

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL DE MEDICINĂ INTERNĂ II

SECARĂ P. ALINA-EMANUELA



# TEZĂ DE DOCTORAT

EVALUAREA ROLULUI CITOKINELOR PROINFLAMATORII  
ȘI A PEPTIDELOR GLICOZILATE URINARE ÎN PREDICȚIA  
ȘI PROGRESIA BOLII CRONICE DE RINICHI DIABETICE  
UTILIZÂND TEHNICI AVANSATE  
DE PROTEOMICĂ URINARĂ

## REZUMAT

Conducător Științific

PROF. UNIV. DR. PETRICA LIGIA  
PROF. UNIV. DR. ZAMFIR ALINA

Timișoara  
2020

## CUPRINS

Listă de lucrări publicate.....	VIII
Listă de abrevieri.....	IX
Index figuri.....	XII
Index tabele.....	XIII
Mulțumiri.....	XV
INTRODUCERE .....	XVII

### PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. BOALA CRONICĂ DE RINICHI DIABETICĂ .....	1
1.1. Definirea conceptului și terminologia curentă .....	1
1.2. Epidemiologie și relevanța clinică .....	3
1.3. Albuminuria – elementul principal de diagnostic actual .....	4
1.3.1. Semnificația barierei de filtrare glomerulară .....	5
1.3.2. Disfuncția endotelială în DZ 2 .....	9
1.3.3. Implicarea podocitelor în mecanismul apariției albuminuriei .....	10
1.3.4. Rolul tubului proximal în determinarea apariției albuminuriei .....	13
2. CITOKINELE PROINFLAMATORII .....	17
2.1. Semnificație, utilizare și detecție de laborator a citokinelor pro-inflamatorii .....	17
2.2. Implicarea citokinelor pro-inflamatorii în boala renală diabetică .....	18
3. PEPTIDELE GLICOZILATE URINARE .....	20
3.1. Perspective cunoscute despre peptidele glicozilate .....	20
3.2. Utilizarea tehnicilor de proteomică urinară pentru detecția peptidelor glicozilate .....	22
3.3. Rolul peptidelor glicozilate urinare în boala renală diabetică .....	24
4. Micro ARN-urile .....	27
4.1. Elemente de actualitate despre miARN-uri .....	27
4.2. Implicații renale ale modulării expresiei genice de către miARN-uri .....	28

### PARTEA SPECIALĂ

STUDIUL 1: PROTEINE URINARE SPECIFICE IDENTIFICATE FOLOSIND TEHNICI MODERNE DE PROTEOMICĂ POT CONTRIBUI LA DESCOPERIREA DE NOI BIOMARKERI ÎN BCR DZ – STUDIU PILOT .....	30
1.1. Obiectivele studiului.....	30
1.2. Motivația efectuării studiului .....	31
1.3. Materiale și metode .....	32
1.3.1. Înrolarea subiecților în studiu .....	32
1.3.2. Deontologie și etică medicală .....	34
1.3.3. Colectarea și analiza probelor de urină .....	34
1.3.4. Analiza spectrometrică LC-MS/MS .....	35
1.4. Rezultate.....	36
1.4.1. Caracteristicile subiecților incluși în studiu.....	36
1.4.2. Caracteristicile proteomice ale probelor evaluate.....	36
1.4.3. Clasificarea proteinelor urinare selecționate pe baza mecanismului patologic subiacent din BCR DZ .....	41
1.4.4. Comparția proteinelor urinare identificate între lotul de bolnavi și cel de control .....	42
1.4.5. Comparția proteinelor urinare identificate între subgrupele de pacienți cu DZ 2 .....	43
1.4.6. Clasificarea proteinelor urinare selectate pe baza mecanismului patogen subiacent și a nivelului albuminuriei .....	44

1.5. Discuții .....	44
1.5.1. Situația actuală și necesitatea unor biomarkeri precoci în BCR DZ .....	44
1.5.2. Criterii adiționale de selecție a proteinelor identificate.....	45
1.5.3. Compararea datelor obținute cu rezultate din literatură .....	46
1.5.4. Identificarea de noi proteine urinare care pot fi asociate cu mecanismele patogenice din BCR DZ .....	47
1.5.4.1. Afectarea glomerulară în BCR DZ.....	47
1.5.4.2. Mecanismul inflamator și stresul oxidativ în BCR DZ .....	47
1.5.4.3. Afectarea tubulară în BCR DZ .....	48
1.5.4.4. Proteinuria și complicațiile DZ 2 .....	49
1.5.4.5. Alte observații.....	49
1.5.4.6. Validarea rezultatelor .....	49
1.5.4.7. Contribuții și limitări ale studiului.....	50
1.6. Concluzii .....	50
1.7. Perspective în studiile proteomice .....	51
1.8. Suport financiar.....	51

## STUDIUL 2: EXPRESIA miARN-URILOR ESTE ASOCIATĂ CU MODIFICĂRILE CLINICE DATORATE REMODELĂRII VASCULARE ÎN RINICHI ȘI CREIER LA PACIENȚII CU DZ 2.....

