

**Școala doctorală în domeniul Științe medicale**

Cu titlu de manuscris

*C.Z.U: 616.72-002.77-053.7:575.174.015.3(043.2)*

**IACOMI Vladimir**

**IMPACTUL FARMACOGENOMIC AL POLIMORFISMULUI  
GENEI METILENTETRAHIDROFOLAT REDUCTAZEI ÎN  
ARTRITA JUVENILĂ IDIOPATICĂ**

**322.01 PEDIATRIE ȘI NEONATOLOGIE**

**Rezumatul tezei de doctor în științe medicale**

**Chișinău, 2024**

Teza a fost elaborată în Departamentul Pediatrie al USMF ”Nicolae Testemițanu”

**Conducător**

Revenco Ninel

Dr.hab.șt.med., profesor universitar

*semnătura*

**Membrii comisiei de îndrumare:**

Groppa Liliana

Dr.hab.șt.med., profesor universitar

*semnătura*

Adauji Stela

Dr.șt.farm., conferențiar universitar

*semnătura*

Mihu Ion

Dr.hab.șt.med., profesor universitar

*semnătura*

Susținerea va avea loc la 27 noiembrie 2024 în incinta USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205, în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 26.06.2024 (*proces verbal nr.38*).

**Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:**

***Președinte:***

Mazur-Nicorici Lucia,

Dr. hab. șt. med., profesor universitar

\_\_\_\_\_

***Membrii:***

Revenco Ninel,

Dr. hab. șt. med., profesor universitar

\_\_\_\_\_

Adauji Stela,

Dr. șt. farm., conferențiar universitar

\_\_\_\_\_

Mătrăgună Nelea,

Dr. hab. șt. med., conferențiar universitar

\_\_\_\_\_

Stratan Valentina,

Dr. șt. biol., conferențiar cercetător

\_\_\_\_\_

Autor

Iacomi Vladimir

\_\_\_\_\_

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. CARACTERISTICA GENERALĂ A MATERIALULUI DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE .....</b>	<b>8</b>
1.1. <b>Prezentarea generală a studiului efectuat.....</b>	<b>8</b>
1.2. <b>Metodologia aplicată în decursul cercetării.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REZULTATE .....</b>	<b>13</b>
2.1. <b>Caracteristica generală a loturilor de studiu.....</b>	<b>13</b>
2.2. <b>Analiza prezenței variantelor polimorfe în gena MTHFR la copiii cu artrită juvenilă idiopatică.....</b>	<b>13</b>
2.3. <b>Evaluarea clinică (JADAS – 71; indicelui ACR pedi 30; DAS28 și chestionarului MISS) în funcție de genotipurile MTHFR.....</b>	<b>14</b>
2.4. <b>Evaluarea toxicității hepatice a MTX la pacienții cu AJI în funcție de variantele polimorfe în gena MTHFR.....</b>	<b>16</b>
2.5. <b>Evaluarea funcțională a toxicității cardiace a MTX în funcție de variantele polimorfe în gena MTHFR.....</b>	<b>18</b>
2.6. <b>Algoritmii pentru genotipare a MTHFR în AJI.....</b>	<b>19</b>
<b>SINTEZA CAPITOLELOR .....</b>	<b>21</b>
<b>CONCLUZII GENERALE.....</b>	<b>23</b>
<b>RECOMANDĂRI PRACTICE.....</b>	<b>24</b>
<b>BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ .....</b>	<b>25</b>
<b>LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE .....</b>	<b>28</b>

## INTRODUCERE

Copiii cu artrită juvenilă idiopatică urmează tratament și sunt monitorizați pe întreg parcursul vieții [1]. Această maladie cronică are geneză neclară și, în pofida noilor descoperiri în patogeneza bolii, evoluția sa rămâne a fi imprevizibilă. În ultimul deceniu, au fost cercetate mai multe verigi moleculare și genetice, care pot pune fundamentele unui model de predicție a succesului terapeutic și remisiunii de durată a maladiei [2,3].

Schimbările la nivelul sistemului osteoarticular și imun, în condițiile de activitate înaltă a bolii, cauzează apariția sechelelor și dezabilității copilului în procesul său de creștere [4]. AJI, cu debut la orice vârstă și de orice tip, produce consecințe asupra statutului fizic și psihoemoțional atât al copilului, cât și al familiei. Totodată, în funcție de gradul de dezabilitate confirmat, tratamentul maladiei implică costuri adiționale pentru îngrijiri și integrare socială [5].

La debutul și pe parcursul fazei acute a artritei juvenile idiopatice, funcțiile locomotorii și psiho-somatice asociate sunt compromise. Odată cu inițierea tratamentului de fond etapizat, aceste funcții se recuperează parțial, după care pacienții cu dificultate acceptă administrarea continuă a acestor preparate. Ca urmare, pacienții revin la unitatea de reumatologie pentru a asocia sau escalada tratamentul spre treapta următoare, în timp, calitatea vieții se reduce, unii copii rămân invalidizați și necesită îngrijire și atenție zilnică. Treapta terapeutică consecutivă reprezintă în sine introducerea medicației antiinflamatoare steroidiene, care poartă și ea un caracter dual, pe de o parte ameliorează manifestările sistemice, iar pe de altă parte induce reacțiile secundare pe termen lung [6]. Recuperarea funcției musculoscheletale depinde de gradul de activitate a bolii, de forma maladiei și de complianța terapeutică a pacientului.

În prezent, au fost obținute progrese semnificative în ce privește identificarea mecanismelor, care au impact asupra demarării remisiunii bolii și restabilirii funcțiilor locomotorii în AJI. Este vorba de căile biomoleculare și susceptibilitatea genetică, care sunt factorii țintă implicați în faza acută a maladiei.

Termenul de „susceptibilitate genetică” se referă la modificările structurale în cadrul genomului, ce au avut loc *in-vivo* de-a lungul timpului formării copilului ca răspuns la factorii interni și externi. Susceptibilitatea presupune că structura anumitei gene influențează funcția proteinei, pe care aceasta o codifică și exprimă fenotipic caracterul pozitiv sau negativ asupra unei stări sau acțiuni. Pentru AJI, această susceptibilitate favorizează capacitatea de a modela o selectare individuală a medicației pentru a urma conceptul „Treat-to-Target”. Variațiile genetice ar favoriza explicarea unor fenomene de intoleranță în recuperarea pacienților cu AJI. În prezent, expresia genelor factorilor metabolici, în special a celor mutante, este presupusă ca potențiali markeri de prognostic al non-responderilor la terapia fond în AJI [7].

O gamă largă de gene sunt responsabile de răspunsul la terapia cu glucocorticosteroizi, *metotrexat* și cea biologică. Astfel, metilentetrahidrofolat reductaza (*MTHFR*), fiind parte componentă în ciclul metabolic al folaților, este implicată în modularea răspunsului la terapia inițială de fond cu *metotrexat* [8–10].

*MTHFR* este bine cunoscută ca gena trombofiliei, fiind implicată în producerea unor rezultate nefavorabile ale sarcinii [11–13], la fel și riscul cardiovascular, care a fost cercetat preponderent la adulți [14,15], și, nu în ultimul rând, în rîndul patologiei neuropsihiatrice [16]. Mai mult, există dovezi limitate precum ca *MTHFR* este un factor de risc matern pentru anomaliile cromozomiale la făt [17]. *MTHFR* nu este afectată în mod direct de către MTX, dar prezintă următoarea verigă de disfuncție a ciclului folaților, după legarea MTX de dihidrofolat reductază. Într-adevăr, variantele polimorfe la nivelul genei acestei enzime sporesc riscul de abolire a sintezei proteice și cresc nivelul seric de homocisteină[18].

Până în prezent, faptul că pacienții cu sau fără variante polimorfe rs1801133 și rs1801131 combinate ale genei *MTHFR* ar avea un rezultat mai prost în urma administrării de MTX rămâne o direcție științifică contradictorie [19]. Noile cercetări au demonstrat că răspunsul la tratament și toxicitatea sunt plurifactoriale și necesită validare în ansamblu sub forma unui model de predicție.

