insuficiența renală acută ischemică [11].

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 [11].

Biopsiile umane în cadrul nefropatiei IgA și glomerulonefritei extracapilare relevă expresia înaltă a CXCR 4, detectată prin imunofluorescență în leziunile hiperplastice asociate cu celulele progneratoare CD 24+. Contrar acestor date, la pacienții cu nefropatie membranoasă și diabet, expresia CXR 4 este vagă. Totuși în modelele experimentale de nefropatie diabetică podocitele au produs cantități mari de CXCL12 [10]. Nivelele serice ridicate ale anticorpilor anti-CD 40 au fost raportate recent în asociere cu recurențele proteinuriei în forme mai severe ale SN cu schimbări minime care s-au soldat cu glomeruloscleroză focal-segmentară (GSFS) [5].

Pe modelele experimentale de nefroză indusă de adriamicină și alte stări experimentale autoimune și degenerative, blocarea CD 40-CD 40L a demonstrat efect protectiv renal. S-a constatat că CD 40L are potențial de creștere a permeabilității renale și este considerat în prezent ca factor de permeabilizare la pacienții cu glomeruloscleroză.

Activarea receptorului CD 40 de pe epiteliul tubular proximal al rinichilor asociază fibroză și inflamația în modelele experimentale de leziuni renale. Legarea CD 40 la ligandul CD40 exprimat pe limfocitele T și trombocite declanșează un proces inflamator cu consecințe majore. Cartografia epitopilor a sugerat modificarea imunogenității CD 40 la pacienții cu glomeruloscleroză și a anticorpilor anti-CD 40 cu scopul identificării pacienților cu risc crescut de incompatibilitate posttransplant [5].

Stabilirea semnificației anticorpilor anti-CD 40 este importantă în înțelegerea mecanismelor fiziopatologice ale proteinuriei; o altă posibilitate ar fi și saturarea cu CD 40 pe celulele prezentatoare de antigeni, ce ar permite creșterea nivelului de liganzi liberi CD 40 (sCD40L) capabili de a interacționa cu CD 40 în podocite. Astfel, CD 40 reflectă un ansamblu de stări inflamatorii în care sunt implicate celulele prezentatoare de antigeni, care imită SN cu schimbări minime în fazele timpurii și tardive ale bolii [3].

Unele studii demonstrează că interacțiunile CD40-CD40L pot ameliora angiogeneza indusă de factorul vascular endotelial de creștere (VEGF) și migrarea celulelor endoteliale. Totodată, CD40-CD40L sunt implicate în reglarea semnalizării proceselor cu radicali liberi de oxigen, ceea ce ar putea facilita elaborarea unor metode de medicație a bolilor inflamatorii [6].

**Concluzii:** Din studiul propriu reiese că evaluarea nivelului SDF-1 și CD 40 în urină reprezintă markeri noninvazivi în aprecierea injuriei renale, permite diferențierea diagnostică a diferitor variante ale maladiei, monitorizarea evoluției, prognozarea complicațiilor, a exodului bolii, precum și elaborarea strategiilor noi de tratament renoprotector în glomerulonefrită la copii.

### Bibliografie

1. Ana Cristina Simões e Silva, André Barreto Pereira, Mauro Martins Teixeira, Antônio Lúcio Teixeira. Chemokines as Potential Markers in Pediatric Renal Diseases In: Disease Markers, 2014, Article ID 278715, p.9
2. Banh THM., Hussain-Shamsy N., Patel V. et al. Ethnic differences in incidence and outcomes of childhood nephrotic syndrome. In: Clin J Am Soc Nephrol. 2016, 11:1760–8.
3. 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;183(2):166-74.
4. Colucci M., Corpetti G., Emma F., Vivarelli M. Immunology of idiopathic nephrotic syndrome. In: Pediatr Nephrol. 2018;33(4):573-584.
5. 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;1, 6(256): 256ra136.
6. 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; 26(9):2983-8.
7. Kidney Disease: Glomerulonephritis Work Group. Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO clinical practice guideline for Glomerulonephritis. In: Kidney Int Suppl., 2012; 2: 139-274.
8. Noone D.G., Iijima K., Parekh R. Idiopathic nephrotic syndrome in children. Lancet. 2018;7;392(10141):61-74.
9. Pereira W.de 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;63:1-12.
10. Rizzo P., Perico N., Gagliardini E. et al. Nature and mediators of parietal epithelial cell activation in glomerulonephritides of human and rat. In: Am J Pathol. 2013;183(6):1769-1778.
11. Romoli S., Angelotti M.L., Antonelli G., Kumar Vr. S. et al. CXCL12 blockade preferentially regenerates lost podocytes in cortical nephrons by targeting an intrinsic podocyte-progenitor feedback mechanism. In: Kidney Int. 2018;94(6):1111-1126.
12. 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;3(4):1297-1300.
13. 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;1(3):87-89.
14. 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; 9(12): e114564.