

## ARTICOL DE CERCETARE

## Endotelina urinară la copii cu glomerulonefrită: studiu prospectiv, descriptiv

Angela Ciuntu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamentul Pediatrie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Secția Nefrologie, Institutul Mamei și Copilului, Chișinău, Republica Moldova.

### Autor corespondent:

Angela Ciuntu, dr. șt. med., conf. univ.

Secția Nefrologie

Institutul Mamei și Copilului

str. Burebista, 93, Chișinău, Republica Moldova, MD 2062

e-mail: angela.ciuntu@usmf.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată la subiectul abordat

Nu au fost studiate, deocamdată, modificările nivelului endotelinei-1 în urină la copiii cu diferite forme ale glomerulonefritei, în funcție de etapele clinico-evolutive ale maladiei.

### Ipoteza de cercetare

Cercetările efectuate în această direcție ar putea furniza date importante despre gradul și severitatea injuriei renale și ar crea premise pentru elaborarea de noi strategii de tratament eficient.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Au fost demonstrate particularitățile modificărilor concentrației ET-1 în urină la copiii cu glomerulonefrită în dependență de varianta clinică și etapa clinico-evolutivă a procesului patologic.

### Rezumat

**Introducere.** Morbiditatea în creștere, etiopatogenia incomplet cunoscută, soluționarea insuficientă a problemelor de diagnostic și tratament, justifică, pe deplin, interesul științific pentru glomerulonefrită la copil. În acest context, tendința actuală este de a stabili utilitatea unor markeri biochimici atât pentru diagnosticul precoce, cât și pentru tratamentul formelor avansate ale procesului patologic renal.

**Material și metode.** Studiul, de tip prospectiv, a fost efectuat în Departamentul Pediatrie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Clinica Nefrologie a Institutul Mamei și Copilului și Laboratorul de biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu”. Au fost înrolați 60 de copii cu glomerulonefrită primară (GNP), dintre care – 25 de copii cu sindrom nefrotic steroid-sensibil (SNSS), 15 copii cu sindrom

## RESEARCH ARTICLE

## Urinary endothelin in children with glomerulonephritis: prospective, descriptive study

Angela Ciuntu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>Nephrology Unit, Mother and Child Institute, Chisinau, Republic of Moldova.

### Corresponding author:

Angela Ciuntu, MD, PhD, associate professor

Nephrology Unit

Mother and Child Institute

93, Burebista str., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2062

e-mail: angela.ciuntu@usmf.md

### What is unknown yet, about the topic

Changes of endothelin-1 level in the urine of children with different forms of glomerulonephritis in clinical evolutionary stages of the disease have not been studied in detail.

### Research hypothesis

Research conducted in this direction could provide important data about the extent and severity of renal injury, and create preconditions for the development of new effective treatment strategies.

### Article's added novelty on this scientific topic

In this work were demonstrated the peculiarities of modifications of ET-1 concentrations in the urine of children with glomerulonephritis according to clinical form and clinical-evolutionary stage of the pathological process.

### Abstract

**Introduction.** Growing morbidity, incomplete knowledge of etiopathogenesis, insufficient solving of the problems related to diagnosis and treatment, fully justify the scientific interest for glomerulonephritis in children. In this context the current tendency is to identify some biochemical markers useful both in early diagnosis and in the treatment of advanced forms of renal pathology.

**Material and methods.** The prospective study was conducted in the Department of Pediatrics, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Mother and Child Institute, Nephrology Unit, and Biochemistry laboratory of Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy. The object of the study were 60 children with primary glomerulonephritis (PGN), including 25 children with steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS), 15 children with ster-

nefrotic steroid-rezistent (SNSR) și 20 de copii cu glomerulonefrită cronică (GNC), forma mixtă, examinați la diferite etape clinico-evolutive ale maladiei. Grupul de control a fost constituit din 20 de copii practic sănătoși.

**Rezultate.** Studiul a constatat o creștere de 1,6 ori a nivelului ET-1 în urină, în grupul copiilor cu glomerulonefrită acută (GNA) și SNSR în perioada manifestărilor clinice, și de 1,8 ori – în lotul copiilor cu SNSR, comparativ cu grupul de control. În perioada remisiei, s-a constatat o reducere a nivelului de ET-1 în urină. Totodată, a fost indentificată o creștere marcată, de 16,9 ori, a valorilor ET-1 în urină în grupul pacienților cu GNC în perioada acutizării, comparativ cu grupul de control. În perioada remisiei, la acești pacienți, concentrația de ET-1 s-a înjumătățit, însă, totuși, depășea de 8,1 ori concentrația lotului de control. S-a stabilit că în GNC, forma mixtă, atât în acutizare cât și în remisie, a avut loc creșterea marcată a concentrației de ET-1 în urină, ce depășea de 10 ori nivelele înregistrate în GNA, sindrom nefrotic.