**Scopul** acestui studiu a fost în aprecierea rolului polimorfismelor genei *MTHFR* ca predictor ai eficacității și toxicității *metotrexatului* în artrită juvenilă idiopatică, pentru elaborarea recomandărilor privind optimizarea tratamentului cu *metotrexat*.

**Obiectivele cercetării:**

1. Determinarea prezenței variantelor polimorfe în gena *MTHFR* în artrită juvenilă idiopatică.
2. Evaluarea clinică a scorurilor de activitate a bolii și intoleranței la *metotrexat* în artrita juvenilă idiopatică.
3. Evaluarea toxicității hepatice a *metotrexatului* în funcție de prezența variantelor polimorfe ale genei *MTHFR* în artrita juvenilă idiopatică.
4. Evaluarea funcțională a toxicității cardiace a *metotrexatului* în funcție de prezența variantelor polimorfe ale genei *MTHFR* în artrita juvenilă idiopatică.
5. Elaborarea recomandărilor privind testarea polimorfismului genetic în AJI

**Ipoteza de cercetare:** Copiii cu artrită juvenilă idiopatică care prezintă variante polimorfe în gena enzimei metilentetrahidrofolat reductaza au eficacitate terapeutică redusă și toxicitate hepatică și cardiacă sporită la administrarea de *metotrexat*.

**Sumarul compartimentelor tezei:** Teza este scrisă în limba română cu titlu de manuscris. Este expusă pe 155 de pagini, redactate la calculator și conține: introducere, revista literaturii, materiale și metode de cercetare, rezultatele obținute, discuții, concluzii generale și recomandări practice. Bibliografia include 160 de titluri. Lucrarea este ilustrată cu 17 tabele, 38 de figuri și 22 de anexe.

În capitolul **Introducere** evidențiem importanța și actualitatea problemelor legate de farmacogenetică în tratamentul AJI. În acest scop, am examinat datele epidemiologice relevante la nivel mondial, factorii de risc, modelele de predicție ale ineficacității și toxicității la tratamentul cu *metotrexat*. De asemenea, am evaluat impactul testării genei *MTHFR* asupra acestor manifestări.

În **Capitolul 1** se conține analiza literaturii de specialitate dedicate aspectelor genetice ale artritei juvenile idiopatice, mecanismelor de reglare metabolică a ciclului folaților, noțiunilor generale despre susceptibilitate genetică și rolul polimorfismului genei *MTHFR* în tratamentul AJI. Acest capitol prezintă realizările obținute pe parcursul ultimilor ani, problemele nesoluționate până în prezent și direcțiile de perspectivă în cercetările acestui domeniu al reumatologiei. Sunt discutate și analizate metodele standard de măsurare a indicilor predictivi ai afectării organice în AJI, precum și implicarea simptomelor comportamentale în complianța la tratament.

În cadrul **Capitolului 2** am descris criteriile de includere a subiecților în studiu, metodologia de calcul al volumului eșantionului și designul cercetării. Capitolul oferă detalii privind metodele clinice, paraclinice și genetice aplicate în decursul studiului. La fel, sunt descrise metodele de evaluare statistică pentru aprecierea rezultatelor studiului, care au stat la baza formulării concluziilor generale.

**Capitolul 3** prezintă rezultatele studiului. În acest capitol sunt descriși subiecții din ambele loturi de studiu în baza indicatorilor demografici și sociali, examinărilor clinice și paraclinice și stabilirea relației lor cu polimorfismul genei *MTHFR*. Subcapitolul dedicat rezultatelor investigațiilor genetice asupra polimorfismelor rs1801133 și rs1801131 a genei *MTHFR* la

subiecții cu artrită juvenilă idiopatică, analizează comparativ loturile în baza genotipurilor depistate. Astfel, am obținut algoritmi de testare individuală a eficacității și toxicității la tratamentul de fond cu *metotrexat*.

**Capitolul 4** include discutarea tuturor rezultatelor, compararea acestora cu date similare din literatura de specialitate și sublinierea aspectelor de noutate pe plan național, dezvoltate în lucrare.

Teza se încheie cu **Concluzii generale și Recomandări practice**.

**Metodologia generală a cercetării:** Pentru realizarea obiectivelor propuse, studiul a fost condus sub forma unei cercetări analitice, de tip caz-control. Cercetarea a fost aprobată de către comitetul de Etică a cercetării al Universității de stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 44/52 din 12.04.2018). În total în studiu au fost incluși 68 de pacienți cu artrită juvenilă idiopatică care primesc tratament cu *metotrexat* mai mult de 6 luni. Toți participanții au fost supuși unei examinări complexe, care a inclus: completarea unui chestionar special elaborat, examenul clinic standard, cu aprecierea unor parametri de interes pentru includerea lor în scorurile clinice de evaluare a bolii, examinări de laborator cu evaluarea unor reactanți de fază acută (viteza de sedimentare a hematiilor, proteina C reactivă), indicatori biochimici sanguini tradiționali pentru aprecierea toxicității hepatice la *metotrexat* (ALT, ALP, Bilirubina totală, AST), examinări imagistice (ecografie, ecocardiografie + Doppler tisular, Fibro Scan). Subiecții supuși cercetării au fost analizați în dependență de forma clinică a maladiei: sistemică, oligoarticulară, poliarticulară, durata bolii, și tratamentul urmat: monoterapie, terapie combinată. Lotul de control a constituit un număr de 45 de copii care nu au prezentat genotipul cercetat. În baza rezultatelor obținute au fost emise concluzii și elaborate recomandări practice.

**Noutatea științifică a rezultatelor cercetării:** a) a fost demonstrat că genotipurile mutante heterozigot combinat și homozigot pentru *MTHFR* este semnificativ în o treime din subiecții cu AJI cu *metotrexat*; b) aplicarea scorurilor clinice pentru a aprecia eficacitatea și toxicitatea *metotrexatului*, demonstrează specificitate și sensibilitate înaltă pentru testarea variantelor polimorfe ale *MTHFR* în AJI; c) elastografia tranzitorie unidimensională a demonstrat caracterul individual de afectare hepatică în tratamentul AJI; d) a fost demonstrată importanța Doppler tisular în aprecierea funcției sistolice și diastolice ventriculare la pacienții cu AJI.

#### **Importanța teoretică a cercetării**

Evaluarea polimorfismelor genetice ale *MTHFR* în relație cu particularitățile clinico-paraclinice ale subiecților cu AJI prin intermediul următoarelor instrumente: examenul clinic standard, scorul DAS 28, scorul JADAS 71, indicele ACRPedi 30%, Scorul de Severitate a Intoleranței la *Metotrexat*, parametrii standard ECG în 12 derivații, parametrii ecografiei standard 2D a ficatului, parametrii FibroScan, parametrii ecografiei 2D standard + Doppler Tisular cardiace. Studiul a generat cunoștințe suplimentare privind testarea genetică cu rol în stabilirea oportunității de inițiere a MTX la subiecții cu AJI, facilitând prognozarea individualizată a probabilității de intoleranță.

#### **Valoarea aplicativă a lucrării**

În baza rezultatelor obținute se propun algoritmi pentru predicția eficacității tratamentului și posibilelor efecte toxice. Rezultatele cercetării vor fi implementate în calitate de suport metodologic în activitatea specialiștilor reumatologi, cardiologi, gastroenterologi și hepatologi pediatri precum și geneticienilor și farmacologilor ce activează în instituțiile medico-sanitare de profil pediatric implicați în procesul de evaluare a conduitei copilului cu AJI.

