



MD 1737 Y 2024.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1737** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2023 0017 (22) Data depozit: 2023.02.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2024.01.31, BOPI nr. 1/2024
(71) Solicitant: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: BERNIC Jana, MD; CEBAN Emil, MD; CIUNTU Angela, MD; ANDRONACHE Lilia, MD; ROLLER Victor, MD; REVENCO Adrian, MD	
(73) Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) **Metodă de pronosticare a riscului de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, și anume la pediatrie, și poate fi utilizată în urologie și nefrologie pentru pronosticarea riscului de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral.

Esența invenției constă în aceea că se recoltează în dinamică urina copiilor cu reflux vezicoureteral, și anume până la și după tratament, apoi se efectuează testarea urinei cu ajutorul testului imunosorbant legat de enzimă

2
(ELISA) cu determinarea valorii cantitative a factorului de creștere al fibroblastelor-beta (FGF-beta) și a moleculei de leziune renală-1 (KIM-1), în cazul în care valoarea cantitativă a FGF-beta depășește 55 pg/ml, iar a KIM-1 depășește 337 pg/ml, se pronostichează risc de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral.

Revendicări: 1

MD 1737 Y 2024.01.31

(54) Method for predicting the risk of developing renal fibrosis/sclerosis in children with vesicoureteral reflux

(57) Abstract:

1
The invention relates to medicine, namely to pediatrics, and can be used in urology and nephrology for predicting the risk of developing renal fibrosis/sclerosis in children with vesicoureteral reflux.

Summary of the invention consists in that urine is collected dynamically from children with vesicoureteral reflux, namely before and after treatment, then the urine is examined using an enzyme-linked

2
immunosorbent assay (ELISA) to determine the quantitative value of fibroblast growth factor-beta (FGF-beta) and kidney injury molecules-1 (KIM-1), if the quantitative value of FGF-beta exceeds 55 pg/ml, and KIM-1 exceeds 337 pg/ml, the risk of developing renal fibrosis/sclerosis in children with vesicoureteral reflux is predicted.

Claims: 1

(54) Метод прогнозирования риска развития фиброза/склероза почек у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к медицине, а именно к педиатрии, и может быть использовано в урологии и нефрологии для прогнозирования риска развития фиброза/склероза почек у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом.

Сущность изобретения состоит в том, что собирают в динамике мочу у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом, а именно до и после лечения, затем проводят исследование мочи с помощью

2
иммуноферментного анализа (ИФА) с определением количественного значения фактора роста фибробластов-бета (FGF-бета) и молекулы повреждения почек-1 (KIM-1), в случае если количественное значение FGF-бета превышает 55 пг/мл, а KIM-1 превышает 337 пг/мл, прогнозируют риск развития фиброза/склероза почек у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом.

П. формулы: 1

Descriere:

