

Echipa de cercetători de la Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa”, Iași, a raportat 4 pacienți cu AJI care au urmat tratament cu Tocilizumab. Evaluarea eficacității tratamentului a fost obiectivată de un răspuns ACR Pedi 50 la 3 luni după luarea acestui medicament. La 6 luni de la inițierea terapiei biologice, pacienții au prezentat un răspuns ACR Pedi 70, iar la 9 luni un răspuns ACR Pedi 90 [8].

#### Concluzii

1. Pe parcursul tratamentului cu Tocilizumab la copiii cu artrită juvenilă idiopatică forma sistemică s-a determinat ameliorare clinică vădită prin scăderea numărului articulațiilor dureroase și tumefiate, evaluării globale a bolii de către pacient și medic și a scorului CHAQ.

2. Indicii paraclinici au înregistrat scăderea procesului activ inflamator în urma tratamentului cu Tocilizumab.

#### Bibliografie

1. **Thomson W., Barrett J. H., Donn R.** Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. *Rheumatology.*, 2002. vol. 41. p. 1183-1189.

2. **Lin C. F., Lei H. I., Lin Y. S.** Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. *Curr. Pharm. Des.*, 2004. vol. 10. nr. 2. p. 213-221.

3. **Lin C. F., Lei H. I., Shian A. L.** Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein-1 via production of nitric oxide. *J. Immunol.*, 2002. vol. 169. nr. 2. p. 657-664.

4. **Kenny T. P., Shu S. A., Moritoki Y.** Cocoa flavanols and procyanidins can modulate the lipopolysaccharide activation of polymorphonuclear cells in vitro. *J Med Food.*, 2009. vol. 12. nr. 1. p. 1-7.

5. **Hahn Y. S., Kim J. G.** Pathogenesis and clinical manifestations of juvenile rheumatoid arthritis. *Korean J Pediatr.*, 2010. vol. 53. nr. 11. p. 921-930.

6. **American College of Rheumatology** 2011 Recommendations for the treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis, 2011. [www.rheumatology.org](http://www.rheumatology.org)

7. **European Medicines Agency**, 2016. [ema.europa.eu/Find medicine/Human medicines/European Public Assessment Reports](http://ema.europa.eu/Find%20medicine/Human%20medicines/European%20Public%20Assessment%20Reports)

8. **Moraru E., Chiran D.** Contribuții la terapia cu agenți biologici în artrita juvenilă. Rezumatul tezei de doctorat. Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa”, Iași. 2014. 28 p.

Ciuntu Angela  
**NIVELUL MOLECULELOR DE SEMNALIZARE CELULARĂ ÎN URINĂ  
LA COPII CU GLOMERULONEFRITĂ**

*Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Departamentul Pediatrie  
(director – dr. hab. medicină, prof. univ. Ninel Revenco),  
IMSP Institutul Mamei și Copilului (Director – dr. șt. med., conf. univ. S. Gladun)*

**SUMMARY**

**THE LEVEL OF CELL SIGNALING MOLECULES IN THE URINE OF CHILDREN WITH GLOMERULONEPHRITIS**

*Study included 60 children with primary glomerulonephritis, including 25 children with nephritic syndrome, 20 children with steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) and 15 children with steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) examined at different clinical and evolutionary stages of the disease. The control group constituted 20 basically healthy children. The results of current study showed high levels of cell signaling molecules (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) during clinical manifestations, that constitute a significant moment due to their major role in immunopathogenesis mechanism of proteinuria in SN. Determination of urinary concentrations of signaling molecules may be useful as a predictive non-invasive method used for the estimation of disease activity and monitoring of disease progression in children with different types of glomerulonephritis and for developing effective and differentiated therapeutic strategies in these patients.*

## УРОВЕНЬ КЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В МОЧЕ ДЕТЕЙ С ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

В исследование были включены 60 детей с первичным гломерулонефритом (ГН), в том числе, 25 детей с нефритическим синдромом, 20 детей с стероид-чувствительным нефротическим синдромом (СЧНС) и 15 детей с стероид резистентным нефротическим синдромом (СРНС), исследованных на различных клинико-эволютивных стадиях развития заболевания. Контрольная группа составила 20 практически здоровых детей. Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня всех изученных клеточных сигнальных молекул (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) в периоде клинических проявлений заболевания играющий важную роль в механизме иммунопатогенеза протеинурии при НС. Определение мочевых концентраций клеточных сигнальных молекул может быть полезным в качестве неинвазивного метода оценки активности заболевания и контроля за развитием заболевания у детей с различными вариантами ГН, а также для разработки эффективных дифференцированных терапевтических стратегий у этих пациентов.