**Concluzii.** Determinarea ET-1 în urină poate fi un marker important, noninvaziv, pentru aprecierea injuriei renale în glomerulonefrită la copii, diferențierea diagnostică noninvazivă a diferitor variante ale maladiei, monitorizarea evoluției și elaborarea strategiilor de tratament renoprotector.

**Cuvinte cheie:** endotelină, glomerulonefrită, copii.

## Introducere

Morbiditatea în creștere, etiopatogenia incomplet cunoscută, soluționarea insuficientă a problemelor de diagnostic și tratament, justifică, pe deplin, interesul științific pentru glomerulonefrită la copil. În acest context, tendința actuală este de a stabili utilitatea unor markeri biochimici atât pentru diagnosticul precoce, cât și pentru tratamentul formelor avansate ale procesului patologic renal.

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 copiii sănătoși și cu afecțiuni renale. Deși ET-1 a fost descrisă, inițial, drept un vasoconstrictor derivat din endoteliu, s-a demonstrat că peptida poate fi produsă de orice celulă și poate acționa asupra oricărei alteia, din organism [1, 2].

Endotelinele interacționează cu două tipuri de receptori: ETA și ETB. În general, în condiții de sănătate, interacțiunea cu receptorii ETA produce vasoconstricție, proliferarea celulelor și acumularea de matrice extracelulară, pe când interacțiunea cu receptorii ETB conduce la vasodilatare, acțiune antiproliferativă și antifibrotică. În anumite condiții patologice, ETB poate media o injurie a țesuturilor și cicatrice [3, 4]. Aceste efecte ale ET-1, constatate atât la persoane sănătoase, cât și bolnave, sunt exercitate prin mecanism autocrin și/sau paracrin. S-a demonstrat, de asemenea, că endotelina endogenă (ET) renală reglează excreția renală de apă și sodiu [5].

ET renală modulează și alte aspecte ale fiziologiei renale, inclusiv, debitul total și regional de sânge, contracția mezangială, funcția podocitelor și reglarea echilibrului acido-bazic

oid-resistant nephrotic syndrome (SRNS), 20 children with chronic glomerulonephritis (CGN) mixed form, being examined at different clinical stages of the disease. Control group constituted 20 practically healthy children.

**Results.** This study reveals an increase by 1.6 times of ET-1 levels in the urine of the group of children with acute glomerulonephritis (AGN) SSNS during clinical manifestations and by 1.8 times in the group of children with SRNS compared to the control group. During remission, it was revealed a reduction of the level of ET-1 in urine. It was also identified a marked increase, by 16.9 times of ET-1 values in the urine of the group of patients with CGN during relapse compared to the control group. In these patients, during remission was noticed almost a double decrease of this index that exceeded by 8.1 times the control group. It was stated that in CGN mixed form in relapse and remission periods occurs a marked increase in the concentration of ET-1 in urine, which exceeded by 10 times AGN indices registered in nephrotic syndrome.

**Conclusions.** Determination of ET-1 in urine may be an important marker for non-invasive assessment of renal injury in glomerulonephritis in children, non-invasive diagnostic differentiation of different variants of the disease, monitoring of evolution and development of kidney-protective treatment strategies.

**Key words:** endothelin, glomerulonephritis, children.

## Introduction

Growing morbidity, incomplete knowledge of etiopathogenesis, insufficient solving of the problems related to diagnosis and treatment, fully justify the scientific interest for glomerulonephritis in children. In this context the current tendency is to identify some biochemical markers useful both in early diagnosis and in the treatment of advanced forms of renal pathology.

It was established that the family of endothelin (ET) comprises three peptides, made of 21 aminoacids (ET-1, ET-2 and ET-3), from which ET-1 has the most relevant biological role for the assessment of renal function both in healthy children and in kidney disease. Although ET-1 was initially described as a vasoconstrictor derived from endothelium, it has been demonstrated that the peptide can be produced by any cell and can have action on any other cells of the body [1, 2].

The endothelins activate two types of receptors ETA and ETB. Generally concerning the health conditions the complex ETA produces vasoconstriction, cell proliferation and extracellular matrix accumulation. Whereas the activation of ETB receptors leads to vasodilatation, antiproliferative and antifibrotic action. In some pathological conditions ETB can cause tissue injury and scarring [3, 4]. These effects of ET-1 both in healthy subjects or disease are carried out in an autocrine and/or paracrine way. Endogenous endothelin (ET) regulates kidney renal excretion of water and sodium [5].