**Aprobarea rezultatelor** obținute a fost efectuată în corespundere cu etapele fundamentale ale studiului. Principalele rezultate au fost prezentate, discutate și aprobate la ședințele Departamentului Pediatrie al IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae

Testemițanu” și Seminarului Științific de Profil, precum și în cadrul conferințelor științifice naționale: Conferința Națională de Pediatrie ”Progrese în Tratatamentul Artritei Juvenile Idiopatice” (2020, Chișinău, Moldova); Conferința Științifică Anuală a USMF ”Nicolae Testemițanu” (2021, Chișinău, Moldova); A 5-a Conferință Națională cu Participare Internațională "Biennale Chișinău-Sibiu" -"Managementul Interdisciplinar al Copilului" (2022, Chișinău, Moldova); Conferința Științifică Anuală a USMF ”Nicolae Testemițanu” (2022, Chișinău, Moldova); Conferința Științifică Anuală a USMF ”Nicolae Testemițanu” (2023, Chișinău, Moldova); și internaționale: The 7th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera (2018, Chișinău, Moldova); Congresul al 25-lea al Societății Europene de Reumatologie Pediatrică (2018, Lisabona, Portugalia); Conferința Națională de Pediatrie ”Ghiduri și Protocoale în Pediatrie” (2018, București, România); A 3-a Conferință Națională cu Participare Internațională "Biennale Sibiu-Chișinău" (2019, Sibiu, România); The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera (2020, Chișinău, Moldova); Conferința Națională de Pediatrie ”Ghiduri și Protocoale în Pediatrie” (2021, București, România); XXIII Конгресс Педиатров России с Международным Участием “Актуальные проблемы педиатрии” (2021, Москва, Российская Федерация; International Black Sea Coastline Countries Scientific Research Symposium – VI (2021, Giresun, Turkey); A XXXIV-a Ediție a Conferinței Naționale ”Zilele Pediatriei Ieșene N.N.Trifan” cu Participare Internațională (2022, Iași, România); Congresul al 28-lea al Societății Europene de Reumatologie Pediatrică (2022, Praga, Cehia); A XXXV-a Ediție a Conferinței Naționale ”Zilele Pediatriei Ieșene N.N.Trifan” cu Participare Internațională (2023, Iași, România); Ediția a 7-a a Conferinței Naționale de Reumatologie Pediatrică cu Participare Internațională (2023, Iași, România); Conferința Națională de Pediatrie cu Participare Internațională (2023, Chișinău, Moldova); Young Investigators Meeting (2023, Rotterdam, Olanda); Congresul al 29-lea al Societății Europene de Reumatologie Pediatrică (2023, Rotterdam, Olanda).

**Cuvinte-cheie:** artrita juvenilă idiopatică, *MTHFR*, copii, *metotrexat*, FibroScan, toxicitate, eficacitate.

# 1. CARACTERISTICA GENERALĂ A MATERIALULUI DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE

## 1.1. Prezentarea generală a studiului efectuat

Studiul de față prezintă un studiu de tip caz-control, care s-a desfășurat în perioada anilor 2017-2021 în cadrul Departamentului Pediatrie, al IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova, la baza clinică IMSP Institutul Mamei și Copilului, Clinica de Reumatologie pediatrică. În studiu au fost incluși 68 de copii cu diagnosticul stabilit de artrită juvenilă idiopatică conform criteriilor de clasificare ILAR.

La inițierea studiului, toți părinții/tutorii legali ai subiecților selectați, au fost informați despre etapele cercetării și încadrați în studiu numai cu acordul personal, fiindu-le explicate în detaliu cerințele impuse și modul de desfășurare al investigațiilor necesare, drepturile participantului, confidențialitatea datelor personale, riscurile, prin discuție în mod particular. Toate procedurile au fost efectuate după semnarea consimțământului informat de către reprezentantul legal și cu asentimentul copiilor cu vârsta  $\geq 14$  ani. Aceștia nu au fost remunerați și nu au suportat costuri financiare aferente participării. Cercetarea a fost aprobată de către Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (aviz pozitiv nr.52 din 12.04.2018).

Eșantionul de cercetare a fost calculat în baza formulei (2.1) standard pentru studiile de tip caz-control:

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 \times P(1-P)}{(P0 - P1)^2} \quad (1.1)$$

unde:

P0 – Pacienți cu artrită juvenilă idiopatică cu MTX și polimorfism al genei *MTHFR*. Conform datelor bibliografice, frecvența variantei polimorfe TT reprezintă 15,49%, (P0 = 0,1549)

P1 – Pacienți cu artrită juvenilă idiopatică cu MTX și fără polimorfism al genei *MTHFR*. Presupunem, că în lotul de cercetare valoarea va fi de 50% (P1 = 0,5), atunci:

$$P = (P0 + P1)/2 = 0,32 \quad (1.2)$$

Z $\alpha$  – valoarea tabelară. Pentru semnificație statistică a rezultatelor de 95% coeficientul Z $\alpha$ =1,96

Z $\beta$  – valoarea tabelară. Pentru puterea statistică a comparației de 90% coeficientul Z $\beta$  = 1,28

f = Proporția subiecților care se așteaptă să abandoneze studiul din motive diferite de efectul investigat q = 1/(1-f), f = 0% (0).

Introducând datele în formulă am obținut:

$$38,36 = \frac{2(1,96 + 1,28)^2 \times 0,32 \times 0,68}{(0,1549 - 0,5)^2}$$

Astfel, pentru cercetare au fost create două loturi:

Lot de cazuri – cel puțin câte 19 pacienți cu diagnosticul stabilit de AJI, cu terapia cu MTX și polimorfism genetic a *MTHFR*;



Lot persoane de control – cel puțin câte 19 pacienți cu diagnosticul stabilit de AJI, cu MTX, fără polimorfism genetic a *MTHFR*.

Eșantionul a fost calculat și cu ajutorul programului computerizat QUANTO v1.2.4, destinat calculelor matematice pentru studiul asocierilor factorilor genetici, de mediu și al interacțiunilor geno-ecologice sau intergenice în dezvoltarea maladiilor multifactoriale. A fost examinată asocierea genei-candidate cu AJI în administrare de metotrexat.

Exemplificăm estimarea numărului de perechi caz-control necesare pentru a studia asocierea cu gena preconizată – *MTHFR*. Admitem următoarele:

1. Prevalența maladiei în populația pediatrică (Kp) este egală cu 0,001% (conform datelor ACR).

2. Polimorfismul genei *MTHFR* determină formarea a 2 alele în locusul 677: alela nulă C (marcată, de ex., prin litera „A”) și alela funcțional competentă T (marcată prin litera „a”). Purtătorii genotipului homozigot TT prezintă risc majorat pentru dezvoltarea toxicității și ineficienței în administrare de metotrexat. Proporția subiecților din populație purtători ai genotipului pentru Republica Moldova este de 15,49%.

3. În conformitate cu legea echilibrului Hardy-Weinberg, am aflat incidența alelelor în populație. Astfel, incidența alelelor competente *MTHFR* în populație este  $qA = \sqrt{15,49} = 0,3935$ . Modelul de moștenire este cel recesiv.

4. Admitem că riscul de dezvoltare a toxicității și ineficienței pentru purtătorii genotipului TT la subiecții cu AJI, în comparație cu cei purtători ai alelelor normale, este egal, cel puțin, cu 2,0 (Rg).

5. Puterea studiului trebuie să fie cel puțin 80%, iar nivelul stabilit de semnificație este egal cu 0,05 (eroarea tip I). Introducând datele în program, am obținut numărul de 204 de perechi caz-control.