2.1. Obiectivele studiului.....	52
2.2. Motivația efectuării studiului .....	52
2.3. Materiale și metode .....	54
2.3.1. Înrolarea subiecților în studiu .....	54
2.3.2. Deontologie și etică medicală .....	55
2.3.3. Evaluarea de laborator a probelor recoltate .....	55
2.3.3.1. Biomarkeri de afectare podocitară.....	56
2.3.3.2. Biomarkeri de disfuncție tubular .....	56
2.3.3.3. Albuminuria și cistatina C.....	56
2.3.3.4. Determinarea miARN-urilor .....	57
2.3.3.5. Măsurători ultrasonografice cerebro-vasculare.....	58
2.3.3.6. Indicele intimă-medie .....	58
2.3.3.7. Indicele de rezistență .....	58
2.3.3.8. Reactivitatea cerebro-vasculară .....	59
2.3.4. Analiza statistică.....	59
2.4. Rezultate.....	60
2.4.1. Caracteristicile subiecților incluși în studiu.....	60
2.4.2. Nivelele urinare și plasmatice ale miARN-urilor se corelează statistic cu biomarkerii de afectare tubulară și podocitară, precum și cu RFG .....	62
2.4.3. Nivelele plasmatice ale miARN-urilor se corelează statistic cu parametrii care indică remodelarea vasculară cerebrală la pacienții cu DZ 2.....	64
2.4.4. Parametrii de remodelare cerebrală vasculară se corelează statistic cu biomarkerii de afectare tubulară și disfuncție podocitară, independent de albuminurie și de nivelul funcției renale .....	65
2.5. Discuții .....	66
2.5.1. Expresia anumitor miARN-uri specifice determină efecte renoprotective sau efecte negative la nivel renal în DZ 2.....	67
2.5.2. miARN-21 ȘI miARN-192 pot determina remodelare vasculară cerebrală, în timp ce miARN-124, 125A, 126 și 146a pot exercita efecte neuroprotective.....	69
2.5.3. Variabilitatea expresiei miARN-urilor la nivel renal și cerebral poate explica disocierea temporală dintre afectarea renală și remodelarea vasculară cerebrală în BCR DZ incipient.....	71
2.6. Contribuții și limitări ale studiului .....	72

2.7. Concluzii .....	73
2.8. Suport financiar.....	73
STUDIUL 3: miARN-URI SPECIFICE SE CORELEAZĂ CU CITOKINE PROINFLAMATORII, PRECUM ȘI CU BIOMARKERI DE AFECTARE PODOCITARĂ ȘI TUBULARĂ, ÎN ETAPELE INIȚIALE ALE BCR DZ .....	
3.1. Obiectivele studiului.....	74
3.2. Motivația efectuării studiului .....	74
3.3. Materiale și metode .....	77
3.3.1. Înrolarea subiecților în studiu .....	77
3.3.2. Deontologie și etică medicală .....	77
3.3.3. Prelucrarea probelor recoltate .....	78
3.3.4. Biomarkeri ai afectării podocitare.....	78
3.3.5. Biomarkeri ai disfuncției tubulare .....	79
3.3.6. Biomarkeri proinflamatorii .....	79
3.3.7. Evaluarea miARN-urilor specifice .....	79
3.3.8. Albuminuria și cistatina C.....	80
3.3.9. Analiza statistică.....	80
3.4. Rezultate.....	81
3.4.1. Caracteristicile subiecților incluși în studiu.....	81
3.4.2. Nivelele biomarkerilor de interes la subiecții diabetici care prezintă albuminurie .....	82
3.4.3. Corelații ale profilelor serice și urinare ale IL-6 ȘI IL-17 cu alți parametri studiați.....	84
3.4.4. Corelații ale profilelor serice ale IL-6 ȘI IL-17 cu nivelele serice ale miARN-urilor 21,124,146a, 192 .....	86
3.4.5. Corelații ale profilelor urinare ale IL-6 ȘI IL-17 cu nivelele urinare ale miARN-urilor 21,124,146a, 192 .....	88
3.5. Discuții .....	89
3.5.1. IL-6, IL-17 se corelează cu biomarkeri podocitari, tubulari, precum și cu parametrii funcției renale, în etapele precoce ale BCR DZ .....	89
3.5.2. Nivelele serice și urinare ale IL-6, IL-17 se asociază cu expresii specifice ale miARN-urilor 21,124,146a,192.....	90
3.5.3. Contribuții și limitări ale studiului .....	91
3.6. Concluzii .....	92
3.7. Suport financiar.....	92
CONCLUZII FINALE.....	
Contribuții originale .....	94
Direcții viitoare de cercetare .....	95
BIBLIOGRAFIE.....	
ANEXE .....	

# 1. INTRODUCERE

Diabetul zaharat de tip 2 reprezintă una din cele mai vechi patologii cunoscute omenirii, conferind persoanelor atinse de această boală o serie de complicații pe termen scurt și pe termen lung, care pot conduce frecvent la invaliditate și chiar la deces. Boala cronică de rinichi diabetică este încadrată, în momentul de față, ca fiind principala cauză responsabilă pentru deteriorarea severă a funcției renale până în punctul în care este necesară instituirea unei metode de suplere a acesteia.

Detectarea bolii cronice de rinichi diabetice se realizează actulamente prin evaluarea a doi parametrii: nivelul funcției renale, determinat prin calcularea ratei de filtrare glomerulară și estimarea gradului de leziune renală prin evaluarea nivelului albuminuriei. Aceste metode sunt folosite curent în practică medicală, atât pentru stabilirea diagnosticului de boală cronică de rinichi, pentru evaluarea aplicabilității unei intervenții terapeutice, pentru stratificarea riscul progresiei, precum și pentru evaluarea deteriorării cardiovasculare asociate. Acești parametri conferă totuși informații limitate în cadrul bolii, fiind elemente tardive de evaluare în depistarea complicațiilor diabetului zaharat de tip 2. Odată cu instalarea deteriorării funcției renale și prin asocierea albuminuriei, leziunea renală este evidentă iar progresia acesteia se poate realiza într-un mod fulminant. Astfel, se indică depistarea de noi biomarkeri, capabili să evidențieze o posibilă implicare renală în evoluția diabetului zaharat de tip 2, înainte de instalarea leziunilor ireversibile.

Proteinele traversează o multitudine de procese în diabetul zaharat, precum glicare, oxidare și nitrare, evenimente premergătoare instalării declinului funcției renale și apariției albuminuriei. Existența unor tehnici proteomice avansate permite detectarea unor proteine sau fragmente de peptide unice la bolnavii cu diabet zaharat de tip 2, care pot fi utilizate ca posibili biomarkeri de detecție precoce a deteriorării renale.

miARN-urile sunt o categorie de ARN-uri mici, endogene, care joacă un rol regulator important în modularea expresiei genelor. Acestea sunt implicate în inițierea sau progresia unei varietăți de patologii. Până în prezent au fost studiate mai multe tipuri de miARN (21, 124, 125a, 126, 146a, 192), care au prezentat diferite efecte biologice în rinichi, creier, având capacitatea de a modula funcțiile celulare și biochimice. În acest fel, miARN-urile pot iniția sau stimula progresia complicațiilor diabetului zaharat de tip 2, inclusiv a bolii cronice de rinichi diabetice, precum și a afectării cerebrovasculare secundare.

