

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

*Studiul modificărilor podocitare la populația pediatrică în  
glomerulopatii*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. MARIA SAJIN**

**Student-doctorand:  
COSTACHE DIANA  
(CĂSĂTORITĂ DEREWICZ)**

**2020**

# Cuprins

Lista lucrărilor științifice publicate

Listă abrevieri

Introducere

<b>I. Partea generală .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Sindromul nefrotic în populația pediatrică .....</b>	<b>2</b>
1.1 Definiția sindromului nefrotic .....	2
1.2 Clasificarea sindromului nefrotic .....	3
1.3 Epidemiologia sindromului nefrotic .....	7
<b>2. Puncția biopsie renală .....</b>	<b>11</b>
2.1 Indicațiile puncției biopsie renale .....	11
2.2 Contraindicațiile puncției biopsie renale .....	15
2.3 Obținerea preparatului histologic .....	15
2.4 Complicațiile puncției biopsie renale .....	17
2.5 Prelucrarea preparatului histologic postpuncție .....	19
2.5.1 Prelucrarea pentru examinarea în microscopie optică .....	22
2.5.2 Prelucrarea pentru examinarea în imunofluorescență .....	25
2.5.3 Prelucrarea pentru examinarea în imunohistochimie .....	26
2.5.4 Prelucrarea pentru examinarea în microscopie electronică .....	27
<b>3. Podocitopatii .....</b>	<b>28</b>
3.1 Podocitul .....	29
3.2 Podocitopatii .....	33
3.3 Nefropatia cu leziuni glomerulare minime .....	38
3.3.1 Fiziopatologia nefropatiei cu leziuni glomerulare minime .....	38
3.3.2 Clasificarea histologică a nefropatiei cu leziuni glomerulare minime .....	40
3.4 Glomeruloscleroza focală și segmentară .....	43
3.4.1 Fiziopatologia glomerulosclerozei focale și segmentare .....	44
3.4.2 Clasificarea histologică a glomerulosclerozei focale și segmentare .....	47

<b>II. Contribuții personale .....</b>	<b>53</b>
<b>4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Metodologia generală a cercetării .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Prelevarea fragmentului tisular – elemente tehnice de puncție biopsie renală .....</b>	<b>61</b>
<b>5.2 Examenul histopatologic în imunofluorescență, microscopia optică și electronică – elemente tehnice .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3 Analiza morfometrică .....</b>	<b>63</b>
<b>5.4 Examenul imunohistochimic .....</b>	<b>64</b>
<b>5.5 Analiza statistică .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Profilul clinico-patologic al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime și al glomerulosclerozei focale și segmentare .....</b>	<b>67</b>
<b>6.1 Introducere .....</b>	<b>67</b>
<b>6.2 Material și metodă .....</b>	<b>68</b>
<b>6.3 Rezultate .....</b>	<b>71</b>
<b>6.3.1 Caracterizarea generală a lotului .....</b>	<b>71</b>
<b>6.3.2 Profilul clinico-patologic al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime și al glomerulosclerozei focale și segmentare – analiză comparativă .....</b>	<b>74</b>
<b>6.3.3 Profilul clinico-patologic al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime – prognostic favorabil și al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime – prognostic nefavorabil – analiză comparativă .....</b>	<b>79</b>
<b>6.4 Discuții .....</b>	<b>87</b>
<b>7. Elemente de morfometrie în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu în microscopie optică .....</b>	<b>93</b>
<b>7.1 Introducere .....</b>	<b>93</b>
<b>7.2 Material și metodă .....</b>	<b>94</b>
<b>7.3 Rezultate .....</b>	<b>97</b>
<b>7.4 Discuții .....</b>	<b>101</b>

<b>8. Particularități structurale în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu în microscopie optică și imunofluorescență .....</b>	<b>104</b>
<b>8.1 Introducere .....</b>	<b>104</b>
<b>8.2 Material și metodă .....</b>	<b>105</b>
<b>8.3 Rezultate .....</b>	<b>108</b>
<b>8.4 Discuții .....</b>	<b>111</b>
<b>9. Elemente de morfometrie în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu în microscopie electronică .....</b>	<b>113</b>
<b>9.1 Introducere .....</b>	<b>113</b>
<b>9.2 Material și metodă .....</b>	<b>114</b>
<b>9.3 Rezultate .....</b>	<b>118</b>
<b>9.4 Discuții .....</b>	<b>120</b>
<b>10. Particularități structurale în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu imunohistochimic .....</b>	<b>126</b>
<b>10.1 Introducere .....</b>	<b>126</b>
<b>10.2 Material și metodă .....</b>	<b>127</b>
<b>10.3 Rezultate .....</b>	<b>130</b>
<b>10.4 Discuții .....</b>	<b>139</b>
<b>11. Concluzii și contribuții personale .....</b>	<b>147</b>
<b>11.1 Concluzii .....</b>	<b>147</b>
<b>11.2 Contribuții personale .....</b>	<b>148</b>
<b>Bibliografie .....</b>	<b>153</b>
<b>Anexe .....</b>	<b>173</b>

## Listă abrevieri

BFG – bariera de filtrare glomerulară  
BRC – boală renală cronică  
CMV – citomegalovirus  
DZ – diabet zaharat  
FABHRP – *eng.* Fragment Antibody Horseradish Peroxidase  
GNMP – glomerulonefrită membranoproliferativă  
GSFS – glomeruloscleroză focală și segmentară  
HE – hematoxilin eozină  
HIV – *eng.* Human Immunodeficiency Virus  
IF – imunofluorescență  
IHC – imunohistochimie  
IL-13 – interleukina 13  
ISKDC – *eng.* International Study of Kidney Disease in Children  
KDIGO – *eng.* Kidney Disease Improving Global Outcomes  
LES – lupus eritematos sistemic  
MBG – membrana bazală glomerulară  
ME – microscopie electronică  
MO – microscopie optică  
NLGM – nefropatia cu leziuni glomerulare minime  
NSS – *eng.* Normal Sheep Serum  
PAS – *eng.* periodic acid Schiff  
PBR – puncție biopsie renală  
PLA2R – *eng.* Phospholipase A2 Receptor  
RFG – rata de filtrare glomerulară  
SNCD – sindrom nefrotic corticodependent  
SNCR – sindrom nefrotic corticorezistent  
SNCS – sindrom nefrotic corticosensibil  
SNRF – sindrom nefrotic cu recăderi frecvente  
suPAR – *eng.* soluble urokinase Plasminogen Activator Receptor  
VHB – virus hepatitic B  
VHC – virus hepatitic

## **Ipoteza de lucru și obiectivele generale**

La începutul anilor 2000, în domeniul glomerulopatiilor s-a conturat o nouă direcție de cercetare ca entitate separată desprinsă din acestea - podocitopatiile.

Diagnosticul de nefropatie cu leziuni glomerulare minime (NLGM) se realizează doar după excluderea anomaliilor patologice în examinarea de microscopie optică (MO), cu punerea în evidență a "ștergerii" proceselor pediculate în microscopie electronică (ME) drept singura modificare existentă la nivelul glomerulilor; de obicei se consideră că răspunde favorabil la terapia glucocorticoidă. Cu toate acestea, rebiopsierea pacienților ce inițial au fost încadrați drept NLGM a demonstrat apariția glomerulosclerozei focale și segmentare (GSFS), cu o incidență mare de progresie spre boală renală cronică (BRC) stadiul terminal [1,2]. Trebuie ținut cont că o biopsie de mici dimensiuni poate să nu includă zonele segmentare de posibilă scleroză și în aceste condiții să fie omis diagnosticul inițial de GSFS. Astfel, ipoteza centrală de lucru a acestei teze este conturată în jurul ideii de a găsi/ descrie markeri anatomico-patologici de diferențiere între NLGM și GSFS fără elemente de scleroză segmentară identificate la prima puncție biopsie renală (PBR) a pacientului, centrate pe studiul modificărilor podocitare.

Obiectivele generale ale cercetării doctorale au vizat caracterizarea descriptivă a entităților patologice NLGM și GSFS, precum și analiza corelațiilor clinico-patologice care fundamentează tabloul evolutiv al afectării renale în aceste entități diagnostice.

Rezultatele pe care le-am obținut contribuie în mod decisiv la aprofundarea stadiului actual al cunoașterii referitor la profilul național al nefropatiilor pediatrice, întrucât există foarte puține studii în literatura de specialitate care să aducă informații epidemiologice despre distribuția acestui tip de patologii la copiii din România [3].

Pe de altă parte, cu ajutorul statisticii inferențiale, cercetarea doctorală a vizat identificarea elementelor de diagnostic diferențial între NLGM și glomerulii optic normali din GSFS, chiar și în acele cazuri cu puțini glomeruli în preparatul de PBR (cazuri interpretate într-o primă etapă drept NLGM, dar pentru care la rebiopsiere diagnosticul confirmat a fost GSFS, aspect certificat și de evoluția nefavorabilă a pacientului la tratamentul corticosteroid). Unii autori consideră că există numeroase similitudini între NLGM și GSFS, din punct de vedere clinic și histologic, pentru a le încadra în aceeași entitate patologică, dar ca două manifestări diferite în funcție de stadiul de progresie [4].

S-a considerat că dimensiunea medie a glomerulilor normali la copiii sub 5 ani este de aproximativ 95  $\mu$ m diametru, în timp ce la adulți este de 140-160  $\mu$ m diametru [5]. Ținând cont de acest aspect, analiza morfometrică a arătat că în biopsiile inițiale, dimensiunea glomerulilor înainte de a se iniția procesul de glomeruloscleroză a fost semnificativ mai mare la pacienții la care s-a confirmat ulterior GSFS față de cei la care s-a menținut diagnosticul de NLGM [1]; s-a considerat un cut-off de > 50% de glomeruli măriți în volum față de normalul pentru vârstă ca fiind un indicator sensibil de progresie spre glomeruloscleroză [6,7].

Apariția hipercelularității mezangiale (> 80% din glomeruli cu > 3 celule în matricea mezangială/ obiectiv 400x) a fost considerată multă vreme un factor de prognostic nefavorabil al pacienților cu NLGM și risc crescut de dezvoltare a GSFS. Toate studiile care au cercetat acest factor au aplicat diferite definiții ale "hipercelularității mezangiale", motiv pentru care este dificil de evaluat impactul unui criteriu definit neuniform. Alt factor ce a fost incriminat în a distinge între NLGM aparentă și GSFS fără scleroză segmentară pe biopsie este reprezentat de depozitele de IgM în imunofluorescență (IF) în asociere cu hipercelularitatea mezangială.

"Ștergerea" proceselor pediculate reprezintă un fenomen întâlnit atât în NLGM, cât și la nivelul tuturor glomerulilor din GSFS, indiferent dacă aceștia sunt afectați sau nu de scleroză segmentară. Aplatizarea pedicelelor cu dispariția diafragmei de filtrare nu permite o diferențiere clară între NLGM și GSFS, dar s-a observat că procesul este mai pregnant în GSFS primare față de cele secundare. Astfel, un alt studiu a corelat hipertrofia glomerulară și distribuția segmentară a "ștergerii" proceselor pediculate sub 50% din suprafața totală a capilarelor glomerulare cu GSFS secundară față de GSFS idiopatică [8]. Cu toate acestea, unele studii atestă că în NLGM are loc o „ștergere” difuză a proceselor pediculate, implicând > 75% din suprafața membranei bazale glomerulare (MBG) [9], iar în GSFS idiopatică este raportată o "ștergere" a proceselor pediculate > 50% [10].