- Invenția se referă la medicină și anume la pediatrie și poate fi utilizată în urologie și nefrologie pentru pronosticarea riscului de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral.
- În pofida progreselor semnificative obținute în ultimele decenii la descifrarea mecanismelor de formare a fibrozei/sclerozei tubulointerstițiale la copiii cu reflux vezicoureteral (RVU), totuși, problema menționată rămâne incomplet elucidată. Se cunoaște că fluxul retrograd de urină duce la ischemia parenchimului renal, urmată de activarea sistemului renină-angiotensină și deteriorarea tuturor structurilor nefronului. În condițiile hipoxiei tisulare locale, se produce o eliberare semnificativă a factorului de creștere vascular-endotelial (VEGF). VEGF este sintetizat de către podocite și celule endoteliale ale capilarelor glomerulare, fiind implicat în menținerea și reglarea proceselor fiziologice precum angiogeneza și limfogeneza. De asemenea, a fost dezvăluit rolul factorului în menținerea fluxului sanguin peritubular. VEGF este un regulator cheie al angiogenezei atât în condiții fiziologice, cât și patologice (Apte R. S., Chen D. S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Cell. 2019 Mar 7, vol. 176(6), p. 1248-1264). Dereglarea sistemului de semnalizare VEGF a fost identificată într-o mare varietate de boli renale (Gu J. W., Manning R. D. Jr, Young E. et al. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor enhances dietary salt-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2009 Jul, vol. 297(1), R. 142-148).
- VEGF este o proteină de semnalizare produsă de o multitudine de celule pentru stimularea vasculogenezei și angiogenezei, procese importante implicate în dezvoltarea embrionară, repararea plăgilor, instalarea și progresia bolilor renale și altor boli, instalarea proceselor inflamatorii (Gu J. W., Manning R. D. Jr, Young E. et al. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor enhances dietary salt-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2009 Jul, vol. 297(1), R. 142-148).
- Investigarea mecanismelor de formare a fibrozei/sclerozei parenchimului renal în stadiile incipiente sunt de o incontestabilă actualitate și valoare, deoarece afecțiunile aparatului urosecretor se impun în atenția specialiștilor ca problemă de rang global, date fiind morbiditatea prin acestea în creștere progresivă, evoluția gravă și incidența înaltă la copii, dar și pentru imperfecțiunea soluțiilor terapeutice, oferite de medicina modernă. De aceea, cercetările în această direcție vor permite o abordare mai rațională a problemei terapiei renoprotectoare și, prin urmare, va încetini sau preveni progresia ulterioară a procesului fibrotic/sclerotic în rinichi, precum și va deschide noi direcții și posibilități pentru tratamentul pacienților cu RVU.
- Metodele tradiționale clinice, de laborator și instrumentale pentru determinarea gradului de afectare a parenchimului renal nu sunt întotdeauna informative, deoarece permit depistarea doar a stadiilor tardive ale procesului fibrotic/sclerotic la nivelul rinichilor (Apte R. S., Chen D. S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Cell. 2019 Mar 7, vol. 176(6), p. 1248-1264; Becker A.M. Postnatal evaluation of infants with an abnormal antenatal renal sonogram. Current Opinion in Pediatrics. 2009, vol.21, p. 207-213).
- În ultimul deceniu, cercetătorii au fost din ce în ce mai interesați de metodele minim invazive de diagnosticare a procesului fibrotic/sclerotic la nivelul rinichilor, fapt extrem de important pentru uronefrologia pediatrică. Elucidarea acestor biomarkeri va face posibilă evaluarea obiectivă a gradului de afectare a rinichilor și va contribui la creșterea eficacității tratamentului, precum și precizarea evoluției bolii și reducerea incidenței complicațiilor.
- De aceea efortul cercetătorilor este orientat spre dezvoltarea și implementarea unor metode minim invazive pentru diagnosticarea leziunilor timpurii ale parenchimului renal, deoarece toate metodele disponibile au o serie de dezavantaje, principalul dintre acestea fiind invazivitatea. În plus, arsenalul de metode disponibile face posibilă detectarea doar a leziunilor grave ale parenchimului renal, care apar la etapele avansate ale procesului patologic.
- Este cunoscută metoda instrumentală ultrasonografică (USG) de diagnosticare a modificărilor fibrotice/sclerotice renale, bazată pe identificarea structurii și dimensiunii parenchimului și sistemului colector al rinichilor datorită siguranței sale relative, vitezei, cost-eficienței reduse, preciziei, fiind utilizate pe scară largă la copii [1].
- Dezavantajele acestei metode constau în sensibilitatea și specificitatea ei nesatisfăcătoare, deoarece, ecografia poate detecta doar modificări sclerotice/fibrotice la nivelul rinichilor doar atunci când acestea sunt pronunțate semnificativ (Gallo P., Schenone M., Giberti C. Ureteropelvic Junction Obstruction: Which Is The Best Treatment Today? F. Gallo, M. Schenone, C. Giberti. J. Laparoendoscopic advanced surgical techniques. 2009, vol. 19 (5), p. 657-662).

Este cunoscută metoda instrumentală de diagnosticare radioizotopică (nefrosintigrafică) a modificărilor fibrotice/sclerotice renale, bazată pe determinarea gradului și volumului parenchimului funcțional prin indicele captării integrale a radiofarmaceuticului. Principiul metodei se bazează pe studiul stării funcționale și structurale a parenchimului renal prin înregistrarea radioactivității în zona rinichilor cu ajutorul unui scanner după administrarea intravenoasă a radiofarmaceuticului. Imaginea rinichilor obținută în timpul studiului face posibilă identificarea zonelor de acumulare crescută sau scăzută a medicamentului etichetat [2].