Renal ET modulates other aspects of renal physiology, including total and regional blood flow, mesangial contraction, podocytes function and regulation of acid-base balance [6, 7].

[6, 7]. Implicarea endotelinei în secreția acidității renale poate avea o importanță deosebită în boala cronică renală (BCR). Creșterea acidității renale determină producția de ET-1, care, la rândul ei, stimulează secreția protonilor în nefronul proximal și distal; blocarea acțiunii ET afectează excreția renală normală de acid [6, 7].

Endotelina joacă un rol cardinal în dezvoltarea proteinuriei, fibrozei și progresiei BCR. ET-1 promovează proliferarea celulară, hipertrofia, inflamația și acumularea matricei extracelulare – toate cele enumerate fiind factori importanți în progresia BCR [8].

Producția de ET-1 renală crește în condiții asociate cu progresia bolii renale, cum ar fi diabetul zaharat, rezistența la insulină, obezitate, activarea sistemului imunitar, dislipidemie, formarea radicalilor liberi de oxigen [8]. 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 [9].

Astfel, sistemul endotelinic se implică în mod activ în patogenia afecțiunilor renale, iar interesul față de acest sistem este în permanentă ascensiune, fapt ce ne-a determinat să efectuăm un studiu vizând particularitățile modificărilor ET-1 în urină la copiii cu glomerulonefrită. Respectiv, scopul studiului a fost determinarea concentrațiilor urinare ale endotelinei-1 la copiii cu glomerulonefrită, în funcție de etapele clinico-evolutive ale maladii.

### Material și metode

Studiul, de tip prospectiv, a fost efectuat în Departamentul Pediatrie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Clinica Nefrologie a Institutul Mamei și Copilului și Laboratorul de biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu”. Protocolul cercetării a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” (aviz favorabil din 13.05.2015, proces verbal nr. 55, președinte CEC – prof. Mihail Gavriluc).

Diagnosticul sindromului nefrotic (SN) a fost bazat pe ghidul KDIGO 2012.

Criteriile de includere în studiu au fost: copii cu SN, cu funcția renală păstrată, ai căror părinți au dat acordul informat pentru înrolare. Au fost excluși din studiu copiii cu SN congenital sau secundar, cât și cei cu BCR, stadiile II-V. Lotul de control a fost constituit din 20 de copii practic sănătoși.

În studiu au fost înrolați 60 de copii cu glomerulonefrită primară, dintre care – 25 de copii cu sindrom nefrotic steroid-sensibil (SNSS), 15 copii – cu sindrom nefrotic steroid-rezistent (SNSR) și 20 de copii – cu glomerulonefrită cronică (GNC), forma mixtă.

Sindromul nefrotic (SN) a fost diagnosticat în baza prezenței edemelor, proteinuriei masive ( $>40 \text{ mg/m}^2/\text{h}$  sau, a raportului proteină/creatinină urinară  $>2,0 \text{ mg/mg}$ ) și hipoalbuminemiei ( $<2,5 \text{ mg/dL}$ ) [10].

Sindromul nefrotic steroid-sensibil (SNSS) a fost stabilit la normalizarea analizei de urină în decursul a 4 săptămâni, mai rar – 8 săptămâni după administrarea glucocorticoizilor și instalarea remisiunii complete [10].

Endothelin involvement in secretion of renal acidity may be of a particular importance in the management of chronic kidney disease (CKD). The increase of kidney acidity causes the production of ET-1, which in turn stimulates the proton secretion in the proximal and distal nephron; the blockage of the ET system affects the normal renal acid excretion [6, 7].

Endothelin plays an important role in the development of proteinuria, fibrosis and progression of CKD. ET-1 promotes cell proliferation, hypertrophy, inflammation and accumulation of extracellular matrix, all of these constitute important factors in the progression of CKD [8].

ET-1 production in the kidney increases the formation of oxygen free radicals in conditions associated with the progression of renal diseases such as diabetes, insulin resistance, obesity, immune system activation, dyslipidaemia, oxygen free radicals formation [8]. An important aspect of ET activity in pathophysiology constitutes the involvement of podocytes. Podocytes injury hallmark of proteinuric renal disease that precedes the development of glomerulosclerosis [9].

Thus, the endothelin system is actively involved in the pathogenetic mechanism of kidney disease. The interest in this system is constantly rising. These are the factors that caused us to conduct a study related to the particularities of ET-1 changes in urine of children with glomerulonephritis. The purpose of the research was to determine urinary concentrations of endothelin-1 in children with glomerulonephritis in different clinical evolutionary stages.