Citokinele proinflamatorii dețin un rol semnificativ în dezvoltarea bolii cronice de rinichi diabetice. Acestea intervin în apariția tulburărilor de hemodinamică de la nivel intraglomerular, în alterarea expresiei matricei extracelulare, în destabilitatea membranei bazale glomerulare, stimulează apoptoza și necroza, precum și stresul oxidativ. De asemenea, miARN-urile sunt implicate în modularea unei varietăți de procese celulare și biochimice, fapte care sugerează implicarea acestora în patogenia afectării renale din diabetul zaharat de tip 2. Astfel, studiul de față a avut drept scop detectarea posibilelor corelații între IL-6, IL-17 și anumite miARN (21, 124, 146a, 192), precum și anumiți biomarkeri specifici ai deteriorării tubulare și podocitare, pentru a evidenția rolul acestor citokine în patogeniza bolii.

Prezentul studiu a vizat detectarea proteinelor urinare la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și diferite grade de afectare renală, utilizând tehnici proteomice moderne. În acest fel, s-a demonstrat importanța spectrometriei de masă în detectarea precoce a bolii cronice de rinichi diabetice și s-a stabilit baza pentru includerea acestor proteine în rutina de detectare a clinicianului, pentru un control optim al bolii. Ulterior, a fost investigat procesul de remodelare a vaselor cerebrale, în etapele inițiale ale bolii cronice de rinichi diabetice. Acest fenomen poate fi explicat prin variabilitatea expresiei miARN în cele două organe, rinichi și creier.

Implicarea anumitor interleukine, cum ar fi IL-6, IL-17, în mecanismul inflamator al bolii cronice de rinichi diabetice, a fost apoi evaluată. Au fost studiate, de asemenea, apariția de corelații statistice semnificative între acestea și anumite miARN specifice, precum și cu biomarkeri cunoscuți de lezare tubulară și podocitară.

**Cuvinte cheie:** diabet zaharat de tip 2, proteomică urinară, albuminurie, inflamație, disfuncție de tub proximal, miARN.

## 2. SCOPUL CERCETĂRII

Prezenta lucrare a urmărit continuarea cercetărilor anterioare, care au identificat aspecte relevante, legate de mecanismele patogenice implicate în leziunile glomerulare și tubulare din BCR DZ. Această lucrare a dorit, de asemenea, să ofere perspective de actualitate și relevante clinic, prin evidențierea unor biomarkerilor noi și timpurii, în BCR DZ. În acest fel, aceste rezultate pot contribui la stabilirea de noi abordări terapeutice ale bolii, pentru a preveni sau a încetini evoluția acesteia.

În conformitate cu aceste aspecte, **obiectivele specifice ale acestei lucrări** pot fi sistematizate după cum urmează:

1. Utilizarea tehnicilor avansate LC-MS / MS din spectrometria de masă, pentru a detecta proteine urinare unice la pacienții cu DZ 2, care pot fi utilizați ca viitori biomarkeri pentru detectarea precoce a BCR DZ.
2. Evaluarea nivelurilor anumitor miARN, prin tehnici ELISA și alte teste complementare de analiză, care pot permite detectia unor conexiuni între leziuni ale creierului și ale rinichilor, în etapele inițiale ale BCR DZ.
3. Să detecteze, utilizând tehnici complexe de laborator, implicarea anumitor citokine proinflamatorii, precum și a anumitor miARN, în stadiile incipiente ale BCR DZ, prin observarea corelațiilor semnificative statistic între aceste molecule și biomarkeri ai leziunilor podocitare și tubulare.

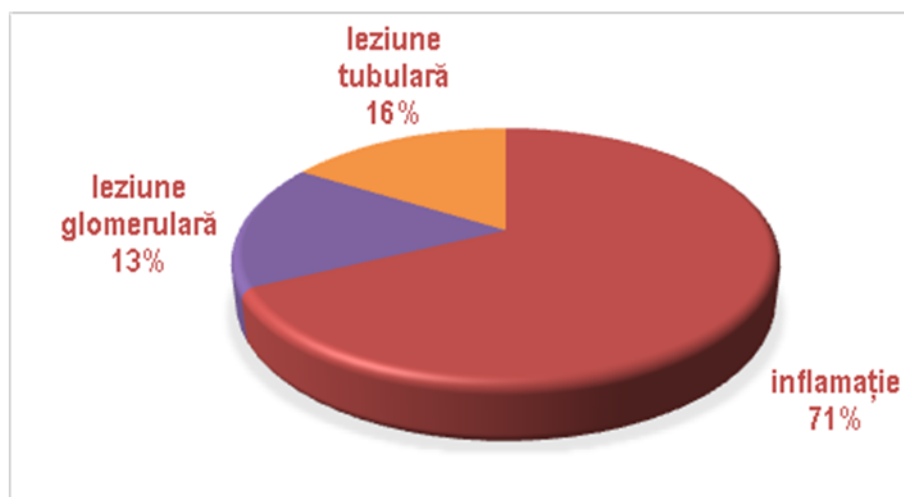
### STUDIUL 1: PROTEINE URINARE SPECIFICE IDENTIFICATE FOLOSIND TEHNICI MODERNE DE PROTEOMICĂ POT CONTRIBUI LA DESCOPERIREA DE NOI BIOMARKERI ÎN BCR DZ – STUDIU PILOT

Acest studiu a avut ca scop implementarea unei platforme proteomice avansate, pentru detectarea proteinelor urinare la un grup de subiecți cu DZ 2 din România, care aveau grade diferite de afectare renală și diferite stadii de albuminurie, comparativ cu un grup de subiecți martor. Platforma proteomică a fost testată și validată în laborator, folosind probe de urină recoltate atât de la subiecți sănătoși, cât și de la subiecți cu DZ 2 incluși în studiu.