S-a demonstrat că CD44, un marker al celulelor epiteliale parietale activate ce tapetează ghemul capilar glomerular, a fost pozitiv în cazurile incipiente de recădere a GSFS la pacienții transplantați ce prezentau doar "ștergerea" proceselor pediculate, înainte de reapariția glomerulosclerozei segmentare [11]; astfel, s-a luat în considerare acest marker în diagnosticul precoce al GSFS idiopatică (nu doar al GSFS recurente în rinichii transplantați). Pe de altă parte, unii autori consideră că CD80 poate fi un marker de diagnostic în biopsii renale pentru NLGM la adulți [12].

## **Metodologia generală a cercetării**

Lotul de studiu a fost constituit din pacienții pediatrici internați în cadrul Departamentului de Nefrologie al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Maria Skłodowska Curie" București, în perioada 2010-2020, ce au fost supuși procedurii de PBR. Tehnica propriu-zisă a PBR a fost realizată la Spitalul Clinic de Nefrologie "Dr. Carol Davila" București, prin acordul de colaborare existent între cele două unități medicale.

Studiul realizat astfel este un studiu retrospectiv. Datele clinice și paraclinice ale pacienților au fost extrase din foile de observație și baza electronică de date a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Maria Skłodowska Curie" București. Datele specifice diagnosticului anatomopatologic au fost preluate din registrele și baza electronică de date (care include imagini de IF, MO respectiv ME ale preparatelor pacienților din momentul diagnosticului) ale Departamentului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic de Nefrologie "Dr. Carol Davila" București. Complementar, din arhiva Departamentului de Anatomie Patologică au fost selectate preparate microscopice (pentru analiza morfometrică) și capsule polimerizate din rășini epoxidice (pentru analiza imunohistochimică - IHC) ale pacienților biopsiați, tratați în Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii "Maria Skłodowska Curie" București.

### **Profilul clinico-patologic al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime și al glomerulosclerozei focale și segmentare**

Beneficiind de experiența solidă în acest domeniu a fiecărei instituții și de caracterul multidisciplinar al patologiei, am considerat oportună alcătuirea unei baze de date care a inclus pacienții pediatrici ai Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii "Maria Skłodowska Curie" București pentru care s-a practicat PBR, în vederea analizei profilului epidemiologic și al stabilirii corelațiilor între aspectele clinice, paraclinice (profil biologic și anatomopatologic), ținând cont de evoluția în timp a patologiei și implicit de prognosticul asociat acesteia.

Obiectivele definite au constat în evaluarea spectrului leziunilor identificate prin PBR la copii, caracterizarea profilului clinico-patologic în două dintre cele mai frecvent întâlnite nefropatii pediatrice – NLGM respectiv GSFS și stabilirea corelațiilor între parametrii epidemiologici și clinico-biologici. În paralel, studiul a vizat caracterizarea pacienților cu NLGM cu prognostic nefavorabil, pentru a identifica elementele morfologice ce conferă acestor pacienți

o evoluție clinică mai degrabă asemănătoare cu GSFS, comparativ cu tabloul clinic clasic descris al NLGM.

### **Material și metodă**

Lotul analizat a inclus inițial 126 pacienți pediatrici tratați în Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii “Maria Skłodowska Curie”, București în perioada 2010-2020, al căror diagnostic a fost stabilit prin PBR.

Pentru fiecare pacient am identificat parametrii clinici, paraclinici și anatomopatologici utilizând informațiile existente în baza de date electronică InfoWorld a spitalului de proveniență, din foile de observație ale acestora și din informațiile disponibile în baza de date a Spitalului Clinic de Nefrologie “Dr. Carol Davila” București.

*Criteriile de excludere* în alcătuirea lotului de lucru au fost reprezentate de:

- Pacienți pierduți din evidența Secției de Nefrologie a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “Maria Skłodowska Curie” București;
- Pacienți cu informații clinice incomplete în foile de observație sau în baza de date electronică a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “ Maria Skłodowska Curie” București;
- Pacienți fără imagini de IF în baza de date electronică a Departamentului de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Nefrologie “Dr. Carol Davila” București;
- Pacienți fără preparate incluse în rășini epoxidice și lame în arhiva Departamentului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic de Nefrologie “Dr. Carol Davila” București (prelucrarea acestora s-a efectuat în alte laboratoare de Anatomie Patologică).

Consecutiv aplicării criteriilor de excludere, lotul de studiu a fost format din 118 pacienți. Informațiile clinico-patologice ale celor 118 pacienți au fost introduse într-o bază de date în Excel, urmărind la fiecare pacient următoarele criterii de la momentul efectuării PBR ( $\pm$  14 zile înainte sau după efectuarea acesteia):

- date epidemiologice: vârstă, gen, mediul de proveniență;
- diagnostic clinic (indicația PBR);
- date paraclinice: valoarea proteinelor totale serice, lipide totale, colesterol, trigliceride, acid uric, uree, creatinină, proteinurie/ 24 h;
- date anatomopatologice: diagnosticul histopatologic, aspectul în MO, ME și IF.

De asemenea, pe lângă parametrii enumerați mai sus, identificați la momentul biopsierii, în baza de date a fost adăugată o variabilă suplimentară pacienților cu NLGM – anume prognosticul. Evaluarea prognosticului a fost realizată în funcție de datele existente în anul 2020 la pacienții aflați încă în evidența Clinicii de Nefrologie a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii ”Maria Skłodowska Curie” București, luând în considerare:

- încadrarea sindromului nefrotic: corticosensibil (SNCS), corticodependent (SNCD), corticorezistent (SNCR);
- tratamentul urmat în prezent de pacient;
- pentru pacienții la care a fost disponibilă, rebiopsierea acestora în urma căreia a fost stabilit diagnosticul de GSFS.

Astfel, valorile pe care le poate avea variabila prognostic au fost definite ca fiind de tip categorial: favorabil respectiv nefavorabil.

În funcție de criteriul diagnostic anatomopatologic, din acest lot am selectat pacienții cu NLGM respectiv GSFS, fiind patologii reprezentative pentru podocitopatii.

Pacienții diagnosticați cu NLGM (51 cazuri) au fost urmăriți din momentul practicării PBR până în anul 2020, sau până ce aceștia au împlinit vârsta de 18 ani și au ieșit din evidența Secției de Nefrologie a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “Maria Skłodowska Curie” București. Din baza de date electronică a spitalului și din foile de observație ale pacienților am selectat informațiile necesare încadrării pacienților cu NLGM în două subgrupuri: cei cu evoluție favorabilă și cei cu evoluție nefavorabilă, în funcție de parametrul temporal.

Criteriile de includere în grupul cu NLGM – evoluție nefavorabilă au fost următoarele:

- schimbarea încadrării în evoluția sindromului nefrotic din corticosensibil în corticorezistent (cu toate consecințele adiacente impuse de această recomandare, cele mai pregnante fiind cele legate de ajustarea conduitei terapeutice cu diferite clase de imunosupresoare);
- atingerea stadiilor IV sau V de BRC;
- pentru pacienții care au fost supuși unei a 2-a biopsii renale, diagnosticarea GSFS, deși la prima biopsie renală au primit diagnosticul de NLGM.

Algoritmul general aplicat în selecția principalelor subgrupuri este redat în Figura 1.

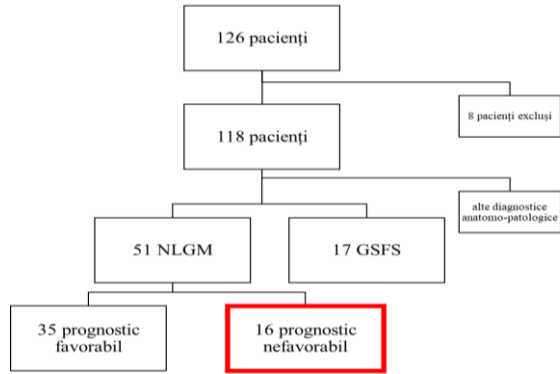


Figura 1. Algoritm general de selecție al loturilor de studiu

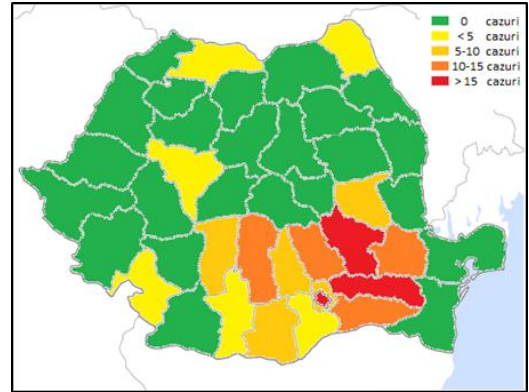


Figura 2. Distribuția cazurilor în funcție de județul de proveniență

## Rezultate

### Caracterizarea generală a lotului

Din totalul celor 118 pacienți selectați, 52 pacienți au fost de gen feminin (44.06%) iar 66 pacienți de gen masculin (55.93%). Vârstele pacienților incluși în studiu au fost cuprinse între 3 și 18 ani, vârsta medie la care aceștia au necesitat PBR fiind de  $10.44 \pm 3.45$  ani. Distribuția totală a cazurilor în funcție de județul de proveniență se poate observa în Figura 2.

În analiza ulterioară a cazurilor am identificat indicațiile pentru care s-a efectuat PBR la fiecare caz în parte. Acestea sunt rezumate în Figura 3.

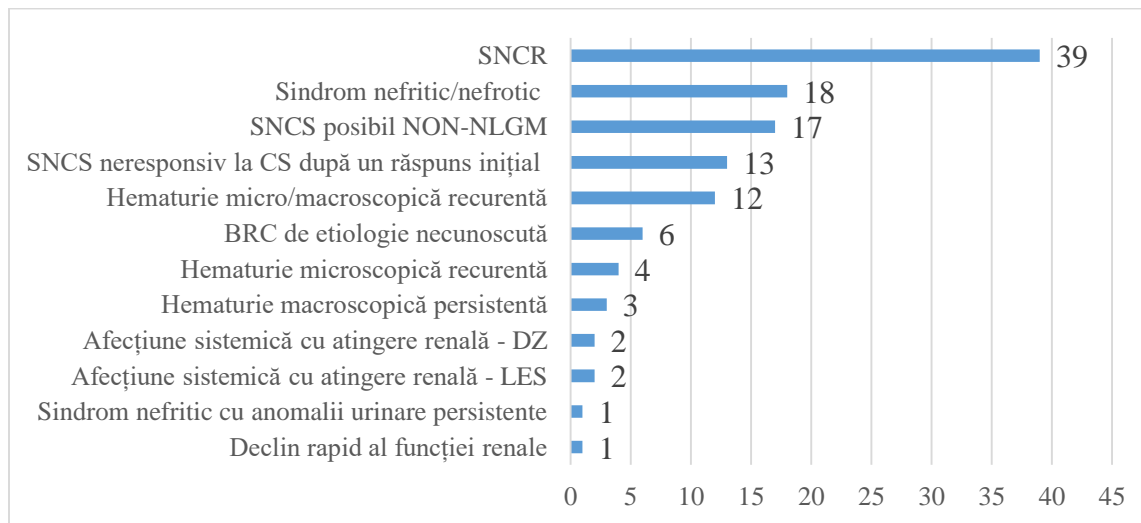


Figura 3. Distribuția cazurilor în funcție de indicația PBR

În funcție de criteriul diagnostic, rezultatele obținute în urma analizei lotului de studiu sunt ilustrate în Figura 4.