**Cuvinte-cheie:** glomerulonefrită, molecule de semnalizare celulară, biomarkeri, citokine, copii.

**Introducere.** Sindromul nefrotic idiopatic (SNI) este o boală multifactorială, caracterizată prin proteinurie, hipalbuminemie, edem și hiperlipidemie [8]. Pierderea urinară masivă a proteinelor serice poate provoca o stare de hipercoagulabilitate, dereglări de fluide, dezechilibre electrolitice și susceptibilitatea la infecții [10]. Rolul sistemului imunitar în SNI a fost demonstrat în studii clinice și experimentale [11]. Unele studii au arătat o asociere între diferite citokine și proteinurie, și au declarat că factorii de permeabilitate glomerulară pot fi responsabili pentru instalarea sindromului nefrotic (SN) la pacienți sau în modelele pe animale. Prin urmare, creșterea nivelului citokinelor IL-1, IL-12 și factorului de necroză tumorală alfa (TNF- $\alpha$ ), prezintă importanță în inițierea și recurența SN [1].

IL-1 $\beta$  joacă un rol important în inflamația acută, este sintetizată, în principal, de macrofagele activate (stimulate antigenic), de limfocitele B și celulele NK (natural killer), acționează nu numai asupra progresării glomerulonefritei, stimulând sinteza moleculelor de adeziune celulară (ICAM-1), dar participă și la formarea fibrozei interstițiului renal [3]. 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. IL-6 determină atât inflamațiile acute, cât și cele cronice. Este sintetizată de celulele endoteliale și mezangiale ca răspuns la o varietate de agonști: Ag, mitogene, endotoxine, IL-1, TNF- $\alpha$  [2]. IL-8, cunoscut de asemenea sub numele de factor chemotactic neutrofil, induce o serie de răspunsuri fiziologice necesare pentru migrație și fagocitoză, cum ar fi creșterea intracelulară de Ca<sup>2+</sup>, exocitoza (de exemplu, eliberarea de histamină) și explozia respiratorie și, de asemenea este un promotor puternic al angiogenezei [4].

Factorul de necroză tumorală  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) este o citokină pleiotropă cu proprietăți proinflamatorii și imunoreglatoare în maladiile renale. În rinichii normali, TNF- $\alpha$  de obicei nu a fost detectat. Cu toate acestea, expresia TNF- $\alpha$  a fost demonstrată în celulele endote-

liale, mezangiale și epiteliale glomerulare precum și în celulele tubulare după stimulare în timpul inflamației, fapt documentat în studii *in vitro* și *in vivo*[9].

Lipsește informații complexe privind modificările acestor citokine în variantele clinico-evolutive ale glomerulonefritei (GN).

**Scopul** studiului constă în evaluarea concentrației de molecule de semnalizare celulară la copiii cu glomerulonefrită la etapele clinico-evolutive ale bolii.

**Material și metode.** 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” (aviz favorabil din 13.05.2015, proces verbal nr.55). Studiul a inclus 60 copii cu glomerulonefrită primară, inclusiv 25 copii cu sindromul nefrotic, 20 copii cu sindromul nefrotic steroid-sensibil (SNSS) și 15 copii cu sindromul nefrotic steroid-rezistent (SNSR). Grupul de control l-au constituit 20 copii practic sănătoși.

Diagnosticul GN s-a bazat pe criteriile clinico-paraclinice și explorări biochimice special selectate. Sindromul nefrotic (SN) a fost diagnosticat în prezența edemelor, proteinuriei masive (>40 mg/m<sup>2</sup>/h sau raportului proteină/creatinină urinară > 2,0 mg/mg) și hipalbuminemiei (<2,5 g/dl)[7].

Metoda de cuantificare a citokinelor, s-a efectuat prin procedeul ELISA-sandwich. Pentru aprecierea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate au fost utilizate metode statistice 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  $p < 0,05$  (StatsDirect statistical software, version 1.9.5, 2001).