Rezultatele au fost apoi comparate cu datele existente din literatura de specialitate, pentru a detecta proteinele urinare care pot fi clasificate ca biomarkeri timpurii ai afectării renale în DZ 2. Astfel, a fost efectuată o evaluare descriptivă a proteinelor urinare, identificate la pacienții cu DZ 2, comparativ cu informațiile obținute de la subiecții martor, utilizând rezultatele furnizate de analiza spectrometrică avansată. Au fost astfel identificate un număr de 557 de proteine umane complexe, utilizând tehnica proteomică MS / MS și apoi programul de căutare a bazei de date spectrometrice SEQUEST, unele detectate doar în grupul pacienților.

Pentru a obține o calitate superioară a identificării proteinelor, s-au aplicat trei criterii suplimentare de selecție, proteinelor deja identificate; astfel, s-au selectat proteine conținând un număr de cel puțin trei peptide unice specifice unui grup proteic, proteine care au o secvență de acoperire de cel puțin 30% în ambele determinări ale probelor pacienților cu DZ 2, precum și un scor de cel puțin 10 al potrivirii peptidice în spectru (PSM), pentru lotul de pacienți comparativ cu lotul de control. De asemenea, acele proteine găsite în mod constant în cantități urinare mari, au fost eliminate din evaluarea finală: imunoglobuline, transferina, antitripsina, haptoglobina. Cu toate acestea, a fost luată în considerare albumina, având în vedere scopul studiului.

Astfel, din numărul total de proteine identificate, au fost selectate 31 de proteine care îndeplinesc aceste criterii. Ulterior, aceste proteine au fost clasificate în funcție de posibila lor implicare în patogeneza DKD, cu rol în mecanismul glomerular, tubulointerstițial și inflamator al bolii. Astfel, 71% dintre aceste proteine au fost corelate cu mecanismul inflamator, 16% cu mecanismul tubulo-interstițional și 13% cu mecanismul glomerular, fapte ilustrate în figura 1.



**Figura 1 - Reprezentare procentuală a proteinelor identificate în funcție de mecanismul patogenic în care intervin în BCR DZ**

Pe de altă parte, din cele 31 de proteine selectate pe baza criteriilor aplicate, 5 proteine pot fi clasificate în funcție de posibilul mecanism în care sunt implicate în patogenia BCR DZ, precum și în funcție de nivelul albuminuriei, așa cum se poate observa în tabelul 1.

**Tabelul 1 - Mecanisme patogenice ale proteinelor selectate în funcție de nivelul albuminuriei**

	Inflamație	Leziuni glomerulare	Leziuni tubulare
Micro-albuminurie	Hemoglobina subunitatea delta: umană, nume genă HBD, taxonomie 9606, SV=2, PE=1	Apolipoproteina A-I: umană, nume genă APOA1, taxonomie 9606, SV=1, PE=1	
Macro-albuminurie	Citidina deaminaza: umană, nume genă CDA, taxonomie 9606, SV=2, PE=1 Proteina S100-A8: umană, nume genă S100A8, taxonomie 9606, SV=1, PE=1		Neutrofil gelatinaza-asociată lipocalinei: umană, nume genă LCN2, taxonomie 9606, SV=2, PE=1

### Concluzii:

1. Tehnicile moderne de proteomică urinară pot fi utilizate pentru a detecta și evalua proteinele urinare care pot juca un rol important în patogenia BCR DZ.
2. Cu ajutorul platformelor proteomice moderne, se pot identifica proteine urinare complexe, care pot fi încadrate ca posibili biomarkeri pentru detectarea precoce a BCR DZ.
3. Prin generarea unui profil proteomic comparativ între grupul de pacienți și grupul de control, pot fi identificate proteinele urinare, care pot fi asociate cu diferitele mecanisme ale BCR DZ.
4. Utilizarea unei platforme proteomice avansate este un instrument puternic pentru descoperirea rapidă, sensibilă și fiabilă a biomarkerilor proteici identificabili în urina umană.
5. Proiectarea și raportarea unei noi metode complexe în spectrometria de masă este o condiție prealabilă pentru un progres și o dezvoltare continuă în domeniul proteomicii urinare.

## STUDIUL 2: EXPRESIA miARN-URILOR ESTE ASOCIATĂ CU MODIFICĂRILE CLINICE DATORATE REMODELĂRII VASCULARE ÎN RINICHI ȘI CREIER LA PACIENȚII CU DZ 2

Prezentul studiu a avut ca scop evaluarea expresiei miARN-urilor specifice identificate în plasma și urina pacienților cu DZ 2. Aceste rezultate au fost apoi comparate cu alți biomarkeri cunoscuți de afectare podocitară și de leziune tubulară proximală. Astfel, a fost evaluată asocierea dintre parametrii de remodelare vasculară din rinichi, creier și expresia unor miARN-uri specifice, la subiecții cu DZ 2. Luând în considerare studiile anterioare, care au evaluat rolul anumitor miARN-urilor de la nivel renal, la pacienții cu DZ 2, s-a investigat dacă aceste miARN pot avea efecte asemănătoare în creier, datorită similitudinilor structurale și funcționale dintre cele două organe. De asemenea, s-a evaluat dacă anumite miARN-uri, implicate în remodelarea vasculară la nivelul creierului, pot provoca efecte la nivelul rinichilor.

Rezultatele obținute au arătat valori mult mai mari ale expresiei miARN-urilor la subiecții diabetici comparativ cu grupul martor; modificări cerebrovasculare au fost detectate chiar și la pacienții diabetici fără albuminurie patologică. Au existat, de asemenea, valori modificate ale biomarkerilor de leziune podocitară și tubulară la subiecții diabetici. În același timp, au existat asocieri statistice puternice între remodelarea renală, cerebro-vasculară și miARN-uri specifice.

A fost utilizată analiza de regresie multivariabilă și s-au identificat corelații semnificative statistic între nivelurile plasmatic, urinare ale miARN 21, 124, 125a, 126, 146 a, 192 și RAC, RFG, precum și cu biomarkeri podocitari și tubulari (Tabelele 2, 3).