Dezavantajele metodei indicate constau în sensibilitatea și specificitatea ei nesatisfăcătoare, invazivitatea ei, pericolul înalt de afectare radioactivă a rinichilor și altor organe, deoarece, metoda propusă nu îndeplinește cerințele privind expunerea selectivă la celulele renale, fiind afectat în mod inevitabil, sistemul imunitar și toate celulele care se divid rapid (de exemplu, epiteliul intestinal, seria eritro-, mielo- și limfopoietică a măduvei osoase, celulele gonadelor și foliculilor piloși). Alte dezavantaje ale metodei indicate constau în costul înalt al remediei radiofarmaceutice, precum și al utilizării echipamentelor radioizotopice care, în plus, necesită și măsuri speciale de protecție; necesitatea înzestrării laboratorului cu utilaj costisitor special de măsurare a izotopilor radioactivi, care trebuie tratați ca mutații posibile și care cer respectarea riguroasă a tehnicii de securitate - manipularea cu grijă și eliminarea radioizotopilor în mod corespunzător; pentru copiii de vârstă mică, este necesară aplicarea intravenoasă a anestezicului, care este un factor stresogen și poate cauza diverse efecte secundare (amețeli, cefalee, diaree-constipație, tulburări grave ale funcției hepatice, etc.), fapt ce nu permite asigurarea unei securități mai eficiente a acestor pacienți. Cele indicate limitează utilizarea acestei metode invazive pentru diagnosticul modificărilor sclerotice (fibrotice) renale la acești pacienți.

Este cunoscută metoda instrumentală de diagnosticare a modificărilor fibrotice/sclerotice renale, bazată pe criteriile de cartografiere Doppler-color, și care se bazează pe determinarea indicelui de rezistență (IR) al arterelor interlobare, indicând astfel modificări sclerotice în parenchimul renal [3], (Kaminska A., Yamao Y., et al. Evaluation of reflux kidney using renal resistive index. J. Urol. 2002, vol. 165(6), p. 2010-2012; Аверченко М. В., Ковтун О. П., Комарова С. Ю. Доплерографические критерии нарушения ренального кровотока у детей с хроническими заболеваниями органов мочевой системы. Материалы Международной школы и научно-практической конференции по детской нефрологии «Актуальные проблемы детской нефрологии». Оренбург. 2010, с. 362-363).

Dezavantajele metodei indicate constau în sensibilitatea și specificitatea ei nesatisfăcătoare, deoarece creșterea indicelui IR la copiii cu modificări sclerotice ale parenchimului renal nu întotdeauna corelează cu gradul modificărilor fibrotice/sclerotice în rinichi. Acest fapt este asociat cu șuntarea arteriovenoasă a sângelui la nivel juxtamedular, fiind un mecanism fiziopatologic universal de compensare patologică a rezistenței periferice crescute, ceea ce determină absența unei relații directe între gradul de scleroză a parenchimului renal și indicatorii rezistenței periferice a fluxului sanguin arterial renal (Е. Б. Ольхова, Е. М. Крылова, И. И. Ефремова. Нефрология и диализ. 2001, № 2, с. 299). Un alt dezavantaj al metodei indicate constă în aceea că aceasta este subiectivă, iar rezultatele obținute depind de calificările specialistului care o efectuează. În plus, la pacienții cu RVU, caracteristicile de viteză ale fluxului sanguin renal se modifică semnificativ, creează mari dificultăți privind interpretarea lor corectă, ceea ce nu permite un diagnostic fiabil al afectării parenchimului renal.

Este cunoscută metoda invazivă de diagnosticare a modificărilor fibrotice/sclerotice renale, bazată pe biopsia renală, considerat cel mai bun instrument pe care clinicienii îl pot folosi pentru a aborda extinderea fibrozei renale la orice nivel al structurii rinichiului [4].

Dezavantajele metodei menționate constau în aceea că este o procedură extrem de invazivă și stresogenă și care poate cauza diverse efecte secundare, precum coagulopatii (sindroame hemoragice sau trombotice, etc.), necesitatea aplicării intravenoase a anestezicului, fapt ce nu permite asigurarea unei mai bune securități ale acestor pacienți. Cele indicate limitează utilizarea acestei metode invazive pentru diagnosticul modificărilor sclerotice (fibrotice) renale la acești pacienți.