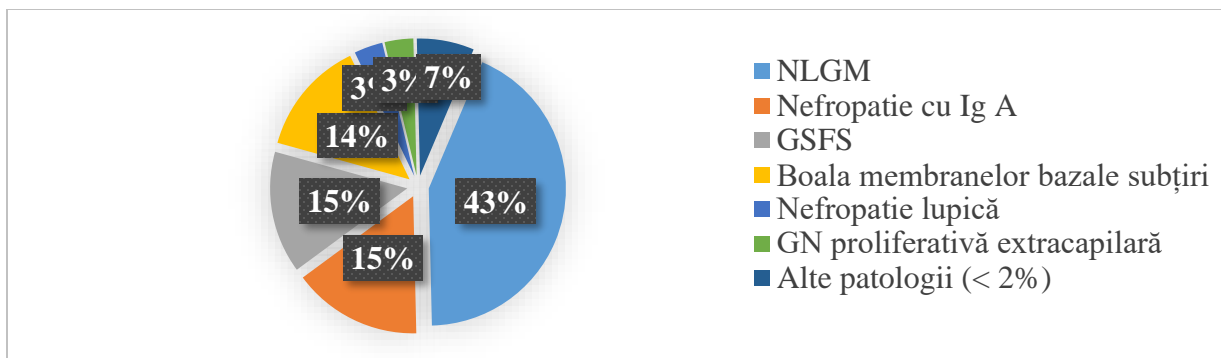


Figura 4. Distribuția cazurilor în funcție de diagnosticul anatomopatologic

### Profilul clinico-patologic al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime și al glomerulosclerozei focale și segmentare – analiză comparativă

Din lotul inițial de 118 pacienți am selectat subgrupurile de pacienți diagnosticați cu NLGM (51 pacienți) și GSFS (17 pacienți).

Vârsta medie a pacienților în subgrupul cu NLGM a fost  $9.94 \pm 3.59$  ani iar în grupul cu GSFS, vârsta medie a fost de  $10.29 \pm 2.91$  ani (Figura 5), fără diferențe semnificative statistic între cele două subgrupuri ( $p=0.71$  – T student independent).

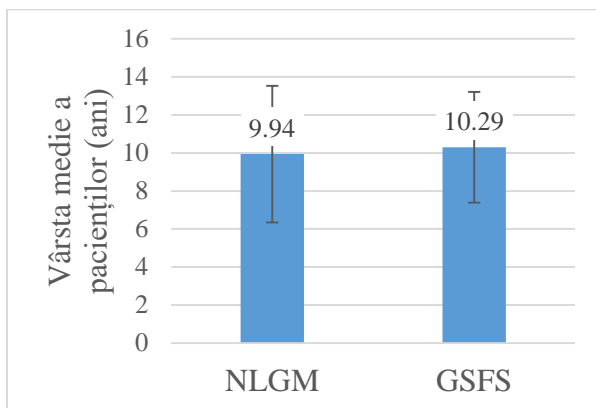


Figura 5. Vârsta medie a pacienților diagnosticați cu NLGM respectiv GSFS

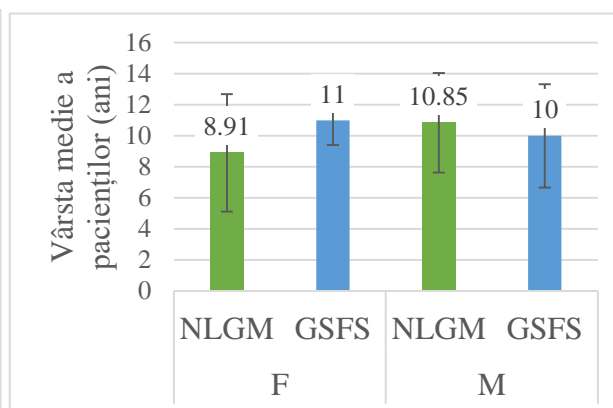


Figura 6. Vârsta medie a pacienților în funcție de diagnostic și gen

În ambele grupuri analizate, genul masculin a fost predominant față de genul feminin: la cei cu NLGM – 52% gen masculin, iar la cei cu GSFS – 70% gen masculin. Cu toate acestea, în distribuția pacienților în funcție de vârstă medie și gen (Figura 6), rezultatele obținute au fost următoarele: pentru genul feminin, vârsta medie a pacienților cu NLGM a fost  $8.91 \pm 3.78$  ani și pentru GSFS  $11 \pm 1.58$  ani. Pentru genul masculin, vârsta medie a pacienților cu NLGM a fost  $10.85 \pm 3.21$  ani iar pentru GSFS  $10 \pm 3.33$  ani. Analiza statistică comparativă a subgrupurilor de

diagnostic pentru genul feminin ( $p=0.24$ , testul T student independent) și pentru genul masculin ( $p=0.45$ , testul T student independent) nu a demonstrat diferențe semnificative statistic.

La o analiză detaliată asupra vârstei la diagnostic în urma PBR, am observat că distribuția cazurilor în funcție de gen nu respectă distribuția normală, gaussiană a populației (spre exemplu, pentru pacienții de gen masculin se observă două vârfuri de incidență ale diagnosticului – în intervalul 8-9 ani respectiv 15-16 ani) - Figura 7.

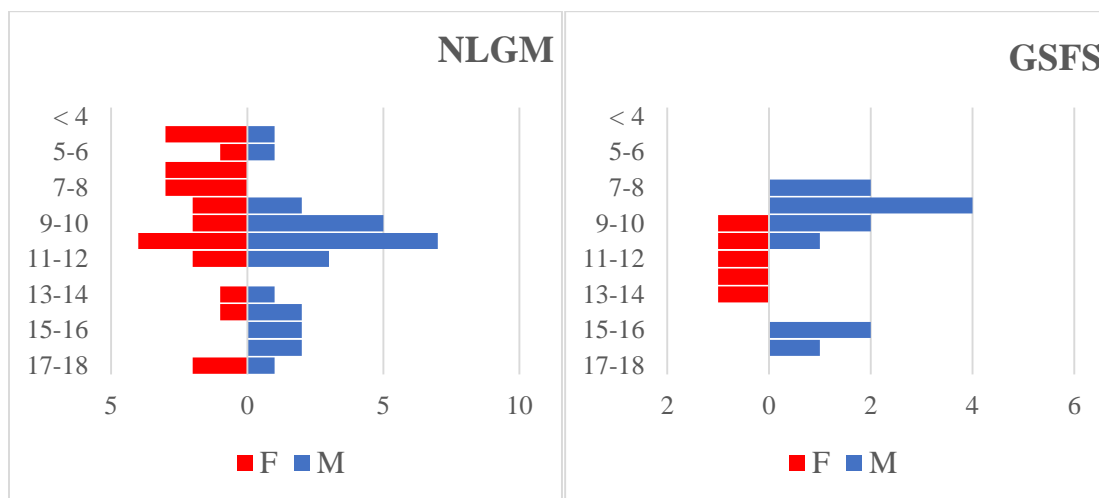


Figura 7. Histograma de frecvență a cazurilor în funcție de vârstă la momentul diagnosticului și gen pentru NLGM respectiv GSFS

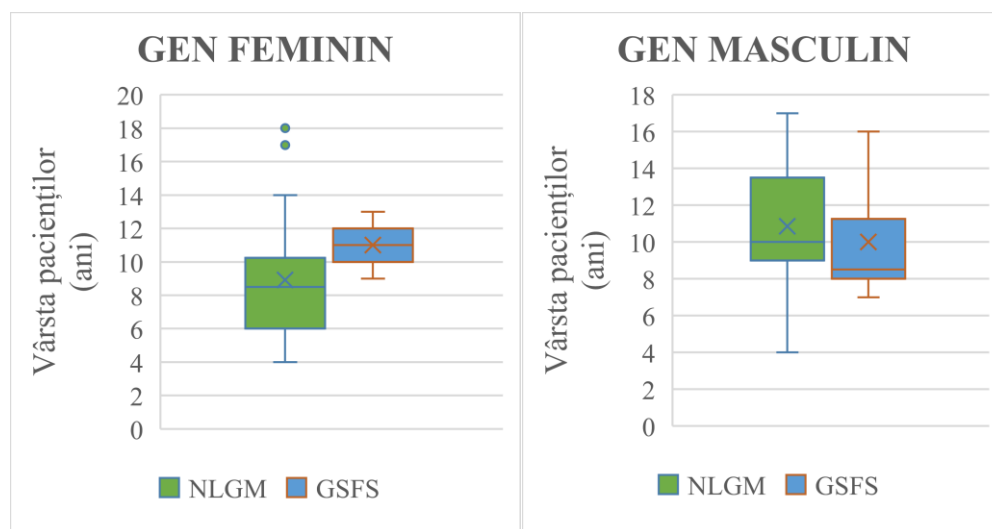


Figura 8. Reprezentare box-plot comparativă a vârstei pacienților cu NLGM și GSFS în funcție de gen

Prin analiza box-plot – Figura 8, am observat că pentru genul feminin, pacienții cu NLGM au mediana vârstei situată aproximativ central în intervalul interquartile, cu o distribuție mai largă a valorilor față de cei cu GSFS. De asemenea, pentru NLGM, doi pacienți de gen feminin cu vârsta la diagnostic de 17 respectiv 18 ani au fost interpretați drept outliers. Pentru genul masculin, atât pentru pacienții cu NLGM cât și pentru cei cu GSFS, mediana a fost situată în partea inferioară a intervalului interquartile, ceea ce a determinat o deviere la dreapta a curbei distribuției valorilor în ambele cazuri.

Pacienții cu NLGM și GSFS au fost analizați și din punctul de vedere al constantelor biologice. În analiza comparativă a valorilor acestor constante, apreciate sub formă de medie ± deviație standard, nu am identificat diferențe semnificative statistic pentru niciun parametru paraclinic, între pacienții diagnosticați cu NLGM respectiv GSFS – Tabel I.

*Tabel I. Analiză comparativă a pacienților cu NLGM și GSFS din punctul de vedere al constantelor biologice*

Variabile paraclinice	NLGM	GSFS	p
	Medie ± deviație standard		
Proteine totale (g/dl)	6.13 ± 2.04	5.42 ± 0.65	0.16
Lipide totale (mg/dl)	967.66 ± 423.46	890.41 ± 206.07	0.47
Colesterol (mg/dl)	388.74 ± 174.78	334.61 ± 98.49	0.23
Trigliceride (mg/dl)	193.72 ± 107.41	185.23 ± 79.53	0.76
Acid uric (mg/dl)	5.43 ± 1.59	6.72 ± 2.13	0.32
Uree serică (mg/dl)	43.84 ± 39.18	48.83 ± 13.80	0.60
Creatinină serică (mg/dl)	0.54 ± 0.49	1.00 ± 1.05	0.1
Proteinurie/24h (g/24h)	2.75 ± 3.28	2.15 ± 1.30	0.46

**Profilul clinico-patologic al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime – prognostic favorabil și al nefropatiei cu leziuni glomerulare minime – prognostic nefavorabil – analiză comparativă**

Rezultatele evaluării comparative între cele două grupuri de studiu din punctul de vedere al constantelor paraclinice sunt sumarizate în Tabelul II. Analiza statistică a evidențiat absența diferențelor semnificative între grupuri, cu excepția proteinuriei ( $p < 0.01$ , testul T student independent). Acest rezultat a confirmat faptul că proteinuriile pacienților cu NLGM ce au evoluat nefavorabil au fost semnificativ diferite (mai mari) față de proteinuriile pacienților cu NLGM și evoluție favorabilă.