**Rezultate.** Vârsta medie a pacienților cu glomerulonefrită acută (GNA) sindrom nefrotic a constituit 9,1 $\pm$ 0,36 ani, a celor cu GNA sindrom nefrotic 6,52 $\pm$ 0,66 ani. Evaluarea clinică a pacienților cu GNA sindrom nefrotic în perioada manifestărilor clinice a

semnalat prezența edemelor de diferit grad localizate pe față, abdomen, gambe, sindrom algic abdominal, hipertensiunea arterială crescută, urina de culoarea „spălăturii de carne”, oligoanurie, vomă, febră 38° pe parcursul a 3-4 zile. Manifestările clinice la copiii cu SN în perioada debutului maladiei au fost determinate de edeme generalizate, până la anasarcă, hipoproteinemie până la 53,30±1,27 g/l, hiperlipidemie până la 9,20±1,13 g/l, proteinurie până la 5,5±0,66 g/l.

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 1β (IL-1β), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8), factorul necrozei tumorale α (TNF-α) la diferite etape clinic-evolutive ale maladiei.

Datele despre nivelul moleculelor de semnalizare celulară în urină la copiii cu glomerulonefrită sunt redate în tabelul 1. La pacienții cu GNA sindrom nefritic în perioada manifestărilor clinice nivelul IL-1β în urină a crescut de 1,4 ori (până la 15,9±5,93 pg/mM creatinină), față de grupul de control (11,4±0,45 pg/

mM creatinină), normalizându-se practic în perioada de remisiune. Totodată, s-au înregistrat valori medii mai mari ale concentrației IL-1β în urină la pacienții cu SNSR comparativ cu SNSS. În perioada remisiunii în GNA sindrom nefritic nivelul IL-1β în urină practic a atins valorile de control. Nivelul crescut de IL-1β determinat în studiu este semnificativ prin rolul său major în mecanismul imunopatogenic al proteinuriei.

Datele expuse în tabelul 1 arată că în GNA sindrom nefritic, în perioada manifestărilor clinice nivelul IL-6 în urină a crescut de 2,1 ori (până la 19,6±1,04 pg/mM creatinină), comparativ cu valorile de control (9,5±0,41 pg/mM creatinină). De notat că pacienții cu SNSR au prezentat valori medii ale IL-6 în urină mult mai mari, comparativ cu cei cu SNSS. Astfel, nivelul IL-6 în urină a crescut de 4,2 ori (până la 39,7±2,20 pg/mM creatinină) în SNSR, perioada de debut, pe când în SNSS a crescut de 3 ori (până la 28,7±1,51 pg/mM creatinină), față de 9,5±0,41 pg/mM creatinină în grupul de control. În perioada remisiunii nivelul IL-6 în urină practic se normalizează în GNA sindrom nefritic, dar se majorează de 6,4 ori în SNSS.

Tabelul 1.

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

Loturile de studiu	IL-1β		IL-6	
	acutizare	remisie	acutizare	remisie
GNA sindrom nefritic	15,9±5,93	13,8±1,60 $p_1 > 0,5$	19,6±1,04***	12,78±1,12* $p_1 < 0,05$
GNA sindrom nefrotic SS	21,9±1,57***	15,3±0,84** $p_1 < 0,01$	28,7±1,51***	60,4±2,87*** $p_1 < 0,001$
GNA sindrom nefrotic SR	31,64±2,94*** $p_2 > 0,05$	-	39,7±2,20*** $p_2 < 0,01$	-
Grupul de control	11,4±0,45		9,5±0,41	

**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.

Tabelul 2.

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

Loturile de studiu	IL-8		TNF-α	
	acutizare	remisie	acutizare	remisie
GNA sindrom nefritic	38,1±4,73	28,3±5,02 $p_1 < 0,5$	52,4±3,77***	33,4±4,39 $p_1 < 0,01$
GNA sindrom nefrotic SS	130,7±14,28***	86,0±8,94*** $p_1 < 0,05$	95,8±9,85***	59,9±7,37*** $p_2 < 0,05$
GNA sindrom nefrotic SR	267,3±21,87*** $p_2 < 0,001$	-	135,2±7,83*** $p_2 < 0,01$	82,3±10,34 $p_1 < 0,01$
Grupul de control	28,1±3,71		33,3±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.

Rezultatele evaluării concentrației IL-8 în urină la copiii cu GN sunt prezentate în tabelul 2. S-a constatat

că în GNA sindrom nefritic în perioada manifestărilor clinice nivelul IL-8 în urină s-a majorat cu 36%,

dar aceste modificări s-au dovedit a fi fără relevanță statistică ( $p > 0,05$ ). Totodată, în SNSR, perioada de debut s-a înregistrat un nivel crescut al IL-8 în urină ce depășea de 9,5 ori, iar în SNSS – de 4,6 ori valorile de control. În perioada remisiunii nivelul IL-8 în urină rămâne majorat în toate variantele clinice ale GN, comparativ cu grupul de control.