Outcome ( <i>rezultat scontat</i> ):	Disease ( <i>maladia</i> ) AJI
Design ( <i>schema studiului</i> ):	Matched case-control ( <i>studiu caz-control</i> )
Hypothesis ( <i>ipoteza testată</i> ):	Gene only ( <i>studiul asocierii genelor cu maladia</i> )
Desired power ( <i>puterea studiului</i> ): 0.800000	
Significance ( <i>semnificația statistică</i> ): 0.050000, 2-sided	
Gene ( <i>gena</i> )	
Mode of inheritance ( <i>modelul moștenirii</i> ):	Recessive ( <i>recesiv</i> )
Allele frequency ( <i>frecvența alelei în populație</i> ): 0.3935	

Disease model ( <i>modelul de studiu</i> )		Summary parameters ( <i>parametrii</i> )		
*P0 0.000008		kP 0.000010		
Rg: 2.0000		(*indicates calculated value, <i>indică valoarea calculată</i> )		
Parameter ( <i>parametru</i> )	N	Null ( <i>nul</i> )	Full ( <i>deplin</i> )	Reduced ( <i>reduc</i> )
Gene ( <i>gena</i> )	204	$\beta G=0$	$\beta G$	----

Totodată, obiectivul studiului este determinarea prezenței variantelor polimorfe în gena *MTHFR* în AJI la pacienții care administrează MTX. Motivat de faptul că studiul răspândirii variantelor polimorfe în populația copiilor cu AJI din RM nu corespunde acestui obiectiv, s-a utilizat calculul eșantionului conform formulei standard pentru studiile de tip caz-control.

Probanzii din cercetare au întrunit următoarele criterii de includere:

- copii cu vârsta cuprinsă între 1 și 18 ani;
- diagnostic de artrită juvenilă idiopatică;
- pacienți cu AJI și tratament cu *metotrexat* pentru o perioadă de peste 6 luni;
- acceptul părinților sau a reprezentantului legal al pacientului (și a pacientului în cazul vârstei 14-18 ani prin formular de informare) de a efectua examinarea molecular-genetică și a participa în studiu.

Criteriile de excludere au fost:

- copii cu artrită juvenilă idiopatică care nu urmează tratament cu *metotrexat*;
- copii cu maladii hepatice acute și cronice;
- copii cu malformații congenitale de cord;
- subiecții care au refuzat participarea în studiu.

Toți subiecții au fost genotipați pentru *MTHFR*, printr-un set de analize, care a inclus hemoleucograma, VSH, analiza biochimică a sângelui, testele imunologice, electrocardiograma, ecocardiografia și ultrasonografia hepatică. Fibro Scan a fost efectuat la 50 de subiecți. Toți pacienții au fost evaluați prin intermediul scorului de severitate a intoleranței la *metotrexat*, indicelui DAS28, JADAS71 și ACRPedi 30. Designul studiului este reprezentat în figura 1.

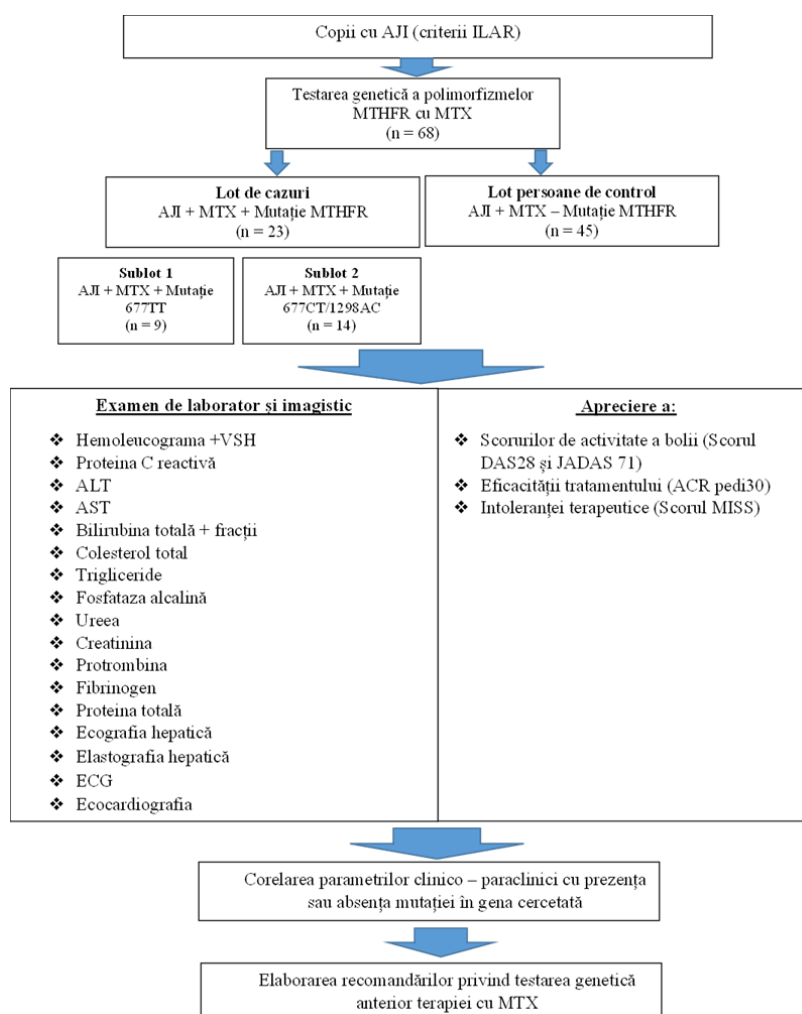


Figura 1. Designul studiului

**Considerații etice.** În cadrul studiului au fost luate în considerare normele internaționale ale eticii medicale cu referire la păstrarea confidențialității datelor participanților, stabilite de Declarația de la Helsinki. Rezultatele obținute au fost comunicate numai participantului respectiv, datele personale ale fiecărui subiect nefiind utilizate în alte scopuri.

## 1.2. Metodologia aplicată în decursul cercetării

### a) Metoda clinică

Protocolul de cercetare a fost utilizat pentru interviuarea ambelor loturi, atât de cazuri, cât și de control. Chestionarul a fost structurat pentru etapa cercetării, astfel încât să permită cumulara rezultatelor necesare și a inclus o serie de întrebări concrete. Acest chestionar a fost completat pentru fiecare pacient inclus în studiu. Metoda-standard de interviuare a permis colectarea datelor despre durata simptomelor și a bolii, evaluarea globală a bolii și a simptomelor, cum ar fi durerea, evaluarea reacțiilor adverse la tratament, iar o parte din informație a fost transferată din documentația medicală.

Scale de evaluare aplicate:

- 1) Indicele de activitate a bolii DAS28 care constă din evaluarea a 4 variabile: numărul de articulații dureroase și tumefiate, evaluarea globală a bolii și valoarea vitezei de sedimentare a hematiilor;
- 2) Indicele de activitate a bolii JADAS71 care a inclus următoarele patru măsurări: evaluarea globală de către medic a activității bolii și evaluarea globală a activității bolii de către pacient sau părinte, măsurată pe scara vizuală analogă de 0-10 cm unde 0 = foarte bine și 10 = foarte slab; viteza de sedimentare a hematiilor, normalizată la o scară de la 0 la 10 conform formulei  $VSH_n = (VSH-20)/10$ ;
- 3) Indicele de eficacitate a tratamentului ACR Pedi30 care se bazează pe variabilele principale cum sunt evaluarea globală de către medic a activității bolii (VAS de 0-10 cm), evaluarea părinților/pacientului a bunăstării generale (VAS de 0-10 cm), capacitatea funcțională, numărul de articulații cu artrită activă (definită ca efuziune articulară sau limitarea mișcării însoțită de hipertermie, durere sau sensibilitate), numărul de articulații cu amplitudine limitată de mișcare și VSH;
- 4) Scorul de severitate a intoleranței la *metotrexat* (MISS) constă din patru domenii: durere abdominală, greață, vărsături și simptome comportamentale și înregistrează simptome anticipatorii, după administrarea *metotrexatului*, precum și simptome asociative. Fiecare dintre cei 12 itemi ai scalei MISS este punctat pe o scară psihometrică (0 = fără simptome, 1 = simptome ușoare, 2 = simptome moderate; 3 = simptome severe) pentru un scor maxim de 36. Este stabilit drept intoleranță la *metotrexat* un scor de  $\geq 6$  puncte pe chestionarul MISS, incluzând cel puțin un simptom anticipator, asociativ sau comportamental.