### Material and methods

This prospective study and was performed in Department of Pediatrics, *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy (SUMPh), Mother and Child Institute, Nephrology Unit, and Biochemistry laboratory of the *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy. The research protocol was approved by the Ethics Committee of Research of *Nicolae Testemitanu* SUMPh (favourable review 13.05.2015, official record no. 55, President of the committee – Professor Mihail Gavriluc).

Diagnostic algorithm of nephrotic syndrome (NS) was based on the guide KDIGO 2012.

Criteria for inclusion were children with NS with preserved renal function, whose parents have consented their participation in this study. Children with congenital or secondary NS and those with stage II-V chronic kidney disease (CKD) were excluded from the study. The control group was constituted by 20 practically healthy children.

The study included 60 children with primary glomerulonephritis, out of the total number – 25 children with steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) and 15 children with steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS), 20 children with mixed form of chronic glomerulonephritis.

Nephrotic syndrome (NS) was diagnosed by the presence of edema, massive proteinuria ( $>40 \text{ mg/m}^2/\text{h}$  or the ratio of protein/urinary creatinine  $>2.0 \text{ mg/mg}$ ) and hypoalbuminemia ( $<2.5 \text{ mg/dL}$ ) [10].

Steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) was domi-

Sindromul nefrotic steroid-rezistent (SNSR) a fost stabilit în cazul menținerii proteinuriei până la nivelul  $<3$  g/dl pe parcursul a 8 săptămâni de tratament cu prednisolon (în doză de 2 mg/kg/zi) și efectuarea, ulterioară, a pulsterapiei cu prednisolon în doză de 20-30 mg/kg/zi timp de 3 zile (dar, cumulativ, nu mai mult de 1 g pe durata unei cure) [10].

O remisiune completă s-a constatat în cazul rezoluției edemelor, normalizării albuminei serice până la 3,5 g/dl și reducerii proteinuriei cu  $<4$  mg/m<sup>2</sup>/oră (100 mg/m<sup>2</sup>/zi) în 3 analize de urină consecutive [10].

Recăderea (recidiva) a fost definită drept o recurență a proteinuriei masive ( $>40$  mg/m<sup>2</sup>/oră sau, a raportului proteină/creatinină urinară  $>2,0$  mg/mg, sau albuminurie  $\geq[2+]$  pe parcursul a 3 zile consecutive), de regulă, cu recurența edemelor [10].

Tratamentul SNSR a constat în administrarea prednisolonului în doză de 2 mg/kg/zi, timp de 6 săptămâni, apoi – câte 1,5 mg/kg/48 ore, timp de 2-5 luni, cu reducerea treptată a dozei. La necesitate, a fost asociat și tratament simptomatic.

Tratamentul SNSR a constat în administrarea puls-terapiei cu metilprednisolon, 20-30 mg/kg în perfuzare intravenoasă, repetat timp de trei zile (dar nu mai mult de 1 g per cură, cumulativ), imunosupresoare (leukeran, 0,2 mg/kg/zi sau ciclofosamidă, 2,5 mg/kg/zi), timp de 8-12 săptămâni, puls-terapie cu ciclofosamidă (12-15 mg/kg), în asociere cu prednisolon (1,5 mg/kg/48 ore). Tratamentul simptomatic a inclus: diuretice, administrare intravenoasă de albumină de 15-20%, inhibitori de enzimă de conversie ai angiotensinei (IECA), anticoagulante, dezagregante, preparate de calciu, vitamina D, antacide.

Dozarea endotelinei urinare s-a efectuat prin metoda ELISA, cu ajutorul kiturilor firmei DRG Diagnostics (Marburg, Germania), conform instrucțiunilor producătorului.

Analiza statistică a datelor a fost efectuată cu ajutorul softului *StatsDirect*, versiunea 1.9.5 (*StatsDirect LTD*, Altrincham, Marea Britanie). Pragul de semnificație statistică a fost considerat o valoare  $p<0,05$ .

## Rezultate

Vârsta medie a debutului SN a fost de  $6,4\pm 0,50$  ani; pentru glomerulonefrita cronică, forma mixtă –  $9,1\pm 1,0$  ani, iar durata bolii a fost de  $2,9\pm 0,47$  ani.

Manifestările clinice ale SN au fost dominate de edeme (92,5%), anasarcă (60,0%), micții rare (48,8%), cefalee (22,5%), dispnee (1,3%), sindrom algic abdominal (8,8%).

