

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL VII – MEDICINĂ INTERNĂ II**

**ERDEI LIVIA OANA**



# **REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT**

**BIOMARKERI MOLECULARI DE DIAGNOSTIC  
ȘI PROGNOSTIC ÎN BOALA CRONICĂ DE  
RINICHI DIABETICĂ**

Conducător Științific  
**PROF. UNIV. DR. PETRICA LIGIA**

**Timișoara  
2020**

## CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE .....	VII
LISTA ABREVIERILOR .....	VIII
INDEXUL FIGURILOR .....	X
INDEXUL TABELELOR .....	XV
MULȚUMIRI .....	XVI
INTRODUCERE .....	XVII

### PARTEA GENERALĂ - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....Error!

Bookmark not defined.

#### 1. Definiții, terminologie, epidemiologia bolii cronice de rinichi diabetice... **Error!**

**Bookmark not defined.**

1.1. Definiții .....	1
1.2. Epidemiologie .....	3
2. Mecanismele albuminuriei din cursul diabetului zaharat .....	6
2.1. Teoria glomerulară .....	6
2.1.1. Endoteliul glomerular .....	6
2.1.2. Membrana bazală glomerulară .....	8
2.1.3. Podocitele.....	9
2.2. Teoria tubulară .....	10
3. Biomarkeri de leziune podocitară și disfuncție ai tubului proximal cu rol în diagnosticul precoce și prognosticul BCRD .....	14
3.1. Biomarkeri ai disfuncției tubului proximal .....	14
3.1.1. Kidney injury molecule-1 (KIM-1) .....	14
3.1.2. Alfa-1 microglobulina .....	16
3.1.3. Beta - 2 microglobulina .....	16
3.1.4. Neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL) .....	17
3.1.5. Liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) .....	18
3.1.6. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) .....	19
3.2. Biomarkeri ai disfuncției podocitare .....	20
3.2.1. Podocituria .....	20
3.2.2. Nefrina.....	23
3.2.3. Podocalixina .....	24
3.2.4. Sinaptopodina.....	24
3.2.5. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) .....	25
4. Producții terminali de glicozilare avansată .....	26
5. Biomarkeri genetici și epigenetici cu rol în mecanismul albuminuriei .....	27
5.1. ARN-ul mesager (ARNm) .....	27
5.2. MicroARN-urile (miRNA) .....	28
6. Biomarkeri inflamatori.....	33
<b>PARTEA SPECIALĂ - CERCETĂRI PERSONALE .....</b>	<b>35</b>

Studiul 1. ARNm urinar asociat podocitelor se corelează cu disfuncția tubului proximal, în stadiul precoce al bolii cronice de rinichi diabetice .....	35
1.1. Scopul studiului .....	35
1.2. Material.....	35
1.3 Metode .....	38
1.3.1. Tehnica ELISA pentru analiza biomarkerilor urinari și serici.....	38
1.3.2. Tehnica de imunonefelometrie pentru analiza biomarkerilor urinari și serici.....	39
1.3.3. Tehnica de obținere a culturilor podocitare .....	40
1.3.4. Analiza expresiei genice .....	44
1.3.4.1. Extracția acizilor nucleici.....	44
1.3.4.2. Cuantificarea și aprecierea purității ARN .....	45
1.3.4.3. Reverstrascriptia.....	45
1.3.4.4. Amplificarea.....	45
1.4. Aspecte etice.....	45
1.5. Analiza statistică a loturilor de pacienți .....	46
1.6. Rezultate .....	46
1.7. Discuții.....	58
1.7.1. Expresiile mRNA-urilor asociate podocitelor sunt crescute la pacienții cu DZ de tip 2.....	58
1.7.2. mRNA-urile asociate podocitelor se corelează cu biomarkerii de leziune podocitară și cu cei ai disfuncției TP renal .....	60
1.7.3. ARNm asociat podocitelor se corelează cu albuminuria și funcția renală la pacienții cu BCRD.....	61
Studiul 2. Profilul de miRNA urinare poate explica leziunea podocitară și disfuncția tubului proximal la pacienții normoalbuminurici cu diabet zaharat de tip 2 .....	63
2.1. Scopul .....	63
2.2. Material.....	63
2.3. Metode .....	64
2.3.1. Tehnica ELISA.....	65
2.3.2. Tehnica de imunonefelometrie.....	65
2.3.3. Tehnica de obținere a miRNA.....	65
2.4. Aspecte etice.....	66
2.5. Analiza statistică a loturilor de pacienți .....	66
2.6. Rezultate .....	67
2.7. Discuții.....	75
2.7.1. Expresia miRNA21 și miRNA124 a fost crescută, în timp ce expresia miRNA192 a fost scăzută și s-au corelat cu biomarkerii de leziune podocitară, încă din stadiul precoce al bolii cronice de rinichi diabetice .....	75