### b) Metoda paraclinică:

Examenul paraclinic a inclus aprecierea markerilor inflamației - viteza de sedimentare a hematiilor (VSH), proteina C-reactivă, fibrinogenul, determinarea parametrilor biochimici- ALP, ALT, AST, Bilirubina totală, investigații efectuate în cadrul Laboratorului clinico-biochimic și imunologic al Institutului Mamei și Copilului.

Explorarea funcțională a ficatului a fost efectuată în cadrul departamentului Diagnostic Funcțional al IMSP Institutul Mamei și Copilului, conform cerințelor în vigoare de supraveghere a pacienților cu AJI (PCN – 7 Artrita Juvenilă Idiopatică, 2016).

Explorarea elastografică a ficatului prin FibroScan a fost efectuată la 50 de subiecți, fiind o metodă nedureroasă și care nu necesită o pregătire prealabilă, iar rezultatul este eliberat pe loc. Aparatul FibroScan Touch 502 Echosens, Paris, Franța, e bazat pe conceptul de elastografie tranzitorie. Valorile de referință a medianei elasticității hepatice au fost preluate din cadrul European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology.

Pentru completarea obiectivului 4, conform 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines, au fost efectuate electrocardiograma și ecocardiografia transtoracică cu Doppler tisular.

### ***c) Metoda molecular – genetică:***

Mostrele de sânge colectat de la subiecții din ambele loturi de studiu au fost păstrate în congelator la -20°C și anonimizate de către Laborator, conform formularului de trimitere din Anexa 2 la contractul prestări servicii nr.20112017 din 20.11.2017. După examinare, ADN-ul celulelor periferice și restul porțiunilor sanguine au fost lichidate, conform amendamentelor de rigoare din alineatul 5.8 la contractul prestări servicii nr.20112017 din 20.11.2017.

Toți cei 68 de subiecți cu AJI, cu MTX, au fost testați prin reacția de polimerizare în lanț. Analizorul utilizat CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, SUA. Metoda de apreciere este una calitativă cu specificitatea clinică de 100%

#### **Interpretarea rezultatului**

Echilibrul Hardy-Weinberg este un concept din genetică care descrie situația în care frecvențele alelelor și genotipurilor unei populații rămân constante de la o generație la alta în absența factorilor perturbatori. Acest echilibru este influențat de cinci condiții: încrucișarea aleatorie, absența selecției naturale, absența migrației, mărimea populației infinit de mare și absența variantelor polimorfe.

Am utilizat formula generală a echilibrului Hardy-Weinberg care este:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

unde:

- $p^2$  reprezintă frecvența genotipului homozigot dominant,
- $2pq$  reprezintă frecvența genotipului heterozigot,
- $q^2$  reprezintă frecvența genotipului homozigot recesiv,
- $p$  este frecvența alelei dominante în populație,
- $q$  este frecvența alelei recesive în populație.

Corectarea pentru asociere a genotipurilor s-a făcut folosind corecția lui Yates, care este o ajustare utilizată pentru a îmbunătăți exactitatea testelor de asociere între genotipuri și boli.

### ***d) Metodele statistice:***

Pentru analiza datelor s-au aplicat următoarele teste statistice: pentru investigații primare de asociere s-a folosit coeficientul de corelație Pearson, testul Chi-pătrat pentru a evalua dacă există o relație semnificativă între două variabile categorice, testul ANOVA (Analysis of Variance) pentru a compara media a trei sau mai multe grupuri pentru a determina dacă există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între ele, testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente în cazul datelor neparametrice, analiza ROC în evaluarea performanței modelelor de diagnostic pe baza diferitelor valori cut – off ale criteriului diagnostic.

## 2. REZULTATE

### 2.1. Caracteristica generală a loturilor de studiu

Studiul efectuat a inclus 68 de subiecți cu diagnosticul de artrită juvenilă idiopatică (AJI), care au fost diagnosticați conform criteriilor ILAR, administreză *metotrexat* (MTX) mai mult de 6 luni, și care au fost internați în cadrul secției de Reumatologie pediatrică a IMSP Institutul Mamei și Copilului. Dintre aceștia, 66,18% (45 de subiecți) au constituit lotul de control și 33,82% – lotul de studiu (23 de cazuri). Repartizarea pacienților în cele două loturi a fost efectuată după testarea genetică a polimorfismelor genei *MTHFR*.

Conform divizării pe sexe, în lotul de control au fost înregistrate 55,56 % (25 de cazuri) fetițe și 44,44 % (20 de cazuri) băieți. În lotul de cazuri, băieții au constituit 47,83 % (11 cazuri), iar fetițele – 52,17 % (12 cazuri). Atât în lotul de studiu, cât și în cel de control, a fost atestată o pondere a numărului de fetițe asupra numărului de băieți ( $\chi^2 = 0,070$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,791$ ). În ceea ce privește vârsta subiecților, ambele loturi incluse în studiu au prezentat un diapazon vădit a intervalului de vârstă cu extremele 24 – 215 luni.

S-a constatat, că în lotul de studiu au prevalat subiecții cu forma oligoarticulară, evoluție persistentă și constituiau 47,82% (11 cazuri) din numărul total al lotului, urmați de cei cu forma poliarticulară, seronegativă ce reprezentau 39,13% (9 subiecți) din numărul total al lotului de cazuri. În lotul de control însă formele clinice s-au oglindit cu valori de 48,9% (22 de cazuri) pentru cea poliarticulară, seronegativă, și cîte 22,22% (10 cazuri) pentru formele oligoarticulară cu evoluție persistentă și cea sistemică cu artrită activă ( $\chi^2 = 6,789$ ;  $gl = 4$ ;  $p = 0,147$ ).

La subiecții din ambele loturi a fost apreciată și durata administrării de *metotrexat*, unde, subiecții din lotul de studiu prezintă o durată medie de administrare de preparat de 38,78 luni (DS = 35,94; ÎI 95%: 20,9 – 56,65), iar în lotul de control media timpului de administrare a constituit 35,03 luni (DS = 39,65; ÎI 95%: 20,73 – 49,33).

### 2.2. Analiza prezenței variantelor polimorfe în gena *MTHFR* la copiii cu artrită juvenilă idiopatică

În cadrul cercetării, subiecții inițial au fost investigați din punct de vedere genetic pentru a determina polimorfismul prezent sau absent la copiii cu AJI care administreză *metotrexat* cel puțin 6 luni de zile. Astfel, în lotul de cazuri, 60,9% (14 subiecți) (ÎI 95%: 40 – 81) a fost notată varianta heterozigotă C/T iar la 39,1% (9 subiecți) (ÎI 95%: 19 – 60) - varianta polimorfă homozigotă a alelei patologice T (T/T) din locusul 677 a genei *MTHFR* ( $\chi^2 = 37,88$ ;  $gl = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Pentru locusul 1298, varianta heterozigotă A/C a fost determinată la 65,2% (15 subiecți) (ÎI 95%: 44,4 – 85), varianta homozigotă după alela normală A (A/A) – la 34,8% (8 subiecți) (ÎI 95%: 15 – 55,6), iar varianta homozigotă pentru alela patologică C (C/C) nu a fost determinată la nici un subiect pentru acest lot ( $\chi^2 = 4,03$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,133$ ).

Comparativ cu distribuția cantitativă în locii analizați, varianta polimorfă heterozigotă combinată a alelelor patologice T și C (C/T și A/C) din locii 677 și 1298 a fost determinată la 60,9% (14 subiecți), (ÎI 95%: 40 – 81).

Este necesar de menționat că variantele polimorfe heterozigote izolate ce includ alelele patologice T și C (C/T și A/C) din locii 677 și 1298 reprezintă o variantă de polimorfism al genei *MTHFR* care nu este luată în considerație în același context de exprimare a fenotipului clinic cercetat. Astfel observăm o distribuție similară la toți pacienții fără variantele polimorfe T/T, C/T și A/C, pentru lotul de control în cercetate.

