

ANGELA CIUNTU^{1,2}, NINEL REVENCO^{1,2}, JANA BERNIC^{1,2}

SEMNIIFICAȚIA CLINICĂ A MARKERILOR STRESULUI OXIDATIV ÎN EVOLUȚIA CLINICĂ A GLOMERULONEFRITEI LA COPII

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

²IMSP Institutul Mamei și Copilului

SUMMARY

CLINICAL SIGNIFICANCE OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN THE EVOLUTION OF GLOMERULONEFRITE IN CHILDREN

Key words: oxidative stress, nitric oxide, glomerulonephritis, children

The aim of the study is to evaluate the urinary concentration of nitric oxide metabolites in children with glomerulonephritis in different stages of the disease. The prospective study of them data on 80 patients with primary glomerulonephritis, including 20 children with steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS), 15 children with steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS), 25 children with acute glomerulonephritis (GN) nephritic syndrome, and 20 children with chronic glomerulonephritis (CG) nephrotic form, who were examined during the exacerbation and remission. The control group consisted of 20 healthy children.

Nitric oxide metabolites concentrations represent noninvasive biomarkers for assessing the degree of oxidative stress in glomerulonephritis. The levels of oxidative stress is useful to predict complications, monitoring the efficacy of therapeutic strategies aimed at reduce the intensity of cellular oxidative stress and to contribute to the prevention of associated renal injury.

РЕЗЮМЕ

ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА У ДЕТЕЙ

Ключевые слова: окислительный стресс, оксид азота, гломерулонефрит, дети

Целью исследования является оценка концентрации метаболитов оксида азота в моче у детей с гломерулонефритом в различных клинических стадиях заболевания. Проспективное исследование включило данные о 80 пациентах с первичным гломерулонефритом, в том числе 20 детей с стероид-чувствительным нефротическим синдромом (СЧНС), 15 детей с стероид-резистентным нефротическим синдромом (СРНС), 25 детей с острым гломерулонефритом (ГН) нефритным синдромом и 20 дети с хроническим гломерулонефритом (ХГ) нефротической формы, которые были обследованы в период обострения и ремиссии. Контрольную группу составили 20 практически здоровых детей.

Определение концентрации метаболитов оксида азота представляет собой неинвазивные биомаркеры для оценки степени окислительного стресса при гломерулонефрите, прогнозирования осложнений, мониторинга эффективности терапевтических стратегий, направленных на снижение интенсивности клеточного окислительного стресса и профилактику ассоциированного повреждения почек.

Introducere. Oxidul nitric (NO) este o moleculă mesager universală, care participă în reglarea a numeroase funcții biologice, reprezentând un puternic vasodilatator endogen în reglarea funcțiilor renale. Sinteza NO se produce pe două căi distincte: oxidul nitric sintazic (NOS)-independent și NOS-dependent[6]. Cea de-a doua cale de sinteză implică participarea NOS, ce transformă L-arginina în NO.

Există tot mai multe dovezi că NO reprezintă unul dintre cei mai importanți modulatori paracrini ai funcțiilor renale, cum ar fi fluxul renal sangvin global și regional, autoreglarea renală, filtrarea glomerulară, secreția de renină și excreția de sare. NO este implicat în patogeneza mai multor maladii renale, inclusiv sindromul nefrotic, leziunea renală acută, nefropatia diabetică, dar și în efectele nefrotoxice ale unor preparate medicamentoase [5,9,10].

Au fost identificate trei izoforme NOS distincte: izoforma endotelială (eNOS sau NOS III), inductibilă (iNOS sau NOS II) și neuronală (nNOS sau NOS I). Toate cele trei izoforme NOS sunt prezente în rinichi. Astfel, izoforma eNOS este abundentă în mucoasa endotelială a patului renal arterial și capilar, precum și în epiteliul celulelor ductelor, în timp ce izoforma nNOS este puternic expresată în macula densa și, într-o măsură mai mică, în arteriolele eferente și celulele epiteliale ale ansei ascendente groase, celulele mesangiale și neuronii intrarenali. Cea de-a treia formă – iNOS – este prezentă în celula epitelială a ansei ascendente groase, tubul proximal și ductul colector, precum și în mușchiul neted vascular, celulele interstițiale mesangiale și medulare [7].