2.7.2. Profilul de miRNA studiat prezintă o variabilitate crescută în ceea ce privește asocierea cu disfuncția tubului proximal renal în stadiile precoce ale bolii cronice de rinichi diabetice .....	77
2.7.3. Profilul miRNA studiat (miRNA192, miRNA124 și miRNA21) este independent de declinul funcției renale.....	79
Studiul 3. Citokinele pro-inflamatorii sunt asociate cu leziunea podocitară și disfuncția tubului proximal în stadiile precoce ale BCRD .....	81
3.1. Scopul .....	81
3.2. Material.....	81
3.3. Metode .....	82
3.3.1. Tehnica ELISA.....	83
3.3.2 Tehnica prin imunonefelometrie.....	83
3.4. Aspecte etice.....	<b>8Error! Bookmark not defined.</b>
3.5. Analiza statistică.....	84
3.6. Rezultate .....	84
3.7. Discuții.....	94
3.7.1. IL-1 alfa, IL-8 și IL-18 se corelează cu leziunea podocitară.....	94
3.7.2. IL-1 alfa, IL-8 și IL-18 se corelează cu disfuncția tubului proximal renal	95
3.7.3. IL-1 alfa, IL-8 și IL-18 se corelează cu albuminuria și RFG .....	96
Studiul 4. Interleukinele și miRNA -urile intervin în stadiul precoce al bolii cronice de rinichi diabetice la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 .....	97
4.1. Scopul studiului .....	97
4.2. Material.....	97
4.3. Metode .....	98
4.3.1. Tehnica ELISA.....	98
4.3.2. Imunonefelometrie .....	98
4.3.3. Determinarea miRNA.....	99
4.4. Aspecte etice.....	99
4.5. Analiza statistică.....	99
4.6. Rezultate .....	100
4.6.1. Regresiile univariabile pentru corelațiile IL serice și urinare studiate cu profilul de miRNA-uri .....	106
4.6.2. Analizele regresiei multivariabile a interleukinelor serice și urinare cu profilul miRNA-uri .....	108
4.7. Discuții.....	110
4.7.1. Expresia IL urinare studiate (IL-1 alfa, IL-8 și IL-18) se corelează cu un anumit profil de miRNA-uri.....	110
4.7.2. Citokinele pro-inflamatorii serice studiate (IL-1 alfa, IL-8, IL-18) sunt crescute la pacienții cu BCRD și se corelează cu un anumit profil de miRNA-uri .....	111
<b>CONCLUZII.....</b>	<b>114</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>118</b>

## ANEXE.....I

### 1. INTRODUCERE

Boala cronică de rinichi diabetică (BCRD) reprezintă, la ora actuală, o cauză importantă de morbiditate și mortalitate atât în cursul diabetului zaharat (DZ) de tip 1, cât și în cursul DZ de tip 2.

Din punct de vedere clinic, BCRD se caracterizează prin afectare renală progresivă reflectată prin albuminurie persistentă ( $>300$  mg/g creatinină), declin progresiv al funcției renale (scăderea ratei de filtrare glomerulară), la care se asociază complicațiile cardiovasculare.

Însă nu toți pacienții cu BCRD prezintă albuminurie persistentă. Astfel, este unanim acceptată terminologia de BCRD non-albuminurică, întrucât complicațiile microvasculare care apar la pacienții cu DZ de tip 2 pot fi independente de valoarea albuminuriei. Acest fapt este dovedit pe studiile bioptice care au demonstrat că există modificări morfopatologice care se produc la nivel renal, în ciuda absenței semnelor clinice ale BCRD.