Lotul de cazuri cu număr absolut de 23 de subiecți a fost divizat în două subloturi în dependență de varianta polimorfă, pentru a putea exprima fenotipul clinic al acestora în forma homozigotă T/T ( $\chi^2 = 20,29$ ;  $gl = 1$ ;  $p < 0,001$ ) sau heterozigotă C/T și A/C ( $\chi^2 = 34,49$ ;  $gl = 1$ ;  $p < 0,001$ ).

De notat, că analiza repartizării frecvenței genotipurilor după Hardy-Weinberg nu a determinat diferențe de la acest echilibru. Frecvența alelică la copiii cu AJI înrolați în cercetare a fost după cum urmează: C = 0,67, T = 0,33 și respectiv A = 0,71, C = 0,29.

### 2.3. Evaluarea clinică (JADAS – 71; indicelui ACR pedi 30; DAS28 și chestionarului MISS) în funcție de genotipurile MTHFR

S-a constatat că subiecții cu valori înalte ale activității bolii au constituit majoritatea în lotul de studiu. Dintre subiecții cu valori joase ale activității bolii conform JADAS – 71, 13,33% (6 cazuri) se aflau la monoterapia cu MTX, aceștia fiind homozigoți după alela normală. În cadrul monoterapiei cu MTX, JADAS – 71 a înregistrat valori înalte la 8,7% (2 subiecți) (ÎI 95%: 0 – 22,2) cu polimorfism heterozigot combinat.

Am stabilit că valoarea  $JADAS71 \geq 11$  este o valoare de prag care poate fi utilizată pentru identificarea cazurilor potențial cu variante polimorfe ale *MTHFR*. Se evidențiază sensibilitatea testării la nivelul de 95,7%, specificitatea fiind de 95,3% ( $\chi^2 = 53,62$ ;  $gl = 1$ ;  $p < 0,001$ ). Analiza ROC, în baza relației sensibilitate–specificitate, are valori relevante  $AUC=0,98$  (ÎI 95%: 0,97 – 1,00,  $p < 0,001$ ), fapt ce confirmă corectitudinea relației stabilite, figura 2. Prin urmare, se recomandă testarea polimorfismului genetic al genei *MTHFR* în cazul tratamentului cu MTX și persistenței gradului înalt al activității bolii la pacienții cu AJI

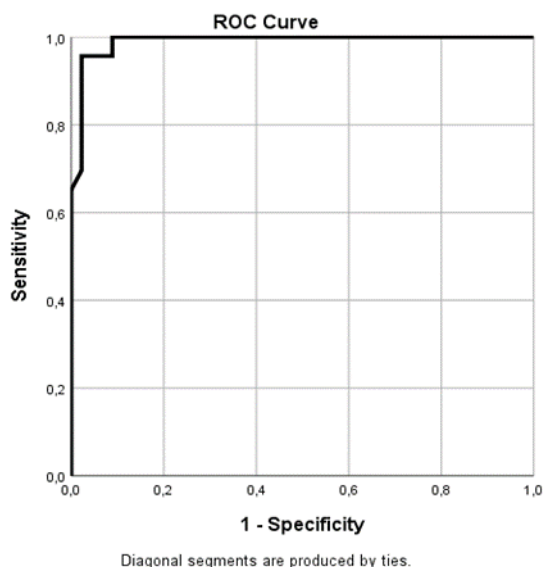


Figura 2. Curba ROC de evaluare diagnostică a JADAS 71

Efectul clinic apreciat prin scorul ACR Pedi 30 a fost marcat la 26 din 68 (38,23%) de subiecți care au administrat MTX. Printre subiecții la care s-a atins efectul clinic, doar 5 (7,35%) pacienți se aflau la monoterapie cu MTX. Ambii subiecți (14,3%; 95% ÎI: 0 – 35,7) din lotul de studiu la care s-a înregistrat ameliorare clinică administrau terapie combinată cu glucocorticoesteroizi. Șansa de a avea un rezultat mai mic de 30% la scorul ACRPedi este 12 ori mai mare pentru pacienții din lotul de studiu ( $OR = 12,0$ , ÎI 95%: 2,5 – 57,3).

Simultan, a fost evaluată activitatea clinică prin intermediul scorului DAS28. S-a constatat o valoare medie a scorului de 3,91 (95% ÎI: 3,51 – 4,32) pentru lotul de studiu, ceea ce corespunde activității moderate a bolii. Deasemenea, se observă decalajul mediei pentru lotul de control, acesta constituind 2,15 (95% ÎI: 1,83 – 2,46), care corespunde remisiunii bolii. Deasemenea, a fost studiată corelația dintre gradul de activitate a maladiei după DAS28 și durata bolii subiecților aflați la tratamentul cu MTX. Aceasta s-a dovedit a fi statistic ne semnificativă ( $r = 0,05$ ;  $p < 0,687$ ).

Analiza a stabilit că valoarea  $DAS28 \geq 3,245$  este o valoare de prag care poate fi folosită pentru identificarea cazurilor potențial cu variante polimorfe. Se evidențiază sensibilitatea testării la nivelul de 87,0%, specificitatea fiind de 93,3% ( $\chi^2 = 43,83$ ;  $p < 0,001$ ). Curba ROC, construită în bază relației sensibilitate–specificitate, are valori relevante  $AUC = 0,949$  (ÎI 95%: 0,89 - 1,00,  $p < 0,001$ ), fapt ce confirmă corectitudinea relației stabilite. Prin urmare, este recomandată testarea polimorfismului genetic al genei *MTHFR* în cazul continuării tratamentului cu MTX și persistenței gradului înalt al activității bolii la pacienții cu AJI, figura 3.

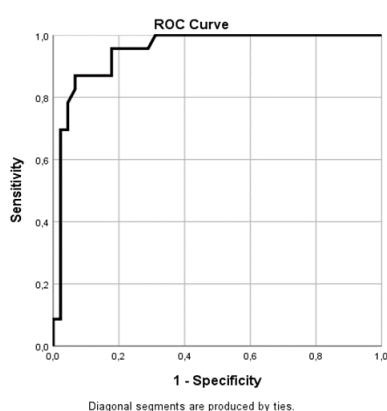


Figura 3. Curba ROC de evaluare diagnostică a DAS28

Prin intermediul testului Mann-Whitney U am confirmat ipoteza alternativă privind scorul MISS obținut pentru aprecierea intoleranței la MTX pentru pacienții cu polimorfism genetic. Curbele de distribuție poartă caracter diferit de locație și formă, figura 4.

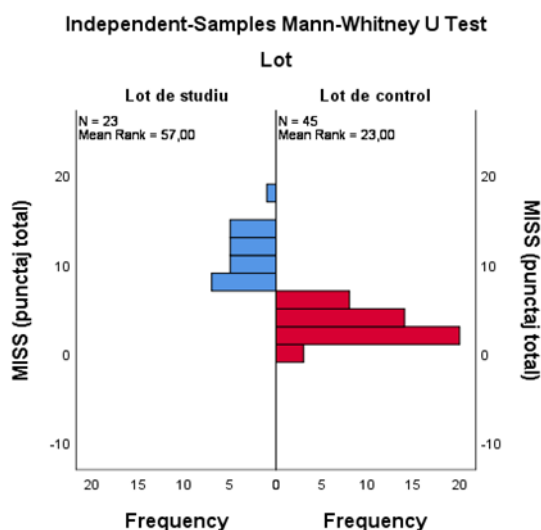


Figura 4. Distribuția scorului MISS pe loturi

În cazul aplicării indicilor și scorurilor pentru aprecierea eficacității clinice, o legătură liniară medie după Pearson au înregistrat-o subiecții lotului de studiu cu varianta polimorfă *MTHFR* combinată, în urma aprecierii valorii numerice a scorului JADAS – 71 și respectiv DAS28. Carența dovezii statistice și anume legăturii liniare puternice este cauzată de numărul mic de subiecți în subloturi, complexitatea testelor, precum și de variabilitatea în timp a indicilor și scorurilor pentru fiecare subiect din studiu.