*Tabel II Analiză comparativă a pacienților cu NLGM și GSFS din punctul de vedere al constantelor biologice*

Variabile paraclinice	NLGM - PROGNOSTIC FAVORABIL	NLGM – PROGNOSTIC NEFAVORABIL	p
	Medie ± deviație standard		
Proteine totale (g/dl)	6.98 ± 1.82	5.92 ± 1.65	0.29
Lipide totale (mg/dl)	906.15 ± 415.12	1102.23 ± 423.07	0.12
Colesterol (mg/dl)	346.05 ± 150.97	324.99 ± 96.35	0.53
Trigliceride (mg/dl)	194.31 ± 121.04	192.43 ± 72.43	0.95
Acid uric (mg/dl)	4.76 ± 1.00	5.03 ± 1.08	0.73
Uree serică (mg/dl)	32.69 ± 16.58	40.04 ± 11.79	0.19
Creatinină serică (mg/dl)	0.42 ± 0.23	0.58 ± 0.11	0.07
Proteinurie/24h (g/24h)	1.52 ± 2.03	4.39 ± 2.19	<b>&lt; 0.01</b>

Curba ROC în funcție de valorile proteinuriei și prognosticul nefavorabil al pacienților cu NLGM a evidențiat o arie de sub curbă de 0.915, cu un interval de încredere 95%, cuprins între (0.836;0.994). Sensibilitatea și specificitatea cât mai înalte ale testului au fost obținute prin maximizarea Indexului Youden. În urma aplicării acestor parametri, cut-off-ul proteinuriei peste care poate fi considerată un indicator pentru prognosticul nefavorabil al pacienților cu NLGM a fost de 2.2 g/24 h.

### **Elemente de morfometrie în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu în microscopie optică**

NLGM se caracterizează prin absența leziunilor glomerulare, vasculare și tubulo-interstițiale în MO, dar exact același aspect poate fi întâlnit la pacienții cu GSFS incipientă în situația în care nu se poate surprinde niciun glomerul cu zone de scleroză segmentară, cele mai frecvente motive invocate fiind profilul de secțiune al glomerulilor ce nu include această zonă sau numărul redus de glomeruli existenți în preparatul de puncție spre a fi examinați.

Obiectivul definit a vizat caracterizarea subgrupului de NLGM – prognostic nefavorabil cu ajutorul MO, pentru a identifica elementele necesare enunțării unui prognostic (favorabil/nefavorabil) în fața unui preparat cu glomeruli optic normali, încă de la momentul primei biopsii renale, fără a fi necesară o a doua rebiopsiere pentru elucidarea prognosticului nefavorabil.

## **Material și metodă**

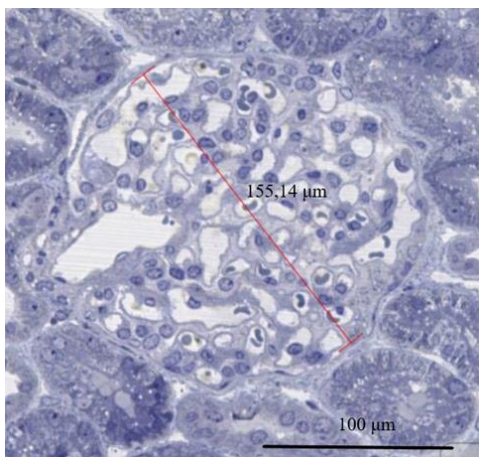
Din totalul celor 118 pacienți internați în Departamentul de Nefrologie al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “Maria Skłodowska Curie” București au fost constituite subgrupurile cu NLGM (51 de pacienți) și GSFS (17 pacienți). Ulterior, pacienții cu NLGM au fost grupați în cei cu prognostic favorabil (35 de pacienți) respectiv prognostic nefavorabil (16 pacienți) în funcție de criteriile enunțate în capitolul anterior.

Întrucât în literatura de specialitate nu există menționate valori de referință ale dimensiunilor glomerulare normale pentru copii, la nivel național și internațional, am alcătuit inițial un lot martor (lotul martor I) din piese provenite de la necropsii realizate în cadrul Departamentului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “Maria Skłodowska Curie” București (total – 68 piese), cu mențiunea că pentru fiecare pacient cu NLGM sau GSFS a fost alocat, în lotul martor, o piesă de țesut renal necropsic provenită de la un pacient cu aceeași vârstă și același gen cu cele ale pacientului cu podocitopatie. Pe lângă criteriile de vârstă și gen care au fost luate în considerare, pentru includerea în lotul martor a fost respectată condiția ca pacientul decedat să nu aibă antecedente clinice sau dovezi morfologice ale unei boli renale primare sau o altă patologie cu posibilă atingere renală secundară (diabet zaharat, lupus eritematos sistemic). În a doua etapă a studiului, am selectat doar pacienții cu NLGM spre a-i diferenția pe cei cu prognostic favorabil de cei cu prognostic nefavorabil. Aceștia au fost analizați în funcție de dimensiunile glomerulare și valoarea proteinuriei/24 h.

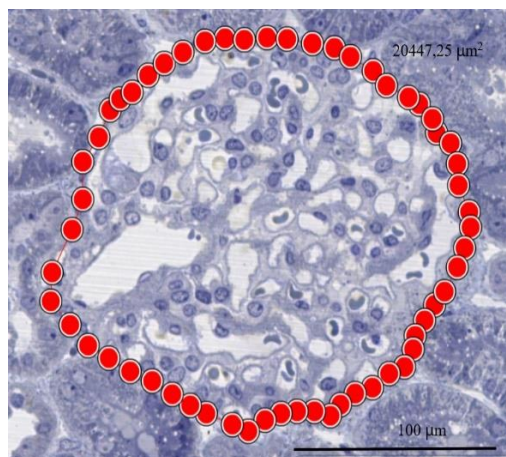
Ca reper în analiza comparativă, am format un nou lot martor, considerat lotul martor II, alcătuit din 51 de pacienți investigați prin PBR pentru afecțiuni renale cu excepția proteinuriei de rang nefrotic (cea mai frecventă indicație fiind hematuria micro/ macroscopică recurentă).

Analiza morfometrică a fost realizată pe preparatele microscopice scanate – lame digitale, cu ajutorul scanner-ului Leica Aperio AT2. Măsurătorile au fost efectuate prin utilizarea programului Digital Image Hub versiunea 4.0.6, furnizat de Leica.

Am aplicat două metode pentru a determina dimensiunea glomerulară: măsurarea diametrului glomerular (Figura 9), respectiv trasarea manuală a perimetrului glomerular (Figura 10), urmând ca aria să fie estimată în primul caz ca fiind dedusă cu ajutorul formulei clasice  $\pi r^2$ , iar în cel de-al doilea caz dedusă direct de programul Digital Image Hub 4.0.6, în baza conturului delimitat manual.



*Figura 9. Măsurarea diametrelor glomerulare (albastru de toluidină, 200x)*



*Figura 10. Tehnica trasării manuale a perimetrului glomerular (AT, 200x)*

### **Rezultate**

Lotul martor I alcătuit din preparate microscopice provenite de la necropsii a inclus un total de 68 de piese (29 de gen feminin și 39 de gen masculin), cu o vârstă medie a subiecților de la care proveneau de  $10.11 \pm 3.25$  ani.

Analiza statistică aplicată (testul T student dependent - two tailed, paired test) pentru compararea celor două metode de măsurare a relevat absența diferențelor semnificative statistice ( $p = 0.8467$ ). Acest rezultat a arătat că, indiferent de metoda aplicată (măsurarea diametrului sau a perimetrului glomerular), ambele metode au fost fiabile pentru estimarea ariei glomerulare, oferind rezultate asemănătoare.

Prin metoda de măsurare a diametrului glomerular, grupul de control a avut valori cuprinse în intervalul (123.98;196,58) cu o medie a valorilor de  $155.06 \pm 26.41 \mu\text{m}$ ; grupul cu NLGM – prognostic favorabil a avut valori cuprinse între (142.79;209.54) cu o medie a valorilor de  $172.84 \pm 27.91 \mu\text{m}$ ; grupul cu NLGM – prognostic nefavorabil a avut valori cuprinse în intervalul (148.50;235.84) cu o medie a valorilor de  $207.74 \pm 29.39 \mu\text{m}$  iar grupul cu GSFS a avut valori cuprinse în (176.96;221.67), cu o medie a valorilor de  $202.54 \pm 22.43 \mu\text{m}$ . Media valorilor diametrelor obținute pentru fiecare grup studiat este reprezentată grafic în Figura 11.

Între valorile obținute pentru fiecare grup analizat am obținut  $p < 0.05$  (testul T student dependent – two tailed, paired test), pentru fiecare comparație, cu o singură excepție. Singurul caz în care diferențele semnificative statistice au fost absente a fost reprezentat de compararea

pacienților cu NLGM – prognostic nefavorabil cu pacienții cu GSFS ( $p= 0.8296$ , test T student dependent – two tailed, paired test).

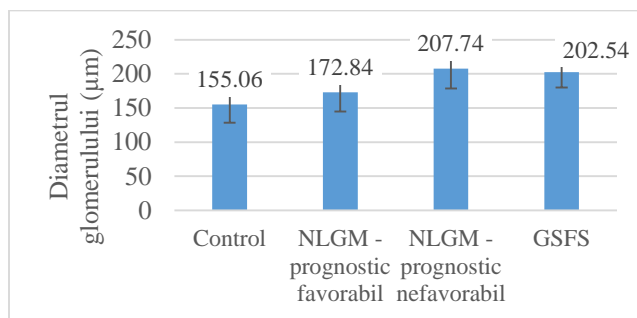


Figura 11. Media diametrelor glomerulare pentru fiecare subgrup studiat

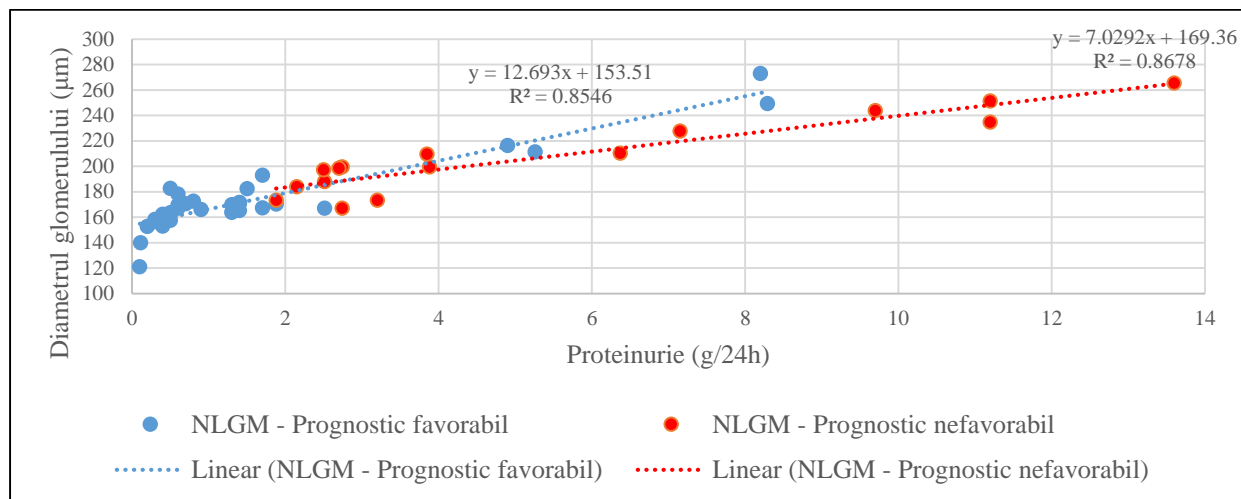
Prin cea de-a doua metodă aplicată, anume măsurarea perimetrului glomerular, am obținut următoarele valori pentru estimarea ariei glomerulare: în grupul control, valorile au fost cuprinse în intervalul (13498.78 - 21784.55), cu o medie de  $17023.56 \pm 3087.62 \mu\text{m}^2$ ; în grupul NLGM – prognostic favorabil, valorile obținute au fost între (14223.94 - 26904.45) cu o medie de  $20608.34 \pm 5179.664 \mu\text{m}^2$ ; în grupul NLGM – prognostic nefavorabil, rezultatele au fost cuprinse între (20178.44 - 29983.73) cu o medie de  $26157.93 \pm 4306.528 \mu\text{m}^2$  iar în grupul cu GSFS am obținut valori cuprinse între (20387.69 - 30189.44) cu o medie de  $25178.89 \pm 3985.59 \mu\text{m}^2$ . Similar cu rezultatele înregistrate prin măsurarea diametrului glomerular, am obținut  $p < 0.05$  (testul T student dependent – two tailed, paired) pentru fiecare comparație între grupurile analizate din punctul de vedere al măsurării ariei glomerulare prin cea de-a doua metodă, cu excepția notată anterior.