Această variabilitate a modificărilor clinice care se produc la pacienții cu DZ de tip 2 sugerează că boala poate să fie subdiagnosticată clinic o perioadă lungă de timp. O serie de biomarkeri serici și urinari au fost studiați în BCRD, cu scopul de a decela modificările incipiente care se produc la nivel renal, atât la nivel glomerular cât și la nivel tubular.

Lucrarea de față este o continuare a studiilor anterioare tezei doctorale, în care am decelat modificări ale biomarkerilor de leziune podocitară și de disfuncție ai tubului proximal (TP), încă din stadiile incipiente ale BCRD. Astfel, se subliniază o teorie mai puțin cunoscută în patogeneza BCRD, și anume implicarea precoce a TP. Disfuncția TP va conduce la incapacitatea acestuia de a reabsorbi albumina filtrată, ceea ce va duce la albuminurie consecutivă.

Anumite cercetări actuale, din literatura de specialitate, s-au axat pe analiza expresiei genice, atât la nivelul compartimentului glomerular, cât și tubular, subliniind importanța profilului expresiei genice în patogeneza BCRD. Posibilitatea de a cuantifica expresia anumitor ARN-uri, obținute prin procesul de transcripție din ADN, nu numai din țesuturile renale, cât și în mod non-invaziv, din biofluide (urină sau ser) a reprezentat un pas important în cunoașterea patogenezei BCRD. Un exemplu de determinare non-invazivă a constituit una din temele de cercetare doctorale (Studiul 1), în care am studiat ARNm urinar asociat podocitelor și implicarea acestuia în stadiul precoce al BCRD.

De asemenea, alături de expresia genică, mecanismele epigenetice, ca de exemplu ARN-urile noncodante (numite microRNA-urilor-miRNA), și-au dovedit posibila implicare în patogeneza BCRD (Studiul 2).

Un aspect de actualitate în cercetarea mea doctorală a fost studierea mecanismelor inflamatorii ca posibili factori declanșatori ai afectării renale din

cursul DZ de tip 2 (Studiul 3), precum și interrelația dintre aceste mecanisme inflamatorii și modificările epigenetice care se produc precoce în BCRD (Studiul 4).

Cuvinte cheie: **albuminuria, boală cronică de rinichi diabetică, microRNA, ARN mesager, interleukine, disfuncție de tub proximal renal, leziune podocitară, podocituria**

## 2. SCOPUL CERCETĂRII

Scopul cercetării actuale a fost identificarea unui panel de biomarkeri moleculari care să descrie cu acuratețe modificările complexe clinice și fiziopatologice care se produc în BCRD, încă din stadiul incipient, înaintea apariției albuminuriei.

**Obiectivele specifice** au fost următoarele:

1. Evaluarea ARN mesager (ARNm) urinar asociat podocitelor la pacienții cu DZ tip 2, precum și relația acestuia cu podocitele urinare și biomarkerii de leziune podocitară, de pe-o parte, și cu biomarkerii de disfuncție ai TP, pe de altă parte.
2. Intervenția agenților de glicozilare avansată (AGE) în BCRD și relația acestora cu biomarkerii de leziune podocitară, podocitele urinare, biomarkerii de disfuncție ai TP și ARNm urinar asociat podocitelor.
3. Investigarea unui panel de miRNA-uri urinare la pacienții cu DZ tip 2 și stabilirea unor corelații între modificările valorilor miRNA-urilor studiate și biomarkerii de disfuncție ai TP, pe de-o parte și cei de leziune podocitară, pe de altă parte.
4. Evaluarea valorilor serice și urinare ale citokinelor pro-inflamatorii (IL-1 alfa, IL-8 și IL-18) în relație cu biomarkerii de leziune podocitară și cu biomarkerii de disfuncție ai TP.
5. Studiarea relației interleukinelor pro-inflamatorii serice și urinare cu anumite profiluri de miRNA-uri serice și urinare la pacienții cu BCRD
6. Evaluarea valorii predictive a biomarkerilor studiați (ARNm, miRNA, citokine pro-inflamatorii, biomarkeri de leziune podocitară, podocituria și biomarkeri de disfuncție ai TP) în diagnosticul BCRD, încă din stadiul precoce, înaintea apariției albuminuriei.