#### 2.4. Evaluarea toxicității hepatice a MTX la pacienții cu AJI în funcție de variantele polimorfe în gena *MTHFR*

Am propus să apreciem valorile markerilor tradiționali care indică instalarea injuriei hepatice medicamentoase. Printre aceștia se enumeră valoarea bilirubinei totale, a alaninaminotransferazei, a aspartataminotransferazei și a fosfatazei alcaline. Pentru transaminazele hepatice se observă un decalaj substanțial al valorilor minime și maxime care practic se regăsesc sub tripla valoare acceptată de NASPHGAN care recomandă interpretarea ALT în baza limitelor superioare specifice sexului pacientului (22 U/L pentru fete și 26 U/L pentru băieți). Raportul după sexe a pacienților din lotul de studiu, care prezintă ALT peste valoarea normală se prezintă în figura 5.

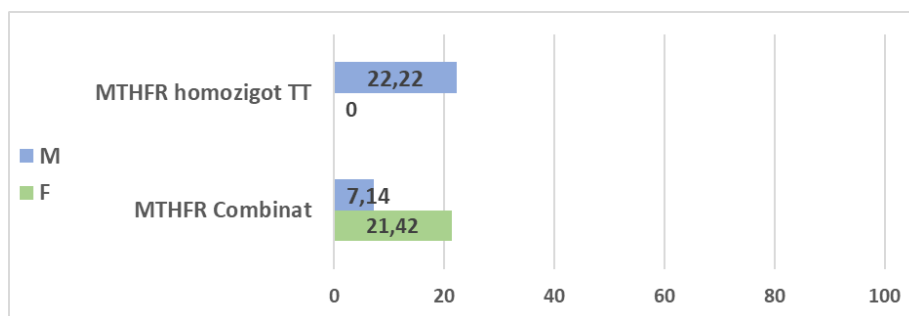


Figura 5. Repartizarea după sexe a pacienților în funcție de ALT (%)

Datele sunt aparent similare și pentru subiecții din lotul de control cu excepția valorii maxime pentru ALT, care a fost înregistrată la un singur pacient (1,47%) din cadrul studiului. Deci, pacienții cu AJI care administrează MTX și se prezintă cu polimorfism al genei *MTHFR* nu înregistrează valori nesemnificativ diferite ale markerilor tradiționali, în comparație cu cei fără polimorfism.

În continuare, au fost cercetate și apreciate simptomele anticipatorii, asociative și comportamentale a scorului MISS care în raport cu polimorfismul genetic prezintă relații semnificativ statistice. Cele din urmă sporesc puterea diagnostică a testării acestor variante polimorfe anterior inițierii terapiei cu MTX.

La capitolul durere abdominală după administrarea de MTX, în lotul de studiu 11 (47,8%; ÎI 95%: 26,9 - 70,0) respondenți au caracterizat-o de intensitate ușoară, iar 12 (52,2%; ÎI 95%: 30,0 – 73,1) – de intensitate moderată. În lotul de control, 16 (35,6%; ÎI 95%: 21,4 – 51,0) subiecți au manifestat dureri abdominale de intensitate ușoară, iar 29 (64,4%; ÎI 95%: 49,0 – 78,6) – nu au acuzat dureri abdominale.

Un alt simptom identificat după administrarea preparatului a fost greața (nausea), aceasta în lotul de bază fiind de intensitate ușoară la 9 (39,1%; ÎI 95%: 20,0 – 60,0) pacienți, și de intensitate moderată la 5 (21,7%; ÎI 95%: 5,3 – 41,4) pacienți. Nausea a fost absentă la 9 (39,1%;



Î 95%: 19,3 – 59,3) subiecți. Pentru lotul de control s-a înregistrat un număr de 7 (15,6%; Î 95%: 5,3 – 27,5) subiecți care au manifestat greață de intensitate ușoară. În total, în grupul martor, 38 (84,4%; Î 95%: 72,5 – 94,7) de pacienți nu au prezentat greață după medicație.

Voma la subiecții analizați în grupul de cazuri a fost apreciată în calitate de simptom de intensitate ușoară de către 6 (26,1%; Î 95%: 8,7 – 44,8) subiecți, și, respectiv de intensitate moderată de către 4 (17,4%; Î 95%: 3,7 – 33,3) subiecți. Nu au prezentat vomă după administrarea de MTX - 13 (56,5%; Î 95%: 37,0 – 77,8) respondenți. În lotul de control, a fost înregistrat 1 (2,2%; Î 95%: 0 – 7,7) pacient cu vomă de intensitate ușoară după MTX, respectiv, restul pacienților incluși în studiu nu prezintă acest simptom post-administrare.

În plus, pacienții pot dezvolta simptome anticipative, care apar înainte de aportul de MTX, și simptome asociative, atunci când pacienții se gândesc la medicament, precum și simptome comportamentale. Aceste efecte adverse apar ca răspuns la simptomele anterioare experimentate de pacienții tratați cu MTX și nu sunt adesea evidente clinic; prin urmare, acestea sunt adesea gestionate inadecvat. Deși suplimentarea cu acid folic în timpul tratamentului cu MTX poate reduce astfel de efecte, mulți pacienți întrerup tratamentul, lucru care afectează negativ controlul bolii și calitatea vieții.

S-a constatat că factorul predominant care direcționează intoleranța la MTX sunt factorii comportamentali, așa cum se arată în diagrama radar din figura 6.

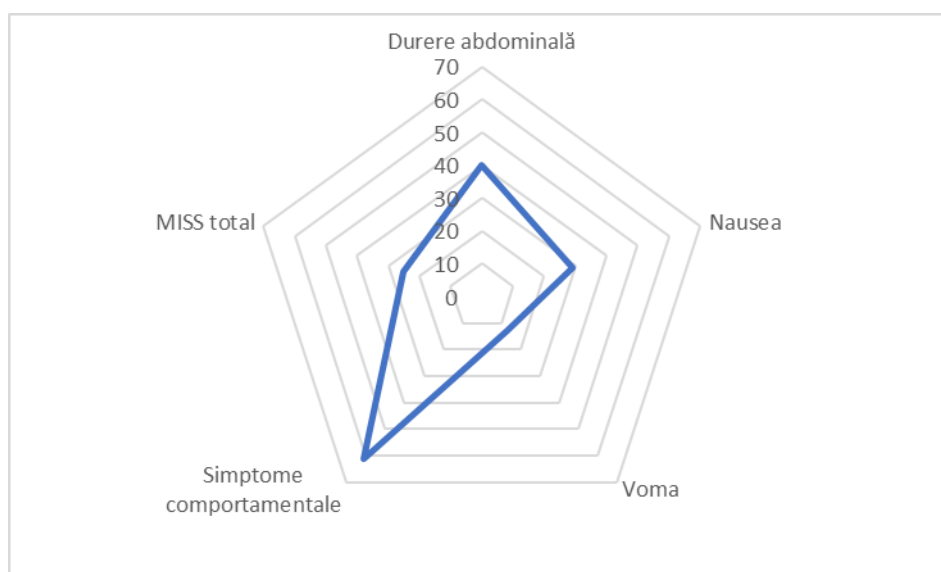


Figura 6. Diagrama radar a scorului MISS și componentele aferente.

În cadrul acestei cercetări am încercat să analizăm structura morfologică a ficatului ca urmare a evenimentelor de toxicitate și intoleranță medicamentoasă în AJI. Metodele imagistice non-invazive cu o specificitate și sensibilitate oportună pentru populația pediatrică în acest aspect este ecografia standard 2D și elastografia tranzitorie unidimensională (FibroScan). Ecografia 2D a ficatului nu a demonstrat diferențe semnificativ statistice privitor la dimensiunile și caracteristica structurală a imaginilor obținute.