Rezultatele evaluării morfometrice au fost analizate prin raportare la valorile proteinuriei, având ca element de referință lotul martor II - control, alcătuit din 51 de pacienți (24 de gen feminin și 27 de gen masculin), cu o vârstă medie la momentul PBR de  $9.5 \pm 2.37$  ani.

Datele rezultate din compararea valorilor proteinuriei celor trei subgrupuri (lot martor II, subgrup NLGM – prognostic favorabil și subgrup NLGM – prognostic nefavorabil) au indicat diferențe semnificative statistic ( $p < 0.05$ ) în fiecare situație (testul Mann-Whitney-Wilcoxon).

Într-o etapă ulterioară, am folosit regresia liniară pentru analiza existenței unei relații între dimensiunile glomerulului și valoarea proteinuriei pentru fiecare pacient. Au fost comparate pe de-o parte diametrul glomerulului și valoarea proteinuriei și, pe de altă parte, aria glomerulară și proteinuria/24 h a pacientului. Atât pentru grupul NLGM – prognostic favorabil cât și pentru grupul NLGM – prognostic nefavorabil am obținut o corelație strânsă ( $p < 0.05$ ) între aceste valori

(Figura 12), demonstrând astfel o relație directă de tip: cu cât este mai mare glomerulul, cu atât este mai ridicată și valoarea proteinuriei. În mod concret, în toate cazurile investigate, pacienții cu glomeruli de dimensiuni crescute au prezentat valori ale proteinuriei mai ridicate față de cei care au avut glomeruli cu dimensiuni reduse.



*Figura 12. Regresie liniară între pacienții cu NLGM din punctul de vedere al diametrului glomerular și al proteinuriei/24h*

### **Particularități structurale în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu în microscopie optică și imunofluorescență**

Mulți autori consideră glomerulonefrita mezangioproliferativă și nefropatia cu IgM ca fiind variante histologice ale NLGM sau GSFS [13], alte opinii susținând definirea ca entități diagnostice de sine stătătoare. Există rezultate care atestă că acei copii diagnosticați cu NLGM care asociază hiper celularitate mezangială au un prognostic nefavorabil din punctul de vedere al numărului crescut de recăderi [14]. Pe de altă parte, un alt studiu efectuat pe copii cu NLGM a demonstrat relația dintre proliferarea de celule mezangiale și un prognostic favorabil [15,16].

Întrucât nu este clar stabilit impactul pe care hiper celularitatea mezangială îl poate avea asupra prognosticului pacienților cu NLGM, numeroase studii au încercat să coreleze prezența acestuia cu cea a depozitelor de IgM în IF. Ținând cont și de pozitivarea în IF a depozitelor de IgM, și în acest caz aspectele sunt controversate. Există studii care susțin că prezența depozitelor

de IgM în mezangiu nu influențează prognosticul pacienților [17,18], în timp ce alte studii susțin că depozitele IgM pozitive în IF pot fi markerii inițiali de severitate ai bolii [19].

În acest context, obiectivul definit a urmărit evaluarea prezenței hipercelularității mezangiale și a depozitelor de IgM, în relație cu prognosticul pacienților cu NLGM.

### **Material și metodă**

Studiul a vizat pacienții diagnosticați cu NLGM, indiferent de prognosticul acestora. Fragmentele tisulare recoltate au fost prelucrate corespunzător pentru MO, IF și ME. Au fost utilizați anticorpi conjugați cu izotiocianat de fluoresceină anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-fracțiuni complement (C1q, C3c, C4), anti-subunități kappa sau lambda ale Ig, anti-albumină și anti-fibrinogen. Cazurile diagnosticate ca NLGM au fost evaluate din punctul de vedere al prezenței hipercelularității mezangiale respectiv al depozitelor de IgM în IF.

### **Rezultate**

Din totalul celor 51 pacienți diagnosticați cu NLGM, un număr total de 4 pacienți au prezentat hipercelularitate mezangială, iar 3 dintre aceștia au asociat IgM pozitiv în IF. În funcție de distribuția acestora din punctul de vedere al prognosticului, 3 dintre pacienții cu hipercelularitate mezangială au avut prognostic nefavorabil (18.75%), toți 3 având și depozite de IgM pozitive în IF, și doar un pacient din subgrupul cu prognostic favorabil a prezentat proliferare mezangială (2.85%), IF în acest caz fiind negativă. Analiza statistică (testul exact Fisher) aplicată pentru a stabili relația dintre prezența hipercelularității mezangiale difuze și prognosticul nefavorabil nu a relevat diferențe semnificative statistic ( $p = 0.0857$ ). Absența diferențelor semnificative statistic a fost evidențiată și pentru asocierea dintre hipercelularitatea mezangială corelată cu IgM pozitiv în IF și prognosticul nefavorabil la pacienții cu NLGM ( $p = 0.25$ ).

## **Elemente de morfometrie în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu în microscopie electronică**

Una din principalele trăsături ale podocitopatiilor este reprezentată de „ștergerea” proceselor podocitare. Cea mai frecventă patologie diagnosticată în urma PBR la copii este NLGM, aceasta fiind strâns legată de aplatizarea proceselor podocitare, în timp ce numărul total de podocite rămâne constant, asemănător cu numărul de podocite existente într-un glomerul normal.

”Ștergerea” proceselor podocitare poate fi întâlnită și în cadrul altor patologii – precum în fazele incipiente de GSFS, urmată de detașarea podocitelor de MBG și intrarea în apoptoză. Obiectivul definit a urmărit evidențierea unor diferențe morfologice ce ar putea să influențeze prognosticul pacienților cu NLGM încă de la prima biopsie renală, sau să indice o posibilă suspiciune de GSFS în lipsa altor elemente definitorii ale bolii. Complementar acestui obiectiv, am studiat relația dintre „ștergerea” proceselor podocitare și singura variabilă paraclinică pentru care am obținut diferențe semnificative statistic între pacienții cu NLGM stratificați în raport de prognostic – anume proteinuria/24 h.

### **Material și metodă**

Studiul a inclus pacienții diagnosticați cu NLGM, stratificați în funcție de prognostic și pe cei diagnosticați GSFS. Grupul martor a fost alcătuit din 68 de pacienți, care au necesitat PBR pentru hematurie micro/macrosopică persistentă. Am definit ”ștergerea” proceselor podocitare prin fuziunea completă a acestora într-o zonă specifică astfel încât diafragmele de filtrare să nu mai fie vizibile, iar MBG să fie acoperită în acea zonă de o bandă subțire formată din fuziunea pedicelelor.

Pentru analiza morfometrică, secțiunile realizate pentru ME au fost examinate, iar pentru fiecare caz am selectat 5 imagini corespunzătoare a 5 bucle capilare diferite ale glomerulului, la o putere de mărire cuprinsă între 5000 și 20000x. Toate imaginile au fost salvate cu extensia .tif și au fost analizate cu ajutorul softului de prelucrare al imaginilor Image J versiunea 1.52a.

Am măsurat, în fiecare imagine, lungimea MBG din bucla capilară situată pe versantul dinspre spațiul urinar (fără a include MBG dinspre mezangiu) și lungimea zonei corespunzătoare de pe MBG în care se observă ”ștergerea” pedicelelor (Figura 13).



*Figura 13. Tehnica de măsurare utilizată în studiu (linia galbenă corespunde lungimii MBG iar săgețile negre delimitează zona în care se observă ”ștergerea” proceselor podocitare; ME*

## Rezultate

Rezultatele măsurătorilor au relevat următoarele: în grupul martor, lungimea din MBG corespunzătoare ”ștergerii” proceselor podocitare a fost cuprinsă între 1.73% și 17.44%, cu o medie a valorilor de  $8.42 \pm 4.59\%$ ; grupul pacienților diagnosticați cu GSFS a avut valori cuprinse între 38.57% și 87.07%, cu o medie a valorilor de  $55.44 \pm 16.17\%$ ; în grupul cu NLGM – prognostic nefavorabil am obținut valori cuprinse între 41.95% și 77.77%, cu o medie de  $55.96 \pm 11.14\%$ , iar în grupul NLGM – prognostic favorabil pacienții au avut valori cuprinse între 59.2% și 98.67%, media fiind de  $74.74 \pm 11.56\%$ .

Datele obținute au relevat valori apropiate ale lungimii medii a MBG corespunzătoare ”ștergerii” proceselor podocitare pentru pacienții cu GSFS și cei cu NLGM – prognostic nefavorabil. Analiza statistică a evidențiat diferențe semnificative statistic între valorile medii ale măsurătorilor realizate între grupul martor și fiecare dintre cele 3 grupuri de studiu ( $p < 0.001$ , test T-student independent), indicând astfel că aplatizarea proceselor podocitare nu ocupă același spațiu la nivelul MBG la pacienții fără proteinurie, comparativ cu pacienții cu patologii caracterizate prin proteinurie. Valorile obținute au fost semnificativ statistic diferite între grupul GSFS și grupul NLGM – prognostic favorabil, respectiv între grupul NLGM – prognostic nefavorabil și grupul NLGM – prognostic favorabil ( $p < 0.001$ , test T student independent). Nu am înregistrat diferențe semnificative între grupul GSFS și grupul NLGM – prognostic nefavorabil ( $p = 0.81949$ , test T student independent).

Analiza statistică a evidențiat, prin testul Mann-Whitney și regresie statistică, prezența unei corelații directe între afectarea podocitară prezentă în grupurile NLGM stratificate în funcție de prognostic și proteinuria pacientului (g/24 h) ( $p=0.0035$  respectiv  $p=0.0049$ ) (Figura 14). Reprezentarea grafică a rezultatelor a marcat dependența dintre creșterea procentului în care sunt ”șterse” procesele podocitare și valoarea proteinuriei, funcția care a redat cel mai bine acest aspect (cea mai mare valoare obținută pentru  $R^2$  în ecuația redată grafic) fiind funcția exponențială (Figura 14). Datele noastre au confirmat faptul că pacienții cu NLGM – prognostic nefavorabil au prezentat proteinurii mai mari față de cei NLGM – prognostic favorabil, în schimb ”ștergerea” pedicelilor a fost mai puțin reprezentată la cei cu prognostic nefavorabil față de cei cu prognostic favorabil.