### 3. CERCETĂRI PERSONALE

#### **Studiul 1. ARNm urinar asociat podocitelor se corelează cu disfuncția tubului proximal, în stadiul precoce al bolii cronice de rinichi diabetice**

Acest studiu a avut ca scop să investigheze expresia anumitor ARNm urinare asociate podocitelor, și anume factorul nuclear kapa B (NFkB), proteina epitelială glomerulară (GLEPP-1), CD2 asociated protein (CD2AP), nefrina (NPHS1), ADAM metallopeptidase domain 10 (ADAM10), podocina (NPHS2), alfa-actinină-4 în BCRD și să evalueze relația acestora cu leziunea podocitară (exprimată prin biomarkerii de leziune podocitară și podocituria), dar și cu disfuncția TP renal (exprimată prin biomarkerii specifici TP). De asemenea, un alt scop al studiului a fost evaluarea AGE urinari și plasmatici în BCRD și relația acestora cu mARN-urile urinare asociate podocitelor, precum și cu biomarkerii de leziune podocitară și disfuncție ai TP.

În studiu au fost înrolați 76 de pacienți cu DZ de tip 2, împărțiți în 3 loturi în funcție de valoarea albuminuriei (28 pacienți au fost normoalbuminurici, 27 pacienți au prezentat microalbuminurie, respectiv 21 pacienți au fost macroalbuminurici) și 20 de pacienți sănătoși, simbolizând lotul martor (lotul 4).

Tehnica imunoenzimatică ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de tip sandwich a fost utilizată pentru identificarea biomarkerilor de leziune podocitară, și anume Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) urinar și nefrina urinară, biomarkerului de disfuncție al TP - Kidney injury molecule-1 urinar (KIM-1) și a peptidelor AGE urinare și plasmatiche. S-a utilizat, de asemenea, tehnica de imunonefelometrie pentru determinarea albuminuriei, a alfa-1 microglobulinei urinare și a cistatinei C serice. Aprecierea podocituriei s-a realizat prin cultivarea podocitelor *in vitro*. Pentru analiza expresiei genelor de interes s-au utilizat patru etape, și anume, extracția acizilor nucleici, cuantificarea și aprecierea purității ARN-ului, reverstrascriptia și amplificarea (reacția de polimerizare în lanț - RT-PCR).

La analiza regresiei multivariabile s-a remarcat că expresia celor 7 gene studiate (NPHS1, NPHS2, alfa-actinină-4, CD2AP, ADAM10, GLEPP-1, NFkB) s-a corelat direct cu podocituria, albuminuria, alfa-1 microglobulina urinară, KIM-1 urinar, nefrinuria, VEGF, și indirect cu rata de filtrare glomerulară (RFG) ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.808$ ;  $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.825$ ;  $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.805$ ;  $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.663$ ;  $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.726$ ;  $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.720$ ;  $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.724$ ).

## **Studiul 2. Profilul de miRNA urinare poate explica leziunea podocitară și disfuncția TP la pacienții normoalbuminurici cu DZ tip 2**

Acest studiu s-a axat pe relația între un anumit panel de miRNA urinare (miRNA192, miRNA21 și miRNA124), și biomarkerii de leziune podocitară, ca de exemplu nefrina urinară, podocalixina urinară, sinaptopodina urinară, pe de o parte, și de disfuncție ai TP renal, ca de exemplu KIM-1 urinar, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) urinar, pe de altă parte. Un alt obiectiv al studiului a fost demonstrarea intervenției precoce a acestor miRNA urinare în diagnosticul BCRD, înainte să apară modificări ale albuminuriei.

În studiu au fost înrolați 68 de pacienți cu DZ de tip 2, împărțiți în 3 loturi în funcție de valoarea albuminuriei (26 pacienți au fost normoalbuminurici, 24 pacienți au prezentat microalbuminurie și 18 pacienți au fost macroalbuminurici) și 11 pacienți sănătoși, reprezentând lotul control (lotul 4).