**Tabelul 2 – Analiza regresivă multivariabilă utilizând nivelul urinar al miARN-urilor**

P	Variabilă	Coef $\beta$	P	95% CI	Prob (F)	R <sup>2</sup>
U miARN-21	Podocalixina/creatinina	0.0005	0.0001	0.0002 – 0.0007	<0.00001	0.791
	NAG/creatinina	0.316	0.0001	0.023 – 0.039		
	RAC	0.0004	0.0001	0.0002 – 0.0007		
U miARN-124	NAG/creatinina	0.062	0.0001	0.044 – 0.079	< 0.00001	0.749
	RAC	0.0004	0.001	0.0001 – 0.0007		
	RFG	-0.009	0.0001	-0.014 – -0.004		
U miARN-125a	Sinaptopodina/creatinina	-0.006	0.002	-0.002 – -0.010	< 0.00001	0.630
	NAG/creatinina	-0.054	0.0001	-0.031 – -0.077		
	RFG	0.009	0.010	0.016 – 0.002		
U miARN-126	Podocalixina / creatinina	-0.0005	0.0001	-0.0002 – -0.0007	< 0.00001	0.797
	NAG/creatinina	-0.020	0.0001	-0.013 – -0.028		
	RAC	-0.0005	0.0001	-0.0003 – -0.0007		
U miARN-146a	Sinaptopodina/creatinina	-0.002	0.032	-0.005 – -0.0003	< 0.00001	0.801
	NAG/creatinina	-0.044	0.0001	-0.057 – -0.031		
	RAC	-0.0004	0.0001	-0.0007 – -0.0002		
	RFG	0.005	0.009	0.001 – 0.009		
U miARN-192	Sinaptopodina/creatinina	-0.003	0.007	-0.006 – -0.001	< 0.00001	0.811
	NAG/creatinina	-0.046	0.0001	-0.059 – -0.033		
	RAC	-0.0005	0.0001	-0.0007 – -0.0002		
	RFG	0.004	0.020	0.0007 – 0.0089		

Legendă: RFG – rata de filtrare glomerulară; NAG – N-beta-D-acetilglucozaminidază; RAC – raportul albumina/creatinina urinară; U miARN – microARN urinar.

**Tabelul 3 – Analiza regresivă multivariabilă utilizând nivelul plasmatic al miARN-urilor**

P	Variabilă	Coef $\beta$	P	95% CI	Prob (F)	R <sup>2</sup>
P miARN-21	Podocalixina/creatinina	0.0005	0.0001	0.0002 – 0.0009	<0.00001	0.699
	NAG/creatinina	0.026	0.0001	0.016 – 0.037		
	RAC	0.0004	0.0001	0.0002 – 0.0007		
P miARN-124	NAG/creatinina	0.020	0.006	0.034 – 0.006	< 0.00001	0.605
	RAC	0.0005	0.0001	0.0008 – 0.0003		
	KIM-1	0.0006	0.001	0.001 – 0.0002		
P miARN-125a	Sinaptopodina/creatinina	-0.051	0.0001	-0.801 – -0.023	< 0.00001	0.482
	NAG/creatinina	-0.034	0.002	-0.055 – -0.013		
	Podocalixina / creatinina	-0.006	0.002	-0.002 – -0.010		
	RAC	-0.0004	0.044	-0.0008 – -0.0001		
P miARN-126	Podocalixina / creatinina	-0.004	0.001	-0.001 – -0.007	< 0.00001	0.562
	NAG/creatinina	-0.039	0.0001	-0.053 – -0.024		
	Sinaptopodina/creatinina	-0.033	0.001	-0.053 – -0.014		
	RAC	-0.0004	0.002	-0.0007 – -0.0001		
P miARN-146a	NAG/creatinina	-0.048	0.0001	-0.065 – -0.030	< 0.00001	0.695
	RAC	-0.0005	0.0001	-0.0008 – -0.0002		
	RFG	0.007	0.003	0.002 – 0.012		
P miARN-192	Sinaptopodina/creatinina	-0.003	0.033	-0.0002 – -0.006	< 0.00001	0.655
	NAG/creatinina	-0.036	0.0001	-0.018 – -0.055		
	RFG	0.011	0.0001	-0.018 – -0.055		

Legendă: RFG – rata de filtrare glomerulară; KIM-1 – molecula de leziune renală 1; NAG – N-beta-D- acetilglucosaminidază; RAC – raportul albumina/creatinina urinară; P miARN – microARN plasmatic.

În cadrul analizei liniare multivariabile din prezentul studiu, nivelele plasmatice ale miARN-urilor 21 și miARN-192 s-au corelat independent cu IR-ACI, IR-ACM și BHI, iar miARN-urile 124, 125a, 126 și 146a au indicat corelații independente cu aceleași parametrii de remodelare vasculară cerebrală, precum și cu IMT-ACC, aspecte evidențiate în tabelul 4.

**Tabelul 4 – Analiza regresivă multivariabilă a indicilor hemodinamici cerebrali**

P	Variabilă	Coef $\beta$	P	95% CI	Prob (F)	R <sup>2</sup>
P miARN-21	IR-ACI	2.773	0.0001	1.470 – 4.076	<0.00001	0.441
	IR-ACM	1.836	0.004	3.080 – 0.592		
	BHI	-0.031	0.014	-0.056 – -0.006		
P miARN-124	IR-ACI	-2.993	0.0001	-4.448 – -1.537	< 0.00001	0.405
	IR-ACM	-2.352	0.001	-0.962 – -3.741		
	BHI	0.041	0.004	0.013 – 0.069		
P miARN-125a	IR-ACI	-1.624	0.010	-2.847 – -0.401	< 0.00001	0.421
	BHI	0.036	0.037	0.002 – 0.070		
P miARN-126	IR-ACI	-3.228	0.001	-5.055 – -1.401	< 0.00001	0.408
	IMT-ACC	-1.829	0.010	-0.0457 – -3.201		
	BHI	0.038	0.008	0.010 – 0.065		
P miARN-146a	IR-ACI	-1.403	0.010	-2.463 – -0.344	< 0.00001	0.528
	BHI	0.488	0.002	0.019 – 0.785		
P miARN-192	IR-ACI	1.409	0.005	0.447 – 2.371	< 0.00001	0.583
	BHI	-0.049	0.0001	-0.076 – -0.022		