Procesul fibrotic poate fi descris ca o „vindecare eşuată a rănilor” sau ca o acumulare excesivă de matrice extracelulară (MEC), iar exagerarea acestui eveniment duce la un rezultat patologic (Henderson N. C., Rieder F., Wynn T. A. Fibrosis: From mechanisms to medicines. Nature. 2020, vol. 587, p. 555-566). De notat că depozitarea excesivă de MEC, în consecință, duce la perturbarea arhitecturii parenchimotoase normale și a funcției renale (Djudjaj S., Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. Mol. Asp. Med. 2019, vol. 65, p. 16-36). Fibroza este un proces ireversibil, care reprezintă un punct de nereturnare a leziunilor și disfuncției tisulare, reducând profund posibilele strategii terapeutice eficiente la dispoziția clinicienilor (Panizo S., Martinez-Arias L., Alonso-Montes C., et al. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. Int. J. Mol. Sci. 2021, vol. 22, p. 408. doi: 10.3390/ijms22010408). De aceea, identificarea biomarkerilor care ar permite estimarea fibrozei renale și a progresiei leziunilor într-o manieră neinvazivă este de o importanță

fundamentală, pentru a ajuta medicii clinicieni să adapteze strategiile de îmbunătățire a diagnosticului, managementului și receptivității pacienților la terapie.

Este cunoscută metoda miniminvasivă de pronosticare al riscului de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral (RVU), bazată pe determinarea în urină a nivelului markerilor biologici ai inflamației - proteinei-1 chimiotactice monocitare (MCP-1), nivelului markerilor fibrogenezei - factorului de transformare a creșterii-beta (TGF-beta), nivelului markerilor angiogenezei - factorului vascular-endotelial de creștere (VEGF) și ai afectării principalelor componente ale nefronului (colagenul de tip IV, izoformele de tip α și π ale glutation-S-transferazei (GST) în urina copiilor cu RVU în dinamică (până și după tratamentul efectuat) [5].

Dezavantajele acestei metode constau în sensibilitatea și specificitatea ei nesatisfăcătoare, gradul înalt de complexitate, precum și costul înalt al realizării metodei indicate.

Cea mai apropiată metodă de metoda revendicată este metoda de pronosticare al riscului de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral (RVU), bazată pe determinarea în urină a nivelului factorului de creștere vasculoendotelial (VEGF) și, dacă valoarea acestuia este egală sau depășește 140 pg/ml, se pronostichează afectarea parenchimului renal. VEGF este un factor implicat în reglarea proceselor fiziologice precum angiogeneza și limfogeneza, este sintetizat de podocite și celule endoteliale renale. VEGF este o proteină de semnalizare produsă de o multitudine de celule pentru stimularea vasculogenezei și angiogenezei, procese importante implicate în dezvoltarea embrionară, repararea plăgilor, instalarea și progresia bolilor renale și altor boli, instalarea proceselor inflamatorii și creșterea tumorală [6].

Dezavantajele metodei indicate constau în sensibilitatea și specificitatea ei nesatisfăcătoare, deoarece VEGF nu este un marker specific al leziunii renale, nivelul acestei proteine putând fi indus de diferiți factori, cum ar fi stresul oxidativ, septic, hemoragie, toxic, psihogenic, etc. Astfel, metoda nu este specifică și, prin urmare, nu este suficient de precisă și devine necesar să se recurgă la metode mai precise și mai specifice.

Problema invenției constă în elaborarea unei metode neinvazive, mai sensibile și mai precise pentru diagnosticarea leziunilor fibrotice/sclerotice ale parenchimului renal la copiii cu RVU, cu utilizarea unor biomarkeri sensibili, preciși, specifici, cost-eficienți.

Esența invenției constă în aceea că se recoltează în dinamică urina copiilor cu reflux vezicoureteral, și anume până la și după tratament, apoi se efectuează testarea urinei cu ajutorul testului imunisorbant legat de enzimă (ELISA) cu determinarea valorii cantitative a factorului de creștere al fibroblastelor-beta (FGF-beta) și a moleculei de leziune renală-1 (KIM-1), în cazul în care valoarea cantitativă a FGF-beta depășește 55 pg/ml, iar a KIM-1 depășește 337 pg/ml, se pronostichează risc de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral.

Valorile indicate au fost calculate reeșind din faptul că nivelul FGF-beta în lotul L0 (martor) oscilează de la 4,9 până la 55 pg/ml, iar valorile KIM -1 - de la 24,8 până la 337 pg/ml.

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale, expuse în tabel. Nivelul biomarkerilor fibrozei/sclerozei renale în urină (FGF-P, KIM-1) în refluxul vezicoureteral (RVU) la copii la etapele de cercetare.

Tabel

Loturile de studiu	FGF-beta, pg/ml, urina	KIM-1, pg/ml, urina
Lotul L0 (martor)	19,30 ± 15,52 100%	201,37 ± 104,53 100%
Lotul LI RVU p/t	182,95 ± 220,47 948%	507,84 ± 384,85 173%
Lotul LI RVU d/t	185,60 ± 144,77 962%	610,10 ± 489,27 196%

Nota: Loturile de studiu: LI RVU - refluxul vezicoureteral; p/t - până la tratament; d/t - după tratament.