Tehnica ELISA a fost folosită pentru determinarea biomarkerilor de leziune podocitară (nefrina urinară, sinaptopodina urinară, podocalixina urinară) și pentru determinarea anumitor biomarkeri de disfuncție ai TP (KIM-1 urinar și NAG urinar). Pentru determinarea albuminuriei, a alfa-1 microglobulinei urinare și a cistatinei C serice s-a utilizat imunonefelometria. Etapele de obținere a miRNA-urilor studiate au fost reprezentate de extracția acizilor nucleici, cuantificarea și aprecierea purității miRNA, reverstranscripția și amplificarea (RT-PCR).

La analiza regresiei univariabile, miRNA21 urinar, miRNA124 urinar și miRNA192 urinar s-au corelat cu biomarkerii de leziune podocitară (nefrina urinară, sinaptopodina urinară, podocalixina urinară), biomarkerii de disfuncție ai TP (NAG urinar, KIM-1 urinar), precum și cu raportul albumină/creatinină urinară (UACR) și RFG.

La analiza regresiei multivariabile, miRNA192 urinar s-a corelat cu sinaptopodina urinară, NAG urinar și RFG ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.902$ ), miRNA124 urinar s-a corelat cu sinaptopodina urinară, NAG urinar, UACR și RFG ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.882$ ), iar miRNA21 s-a corelat cu podocalixina urinară, NAG urinar, UACR și RFG ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.881$ ).

De menționat că expresia miRNA192 urinar a fost scăzută, în timp ce expresiile miRNA21 urinar și miRNA124 urinar au fost crescute.



### **Studiul 3. Citokinele pro-inflamatorii sunt asociate cu leziunea podocitară și cu disfuncția TP în stadiile precoce ale BCRD**

Acest studiu a investigat rolul citokinelor pro-inflamatorii serice și urinare (IL-1 alfa, IL-8, IL-18) în stadiile incipiente ale BCRD, prin evaluarea acestora în raport cu biomarkerii de leziune podocitară și cei de disfuncție ai TP.

Studiul a cuprins 117 pacienți cu DZ tip 2 (36 pacienți normoalbuminurici, 42 pacienți microalbuminurici, respectiv 39 pacienți macroalbuminurici) și 11 subiecți sănătoși.

Metoda ELISA tip sandwich a fost folosită pentru determinarea biomarkerilor de leziune podocitară (nefrina urinară, sinaptopodina urinară, podocalixina urinară), ai biomarkerilor urinari specifici TP (KIM-1 urinar, NAG urinar), precum și pentru evaluarea interleukinelor serice și urinare (IL-1, IL-8, IL-18). Prin imunonefelometrie s-au determinat albuminuria și cistatina C.

La analiza regresiei univariabile, interleukinele serice și urinare studiate (IL-1 alfa, IL-8 și IL-18) s-au corelat pozitiv cu biomarkerii de leziune podocitară studiați (nefrina urinară, podocalixina urinară, sinaptopodina urinară), cu biomarkerii de disfuncție ai TP (KIM-1 urinar, NAG urinar), precum și cu albuminuria, și negativ cu RFG.

La analiza regresiei multivariabile, IL-1 alfa urinară s-a corelat direct cu podocalixina urinară și NAG urinar ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.57$ ), IL-8 urinară s-a corelat pozitiv cu sinaptopodina urinară, KIM-1 urinar, NAG urinar, nefrinuria ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.67$ ), IL-18 urinară s-a corelat direct cu sinaptopodina urinară, NAG urinar și nefrinuria ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.59$ ), IL-1 alfa serică s-a corelat direct cu nefrinuria, sinaptopodina urinară și NAG urinar ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.68$ ), IL-8 serică s-a corelat, de asemenea, direct cu sinaptopodina urinară și NAG urinar ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.66$ ) și IL-18 serică s-a corelat pozitiv cu NAG urinar, KIM-1 urinar și podocalixina urinară ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.64$ ).