Din datele tabelului 2 rezultă că TNF- $\alpha$  în urină crește în toate loturile de pacienți. Nivelul TNF- $\alpha$  în urină a crescut mai pronunțat în SNSR perioada de debut, comparativ cu SNSS, iar în perioada remisiunii nivelul TNF- $\alpha$  în urină, deși scade ușor, rămâne la valori majorate în aceste grupuri de pacienți. Astfel, în studiul de față s-au determinat niveluri crescute ale moleculelor de semnalizare celulară – interleukinelor, moment semnificativ prin rolul lor major în mecanismul imunopatogenic al proteinuriei în SN.

**Discuții.** Rezultatele studiului nostru relevă importanța clinico-diagnostică a determinării concentrației moleculelor de semnalizare celulară în urină pentru depistarea precoce a afectării renale la copiii cu GN, notând o creștere semnificativă a concentrațiilor urinare ale acestora. Un important efect al creșterii IL-1 $\beta$  în asocieră cu IL-6 este creșterea 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 potențială sursă majoră a citokinelor inflamatorii, în special IL-1 $\beta$ , IL-6, mai rar decât celulele glomerulare rezidente.

Expresii semnificativ crescute ale TNF- $\alpha$  au fost depistate în specițiile din biopsiile renale, iar concentrațiile ridicate ale acestei citokine au fost demonstrate în serurile și în urina pacienților cu diferite tipuri de GN. În modelele experimentale de nefrită nefrotică, administrarea exogenă a TNF- $\alpha$  a contribuit la exacerbarea injuriei glomerulare [5]. TNF- $\alpha$  stimulează eliberarea unor mediatori inflamatori, incluzând interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), proteina chemoatractantă monocitară (MCP-1) și factorul de creștere tumorală TNF- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), principalii factori de reglementare ai sintezei de collagen [12].

Expresia IL-6 în urină și țesuturile renale a fost corelată cu proteinuria în SNSM la animale. De asemenea, nivelurile serice de IL-8 au fost mai mari în faza inițială a SN comparativ cu faza de remisiune la copiii cu SNSS, iar concentrațiile urinare ale IL-8 au fost corelate cu proteinuria la copii cu SN [6,13].

**Concluzii.** 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.

#### Bibliografie

1. **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.

2. **Braun GS., Nagayama Y., Maruta Y et al.** IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN. J Am Soc Nephrol. 2016;27(1):132-42.

3. **Charles L. Edelstein.** Biomarkers of Kidney Disease, Chapter 10 – Biomarkers in Glomerular Disease, 2011, p.367–383.

4. **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; 354 (6):610–621.

5. **Ernandez T., Mayadas T.N.** Immunoregulatory role of TNFalpha in inflammatory kidney diseases. In: Kidney Int., 2009;76(3), p.262-76.

6. **Kanai T., Yamagata T., Momoi MY.** Macrophage inflammatory protein-1beta and interleukin-8 associated with idiopathic steroidsensitive nephrotic syndrome. Pediatr Int. 2009;51:443–447.

7. **Kidney Disease: Glomerulonephritis Work Group. Improving Global Outcomes (KDIGO).** KDIGO clinical practice guideline for Glomerulonephritis., Kidney Int Suppl. 2012;2:139–274.

8. **Seong Heon Kim., Se Jin Park., Kyoung Hee Han et al.** Pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome: an immunological concept. Korean J Pediatr., 2016; 59(5): 205–211.

9. **Oh J., Kemper MJ.** Minimal change (steroid sensitive) nephrotic syndrome in children: new aspects on pathogenesis and treatment. Minerva Pediatr. 2012;64:197–204.

10. **Park SJ., Shin JI.** Complications of nephrotic syndrome. Korean J Pediatr., 2011;54:322–328.

11. **Pereira Wde F., Brito-Melo GE., Guimarães FT et al.** The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. Inflamm Res., 2014;63:1–12.

12. **Raveh D., Shemesh O., Ashkenazi YJ et al.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  blocking agent as a treatment for nephrotic syndrome. In: Pediatr Nephrol., 2004;19:1281-1284.

13. **Souto MF., Teixeira AL., Russo RC et al.** Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. Pediatr Res. 2008;64:637–642.