Din datele expuse în tabel se vede că nivelul FGF-beta la etapele de cercetare (p/t și d/t) a crescut semnificativ (de circa 9,5 ori, și respectiv, de 9,6 ori, comparativ cu martorul, $p < 0,001$). Nivelul

KIM-1 la etapele de cercetare (p/t și d/t) a crescut semnificativ (de 1,7 ori, și respectiv, de circa 2 ori, comparativ cu martorul, $p < 0,001$). De notat că după cura de tratament valorile indicilor menționați nu se normalizează, fapt ce demonstrează persistența procesului patologic și sensibilitatea înaltă a metodei indicate. După cum se știe, FGF-beta participă la tranziția epitelial-mezenchimală (TEM) a celulelor epiteliale tubulare renale. TEM este unul dintre evenimentele cheie în procesul de fibroză interstițială renală (Strutz F., Zeisberg M., Hemmerlein B., et al. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 2000; vol. 57(4): p.1521-1538; Strutz F., Zeisberg M., Ziyadeh F. N., et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 2002, vol. 61(5), p. 1714-1728). Supraexprimarea FGF-beta stimulează proliferarea fibroblastelor și producția de matrice extracelulară (MEC), ceea ce promovează leziuni tubulointerstițiale renale în diabet (Floege J., Kriz W., Schulze M., et al. Basic fibroblast growth factor augments podocyte injury and induces glomerulosclerosis in rats with experimental membranous nephropathy. *J. Clin. Invest.* 1995, vol. 96(6), p. 2809-2819). FGF-beta poate, de asemenea, induce TEM prin activarea stabilă a căii de semnalizare PI3K/AKT. Sinteza MEC și proliferarea și activarea fibroblastelor interstițiale, ai celulelor mezangiale glomerulare și ai celulelor epiteliale tubulare joacă un rol esențial în dezvoltarea fibrozei renale (Agrawal S., Maity S., AlRaawi Z., et al. Targeting Drugs Against Fibroblast Growth Factor(s)-Induced Cell Signaling. *Curr. Drug Targets.* 2021, vol. 22(2), p. 214-240).

Expresia renală a KIM-1 crește semnificativ în țesutul renal uman la pacienții cu boli renale (van Timmeren M. M., van den Heuvel M. C., Bailly V., Bakker S. J. L., van Goor H, Stegeman C. A. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J. Pathol.* 2007, vol. 212 (2): p. 209-217). KIM-1 urinar s-a dovedit a fi un marker foarte sensibil și specific al leziunii renale tubulare proximale și poate, de asemenea, să distingă necroza tubulară acută ischemică de azotemia prerenală (Bhosale S. J., Atul P., Kulkarni A. P. Biomarkers in acute kidney injury. *Indian J. Crit. Care. Med.* 2020, 24 (Suppl 3), S90-S93). Humphreys și colab. (Humphreys B. D., Xu F., Sabbiseti V., et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2013, vol. 123, p. 4023-4035) au demonstrat că expresia cronică a KIM-1 conduce la inflamație, fibroză interstițială și sinteza excesivă a matricei extracelulare, ducând în cele din urmă la fibroză (Waanders F., van Timmeren M. M., Stegeman C. A., Bakker S. J., van Goor H. Kidney injury molecule-1 in renal disease. *J. Pathol.* 2010, vol. 220, p. 7-16).

Rezultatul tehnic al invenției constă în mărirea sensibilității, preciziei, reproductibilității și inofensivității metodei de apreciere a leziunilor fibrotice/sclerotice în rinichi datorită folosirii biomarkerilor urinari sensibili FGF-beta și KIM-1 pentru diagnosticarea leziunilor fibrotice/sclerotice la copiii cu RVU. Avantajul determinării FGF-beta și KIM-1 în practica clinică constă în aceea că acești biomarkeri ajută la stabilirea unui diagnostic neinvaziv mai precis și poate sugera tratamente eficiente de pronosticare a riscului ridicat de afectare a rinichilor la copiii cu RVU.