Examinările paraclinice efectuate au determinat o hipoproteinemie până la  $52,9\pm 0,91$  g/l, (albuminele serice atinând  $34,03\pm 2,82$  g/l), o majorare a lipidelor totale ( $9,53\pm 0,98$  mmol/l), colesterolului ( $8,48\pm 0,35$  mmol/l),  $\beta$  lipoproteidelor ( $99,4\pm 2,75$  UA). Ureea serică a avut o valoare medie ( $\pm$ SD) de  $6,2\pm 0,53$  mmol/l, creatinina – de  $0,060\pm 0,04$  mmol/l. Proteinuria a atins valori de până la  $5,5\pm 0,66$  g/l.

Rezultatele, expuse în Tabelul 1, relevă creșterea de 1,6 ori a nivelului ET-1 în urină în glomerulonefrita acută (SNSS) în perioada manifestărilor clinice și de 1,8 ori – în grupul copiilor cu SNSR, comparativ cu grupul de control. În același timp,

notată prin normalizarea de urinaliză în termen de 4 săptămâni după administrarea de glucocorticoizi și instalarea de remisiune completă [10].

Steroid-rezistent nephrotic syndrome (SRNS) was established in cases of maintaining of the level of proteinuria to  $<3$  g/dL over the 8 weeks of treatment with prednisolone at a dose of 2 mg/kg/24h and subsequently carrying out pulse therapy with prednisolone 20-30 mg/kg/24h, for 3 days consecutively (not more than 1 g during a course) [10].

Complete remission has been found in the case of resolution of edema, normalization of serum albumin up to 3.5 g/dl and reduction of proteinuria up to  $<4$  mg/m<sup>2</sup>/h (100 mg/m<sup>2</sup>/24h) in three consecutive urine analysis [10].

Relapse (recurrence) was defined as a recurrence of massive proteinuria ( $>40$  mg/m<sup>2</sup>/h or the ratio of protein / urinary creatinine  $>2.0$  mg/mg or albuminuria  $\geq 2+$  within 3 consecutive days, usually with recurrence edema [10].

The treatment in SSNS included the administration of prednisolone at a dose of 2 mg/kg/24h for 6 weeks, then 1.5 mg/kg/48h for 2-5 months with gradual dose reduction and symptomatic treatment. The treatment in SRNS included the administration of pulse therapy with methylprednisolone 20-30 mg/kg i.v. perfusion, for 3 days consecutively (but no more than 1g per cure), immunosuppressants (leukeran 0.2 mg/kg/24h or cyclophosphamide 2.5 mg/kg/24h) for 8-12 weeks and pulse therapy with cyclophosphamide 12-15 mg/kg. Symptomatic therapy included albumin infusions, diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACE), anticoagulants, disaggregating, calcium medications, vitamin D, and antacid.

Dosage of urinary endothelin was counted through ELISA method using the DRG Diagnostics kit (Marburg, Germany) according to the attached instructions.

Statistical analysis was performed using the *StatsDirect* software, 1.9.5 version (*StatsDirect LTD*, Altrincham, Great Britain). Statistical significance threshold was considered  $p<0.05$ .

## Results

The average age of the onset of NS was  $6.4\pm 0.50$  years; for the mixed form of chronic glomerulonephritis (CGN)  $9.1\pm 0.99$  years and its disease duration was  $2.9\pm 0.47$  years.

The clinical manifestations of NS were represented by edema (92.5%), anasarca (60.0%), rare urination (48.8%), headache (22.5%), dyspnea (1.3%) and algic syndrome (8.8%).

Paraclinical examinations have determined a hypoproteinemia up to  $52.9\pm 0.91$  g/l (serum albumins –  $24.03\pm 2.82$  g/l), total lipids increased ( $9.53\pm 0.98$  mmol/l), increase of cholesterol ( $8.48\pm 0.35$  mmol/l), increase of  $\beta$ -lipoproteins ( $99.4\pm 2.75$  arbitrary units). Serum urea had mean values of  $6.2\pm 0.53$  mmol/l, creatinine –  $0.060\pm 0.040$  mmol/l, proteinuria up to  $5.5\pm 0.66$  g/l.