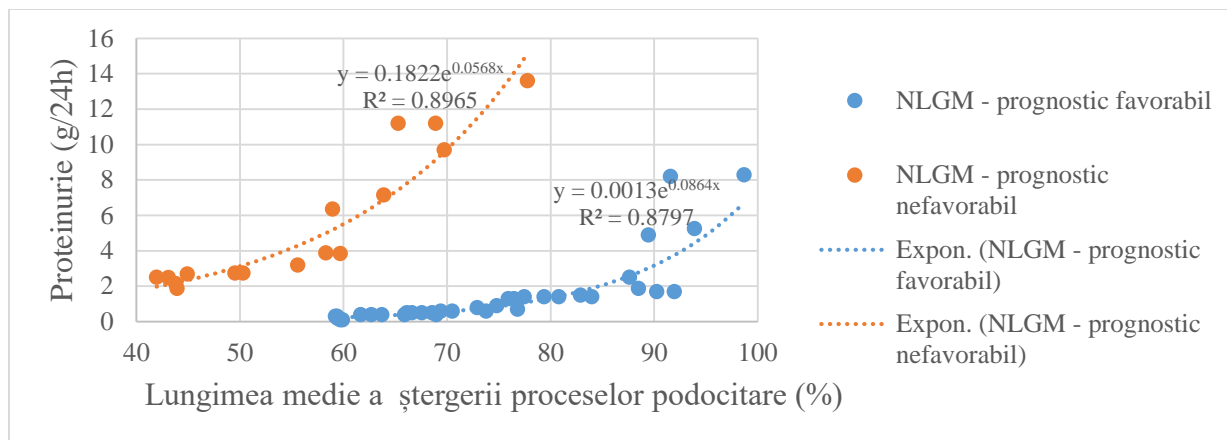


Figura 14. Relația dintre "ștergerea" proceselor podocitare (%) și proteinurie (g/24 h) la pacienții cu NLGM

### Particularități structurale în nefropatia cu leziuni glomerulare minime și în glomeruloscleroza focală și segmentară – studiu imunohistochimic

Literatura de specialitate acordă un spațiu important analizei similitudinilor și diferențelor clinico-morfologice dintre NLGM și GSFS, în tentativa de a stabili dacă cele două entități diagnostice sunt etape evolutive ale aceleiași afecțiuni, sau dacă sunt dezvoltate prin mecanisme fiziopatologice distincte.

Conform rezultatelor publicate în fluxul principal, markerul de activare CD44 poate diferenția NLGM de stadiile incipiente ale GSFS [20]. De asemenea CD44 este pozitiv și în stadiile precoce de recădere a GSFS la pacienții care au beneficiat de transplant renal, singurul aspect inițial observat fiind "ștergerea" proceselor pediculate înainte de apariția clară a GSFS [11]. Aceste două studii furnizează argumente solide pentru utilizarea CD44 drept marker pentru posibilul diagnostic de GSFS incipientă. Odată cu publicarea studiului efectuat de Shimada et al., în 2011 [21], NLGM a fost privită drept o patologie cu dublă componentă inițială: pe de-o parte prin modificări ale suprafeței podocitare, reflectate prin expresia CD80 pe membrana podocitară și, pe de altă parte, prin disfuncția limfocitelor T reglatorii. Astfel, numeroase studii au vizat investigarea expresiei CD80 ca și element de diagnostic diferențial între NLGM și GSFS, printr-o metodă non-invazivă - anume dozarea CD80 urinar. S-a demonstrat că prezența CD80 urinar și valorile acestuia la copiii cu sindrom nefrotic pot diferenția NLGM de GSFS [22,23,24]. Suplimentar, studii recente

au demonstrat că prezența CD80 la nivel glomerular reprezintă un marker sensibil de diagnostic al NLGM, fără însă a putea diferenția între formele corticosensibile sau corticorezistente de NLGM [12].

Având în vedere cele enunțate mai sus, obiectivul definit a vizat analiza expresiei markerilor CD44, Ki-67 și CD80, urmărind identificarea profilului particular al exprimării lor în corelație cu patogenia leziunilor pacienților diagnosticați cu NLGM – prognostic nefavorabil, leziuni care pot masca apartenența diagnostică la NLGM – formă corticorezistentă sau la GSFS – formă incipientă, înainte de apariția sclerozei segmentare.

### Material și metodă

Lotul de studiu a fost alcătuit din cei 51 de pacienți diagnosticați cu NLGM, stratificați în funcție de prognostic. Fragmentele tisulare ale acestor pacienți incluse în rășini epoxidice sub formă de capsule etichetate, au fost secționare suplimentar în vederea efectuării IHC pe secțiuni semifine. Tehnica propriu-zisă de efectuare a examenului IHC în aceste condiții este practică în cadrul Departamentului de Anatomie Patologică și Citologie al Spitalului Ambroise-Paré, Boulogne-Billancourt, Paris – Franța.

### Rezultate

Expresia Ki-67 a fost negativă pentru toți cei 51 de pacienți (atât pentru cei cu prognostic favorabil, cât și pentru cei cu prognostic nefavorabil).

Expresia anticorpului antiCD80 a avut un grad de pozitivare de 72.54% din totalul pacienților (37 de pacienți din totalul celor 51). În funcție de apartenența la subgrupul de studiu, reacția CD80 a fost pozitivă pentru 33 de pacienți din cei 35 cu NLGM – prognostic favorabil, (94.28%) și 4 pacienți din cei 16 cu NLGM – prognostic nefavorabil (25%) – Figura 15. Imagine reprezentativă cu CD80 pozitiv în subgrupurile de studiu este ilustrată în Figura 16.

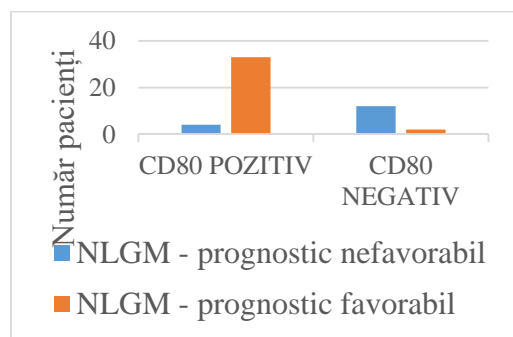


Figura 15. Distribuția CD80 în cele două grupuri studiate

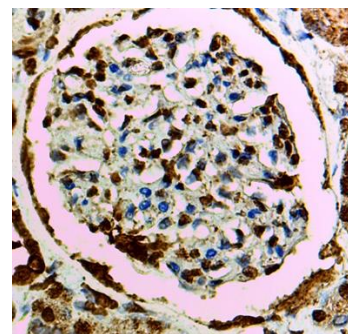


Figura 16. CD80, 1000x, pozitiv la un pacient cu NLGM – prognostic nefavorabil

Analiza statistică (testul exact Fisher) a relevat diferențe semnificative statistice ( $p < 0.001$ ) între expresia CD80 pozitivă în subgrupul de NLGM – prognostic favorabil și, respectiv, NLGM – prognostic nefavorabil.

Expresia antiCD44 a avut un grad de pozitivare de 25.49 % din totalul pacienților cu NLGM (13 pacienți din totalul celor 51), distribuția în funcție de subgrupurile de studiu indicând că toate cazurile pozitive au făcut parte din subgrupul NLGM – prognostic nefavorabil, (13 cazuri din cele 16 - 81.25%) și că nu a existat niciun caz pozitiv pentru CD44 în subgrupul NLGM – prognostic favorabil (Figura 17). Aspect reprezentativ pentru reacția CD44 pozitivă la pacienții cu NLGM – prognostic nefavorabil este ilustrat în Figura 18.

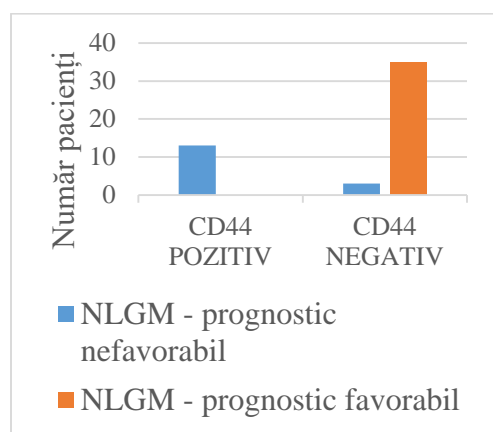


Figura 17. Distribuția imunomarcajului CD44 în cele două grupuri studiate

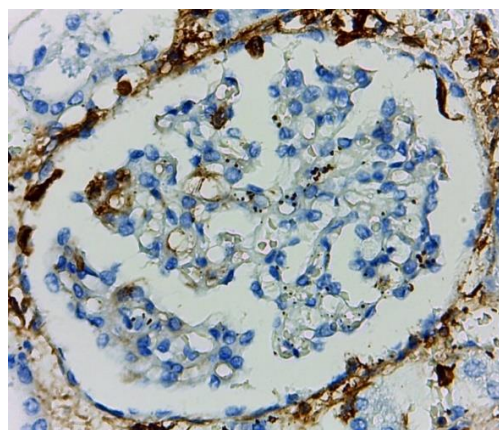


Figura 18. Imunomarcaj CD44, 1000x, pozitiv la pacient cu NLGM – prognostic nefavorabil

Analiza statistică (testul exact Fisher) a evidențiat faptul că există o diferență semnificativă statistic ( $p=0.0269$ ) între expresia CD44 pozitivă în grupul de NLGM – prognostic favorabil și NLGM – prognostic nefavorabil.

Integrarea rezultatelor imunoreacției pentru markerii CD44 și CD80, pentru fiecare caz în parte, a condus la caracterizarea celor două subgrupuri de NLGM, cu prognostic favorabil și respectiv cu prognostic nefavorabil, prin prisma substratului molecular care poate diferenția cele două posibilități de evoluție în corelație cu posibilitatea existenței unei GSFS incipiente, înainte de apariția sclerozei segmentare.

Astfel, având în vedere faptul că pacienții cu NLGM – prognostic favorabil au prezentat imunoreacție negativă pentru CD44 (potențial marker pentru GSFS incipientă, înainte de apariția sclerozei segmentare), am considerat că acest marcaj este tipic pentru NLGM, în corelație cu

prognosticul. În paralel, 33 din 35 pacienți din acest subgrup au prezentat imunoreacție CD80 pozitivă, marcaj considerat un argument în plus pentru diagnosticul de certitudine al leziunilor histopatologice specifice NLGM. În baza acestor considerente, subgrupul NLGM – prognostic favorabil a fost considerat ca subgrup martor, aspectul IHC fiind interpretat ca și aspect tipic de NLGM.

Rezultatele obținute în investigarea IHC pentru subgrupul NLGM – prognostic nefavorabil, au permis diferențierea de subgrupul NLGM – prognostic favorabil. Această diferențiere moleculară, care a adus informații suplimentare examenelor în MO, IF și ME, a indicat posibilitatea încadrării acestui subgrup ca GSFS incipientă, înainte de dezvoltarea sclerozei segmentare.