Legendă: IR – indicele de rezistență; ACI – artera carotidă internă; ACM – artera cerebrală medie; ACC – artera carotidă comună; IMT – indicele intimă-medie; BHI – indicele de apnee; P miARN – nivelul plasmatic al microARN

Analiza regresivă multivariabilă a indicat corelații semnificative și independente între parametrii neurosonologici precum IR-ACI, IR-ACM, IR-ACC, BHI și RAC, RFG, parametri de afectare tubulară (KIM-1, NAG) precum și cu parametri de afectare podocitară (sinaptopodina, podocalixina, nefrina), aspecte evidențiate în tabelul 5.

**Tabelul 5 – Analiza regresivă multivariabilă dintre parametrii hemodinamici cerebrali, biomarkeri de afectare podocitară, tubulară, RFG și RAC**

P	Variabilă	Coef $\beta$	P	95% CI	Prob (F)	R <sup>2</sup>
IR-ACI	Sinaptopodina/creatinina	0.009	0.0001	0.005 – 0.013	<0.00001	0.795
	Podocalixina / creatinina	0.001	0.0001	0.001 – 0.0005		
	Nefrina / creatinina	0.011	0.024	0.001 – 0.022		
	RFG	-0.003	0.0001	-0.004 – -0.002		
IR-ACM	Sinaptopodina/creatinina	0.014	0.0001	0.009 – 0.019	< 0.00001	0.730
	Podocalixina / creatinina	0.001	0.0001	0.002 – 0.001		
	RFG	-0.005	0.0001	-0.006 – -0.004		
	RAC	0.006	0.032	0.001- 0.038		
IMT-ACC	Sinaptopodina/creatinina	0.014	0.0001	0.008 – 0.020	< 0.00001	0.785
	Podocalixina / creatinina	0.001	0.0001	0.002 – 0.0008		
	RFG	-0.006	0.0001	-0.007 – -0.004		
	RAC	0.003	0.001	0.001- 0.008		
BHI	Sinaptopodina/creatinina	-0.259	0.010	-0.455 – -0.063	< 0.00001	0.656
	Podocalixina / creatinina	-0.030	0.022	-0.004 – -0.055		
	KIM 1 / creatinina	-0.006	0.040	-0.0003 – -0.013		
	NAG / creatinina	-0.194	0.023	-0.360 – -0.027		
	RFG	0.173	0.0001	0.118 – 0.228		

Legendă: IR – indicele de rezistență; ACI – artera carotidă internă; ACM – artera cerebrală medie; ACC – artera carotidă comună; IMT – indicele intimă-medie; BHI – indicele de apnee; RFG – rata de filtrare glomerulară; KIM-1 – molecula de injurie renală 1; NAG – N-beta-D-acetilglucozaminidaza

Studiul de față demonstrează că modificări cerebrovasculare sunt detectate chiar și la pacienții diabetici normoalbuminurici. Aceștia prezintă, de asemenea, valori ușor modificate ale biomarkerilor de afectare podocitară și tubulară. Totodată, s-a evidențiat faptul că există asocieri puternice statistic dintre remodelarea vasculară renală, cerebrală și miARN-uri specifice.

Rezultatele obținute în prezentul studiu indică rolurile specifice ale miARN-urilor în remodelarea cerebro-vasculară, fie prin creșterea rigidității vasculare și prin stimularea aterosclerozei (miARN-21, 192), fie prin asigurarea protecției vasculare (miARN-124, 125a, 126 și 146a). De fapt, unele miARN-uri pot avea efecte protectoare asupra rinichilor și efecte negative asupra creierului sau invers. Acesta este cazul miARN-192, care participă la activități renoprotectoare, având în același timp efecte negative asupra vascularizației cerebrale. Pe de altă parte, miARN-124 are efecte opuse în ambele organe. În timp ce miARN-21 este implicat în producerea unor modificări renale și cerebrale negative, miARN-125a, 126 și 146 au efecte protective la ambele nivele.

Expresia urinară crescută a NAG a fost semnificativ asociată cu valori scăzute ale IR, ceea ce poate sugera că nivelurile de NAG indică modificări incipiente în microvascularizarea creierului. În același timp, s-au detectat corelații importante între anumiți parametri asociați cu hemodinamica cerebrală și anumiți biomarkeri de afectare tubulară și podocitară în DZ 2, rezultate independente de albuminurie și de gradul afectării renale.

Variabilitatea expresiei și implicării miARN-urilor în creier și rinichi sugerează prezența remodelării cerebro-vasculare la pacienții cu DZ 2 și normoalbuminurie, care exprimă în continuare nivele ridicate ale biomarkerilor de afectare podocitară și tubulară. Cu

toate acestea, rezultatele trebuie interpretate cu atenție, luând în considerare complexitatea structurii creierului, precum și acțiunea specifică a anumitor miARN-uri.

#### Concluzii:

1. La pacienții cu DZ 2, există o asociere între apariția remodelării vasculare în creier și rinichi și activitatea anumitor miARN-uri.
2. Modificările vaselor cerebrale sunt detectate chiar și la subiecții normoalbuminurici, ceea ce poate sugera leziuni cerebrale precoce în BCR DZ.
3. Expresia miARN-urilor prezintă o variabilitate ridicată, precum și un rol important, atât la nivelul creierului cât și în rinichi.
4. Detectarea profilelor miARN-urilor permite tratamentul individualizat pentru fiecare pacient cu DZ 2, luând în considerare cel mai afectat teritoriu vascular în această patologie.