The results from Table 1 show an 1.6 fold increase of the concentration of ET-1 in the urine in the group of children with acute glomerulonephritis SSNS during relapse and a 1.8 fold increase in the group of children with SRNS compared



schimbări esențiale ale concentrației ET-1 în urină, la compararea grupurilor de pacienți cu GNA (SNSS) și GNA (SNSR), atât în perioada de acutizare, cât și în remisie, nu au fost depistate. În perioada remisiei, s-a înregistrat reducerea importantă a valorilor ET-1 în urină, constatându-se, în același timp, nu doar revenirea în cadru normal, dar și diminuarea acestui indice cu 12-20%, însă fără relevanță statistică. Totodată, a fost indentificată o creștere marcată, de 16,9 ori, a concentrației ET-1 în urină în grupul pacienților cu GNC, forma mixtă, în perioada acutizării, comparativ cu grupul de control și care depășea de 10 ori nivelul grupului de pacienți cu GNA, sindrom nefrotic.

**Tabelul 1.** Nivelul endotelinei urinare (ng/ml) la copii cu glomerulonefrită.

Grupul de pacienți	faza de acutizare	remisie
Control (n=20)	82,50±6,72	
Glomerulonefrită acută, sindrom nefrotic (n=40)	139,10±12,08**	71,00±5,08 p <sub>1</sub> <0,001
Glomerulonefrită acută, sindrom nefrotic steroid-sensibil (n=25)	130,40±7,35** p <sub>2</sub> >0,05	66,10±5,41 p <sub>1</sub> <0,001
Glomerulonefrită acută, sindrom nefrotic steroid-rezistent (n=15)	147,60±16,65* p <sub>2</sub> >0,05	75,90±4,71 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> >0,05
Glomerulonefrită cronică, forma mixtă (n=20)	1391,60±241,95*** p <sub>3</sub> <0,001	670,10±54,74*** p <sub>1</sub> <0,05, p <sub>3</sub> <0,01

*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 SNSR cu SNSS; p<sub>3</sub> – autenticitatea la compararea GNC cu GNA SN.

În perioada remisiei, a avut loc o diminuare notabilă, aproape dublă, a ET-1 la pacienții cu formă mixtă a GNC, dar care a rămas crescută, depășind de 8,1 ori nivelul grupului martor și de 9,4 ori – valorile indicatorului dat, comparativ cu GNA, sindrom nefrotic.

## Discuții

În acest studiu, au fost constatate nivele semnificativ sporite ale ET-1 în urină la copiii cu diferite forme ale GN, atât în perioada de acutizare, cât și remisiune, cele mai înalte valori fiind înregistrate la copiii cu GNC, forma nefrotică.

Creșterea nivelului ET-1 în urină la copiii cu glomerulonefrită indică la activarea sintezei acestei peptide de către elementele structurale renale. Sinteza renală a ET-1 poate fi stimulată de citokine, factori de creștere, chemokine, factori vasoactivi, hormoni, specii reactive ale oxigenului, colesterol și 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, leziunea cărora se consideră principala cauză a proteinuriei [11].

După cum s-a menționat anterior, vasoconstricția renală puternică ar putea contribui la scăderea fluxului sanguin și a ratei de filtrare glomerulară. De asemenea, ET-1 reflectă stresul oxidativ și inflamația în rinichi.

to the control group. At the same, time significant changes in the concentration of ET-1 in urine when comparing groups of patients with AGN SS nephrotic syndrome and SR nephrotic syndrome in the relapse and remission period have not been detected. During remission it was recorded a significant drop of ET-1 values. At the same time, it was established that this index not only returned to normal but also it decreased by 12-20%, all these without statistical relevancy. There has been identified a marked 16.9 fold increase of ET-1 concentrations in urine of patients with CGN mixed form during relapse compared to the control group, which exceeded by 10 times the group of patients with AGN nephrotic syndrome.

**Table 1.** Urine endothelin levels (ng/ml) in children with glomerulonephritis.

Group of patients	relapse	remission
Control (n=20)	82.50±6.72	
Acute glomerulonephritis, nephrotic syndrome (n=40)	139.10±12.08**	71.00±5.08 p <sub>1</sub> <0.001
Acute glomerulonephritis, nephrotic syndrome, steroid-sensitive (n=25)	130.40±7.35** p <sub>2</sub> >0.05	66.10±5.41 p <sub>1</sub> <0.001
Acute glomerulonephritis, nephrotic syndrome, steroid-resistant (n=15)	147.60±16.65* p <sub>2</sub> >0.05	75.90±4.71 p <sub>1</sub> <0.01 p <sub>2</sub> >0.05
Chronic glomerulonephritis, mixed form (n=20)	1391.60±241.95*** p <sub>3</sub> <0.001	670.10±54.74*** p <sub>1</sub> <0.05, p <sub>3</sub> <0.01

*Note:* statistically significant difference comparing to values of control group: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; p<sub>1</sub> – authenticity compared to the respective index, registered in the relapse period; p<sub>2</sub> – authenticity when comparing SRNS with SSNS; p<sub>3</sub> – authenticity when comparing NS in AGN and CGN.