### **Studiul 4. Interleukinele și miRNA intervin în stadiul precoce al bolii cronice de rinichi diabetice la pacienții cu diabet zaharat de tip 2**

În această lucrare am analizat relația citokinelor pro-inflamatorii serice și urinare (IL-1 alfa, IL-8 și IL-18) cu un anumit profil de miRNA serice și urinare, și anume miRNA21p, miRNA124, miRNA125a, miRNA126, miRNA146a și miRNA192.

În studiu au fost înrolați 117 pacienți cu DZ de tip 2, care au fost împărțiți în trei loturi, în funcție de gradul albuminuriei (36 pacienți normoalbuminurici, 42 pacienți microalbuminurici, 39 pacienți macroalbuminurici) și 11 subiecți de control (lotul 4).

Tehnicile de laborator utilizate au fost reprezentate de tehnica ELISA tip sandwich pentru determinarea interleukinelor, imunonefelometria pentru determinarea albuminuriei și cistatinei C și tehnica RT-PCR pentru determinarea miRNA-urilor.

La analiza regresiei multivariabile, IL urinare s-au corelat cu miRNA urinare studiate și RFG, după cum urmează: IL-1 alfa s-a corelat direct cu miRNA21 și 124, invers cu miRNA125a, miRNA192 și RFG ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.744$ ). IL-8 s-a corelat direct cu miRNA21 și miRNA124, și invers cu miRNA125a, miRNA126, miRNA146a și RFG ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.726$ ). IL-18 s-a corelat direct cu miRNA21 și miRNA124 și invers cu miRNA146a, 192 și RFG ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0.698$ ).

În ceea ce privește IL serice, la analiza regresiei multivariabile, IL-1 alfa serică s-a corelat direct cu miRNA124 serică și negativ cu miRNA125a și miRNA192 serice ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0,723$ ); IL-8 serică s-a corelat invers cu miRNA146a și miRNA192 serică ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0,743$ ); iar IL-18 serică s-a corelat direct cu miRNA21 și indirect cu miRNA125a și miRNA146a serice ( $p < 0.0001$ ,  $R^2=0,636$ ).

## 4. CONCLUZII

### 1. Modificările ARNm și factorii epigenetici sunt implicați în BCRD încă din stadiul precoce

- 1.1. La pacienții cu DZ de tip 2, mARN-urile urinare asociate podocitelor (NPHS1, NPHS2, CD2AP, ADAM 10, GLEPP-1, alfa actinină-4, NFkB) pot fi considerați markeri de precocitate ai BCRD, pentru că expresia lor a fost crescută încă din stadiul de normoalbuminurie. De asemenea, s-au corelat cu markerii urinari de precocitate ai BCRD, și anume biomarkerii de leziune podocitară (nefrina și VEGF) și ai TP (alfa-1-microglobulina, KIM-1), precum și cu podocituria.
- 1.2. AGE urinari și plasmatici pot fi implicați în modificarea expresiei mARN-urilor asociate podocitelor (NPHS1, NPHS2, CD2AP, ADAM 10, GLEPP-1, alfa actinină-4, NFkB)
- 1.3. Profilul de miRNA urinare studiat (miRNA21, miRNA124 și miRNA192) s-a asociat cu biomarkerii de disfuncție ai TP (NAG urinar și KIM-1 urinar), precum și cu biomarkerii de leziune podocitară (nefrina urinară, sinaptopodina urinară, podocalixina urinară), încă din stadiul de normoalbuminurie, ceea ce denotă implicarea precoce a acestor miRNA-uri în BCRD.
- 1.4. Expresia urinară a miRNA192 este diminuată la pacienții cu BCRD, în timp ce expresia urinară a miRNA21 și miRNA124 este crescută la pacienții cu BCRD. Această afirmație denotă că expresia urinară crescută a unor miRNA-uri (ca, de exemplu, miRNA192) are efect protectiv renal,

în timp ce expresia urinară crescută a altor miRNA-uri (miRNA21 și miRNA124) se asociază cu efecte negative la nivel renal.