### STUDIUL 3: miARN-URI SPECIFICE SE CORELEAZĂ CU CITOKINE PROINFLAMATORII, PRECUM ȘI CU BIOMARKERI DE AFECTARE PODOCITARĂ ȘI TUBULARĂ, ÎN ETAPELE INIȚIALE ALE BCR DZ

Studiul de față și-a propus să evalueze prezența unor asocieri, semnificative statistic, între anumite citokine proinflamatorii și miARN-uri specifice, biomarkeri cunoscuți de afectare podocitară și disfuncție tubulară, la pacienții cu DZ 2. În acest fel, prezentul studiu a urmărit identificarea unor posibili biomarkeri de afectare renală precoce în DZ 2, anterior instalării albuminuriei.

În acest studiu, s-a pornit de la ipoteza că, în evoluție, DZ 2 se complică cu apariția unor modificări la nivelul structurilor podocitare și tubulare renale, decelabile doar prin evaluarea unor biomarkeri specifici. Totodată, se cunoaște faptul că anumite miARN-uri au prezentat nivele plasmatice sau urinare modificate, la pacienții cu DZ 2, prin comparație cu subiecții de control. De asemenea, prezența inflamației cronice și implicarea anumitor citokine proinflamatorii au fost asociate cu dezvoltarea și progresia BCR DZ. Pornind de la prezumția deja cunoscută, a faptului că anumite molecule proinflamatorii și miARN-uri prezintă nivele modificate și se pot influența reciproc în BCR DZ, s-a dorit să se evalueze implicația acestora în patogenia bolii, în mod special în etapele inițiale ale patologiei.

În studiul de față, expresia citokinelor proinflamatorii studiate a cunoscut valori mult mai ridicate la pacienții diabetici față de lotul de control. De asemenea, au fost diferențe importante între nivelele miARN-urilor întâlnite la pacienții diabetici, cele mai mari nivele fiind decelate la categoria de pacienți macroalbuminurici. Cu ajutorul analizei regresive multivariabile, s-au obținut corelații puternice între sIL-6 și sinaptopodina, NAG, RFG ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.805$ ), precum și între sIL-17 și sinaptopodina, NAG, KIM-1, RFG, RAC ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.941$ ), fapte evidențiate în tabelul 6. Pe de altă parte, nivelele urinare ale IL au prezentat corelații semnificative astfel: între uIL-6 și sinaptopodina, NAG, RFG ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.889$ ), între uIL-17 și sinaptopodina, nefrina, NAG, RFG ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.905$ ), după cum se poate observa în tabelul 7.

**Tabelul 6 – Analiza regresivă multivariabilă pentru nivelele serice ale citokinelor proinflamatorii IL-6 și IL-17**

P	Variabilă	R <sup>2</sup>	Coef β	P	Prob(F)	95% CI
sIL-6	Constanta	0.805	168.498	<0.0001	<0.00001	141.929 – 195.067
	NAG/creatinina	0.805	3.719	<0.0001	<0.00001	2.667 – 4.770
	Sinaptopodina/creatinina	0.805	0.378	<0.0001	<0.00001	0.230 – 0.526
	RFG	0.805	-0.956	<0.0001	<0.00001	-1.210 – -0.701
sIL-17	Constanta	0.941	195.421	<0.0001	<0.00001	133.934 – 256.908
	NAG/creatinina	0.941	6.896	<0.0001	<0.00001	4.401 – 9.392
	Sinaptopodina/creatinina	0.941	1.622	<0.0001	<0.00001	1.090 – 2.154

P	Variabilă	R <sup>2</sup>	Coef β	P	Prob(F)	95% CI
	KIM-1/creatinina	0.941	0.447	<0.0001	<0.00001	0.360 – 0.535
	RFG	0.941	-1.267	<0.0001	<0.00001	-1.870 – -0.663
	RAC	0.941	0.028	0.005	<0.00001	0.008 – 0.047

**Legendă:** RAC- raportul albumină/creatinină urinară; RFG – rata filtrării glomerulare; KIM- 1/creat – raportul nivelelor urinare ale moleculei de injurie renală 1/creatinină; NAG/creatinină – raportul nivelelor urinare ale N-acetil-B-D-glucosaminidaza/creatinină; sIL- nivelele serice ale interleukinei.

**Tabelul 7 – Analiza regresivă multivariabilă pentru nivelele urinare ale citokinelor proinflamatorii IL-6 și IL-17**

P	Variabilă	R <sup>2</sup>	Coef β	P	Prob(F)	95% CI
uIL-6	Constanta	0.889	107.744	<0.0001	<0.00001	87.164 – 128.323
	NAG/creatinina	0.889	3.505	<0.0001	<0.00001	2.690 – 4.320
	Sinaptopodina/creatinina	0.889	0.523	<0.0001	<0.00001	0.408 – 0.637
	RFG	0.889	-0.972	<0.0001	<0.00001	-1.169 – -0.774
uIL-17	Constanta	0.905	218.858	<0.0001	<0.00001	175.297 – 262.419
	NAG/creatinina	0.905	6.992	<0.0001	<0.00001	5.282 – 8.703
	Sinaptopodina/creatinina	0.905	1.101	<0.0001	<0.00001	0.814 – 1.389
	Nefrina/creatinina	0.905	9.512	<0.0001	<0.00001	4.764 – 14.259
	RFG	0.905	-1.604	<0.0001	<0.00001	-2.033 – -1.176

**Legendă:** RFG – rata filtrării glomerulare; NAG/creatinină – raportul nivelelor urinare ale N-acetil-B-D-glucosaminidaza/creatinină; uIL- nivelele urinare ale interleukinei.

Prin aplicarea analizei regresive multivariabile, s-au decelat asocieri semnificative statistic, pozitive între sIL-6 și miARN-21, miARN-192 și negative cu miARN-124, miARN-146a ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.862$ ). sIL-17 a dezvoltat corelații directe cu miARN-21, miARN-192 și negative cu miARN-124 ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.745$ ). Aceste aspecte sunt observabile în tabelul 8.