During remission a significant, almost double decrease of ET-1 level has been noted in patients with mixed form of CGN, but it remained high exceeding by 8.1 times the control group and by 9.4 times the values of this index compared with AGN nephrotic syndrome.

## Discussions

In this study, we have obtained significantly increased levels of ET-1 concentrations in the urine of children with various forms of GN during relapse and remission, the highest values being recorded in children with mixed form CGN.

Increase of the level of ET-1 in urine of children with glomerulonephritis indicates the activation of the synthesis of this peptide by structural elements of kidneys. Renal synthesis of ET-1 can be stimulated by cytokines, growth factors, chemokines, vasoactive factors, hormones, reactive oxygen species, cholesterol and other substances. Excess protein from food and overload with protein stimulate the production of ET-1 by the renal proximal tubules, which can be critical in the progression of renal diseases. In addition the ET-1 can induce the reduction of podocytes that are considered to be the main cause of proteinuria [11].

Studiile din ultimii ani au adus tot mai multe dovezi experimentale și clinice, precum că ET-1, acționând primar prin receptorii 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 a proteinuriei [12].

Într-un studiu preclinic recent, Tobe S. *et al.* (2015), aduce dovezi consistente privind utilizarea antagoniștilor ET pentru tratamentul maladiilor renale, în general, și a nefropatiei diabetice, în particular [13]. Alte studii preclinice au demonstrat regresia injuriei glomerulare și podocitare în modelele de BCR, care este mediată de receptorii ETA – efecte, care sunt însoțite de ameliorarea proteinuriei [14].

Nivelele de ET-1 în urină, mai scăzute în SSNS și SNSR în remisie, comparativ cu perioada de acutizare, cu reducerea indicilor clinico-paraclinici (rezoluția edemelor, proteinuriei, normalizarea albuminemiei), constatate în cercetările noastre, se datorează tratamentului cu steroizi, imunosupresoare și administrarea IECA. Rezultatele obținute confirmă rezultatele prezentate de alți cercetători. Astfel, Barton M. (2008), 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 [8]. Studii clinice au demonstrat ca inhibitorii ai sistemului renină-angiotensină-aldosteron (SRAA), cum ar fi inhibitorii enzimei de conversie ai angiotensinei (IECA) sau blocanții receptorilor angiotensinei (BRA), încetinesc progresia BCR. Prin mecanisme, în special, independente de presiune, aceste medicamente nu numai că întârzie progresia injuriei glomerulare, dar pot chiar inversa proteinuria la pacienții cu maladii cronice proteinurice [8].

În GNC, în perioada remisiei, în rezultatul tratamentului aplicat, a fost observată o diminuare notabilă a nivelelor de endotelină, care n-au atins, totuși, valorile grupului de control, ceea ce sugerează că remisiunea este, până la urmă, incompletă. Cura de tratament, doar partial, contribuie la reducerea nivelului ET-1.

Pe de altă parte, studiile preclinice au demonstrat că antagoniștii receptorilor endotelinei pot inversa boala proteinurică renală și glomeruloscleroza, iar studiile preliminare, efectuate la persoanele suferinde de boli renale, au demonstrat că aceste medicamente au efecte antiproteinurice remarcabile, care sunt aditive celor produse de terapia antiproteinurică standard [8].

Aceste rezultate vin să susțină, odată în plus, rolul ET-1 în patogenia glomerulonefritei și justifică necesitatea utilizării antagoniștilor ET-1 ca o nouă opțiune terapeutică în patologia dată. Sunt necesare studii clinice suplimentare pentru a întări aceste observații și pentru a obține o abordare terapeutică eficientă și, eventual, diferențiată, la pacienții cu glomerulonefrită.

As mentioned above, marked renal vasoconstriction, may contribute to the decrease of blood flow and glomerular filtration rate (GFR), also, ET-1 increases oxidative stress and inflammation in kidneys.

In recent years studies in this domain have brought increasing evidence of experimental and clinical character that ET-1 primary acts through endothelin receptor may play important role in the development of proteinuria, glomerular damage, fibrosis and inflammation. Use of receptor antagonists ET are able to slow down the progression of kidney diseases primarily by reducing blood pressure and proteinuria [12].

In a recent preclinical study Tobe S. *et al.* (2015) bring substantial evidence on the use of ET antagonists in the treatment of kidney disease in general and diabetic nephropathy in particular [13]. Other preclinical studies have repeatedly shown the regression of glomerular and podocyte injuries in CRD models, which is carried out by ETA receptors, effects that are accompanied by proteinuria amelioration [14].