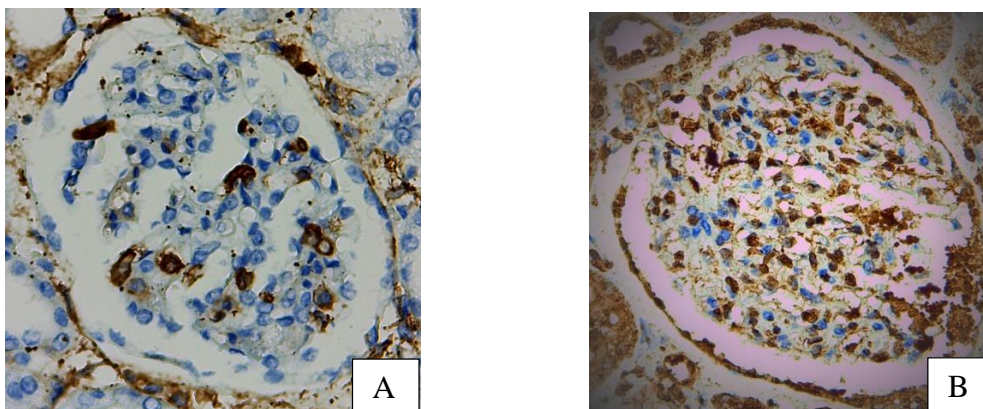
Rafinând analiza profilului IHC care a caracterizat subgrupul NLGM - prognostic nefavorabil, am identificat trei posibilități ale imunoreacției:

- CD44 pozitiv și CD80 negativ – 12 pacienți (75%);
- CD44 negativ și CD80 pozitiv – 3 pacienți (18.75%);
- CD44 pozitiv și CD80 pozitiv – 1 pacient (6.25%).

Cele trei tipuri ale imunoreacției au fost interpretate în corespondență cu profilul clinic, ținând cont că aceste cazuri au provenit de la pacienți cu un prognostic atipic pentru NLGM:

- CD44 pozitiv și CD80 negativ – situație corespunzătoare unei GSFS incipiente înainte de apariția zonelor de scleroză focală și segmentară;
- CD44 negativ și CD80 pozitiv – situație corespunzătoare NLGM, fără implicarea GSFS;
- CD44 pozitiv și CD80 pozitiv – situație de graniță cu elemente din ambele patologii, atât NLGM cât și GSFS, susceptibilă cu ipoteza conform căreia aceste podocitopatii sunt de fapt stadii diferite de evoluție din conținutul aceluiași proces fiziopatologic.

Rezultatele noastre indică faptul că proporția pacienților care au prezentat pozitivitate pentru un singur anticorp a fost covârșitoare (15 pacienți - 93.75%), spre deosebire de pozitivitatea ambilor anticorpi la un singur pacient din cei 16 – 6.25% (Figura 19). Acest aspect a fost interpretat ca reper pentru a înclina balanța către infirmarea ultimei ipoteze menționate, și pentru certificarea că NLGM, respectiv GSFS, sunt entități fiziopatogenice distincte, cu mecanisme patogenice diferite.



*Figura 19. Pacient diagnosticat cu NLGM – prognostic nefavorabil. A – CD44, 1000x, pozitiv în special la nivelul celulelor parietale din vecinătatea capsulei Bowman, discrete celule epiteliale parietale activate, migrate în interiorul glomerulului; B – CD80, 1000x, pozitiv difuz pozitiv la nivelul podocitelor*

Având în vedere majoritatea pozitivării cazurilor pentru CD44 (75%), datele obținute au indicat că pacienții diagnosticați inițial ca NLGM – prognostic nefavorabil ar putea constitui cazuri de GSFS nediagnosticată datorită imposibilității evidențierii sclerozei segmentare în cel puțin un glomerul.

## **Concluzii și contribuții personale**

### **Concluzii**

Ideea în jurul căreia a fost construită cercetarea doctorală a fost reprezentată de identificarea și analiza aspectelor distinctive ale pacienților pediatrici care au fost diagnosticați cu NLGM dar care, în evoluție, nu au prezentat prognosticul așteptat conform datelor din literatura de specialitate. Astfel, am realizat o caracterizare completă a grupului de pacienți incluși în studiu, din punct de vedere demografic, clinic, paraclinic și anatomopatologic – utilizând maximum de informații existente pe preparatul inițial de PBR. Având în vedere noile cercetări din domeniul podocitopatiilor, am pornit de la ipoteza conform căreia diagnosticul de NLGM stabilit inițial poate masca, în cazul pacienților cu evoluție nefavorabilă, un diagnostic mult mai sumbru, anume GSFS – scleroza segmentară fiind imposibil de evidențiat morfologic la momentul prezentării pacientului. Consecutiv, întrebarea cheie la care studiul doctoral a urmărit formularea unui răspuns a fost enunțată astfel: ”în fața unui pacient cu glomeruli optic normali, IF negativă și pedicele

”șterse” extensiv în ME, există anumiți parametri care să indice o posibilă evoluție spre apariția sclerozei glomerulare, sau diagnosticul de NLGM este singurul luat în considerare?”

Studiul de față a caracterizat întregul grup NLGM cu prognostic nefavorabil din punct de vedere epidemiologic, clinico-paraclinic și morfologic (în baza modificărilor prezente în fragmentele tisulare prelevate prin PBR), datele obținute fiind interpretate utilizând statistica descriptivă și inferențială. De cele mai multe ori a fost utilizat un lot martor cu care a fost comparat grupul de studiu, pentru a valida semnificația rezultatelor obținute. Obiectivele de cercetare definite au fost realizate cu ajutorul studiilor morfometrice în MO, ME cât și cu ajutorul IHC efectuată pe secțiuni semifine.

Metodele utilizate pot fi integrate într-un algoritm de analiză care rafinează posibilitatea precizării, pentru fiecare pacient la care se suspicionează NLGM, dacă va avea prognosticul scontat de literatura de specialitate sau va face parte din categoria celor corticorezistenți, sau din categoria celor care prezintă GSFS incipientă.

Astfel, am demonstrat că investigarea acestor pacienți apelând la noi parametri imunohistochimici și evaluare morfometrică poate fi de un real folos în identificarea unor aspecte cu aplicabilitate practică pentru clinicienii care se confruntă cu alegeri dificile în stabilirea managementului terapeutic. Trebuie însă subliniat faptul că tehnicile utilizate nu pot fi aplicate în practica de rutină. Analiza morfometrică este o metodă operator dependentă, consumatoare de timp, și care necesită programe specializate de analiză și prelucrare ale imaginilor. Tehnica IHC cu aplicarea CD44 a condus la obținerea unui rezultat fiabil în precizarea unei GSFS incipiente, dar această tehnică a ridicat și cele mai multe probleme de prelucrare ale țesutului, datorită particularităților de arhivare ale fragmentelor tisulare prelevate prin PBR (capsule etichetate, polimerizate în rășini epoxidice).

Limitele studiului doctoral derivă din numărul relativ mic de subiecți incluși în studiu. Dimensiunea grupului analizat nu a permis obținerea unor rezultate cu putere statistică ridicată, susținând astfel clarificarea unor aspecte importante pentru diagnosticul diferențial – de exemplu validarea cut-off-ului pentru proteinurie în diagnosticul diferențial al pacienților NLGM cu prognostic favorabil, față de cei cu prognostic nefavorabil.

Direcțiile de cercetare ar trebui axate pe elucidarea mecanismelor care stau la baza proceselor fiziopatologice ale acestor două podocitopatii. Odată înțelese toate aspectele, inclusiv modul în care se suprapun aceste procese, există avantaje majore de ordin terapeutic, spre exemplu folosirea

abataceptului la cei cu recădere de NLGM. Trebuie efectuate studii clinice randomizate cu includerea unui număr mare de subiecți pentru a stabili cu certitudine relațiile existente între diferitele mecanisme fiziopatologice și răsunetul lor clinic.

### **Contribuții personale**

- Studiul de față a inclus un număr de 126 pacienți diagnosticați în cadrul Departamentului de Nefrologie Pediatrică al Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii “Maria Skłodowska Curie” București, evaluați prin PBR în perioada 2010-2020; dintre aceștia, urmând criteriile de selecție și pe cele de excludere, am selectat 51 pacienți cu diagnosticul NLGM și 17 pacienți cu diagnosticul GSFS. Pacienții cu diagnostic de NLGM au fost încadrați în două subgrupuri: cu prognostic favorabil (35 de pacienți) respectiv cu prognostic nefavorabil (16 pacienți). Ceilalți pacienți pentru care, în urma evaluării PBR, au avut alte încadrări diagnostice, au constituit lotul/ loturile martor.

- La nivelul întregului lot selectat a existat o ușoară dominanță a genului masculin (55.93% față de 44.06% pentru genul feminin), iar vârsta medie la diagnostic a fost de  $10.44 \pm 3.45$  ani. Majoritatea cazurilor au provenit din zona de sud-est a țării, fapt ce se corelează cu adresabilitatea crescută a pacienților din această zonă pentru capitală.

- Principala indicație clinică de efectuare a PBR a fost SNCR (33%), iar în urma acesteia, cel mai frecvent diagnostic stabilit a fost reprezentat de NLGM (43%).

- În analiza comparativă a pacienților cu NLGM și, respectiv, GSFS, vârsta medie a pacienților cu NLGM a fost de  $9.94 \pm 3.59$  ani, iar în cadrul grupului cu GSFS -  $10.29 \pm 2.91$  ani, fără diferențe semnificative statistic între cele două grupuri diagnostice.

- Atât pentru pacienții cu NLGM, cât și pentru cei cu GSFS am observat o pondere crescută pentru genul masculin – 52%, respectiv 70%. Stratificând pacienții în funcție de vârstă și gen, nu am obținut rezultate semnificative statistic în analiza comparativă a subgrupurilor de diagnostic.

- Luând în considerare criteriul de biopsiere, majoritatea pacienților NLGM (43%) au fost biopsiați pentru SNCR, această indicație fiind majoritară și pentru pacienții GSFS (82%).

- În analiza variabilelor paraclinice (proteine totale, lipide totale, colesterol, trigliceride, acid uric, uree, creatinină, proteinurie/ 24 h) nu am obținut diferențe semnificative statistic între pacienții cu GSFS și cei cu NLGM.

- În analiza comparativă a pacienților cu NLGM – prognostic favorabil și, respectiv, cu NLGM – prognostic nefavorabil, analiza statistică a relevat diferențe semnificative statistic pentru

parametrul vârstă. Distribuția pe genuri a fost cvasiegală pentru grupul cu prognostic favorabil. Deși pacienții de gen masculin au reprezentat 68.75% din subgrupul cu prognostic nefavorabil, analiza statistică nu a confirmat corelația dintre acest gen și prognostic.

- Principalele indicații de biopsiere în cazul pacienților cu NLGM – prognostic favorabil au fost SNCR (28%) și SNCS cu lipsa răspunsului tardiv la tratamentul steroidian după un răspuns favorabil într-o primă etapă (28%), în timp ce 75% pacienții NLGM – prognostic nefavorabil au fost biopsiați pentru SNCR.

- Analiza comparativă a pacienților cu NLGM – prognostic favorabil și, respectiv, NLGM – prognostic nefavorabil, din punctul de vedere al constantelor biologice, a relevat diferențe semnificative statistic pentru valorile proteinuriei. Pacienții cu evoluție nefavorabilă au avut valori mult mai mari ale proteinuriei/24 h față de cei cu evoluție favorabilă, curba ROC indicând o valoare de 2.2 g/24 h ca nivel de cut-off pentru predicția celor două posibilități de evoluție.

- În analiza de MO, pentru o caracterizare cât mai obiectivă a subgrupului NLGM – prognostic nefavorabil, am efectuat o analiză comparativă cu subgrupul NLGM – prognostic favorabil și subgrupul GSFS, asigurând în constituirea subgrupurilor corespondența de vârstă și gen.

- Pentru studiul de morfometrie în MO, am utilizat două tehnici de măsurare ale glomerulilor în MO (diametrul glomerular și perimetrul glomerular) care au permis calcularea ariei glomerulare. Cele două metode de măsurare au oferit rezultate similare, astfel încât au fost validate și aplicate.