## **2. Moleculele inflamatorii sunt implicate în BCRD încă din stadiile incipiente**

- 2.1 Citokinele pro-inflamatorii serice și urinare studiate (IL-1 alfa, IL-8 și IL-18) sunt asociate cu biomarkerii disfuncției TP (KIM-1 urinar, NAG urinar) și cu cei ai leziunii podocitare (nefrina urinară, sinaptopodina urinară, podocalixina urinară), încă din stadiul de normoalbuminurie, ceea ce demonstrează rolul inflamației în BCRD incipientă.
- 2.2 Fiecare IL s-a corelat în mod diferit cu biomarkerii podocitari studiați (nefrina urinară, sinaptopodina urinară, podocalixina urinară), ceea ce se poate explica prin faptul că IL pot acționa prin mecanisme diferite în anumite arii din structura podocitară (domeniul apical, jonctional sau bazal).

## **3. Există o relație de cauzalitate între citokinele pro-inflamatorii și mecanismele epigenetice din BCRD în diagnosticul precoce al BCRD**

- 3.1 IL serice și urinare (IL-1 alfa, IL-8 și IL-18) se asociază cu miRNA urinare și serice studiate (miRNA21, miRNA124, miRNA125a, miRNA126, miRNA146a și miRNA192), încă din stadiul de normoalbuminurie.
- 3.2 MiRNA studiate ar putea modula expresia și activitatea IL serice și urinare, având un potențial rol în dezvoltarea și progresia BCRD.
- 3.3 Expresiile crescute ale miRNA125a, miRNA126, miRNA146a și miRNA192 pot prezenta un efect renoprotectiv.

## LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

1. Ligia Petrica, Sorin Ursoniu, Florica Gadalean, Adrian Vlad, Gheorghe Gluhovschi, Victor Dumitrascu, Daliborca Vlad, Cristina Gluhovschi, Silvia Velciov, Flaviu Bob, Petru Matusz, **Oana Milaș**, Alina Secara, Anca Simulescu, Roxana Popescu. Urinary podocyte-associated mRNA levels correlate with proximal tubule dysfunction in early diabetic nephropathy of type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2017;9:31. doi: 10.1186/s13098-017-0228-y (ISI journal, **IF: 2,413**)
2. **Oana Milaș**, Florica Gadalean, Adrian Vlad, Victor Dumitrascu, Cristina Gluhovschi, Gheorghe Gluhovschi, Silvia Velciov, Roxana Popescu, Flaviu Bob, Petru Matusz, Agneta-Maria Pusztai, Octavian M Cretu, Alina Secara, Anca Simulescu, Sorin Ursoniu, Daliborca Vlad, Ligia Petrica. Deregulated profiles of urinary microRNAs may explain podocyte injury and proximal tubule dysfunction in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus. *J Investig Med* 2018;66(4):747-754. doi: 10.1136/jim-2017-000556. (ISI journal, **IF: 1,994**)
3. **Oana Milaș**, Florica Gadalean, Adrian Vlad, Victor Dumitrascu, Silvia Velciov, Cristina Gluhovschi, Flaviu Bob, Roxana Popescu, Sorin Ursoniu, Dragos Catalin Jianu, Petru Matusz, Agneta-Maria Pusztai, Alina Secara, Anca Simulescu, Maria Stefan, Mihaela Patruica, Flaviu Petrica, Daliborca Vlad, Ligia Petrica. Pro-inflammatory cytokines are associated with podocyte damage and proximal tubular dysfunction in the early stage of diabetic kidney disease in type 2 diabetes mellitus patients. *J Diabetes Complications* 2020;34(2):107479. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2019.107479 (ISI journal, **IF: 2,684**)
4. Ligia Petrica, **Oana Milaș**, Mihaela Vlad, Adrian Vlad, Florica Gadalean, Victor Dumitrascu, Silvia Velciov, Cristina Gluhovschi, Flaviu Bob, Sorin Ursoniu, Dragos C Jianu, Petru Matusz, Agneta-Maria Pusztai, Octavian Cretu, Daniela Radu, Alina Secara, Anca Simulescu, Maria Stefan, Roxana Popescu, Daliborca Vlad. Interleukins and miRNAs intervene in the early stages of diabetic kidney disease in Type 2 diabetes mellitus patients. *Biomark Med* 2019;13(18):1577-1588. doi: 10.2217/bmm-2019-0124 (ISI journal, **IF: 2,268**)