Metoda se efectuează în modul următor: se recoltează urina copiilor cu RVU în dinamică (până la începerea tratamentului și după efectuarea tratamentului). Apoi, probele de urină se centrifughează la 5000 rpm, timp de 10 minute, iar supernatantul a fost congelat și depozitat la minus 30 grade Celsius, până la efectuarea analizelor. În mod similar, au fost colectate probe de urină de la copiii practic sănătoși, fără careva patologii ale sistemului urinar. Apoi, pentru pronosticarea leziunilor fibrotice/sclerotice ale parenchimului renal la copiii cu RVU în urină se determină nivelul FGF-beta și KIM-1 până și după tratament și, dacă valoarea acestora depășește 55 pg/ml, și respectiv - 337 pg/ml, se pronostichează un risc de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale. Valorile indicate au fost calculate reeșind din faptul că nivelul FGF-beta în lotul martor oscilează de la 4,9 până la 55 pg/ml, iar valorile KIM-1 de la 24,8 până la 337 pg/ml. Nivelul biomarkerilor indicați de FGF-beta și KIM-1 a fost apreciat cu ajutorul kiturilor de analize a testului imunosorbant legat de enzimă (ELISA) (sandwich) ale firmei Vector-Best (Rusia) conform instrucțiunilor anexate.

Principiul metodei ELISA se bazează pe utilizarea anticorpilor specifici de înaltă purificare către biomarkerii menționați, denumiți „capture antibodies”, adică „anticorpi de capturare”, care sunt imobilizați necovalent pe suprafața internă a godeurilor microplăcii cu 96 godeuri, și servesc pentru capturarea specifică a biomarkerilor respectivi (FGF-beta și KIM-1) din proba de cercetat. Apoi biomarkerii menționați din proba de cercetat fixați la microplacă reacționează cantitativ cu conjugatul nr. 1 ce conține anticorpi către biomarkerii menționați conjugați cu biotina (anticorpii de detecție). Apoi biomarkerii respectivi care au reacționat cu conjugatul nr. 1 interacționează cu conjugatul nr. 2 ce conține complexul streptavidină-peroxidază din hrean. În continuare cantitatea de conjugat nr. 2 care a reacționat se determină prin reacția de colorare cu utilizarea substratului peroxidazei - peroxidului de hidrogen și a cromogenului tetrametilbenzidină prin spectrofotometrie la riderul pentru microplăci.

Principiul metodei constă în aceea că, mai întâi biomarkerii respectivi (BM) - FGF-beta și KIM-1 din proba de cercetat reacționează cu anticorpii specifici imobilizați pe microplacă, apoi BM fixați la microplacă reacționează cantitativ cu conjugatul ce conține anticorpi anti-BM conjugați cu biotina, apoi se adaugă anticorpii ce conțin complexul streptavidină legată de peroxidaza din hrean, apoi se adaugă substratul peroxidazei - H₂O₂ și cromogenul (tetrametilbenzidină), iar intensitatea colorării este proporțională cu concentrația BM și se măsoară prin spectrofotometrie la riderul pentru microplăci, totodată, cu cât este mai mare gradul de creștere a BM, cu atât riscul dezvoltării fibrozei/sclerozei renale este mai mare.

Avantajul acestei metode constă în aceea că proba de cercetat nu trebuie să fie purificată înainte de analiză, iar metoda este foarte sensibilă.

Cele relatate pot fi demonstrate prin următoarele exemple clinice.

Exemplul 1

Pacienta S.G., 4 de ani. Diagnosticul clinic: Reflux vezico-ureteral bilateral mixt: pe dreapta gr. III, pe stânga gr. IV. Hipoplazia renală pe stânga. Pielonefrită cronică secundară, evoluție recidivantă. Pe parcursul examinărilor clinico-paraclinice, copilul a urmat tratament cu utilizarea urosepticilor (Furagin 50 mg câte 1/2 past. x 4 ori/zi *per os*). Pacientul a fost evaluat din punct de vedere a riscului operator atât prin scorurile utilizate, prin predictorii clinici, cât și prin predictorii chirurgicali. Unul din predictorii favorabili a pronosticului a fost capacitatea funcțională bună a pacientului, anterior o persoană clinic sănătoasă. Afecțiunea chirurgicală dată a avut caracter bilateral și pacientul a fost supus intervenției chirurgicale pe partea dreaptă și stânga. A fost efectuată plastia antireflux procedeu "Lich". Postoperator s-a continuat tratamentul antibacterian de (Ceftriaxon 500 mg x 2 ori/zi, intravenos), reechilibrare hidro-electrolitică și metabolică, Metoclopramidă 3 mg x 2 ori/zi, probiotice, antidolore, etc. Datele de laborator - fără careva devieri semnificative. Evoluția postoperatorie a fost favorabilă fără careva complicații, pacienta fiind externată la a 7-a zi postoperator. A urmat monitorizarea prin evoluție clinică, date de laborator, imagistice la fiecare 6 luni. Nivelul excreției urinare a markerilor fibrozei/sclerozei renale constituie nivelul FGF-beta și KIM-1 până la inițierea tratamentului constituie 342 pg/ml și, respectiv, 897 pg/ml. După efectuarea tratamentului valorile biomarkerilor indicați au rămas înalte - 351 mg/ml și, respectiv, 754 pg/ml, fapt ce reflectă afectarea parenchimului renal și risc crescut al dezvoltării fibrozei/sclerozei renale.