Eliberarea izoformelor eNOS și iNOS-derivată din NO are un rol esențial în menținerea efectului vasodilatator, prin reglarea rezistenței vasculare renale și sistemice, a tensiunii arteriale și a perfuziei tisulare. Astfel, NO intrarenal prezintă efect diuretic endogen prin reglarea excreției renale de sodiu și apă. NO produs de către iNOS în celulele epiteliale tubulare promovează efectul natriuretic prin inhibarea reabsorbției de sodiu. Iar, NO derivat din nNOS în macula densa atenuează vasoconstricția arteriolară aferentă mediată de feedback tubuloglomerular ca răspuns la conținutul de Na în lumen, facilitând astfel excreția de Na și filtrarea glomerulară [1]. Totuși, există studii limitate referitoare la impactul NO la pacienții cu glomerulonefrită.

Scopul studiului constă în evaluarea concentrației metaboliților oxidului nitric în urină la copiii cu glomerulonefrită în etapele clinico-evolutive ale bolii.

Material și metode de investigație. Au fost analizate prospectiv datele a 80 pacienți cu glomerulonefrită primară, inclusiv 20 de copii cu sindromul nefrotic steroid-sensibil (SNSS) și 15 copii cu sindromul nefrotic steroid-rezistent (SNSR), 25 de copii cu glomerulonefrită acută (GNA) sindrom nefrotic și 20 de copii cu glomerulonefrită

cronică (GNC) formă nefrotică, care au fost examinați în perioada de acutizare și de remisiune. Grupul de control l-au constituit 20 de 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” cu analiza probelor biologice colectate conform principiilor contemporane de cercetare, aprobate de Comitetul de Etică a Cercetării al IP USMF „Nicolae Testemițanu”. Diagnosticul GN s-a bazat pe criteriile clinico-paraclinice și pe explorări biochimice special selectate. Sindromul nefrotic (SN) a fost diagnosticat în prezența edemelor, proteinuriei masive ($>40 \text{ mg/m}^2/\text{h}$ sau raportul proteină/creatinină urinară $>2,0 \text{ mg/mg}$) și a hipoalbuminemiei ($<2,5 \text{ mg/dl}$) [8].

Dozarea metaboliților oxidului nitric – NO_2 și NO_3 – în materialul biologic s-a efectuat după deproteinizarea materialului biologic conform procedurii descris de Metelskaia V. A., Tumanova N. G. [11].

Pentru aprecierea diferenței semnificative dintre indicii studiați ai loturilor comparate au fost utilizate metode statistice cu aprecierea mărimii aritmetice medii [X], a devierii medii pătrate, erorii medii a mărimii aritmetice medii [$\pm m$]. De asemenea, s-au utilizat testul statistic nonparametric „U Mann-Whitney” și pragul de semnificație $p < 0,05$.

Rezultatele investigațiilor. Sistemul de oxidare cu radicali liberi a fost apreciat prin estimarea nivelului metaboliților oxidului nitric NO_2 și NO_3 în urină la copii cu diferite variante ale glomerulonefritei. Datele prezentate în tabelul 1 demonstrează modificările conținutului sumar de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ în urină care au crescut în toate loturile de pacienți.

Tabelul 1. Concentrația metaboliților NO (suma $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ și nivelul de NO_2) în urină la copiii cu glomerulonefrită ($\mu\text{M/mM}$ creatinină)

| Grupuri de studiu | Suma $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ | | NO_2 | |
|----------------------|---|--|---|---|
| | acutizare | remisiune | acutizare | remisiune |
| GNA sindrom nefrotic | 144,1 \pm 15,98*** 344,7% | 111,6 \pm 2,8*** 267,0%, $p_1 > 0,05$ | 7,5 \pm 0,51 105,6% | 9,3 \pm 1,16 131,0%, $p_1 > 0,05$ |
| SNSS | 161,4 \pm 20,87*** 386,1% | 170,5 \pm 29,33** 407,9%, $p_1 > 0,05$ | 16,2 \pm 2,99* 228,2% | 12,1 \pm 2,66 170,4%, $p_1 > 0,05$ |
| SNSR | 104,4 \pm 20,13** 249,8%, $p_2 > 0,05$ | 188,2 \pm 16,59*** 450,2%, $p_1 < 0,01$ | 10,1 \pm 0,54** 142,3%, $p_2 > 0,05$ | 9,2 \pm 0,54 129,6% $p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$ |
| GNC forma nefrotică | 58,6 \pm 2,38 140,2% | 91,1 \pm 10,51** 217,9%, $p_1 < 0,01$ | 5,5 \pm 0,29 77,5% | 3,8 \pm 0,12 53,5%, $p_1 < 0,01$ |
| 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 SNSS cu SNSR.