- Am obținut, în urma analizei morfometrice, următoarele valori medii ale diametrelor glomerulare: pentru grupul martor  $155.06 \pm 26.41 \mu\text{m}$ , grupul cu NLGM – prognostic favorabil  $172.84 \pm 27.91 \mu\text{m}$ ; grupul cu NLGM – prognostic nefavorabil  $207.74 \pm 29.39 \mu\text{m}$  iar pentru grupul cu GSFS  $202.54 \pm 22.43 \mu\text{m}$ . Comparând mediile diametrelor glomerulare între grupurile studiate, am obținut diferențe semnificative statistic, cu excepția comparației dintre grupul NLGM – prognostic nefavorabil și grupul GSFS. Conform datelor obținute, pacienții cu NLGM – prognostic nefavorabil pot avea diametre glomerulare cu aproximativ 20% mai mari decât diametrele glomerulare ale pacienților NLGM ce vor evolua favorabil.

- Rezultatele măsurării mediei ariei glomerulare au fost următoarele: în grupul control,  $17023.56 \pm 3087.62 \mu\text{m}^2$ ; în grupul NLGM – prognostic favorabil  $20608.34 \pm 5179.664 \mu\text{m}^2$ ; în grupul NLGM – prognostic nefavorabil  $26157.93 \pm 4306.528 \mu\text{m}^2$  iar în grupul cu GSFS  $25178.89 \pm 3985.59 \mu\text{m}^2$ . Analiza statistică a relevat diferențe semnificative statistic între grupuri, cu

excepția comparației dintre grupul GSFS și grupul NLGM – prognostic nefavorabil. Conform datelor obținute, pacienții cu NLGM – prognostic nefavorabil pot avea o arie glomerulară cu 27% mai mare față de cea a pacienților cu prognostic favorabil.

- Analiza statistică a indicat diferențe semnificative între valorile proteiuriei în grupul NLGM – prognostic favorabil și, respectiv, grupul NLGM – prognostic nefavorabil. Cu ajutorul regresiei liniare, am pus în evidență o relație de dependență între valorile proteinuriei și dimensiunile glomerulare, în ambele grupuri. Dimensiunile glomerulare crescute au fost corelate cu valori ridicate ale proteiuriei/ 24 h.

- În grupul NLGM – prognostic nefavorabil am identificat 3 pacienți cu hiper celularitate mezangială difuză care au asociat și IgM pozitiv în IF. Analiza statistică nu a confirmat corelația dintre hiper celularitatea mezangială difuză, respectiv prezența depozitelor de IgM și prognosticul nefavorabil.

- Analiza morfometrică în ME a vizat grupul NLGM (stratificat în raport de prognostic), grupul GSFS și grupul martor. Pentru fiecare pacient au fost efectuate măsurători ale ”ștergerii” pedicelelor în raport cu lungimea MBG, iar media rezultatelor obținute a fost:  $8.42 \pm 4.59$  % pentru grupul martor,  $55.44 \pm 16.17$  % pentru pacienții cu GSFS,  $55.96 \pm 11.14$  % pentru pacienții NLGM – prognostic nefavorabil și  $74.74 \pm 11.56$  % pentru pacienții NLGM – prognostic favorabil. Analiza statistică a relevat diferențe semnificative statistic între grupul GSFS și grupul NLGM – prognostic favorabil, precum și între grupul NLGM – prognostic favorabil și grupul NLGM – prognostic nefavorabil; nu au fost înregistrate diferențe semnificative statistic între grupul GSFS și grupul NLGM – prognostic nefavorabil, la acești pacienți proporția în care procesele podocitare sunt ”șterse” fiind similară.

- Analiza statistică a evidențiat existența unei corelații între valorile proteiuriei și procentul în care sunt ”șterse” pedicelele la grupul NLGM – prognostic favorabil și, respectiv, grupul NLGM – prognostic nefavorabil. Conform datelor obținute, pacienții cu NLGM – prognostic nefavorabil au avut proteinurii mai mari și o aplatizare mai restrânsă a pedicelelor, comparativ cu pacienții cu NLGM – prognostic favorabil.

- Examenul IHC, utilizând tehnică particulară și anticorpi anti-Ki-67, anti-CD44 și anti-CD80, a urmărit validarea ipotezei conform căreia pacienții cu NLGM – prognostic nefavorabil pot fi pacienți cu GSFS nedagnosticată datorită evaluării într-un stadiu incipient, precursor al apariției sclerozei segmentare.

- Imunomarcajul Ki-67 negativ, atât pentru grupul cu NLGM – prognostic favorabil, cât și pentru grupul NLGM – prognostic nefavorabil, a indicat absența existenței podocitelor intrate în ciclul de diviziune celulară și, implicit, apariția GSFS varianta cu colaps glomerular.

- Imunomarcajul pentru CD80 a fost pozitiv în 94.28% cazuri din grupul NLGM – prognostic favorabil, și în 25% cazuri din grupul NLGM – prognostic nefavorabil, analiza statistică indicând diferențe semnificative statistic între expresia CD80 în cele două grupuri. Consecutiv, CD80 reprezintă un marker podocitar valoros pentru identificarea leziunilor tipice de NLGM ale pacienților în recădere.

- Imunomarcajul pentru CD44 a fost negativ pentru toate cazurile din grupul NLGM – prognostic favorabil, și pozitiv pentru 81.25% cazuri din grupul NLGM – prognostic nefavorabil, analiza statistică indicând diferențe semnificative statistic între expresia CD44 în cele două grupuri.

- În grupul NLGM – prognostic favorabil, imunoreacția CD44 negativă în toate cazurile și imunoreacția CD80 pozitivă în 94.28% din cazuri a fost interpretată ca expresie tipică pentru această condiție patologică. În grupul NLGM – prognostic nefavorabil, 75% cazuri au prezentat imunoreacție CD44 pozitivă și CD80 negativă, 18.75% cazuri – imunoreacție CD44 negativă și CD80 pozitivă, și 6.25% cazuri imunoreacție pozitivă dublă, pentru CD44 și CD80. Consecutiv, profilul IHC al pacienților cu imunoreacție CD44 pozitivă și CD80 negativă poate fi interpretat ca reper de identificare a transformărilor produse la nivel molecular, într-un stadiu incipient de GSFS, premergător apariției glomerulosclerozei.

## Bibliografie selectivă

1. Fogo A, Hawkins EP, Berry PL, et al. Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. *Kidney Int.* 1990; 38:115–23.
2. Trainin EB, Gomez-Leon G. Development of renal insufficiency after long-standing steroid-responsive nephrotic syndrome. *Int J Pediatr Nephrol.* 1982; 3:55–8.
3. Gall Z, Duicu C, Kiss E, et al. Clinical Features and Histopathological Spectrum in Adolescent Onset Nephrotic Syndrome in a Romanian Children Population. *Acta Medica Marisiensis.* 2015; 60(4):146-150.
4. Feehally J. Focal segmental glomerulosclerosis: challenges in definitions, pathogenesis and management. *African Journal of Nephrology.* 2017; 20(1):48-56.
5. Hurley RM, Drummond KN. Glomerular enlargement in primary renal disease. A quantitative study. *Arch Pathol.* 1974; 97:389–91.
6. Nyberg E, Bohman SO, Berg U. Glomerular volume and renal function in children with different types of the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1994; 8:285–9.
7. Suzuki J, Yoshikawa N, Nakamura H. A quantitative analysis of the glomeruli in focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 1994; 8:416–9.
8. D'Agati V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003; 23:117–34.
9. Farris AB. Section 2: Glomerular Diseases, Minimal Change Disease. In Colvin RB, Chang A, et al. *Diagnostic Pathology: Kidney diseases*, 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 48-56.
10. Farris AB. Section 2: Glomerular Diseases. Focal Segmental Glomerulosclerosis. Focal Segmental Glomerulosclerosis, Primary. In Colvin RB, Chang A. *Diagnostic Pathology: Kidney Diseases, Second Edition.* Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 64-72.
11. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007; 2(3):529-42.
12. Zhao B, Han H, Zhen J, et al. CD80 and CTLA-4 as diagnostic and prognostic markers in adult-onset minimal change disease: a retrospective study. *PeerJ.* 2018; 6:e5400.
13. Al-Eisa A, Carter JE, Lirenmann DS, et al. Childhood IgM nephropathy: comparison with minimal change disease. *Nephron.* 1996; 72:37–43.

14. Allen WR, Travis LB, Cavallo T, Brouhard BH, Cunningham RJ. Immune deposits and mesangial hypercellularity in minimal change nephrotic syndrome: Clinical relevance. *J Pediatr*. 1982; 100:188-191.
15. Habib R, Girardin E, Gagnadoux MF, et al. Immunopathological findings in idiopathic nephrosis: clinical significance of glomerular "immune deposits". *Pediatr Nephrol*. 1988; 2:402-408.
16. Silverstein DM, Craver RD. Mesangial hypercellularity in children: presenting features and outcomes. *Pediatr Nephrol*. 2008 ; 23(6):921-8.
17. Spreitzer M, Vizjak A, Ferluga D, Kenda RB, Levart TK. Do C1q or IgM nephropathies predict disease severity in children with minimal change nephrotic syndrome? *Pediatr Nephrol*. 2014; 29(1):67-74.
18. Juozapaite S, Cerkauskiene R, Laurinavicius A, Jankauskiene A. The impact of IgM deposits on the outcome of Nephrotic syndrome in children. *BMC Nephrol*. 2017; 18(1):260.
19. Kanemoto K, Ito H, Anzai M, et al. Clinical significance of IgM and C1q deposition in the mesangium in pediatric idiopathic nephrotic syndrome. *J Nephrol*. 2013; 26(2):306-14.
20. Smeets B, Stucker F, Wetzels J, et al. Detection of activated parietal epithelial cells on the glomerular tuft distinguishes early focal segmental glomerulosclerosis from minimal change disease. *Am J Pathol*. 2014; 184(12):3239-48.
21. Shimada M, Araya C, Rivard C, Ishimoto T, Johnson RJ, Garin EH. Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder? *Pediatr Nephrol*. 2011; 26(4): 645-9.
22. Cara-Fuentes G, Wei C, Segarra A, et al. CD80 and suPAR in patients with minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis: diagnostic and pathogenic significance. *Pediatr Nephrol*. 2014; 29(8): 1363-71.
23. Garin EH, Mu W, Arthur JM, et al. Urinary CD80 is elevated in minimal change disease but not in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2010; 78(3):296-302.
24. Ling C, Liu X, Shen Y, et al. Urinary CD80 levels as a diagnostic biomarker of minimal change disease. *Pediatr Nephrol*. 2015; 30(2):309-16.

## Lista lucrărilor științifice publicate

### Articole indexate ISI sau BDI

1. **Derewicz D**, Taraș R, Florescu C, Bălgrădean M, Sajin M. Morphometry of podocytes - a single center study of pediatric patients: is there any correlation with proteinuria level? Archives of the Balkan Medical Union. 2019;54(3):532-539  
<https://umbalk.org/morphometry-of-podocytes-a-single-center-study-of-pediatric-patients-is-there-any-correlation-with-proteinuria-level/>  
<https://doi.org/10.31688/ABMU.2019.54.3.20>
2. **Derewicz D**, Moldovan VT, Ali L, Taraș R, Florescu C, Bălgrădean M, Sajin M. The role of glomerular morphometric features in paediatric podocytopathies - a single center study. Romanian Journal of Morphology and Embryology 2018; 59(4):1061-1066, Impact Factor: 1.5  
<http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/59041810611066.pdf>