Exemplul 2

Băiat, Z.V., în vârstă de 1 an, în perioada intrauterină, la 38 săptămâni de gestație, la examenul ultrasonografic s-a determinat o malformație congenitală renourinară: Agenezia rinichiului pe dreapta. Megaureterohidronefroză refluxantă pe stânga, gradul V, mixt în rinichi unic ectopiat pelvian, cu diminuarea evidentă a funcției unicului rinichi pe stânga. Pielonefrită recidivantă. Boală cronică renală (BCR), gr. II.

Diagnosticul a fost confirmat postnatal prin ecografia sistemului urinar. Investigațiile clinice și paraclinice au inclus: anamnestical, debutul bolii, examenul clinic general, de laborator: hemoleucograma, sumarul urinei, urocultura cu aprecierea antibiogrammei, urografia intravenoasă, scintigrafia renală în dinamică, cistouretrografia micțională. Hemoleucograma a indicat sporirea nesegmentatelor și creșterea nivelului limfocitelor, ceea ce denotă persistența procesului inflamator la copil. În analiza biochimică a sângelui se atestă o sporire a ureei, ceea ce indică prezența BCR la copil. Sumarul urinei: Fără modificări semnificative.

Copilului, în scop de decomprimare a căilor urinare, i-a fost instalat un cateter în vezica urinară, pe o perioadă de 6 luni. Pentru depistarea refluxului vezicoureteral pe rinichi unic congenital ectopiat pelvian s-a recurs la ultrasonografia sistemului urinar, prin care s-a stabilit prezența megaureterohidronefrozei refluxante pe stânga, gradul V în rinichi ectopiat pelvian.

Concluzie: La copil este prezentă o anomalie congenitală renourinară: rinichi unic pe stânga, ectopiat pelvian cu funcția diminuată considerabil. Agenezia rinichiului pe dreapta.

Dispensarizarea copilului a inclus: hemoleucograma o dată pe lună, sumarul urinei (Proba Neciporenko, Proba Zemnițki, ultrasonografia organelor interne și a sistemului urinar, determinarea filtrației glomerulare, cistouretrografia micțională, scintigrafia renală în dinamică, urografia intravenoasă (sub monitorizarea ureei și a creatininei serice)). Copilul a fost spitalizat repetat postoperator pentru examen urologic aprofundat. Nivelul excreției urinare a markerilor fibrozei/sclerozei renale constituie nivelul FGF-beta și KIM-1 până la începerea tratamentului constituie 351 pg/ml și, respectiv, 768 pg/ml. După efectuarea tratamentului valorile biomarkerilor indicați au rămas înalte - 351 mg/ml și, respectiv, 754 pg/ml, fapt ce reflectă afectarea parenchimului renal și risc crescut al dezvoltării fibrozei/sclerozei renale. Pe baza datelor obținute, a fost diagnosticat CKD, care a necesitat administrarea terapiei nefroprotectoare. Metodele instrumentale efectuate pentru

diagnosticarea stării funcției renale au confirmat prezența unor zone minimale de afectare a parenchimului renal.

Exemplul 3

5 Pacientul C.M. în vârstă de 5 ani. Diagnosticul clinic: Anomalie de dezvoltare a sistemului reno-urinar. Nefroscleroză pe stânga. Stare după plastia antireflux bilaterală. Pielonefrită cronică secundară în remisie.