Astfel, în GNA sindrom nefritic, perioada manifestărilor clinice, suma $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ 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 $111,6 \pm 2,8 \mu\text{M}/\text{mM}$ creatinină. Totodată, s-a înregistrat o majorare mai pronunțată a conținutului sumar al metaboliților oxidului nitric ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) în SNSS perioada de debut, comparativ cu SNSR. Astfel, suma $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ în urină a crescut de 3,9 ori în SNSS și de 2,5 ori în SNSR. În perioada de remisiune, în SNSS suma $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ în urină rămâne practic la același nivel ca în etapa precedentă, pe când în SNSR 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 NO_2 s-a majorat de 2,3 ori (până la $16,2 \pm 2,99 \mu\text{M}/\text{mM}$ creatinină) în SNSS perioada de debut, pe când în SNSR 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 NO_2 în urină a diminuat și nu mai diferea de cel înregistrat în grupul de control.

Rezultatele de evaluare a modificărilor nivelului NO_3 și a raportului NO_3/NO_2 în urină la copiii cu glomerulonefrită sunt prezentate în tabelul 2. Datele arată că s-a înregistrat o creștere a nivelului de NO_3 în urină în toate loturile de pacienți.

Tabelul 2. Modificările nivelului NO_3 și ale raportului NO_3/NO_2 în urină la copiii cu glomerulonefrită

| Grupuri de studiu | NO_3 ($\mu\text{M}/\text{mM}$ creatinină) | | Raportul NO_3/NO_2 | |
|----------------------|---|---|------------------------------------|--|
| | acutizare | remisiune | acutizare | remisiune |
| GNA sindrom nefritic | $136,56 \pm 16,02^{***}$ 350,2% | $102,3 \pm 2,45^{***}$ $262,3\%$, $p_1 < 0,05$ | $20,3 \pm 3,31^{**}$ 303,0% | $13,2 \pm 1,96^*$ $197,0\%$, $p_1 > 0,05$ |
| SNSS | $145,2 \pm 18,46^{***}$ 372,3% | $158,4 \pm 28,70^{***}$ $406,2\%$, $p_1 > 0,05$ | $12,4 \pm 1,74^{***}$ 185,1% | $20,0 \pm 5,85^*$ $298,5\%$, $p_1 > 0,05$ |
| SNSR | $94,0 \pm 20,58^*$ $241,0\%$, $p_2 > 0,05$ | $179,0 \pm 16,05^{***}$ $459,0\%$, $p_1 < 0,01$; $p_2 > 0,05$ | $14,3 \pm 1,56^{***}$ 213,4% | $19,1 \pm 0,62^{***}$ $285,1\%$, $p_1 < 0,05$ |
| GNC forma nefrotică | $53,3 \pm 2,22^{**}$ 136,7% | $87,3 \pm 10,61^{**}$ $223,8\%$, $p_1 < 0,01$ | $10,1 \pm 0,53^{**}$ 150,7% | $24,26 \pm 3,53^{***}$ $362,1\%$, $p_1 < 0,01$ |
| 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 SNSS cu SNSR.

Cele mai înalte valori ale NO_3 în urină au fost înregistrate în SNSS perioada de debut: 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 SNSR 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 SNSS, perioada de remisiune, concentrația 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 SNSR, valorile NO_3 majorându-se 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 NO_3/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 NO_3/NO_2 în SNSR perioada de debut, pe când

în SNSS 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 NO_3/NO_2 în urină atât în SNSR, cât și în cel SNSS, comparativ cu grupul de control.

Discuții. În cadrul acestui studiu au fost identificate niveluri semnificativ sporite ale metaboliților NO în urină în toate grupurile de pacienți în perioada acutizării, comparativ cu perioada remisiunii.

NO are rol protector important în ischemia renală, preîntâmpinând dezintegrarea celulară și compromiterea funcțiilor renale în perioada postischemică, dar și un rol negativ, toxic, contribuind la agravarea leziunilor ischemice. Acțiunea toxică a excesului de NO este legată de mai mulți factori. Cel mai important dintre ei îl constituie interacțiunea NO cu speciile reactive ale oxigenului (SRO), semnificativ activate în ischemie și reperfuzie, cu formarea peroxinitritului care are proprietăți oxidative înalte, astfel exercitând efect toxic celular; peroxinitritul poate produce nitrozilarea diferitor componente celulare – structurilor proteice, enzimelor, acizilor nucleici, condiționând astfel dezintegrarea celulară [2].