**Tabel 8 – Analiza regresivă multivariabilă pentru profilele serice ale IL-6, IL-17 și nivelele serice ale anumitor miARN-uri specifice.**

P	Variabilă	R <sup>2</sup>	Coef β	P	Prob(F)	95% CI
sIL-6	Constanta	0.862	90.041	<0.0001	<0.00001	43.114 – 136.969
	S miARN-21	0.862	18.158	0.011	<0.00001	4.283 – 32.033
	S miARN-124	0.862	-14.387	0.022	<0.00001	-26.667 – -2.106
	S miARN-146a	0.862	-20.716	<0.0001	<0.00001	-31.485 – -9.947
	S miARN-192	0.862	43.777	<0.0001	<0.00001	33.314 – 54.240
sIL-17	Constanta	0.745	-7.410	0.942	<0.00001	-207.215 – 192.395
	S miARN-21	0.745	234.441	<0.0001	<0.00001	159.427 – 309.456
	S miARN-124	0.745	-122.922	<0.0001	<0.00001	-188.775 – -57.069
	S miARN-192	0.745	65.994	0.016	<0.00001	12.598 – 119.390

**Legendă:** P – parametru; sIL- nivel seric al interleukinei; S miARN – nivel seric al miARN.

Totodată, utilizând aceeași metodă statistică, s-au observat asocieri pozitive între uIL-6 și miARN-21, respectiv negative cu miARN-192 ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.886$ ). uIL-17 a dezvoltat, în mod asemănător, corelații directe cu miARN-21 și negative cu miARN-192 ( $p < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.860$ ). Aceste aspecte pot fi observate în tabelul 9.

**Tabel 9 – Analiza regresivă multivariabilă pentru profilele urinare ale IL-6, IL-17 și nivelele urinare ale anumitor miARN-uri specifice.**

P	Variabilă	R <sup>2</sup>	Coef β	P	Prob(F)	95% CI
uIL-6	Constanta	0.886	93.413	0.003	<0.00001	32.142 – 154.683
	U miARN-21	0.886	58.205	<0.0001	<0.00001	36.779 – 79.632
	U miARN-192	0.886	-49.511	<0.0001	<0.00001	-65.234 – -33.788
uIL-17	Constanta	0.860	133.808	0.085	<0.00001	-18.473 – 286.090
	U miARN-21	0.860	162.914	<0.0001	<0.00001	109.661 – 216.168
	U miARN-192	0.860	-83.845	<0.0001	<0.00001	-122.924 – -44.766

Legendă: Pa – parametru; uIL- nivel urinar al interleukinei; U miARN – nivel urinar al miARN

Din câte se cunoaște până în prezent, studiul de față este primul care evaluează și identifică ample conexiuni, puternic semnificative statistic, între anumiți biomarkeri de afectare tubulară, podocitară, anumite miARN-uri și interleukine proinflamatorii, încă din etapa de normoalbuminurie, la bolnavii cu DZ 2. În studiul de față, nivelele biomarkerilor de afectare podocitară s-au corelat cu cei de disfuncție tubulară și toți aceștia au prezentat valori crescute la pacienții cu DZ 2, inclusiv la cei normoalbuminurici. Aceste observații indică afectarea podocitară și tubulară concomitentă în BCR DZ, precum și rolul semnificativ al tubului proximal în reabsorbția albuminei. Mai apoi, în prezentul studiu, s-a decelat o asocieră semnificativă statistic între anumite citokine proinflamatorii și biomarkerii de afectare podocitară și tubulară evaluați. Aceste aspecte confirmă relaționarea importantă care există între compartimentele nefronului și asigurarea funcționalității renale.

#### **Concluzii:**

1. În BCR DZ, procesul inflamator cronic joacă un rol central în patogeniza bolii și nivelurile crescute ale citokinelor inflamatorii IL-6 și IL-17, detectate în acest studiu, confirmă această teorie.
2. Corelațiile puternice pozitive detectate între aceste citokine proinflamatorii și anumiți biomarkeri ai afectării podocitare (nefrină, podocalixină, sinaptopodină) evidențiază o posibilă interconectare între mecanismul inflamator al DZ 2 și afectarea glomerulară, în stadiile incipiente ale BCR DZ.
3. Corelațiile pozitive detectate între aceleași citokine inflamatorii și anumiți biomarkeri de leziune tubulare cunoscuți (KIM-1, NAG, alfa-1 microglobulină) demonstrează o posibilă corelație între mecanismul inflamator al DZ 2 și afectarea tubulară, în etapele subclinice ale BCR DZ.
4. miARN-urile 21, 124, 146a, 192 joacă un rol important în reglarea activității și exprimării IL și sunt implicate astfel în patogenia BCR DZ.

## **CONTRIBUȚII ORIGINALE**

Contribuțiile originale aduse prin prezenta lucrare pot fi sumarizate astfel:

1. Studiul de față este singurul, din câte se cunoaște, care a utilizat tehnici moderne din sfera proteomicii, pentru detecția proteinelor urinare la două loturi comparative de subiecți, unul cu BCR DZ și celălalt gup de control. Acest aspect a permis identificarea unor proteine urinare specifice, care pot fi încadrate în unul din principalele mecanisme patogenice cunoscute din cadrul bolii și care se corelează cu nivelul albuminuriei.

2. S-au identificat implicații ale anumitor miARN-uri specifice în afectarea vasculară cerebrală și renală din DZ 2, fapte care nu au mai fost studiate până în prezent sub această formă.
3. S-au caracterizat anumite citokine proinflamatorii și anumite miARN-uri, care s-au corelat puternic cu biomarkeri de afectare tubulară și podocitară și pot reprezenta elemente indicatoare ale prezenței afectării renale incipiente în BCR DZ, fapte care nu au mai fost evidențiate până în prezent, în acest mod.

*Această cercetare a primit finanțare printr-o bursă internă furnizată de UMFT, PIII-C5-PCFI; 2017/2018, a fost sponsorizată în cadrul în cadrul Granturilor Interne UMFT- Proiecte pentru Cercetători Experimentați (proiect nr. 6), 2019/2020 și a fost realizată cu sprijinul Autorității Naționale Române pentru Cercetare Științifică, UEFISCDI, proiectele PN-III-P1- 1.2-PCCDI-2017- 0046 și PN-III-ID-PCE-2016-0073.*