10 Pacientul nu reprezintă careva acuze, doar o stare generală satisfăcătoare, afebril, conștient. Tegumentele roz palide, curate, țesutul celular subcutanat normal dezvoltat (m=T8100g). Palparea bimanuală a rinichilor indoloră. Datele de laborator: Hemoleucograma în limitele valorilor normale, VSH - 6 mm/h. Markerii biochimici - fără modificări patologice. Examenul sumar al urinei: culoarea galbenă, reacția acidă, densitatea relativă - 1011, epiteliu plat - 0-2 c/v, leucocite - 1-2 c/v, proteine - reacția negativă. Nivelul excreției urinare a markerilor fibrozei/sclerozei renale FGF-beta și KIM-1 până la începerea tratamentului constituie 496 pg/ml și, respectiv, 1069 pg/ml. După efectuarea tratamentului valorile biomarkerilor indicați au rămas înalte - 391 mg/ml și, respectiv, 895 pg/ml, fapt ce reflectă

15 afectarea parenchimului renal și risc crescut al dezvoltării fibrozei/sclerozei renale.
Concluzie: în contextul agravării condiției clinice, cât și a investigațiilor paraclinice (laborator, imagistic) a pacientului, și în pofida intervențiilor chirurgicale efectuate, cât și a tratamentului medical țintit, procesul de nefroscleroză a progresat, ceea ce ne indică că refluxul vezico-ureteral prezintă o malformație congenitală gravă, manifestată prin dezvoltarea cicatricelor renale, rezultat al infecțiilor urinare recidivante, care la unii pacienți provoacă instalarea progresivă, ireversibilă a Bolii Renale Cronice.

25 Particularitățile cazurilor prezentate rezidă în asocierea refluxului vezicoureteral cu pericol crescut de infecție, pielonefrită recidivantă și intervenții chirurgicale, dar cu risc majorat de afecțiune morfo-funcțională a rinichilor, fapt dovedit prin creșterea pregnantă a biomarkerilor urinari ai fibrozei/sclerozei renale - FGF-beta și KIM-1.

30 După cum se poate observa din descriere și din exemplele date, metoda propusă permite diagnosticarea leziunilor renale într-un stadiu incipient, ceea ce va face posibilă prescrierea terapiei nefroprotectoare acelor pacienți care au nevoie de aceasta cât mai curând posibil. La rândul său, nefroprotecția adecvată, inițiată în timp util va ajuta la încetinirea progresiei bolii cronice de rinichi (CKD). Metoda propusă pentru pronosticarea riscului de dezvoltare al bolii cronice de rinichi, bazată pe măsurarea nivelului FGF-beta și KIM-1, este simplă și nu este inferioară ca acuratețe diagnosticului instrumental. Avantajul său este, de asemenea, că nu necesită intervenție invazivă suplimentară, utilizarea de echipamente scumpe și radiofarmaceutice și poate fi efectuată și în condiții de ambulatoriu. Spre deosebire de metodele existente în prezent, metoda permite un pronostic al riscului de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale, fiind în același timp o metodă sensibilă, neinvazivă de diagnostic și

35 pronostic.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Becker A.M. Postnatal evaluation of infants with an abnormal antenatal renal sonogram. / *Current Opinion in Pediatrics*. 2009, vol.21, p. 207-213
2. Фомин Д.К. Диагностика обструктивных уропатий у детей методами ядерной медицины. Автореф. дис. докт. мед. наук. М., 2008, 44 с.
3. Врублевский С.Г. Диагностика и тактика лечения детей с расширением чашечнолоханочной системы. *Вопросы практической педиатрии*. 2008, Т. 3. № 3, с. 35-39
4. Barinotti A., Radin M., Cecchi I., et al. Serum Biomarkers of Renal Fibrosis: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2022 Nov 16, vol. 23(22), p. 14139
5. Лакомова Д.Ю. Способ диагностики повреждения почечной паренхимы у детей. Автореферат дис.канд.мед.наук. Саратов, 2011, 27 стр.
6. Gu J.W., Manning R.D. Jr, Young E. et al. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor enhances dietary salt-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009 Jul, vol. 297(1), R. 142-148

(57) Revendicări:

Metodă de pronosticare a riscului de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral, care constă în aceea că se recoltează în dinamică urina copiilor cu reflux vezicoureteral, și anume până la și după tratament, apoi se efectuează testarea urinei cu ajutorul testului imunosorbant legat de enzimă (ELISA) cu determinarea valorii cantitative a factorului de creștere al fibroblastelor-beta (FGF-beta) și a moleculei de leziune renală-1 (KIM-1), în cazul în care valoarea cantitativă a FGF-beta depășește 55 pg/ml, iar a KIM-1 depășește 337 pg/ml, se pronostichează risc de dezvoltare a fibrozei/sclerozei renale la copiii cu reflux vezicoureteral.

**Document semnat
digital**