Un alt mecanism al toxicității NO este proprietatea acestuia de a inhiba reversibil citocromoxidaza mitocondrială, însoțit de inhibiția respirației celulare și în paralel, de generarea de SRO în mitocondrii [1,4].

NO este un activator puternic al neutrofilelor polimorfonucleare, iar creșterea concentrației lui poate contribui la intensificarea efectelor citotoxice ale acestora. Migrația în parenchimul organului a leucocitelor neutrofile, generatoare de SRO în cantități enorme, are ca rezultat la afectarea țesutului renal în caz de ischemie și infecții renale. Alt mecanism negativ al NO este proprietatea de a influența apoptoza celulară. Excesul de NO induce apoptoza, atât la nivelul celulelor endoteliale, cât și al celor epiteliale [4].

Studii efectuate de Reddy Y. S au demonstrat că scăderea producției sau biodisponibilitatea redusă a NO poate duce la disfuncția endotelială la pacienții cu boală renală cronică (BRC). Scăderea producției de NO se poate datora disponibilității scăzute a substratului argininei sau unei acumulări crescute de ADMA, care este un puternic inhibitor al enzimei e-NOS [11].

Studii pe modele experimentale de glomerulonefrită, inclusiv cele induse prin infuzia de anticorpi la antigenul Thy1, nefrita Heymann și nefrita autoimună, au demonstrat creșterea producției de NO. Producția excesivă de NO prin oxidarea sintetică de oxid nitric (iNOS), derivată din celulele sistemului imun infiltrate sau din celulele glomerulare rezidente, este asociată cu o lezare glomerulară semnificativă. Inhibarea acestei enzime a contribuit la reducerea proteinuriei și diminuarea leziunilor glomerulare. În schimb, NO derivat din NO sintaza endotelială (eNOS) poate limita afectarea glomerulară păstrând integritatea celulelor endoteliale [12].

Rezultatele studiului prezent 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, reprezintă un element patogen important în autoîntreținerea și exacerbarea răspunsului inflamator sistemic cu potențial de generare a sindromului de disfuncție organică multiplă.

Concluzii. Concentrația urinară a metaboliților oxidului nitric reprezintă un biomarker noninvaziv pentru evaluarea gradului de stres oxidativ în glomerulonefrită. Acesta permite prognozarea complicațiilor, monitori-

zarea eficienței strategiilor terapeutice menite să reducă intensitatea stresului oxidativ celular și să contribuie la prevenirea leziunii renale asociate.

Bibliografie

1. Ashfaq A., Dempsey S. K., Daneva Zdravka et al. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(9): 2605.
2. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Jan; 294(1):F1-9.
3. Chien-Ning Hsu , You-Lin Tain. Regulation of Nitric Oxide Production in the Developmental Programming of Hypertension and Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(3): 681.
4. Dellamea BS, Leita CB, Friedman R, Canani LH. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* 2014; 6: 17.
5. Forstermann U. Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function, *Eur. Heart J.* 2012; 33(7) 829-837.
6. Galougahi K.K., Liu C.C., Gentile C., Kok C. et al. Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* 2014;3:e000731
7. KDIGO clinical practice guideline for Glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl.*, 2012;2:139-274.
8. Ko-Lin Kuo., Der-Cherng Tarng. Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Adaptive Medicine.*, 2010;2:87-94.
9. Lankadeva Y.R., Singh R.R., Moritz K.M. et al. Renal dysfunction is associated with a reduced contribution of nitric oxide and enhanced vasoconstriction after a congenital renal mass reduction in sheep. *Circulation.* 2015;131:280-288.
10. Metelskaya V.A., Tumanova N.G. Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites. *Клин.лабор. д-ка*, 2005;(6):15-18.
11. Reddy Y. S., Kiranmayi V. S., Bitla A. R. et al. Nitric oxide status in patients with chronic kidney disease. *In. J Nephrol.* 2015; 25(5): 287-291
12. Trachtman H. Nitric oxide and glomerulonephritis. *Sem. Nephrology*, 2004;24: (4):324-332.