Levels of ET-1 in urine are lower in SSNS and SRNS remission period, compared to the relapse period, they manifest with decrease of clinical and laboratory indices (resolution of edema, proteinuria, and normalization of albumin). These indices were established due to the treatment which included steroids, immunosuppressants and administration of ACE inhibitors. These data are in compliance with the results of the research study. Thus, Barton M. (2008), have determined that several antiproteinuric drugs such as angiotensin converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor antagonists, statins and certain calcium channel blockers inhibit the formation of endothelin-1 [8]. Clinical studies have shown that inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) such as inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) or the angiotensin receptor blockers (ARB) slow down the progression of CRD. Especially through mechanisms independent of pressure, these drugs not only delay the progression of glomerular injury, but may even reverse proteinuria level in patients with chronic proteinuric diseases [8].

In remission period of CGN, as a result of the treatment, we noticed diminution of endothelin levels that did not reach levels of the control group, suggesting that recovery is incomplete. The course of treatment, only partially, helps to eliminate disturbances ET-1 level.

On the other hand, pre-clinical studies have demonstrated that antagonists of endothelin receptors can reverse the CKD and glomerulosclerosis. Preliminary studies in humans with renal disease have shown that these drugs have remarkable antiproteinuric effects, that are additive in standard antiproteinuric therapy [8].

These results further support the role of ET-1 in the pathogenesis of glomerulonephritis and justify the need for ET -1 antagonists as a new therapeutic option in GN nephrotic syndrome. Further clinical studies are needed to reinforce these observations for to obtain a differentiated and potentially effective therapeutic approach in patients with GN.

### Concluzii

Determinarea ET-1 în urină poate fi un marker important, noninvaziv, pentru aprecierea injuriei renale în glomerulonefrită la copii, diferențierea diagnostică noninvazivă a diferitor variante ale maladiei, monitorizarea evoluției și elaborarea strategiilor de tratament renoprotector.

### Declarația de conflict de interese

Autorul declară lipsa oricăror potențiale conflicte de interese.

### Conclusions

Determination of ET-1 in urine may be an important marker for non-invasive assessment of renal injury in glomerulonephritis in children, non-invasive diagnostic differentiation of several variants of the disease, monitorization of the evolution and development of new kidney protective treatment strategies.

### Declaration of conflict of interests

The author declares absence of any potential conflict of interest.

### Referințe / references

1. Barton M, Kohan D. Endothelin in renal physiology and disease. *Contrib. Nephrol. Basel. Karger*, 2011; 172: 35-49.
2. Kohan D. Introduction: basic biology of the renal endothelin system. *Semin. Nephrol.*, 2015; 35: 121-124.
3. Anguiano L., Riera M., Pascual J., Soler M. Endothelin blockade in diabetic kidney disease. *J. Clin. Med.*, 2015; 4 (6): 1171-92.
4. Barton M., Sorokin A. Endothelin and the glomerulus in chronic kidney disease. *Semin. Nephrol.*, 2015; (2): 156-67.
5. Maguire J., Davenport A. Endothelin receptors and their antagonists. *Semin. Nephrol.*, 2015; 35 (2): 125-136.
6. Pallini A., Hulter H., Muser J. *et al.* Role of endothelin-1 in renal regulation of acid-base equilibrium in acidotic humans. *Am. J. Physiol. Renal Physiology*, 2012; 303: F 991-9.
7. Kohan D., Barton M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2014; 86 (5): 896-904.
8. Barton M. Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, 2008; 4 (9): 490-501.
9. Daehn I., Casalena G., Zhang T., Shi S., Fenninger F., Barasch N. *et al.* Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 2014; 124 (4): 1608-21.
10. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidney*, 2012; (Int. suppl. 2): 139-274.
11. Barton M., Tharaux P.-L. Endothelin and the podocyte. *Clin. Kidney J.*, 2012; 5 (1): 17-27.
12. Culshaw G., MacIntyre I., Dhaun N., Webb D. Endothelin in non-diabetic chronic kidney disease: preclinical and clinical studies. *Semin. Nephrol.*, 2015; 35 (2): 176-87.
13. Tobe S., Kohan D., Singarayer R. Endothelin receptor antagonists: new hope for renal protection? *Curr. Hypertens. Rep.*, 2015; 17 (7): 57.
14. Komers R., Plotkin H. Dual inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system and endothelin-1 in treatment of chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2016; 310 (10): R877-R884.