Utilizând FibroScan am putut să presupunem cu o probabilitate înaltă, specifică fiecărui pacient în particular despre prezența afecțiunii subclinice în baza imaginilor și indicilor obținuți. Tablou elastografic de densitate sporită s-a profilat la 37 (54,41%;) de pacienți, preponderent în lotul de control (24 (53,3%; Î 95%: 39,1 – 68,3) vs. 13 (56,5%; Î 95%: 35,0 – 76,0);  $\chi^2= 0,447$ ;

p= 0,800. În studiu nu am obținut date despre o relație sensibilitate – specificitate care ar ajuta să depistăm prospectiv pacienții cu variante polimorfe în gena *MTHFR* prin intermediul elastografiei hepatice. Analiza ROC nu prezintă valori relevante AUC=0,471 (ÎI 95%: 0,29 – 0,64, p=0,739).

Deocamdată, s-a constatat o valoare medie a medianei elasticității hepatice de 5,34 (ÎI 95%: 4,84 – 5,84) pentru lotul de studiu, ceea ce reprezintă o valoare de 1,13 ori mai mare decât media elasticității pentru toate grupele de vârstă în populația pediatrică sănătoasă. Se notează lipsa discrepantei mediei în lotul de control, acesta constituind 5,38 (ÎI 95%: 5,01 – 5,75).

Semnificația clinico-diagnostică a leziunilor ecografice moderate și moderat-severe observate prin valorile maxime (7,8 kPa) ale medianei elasticității hepatice confirmă estimarea efectului cumulativ al preparatului și rata de răspuns la tratament, care a fost determinată individual la 9 (20%) pacienți din grupul de control dintre care 7 (15,55%) urmau monoterapia cu MTX.

Totodată, este important de a menționa diferențele care au fost înregistrate pentru pacienții investigați prin FibroScan, care au administrat MTX în monoterapie și acei care au urmat terapia combinată (F = 4,16; p = 0,022) (tabelul 1).

Tabelul 1. **Mediana elasticității hepatice la pacienții incluși în studiu în dependență de tratamentul administrat (kPa)**

	N	Media (DS)	ÎI 95%	Minimum - Maximum
<b>Monoterapie</b>	19	5,85 (0,99)	5,37 – 6,33	3,6 – 7,8
<b>Glucocorticosteroizi</b>	28	5,11 (0,93)	4,75 – 5,48	2,8 – 6,8
<b>Glucocorticosteroizi + Biologica</b>	3	4,70 (0,69)	2,97 – 6,42	3,9 – 5,1
<b>Total</b>	50	5,37 (1,01)	5,08 – 5,65	2,8 – 7,8

## 2.5. Evaluarea funcțională a toxicității cardiace a MTX în funcție de variantele polimorfe în gena *MTHFR*

După prelucrarea datelor electrocardiografice, aplicând testul Mann-Whitney U, am obținut valoarea 525,00 (p= 0,923) pentru frecvența contracțiilor cardiace, valoarea 665,50 (p= 0,055) pentru intervalul PQ, și valoarea 480,00 (p= 0,627), ceea ce confirmă ipoteza nulă privind importanța acestor indici pentru prognosticul toxicității la subiecții cu polimorfismul genei *MTHFR*. Nu au fost înregistrate diferențe de valori ai aceluiași indici și la nivel de subploturi.

În urma analizei datelor obținute prin ecocardiografia 2D putem relata, că dimensiunile și volumele pentru ventriculul stîng au fost nesemnificativ diferite între loturi. Am utilizat testul Mann-Whitney U care a confirmat ipoteza nulă privind utilitatea acestor indici în evaluarea cardiotoxicității la administrarea de MTX ( U= 451,00; p= 0,387 pentru DTD VS; U= 483,00; p= 0,652 pentru DTS VS; U= 460,50; p= 0,460 pentru VTD VS; U= 500,00; p= 0,820 pentru VTS VS; și respectiv 463,50; p= 0,482 pentru FE). Atît pentru lotul de studiu (69,33% (ÎI 95%: 67,72 – 70,94 %)), cît și pentru lotul de control (68,72% (ÎI 95%: 67,41 – 70,02 %)) valorile medii nu au deviat statistic, respectiv nici nu au întrunit condiția ghidului ESC 2022 pe Cardio-oncologie pentru un declin al FEVS  $\geq 10\%$  până la o valoare de  $< 53\%$ .

Au fost apreciați deasemenea parametrii sistolici ai ventriculului drept (TAPSE și S'). Testul Mann-Whitney U pentru eşantioane independente, cu un p= 0,731 pentru TAPSE și

respectiv  $p = 0,943$  pentru  $S'$ , demonstrează că acești doi parametri nu sunt semnificativ diferiți între subiecții cu variante polimorfe și cei fără ele.

Am utilizat Doppler tisular și pentru a aprecia parametrii diastolici ai ventriculului stîng ( $e'$  septal, lateral și medie,  $E$ ,  $E/e'$  medie). Indicele cu semnificație statistică mare a fost  $E/e'$  medie – 8,00 (ÎI 95%: 7,66 – 8,34).

Valorile PSAP pentru lotul de cazuri au fost exprimate prin media de 26 mmHg (ÎI 95%: 24,95 – 27,05), iar pentru lotul de control media ia valori de 25,31 mmHg (ÎI 95%: 24,59 – 26,03). Valoarea minimă PSAP a fost de 22 mmHg, iar cea maximă a atins pragul de 30 mmHg, cu o medie de 25,5 mmHg și o mediană de aceeași valoare.

## 2.6. Algoritmii pentru genotipare a MTHFR în AJI

În urma analizei datelor obținute în cercetare, au fost elaborate algoritmele de optimizare a conduitei diagnostice și recomandării terapeutice în artrită juvenilă idiopatică, figura 7 și figura 8.

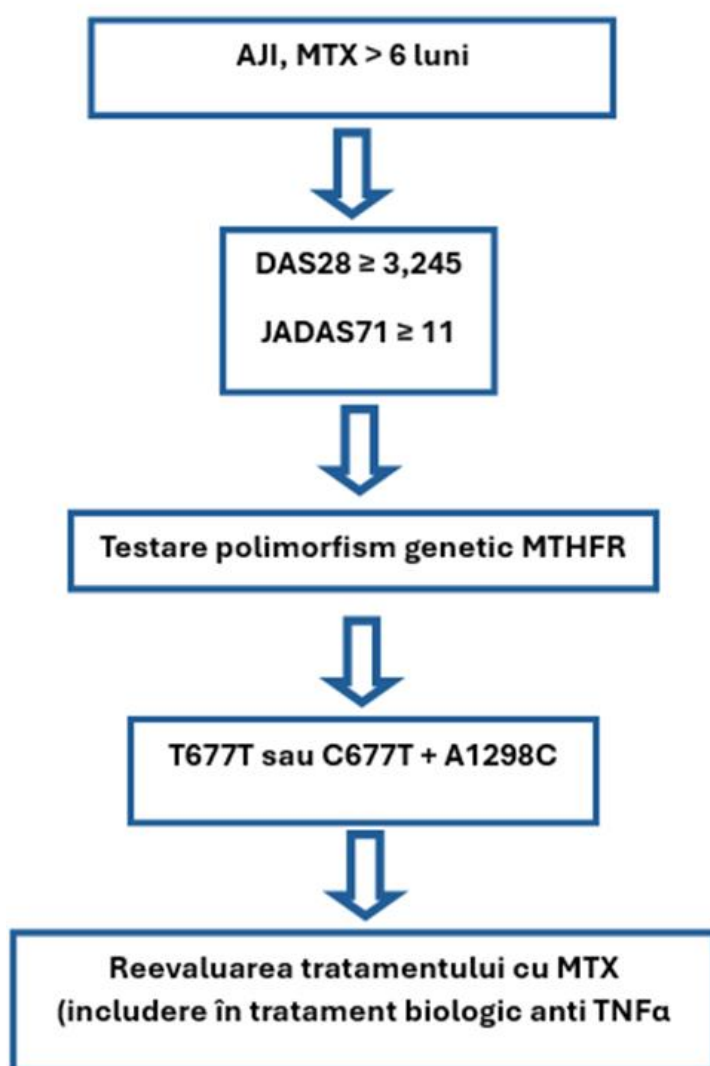


Figura 7. Algoritmii de diagnostic al ineficienței tratamentului cu MTX

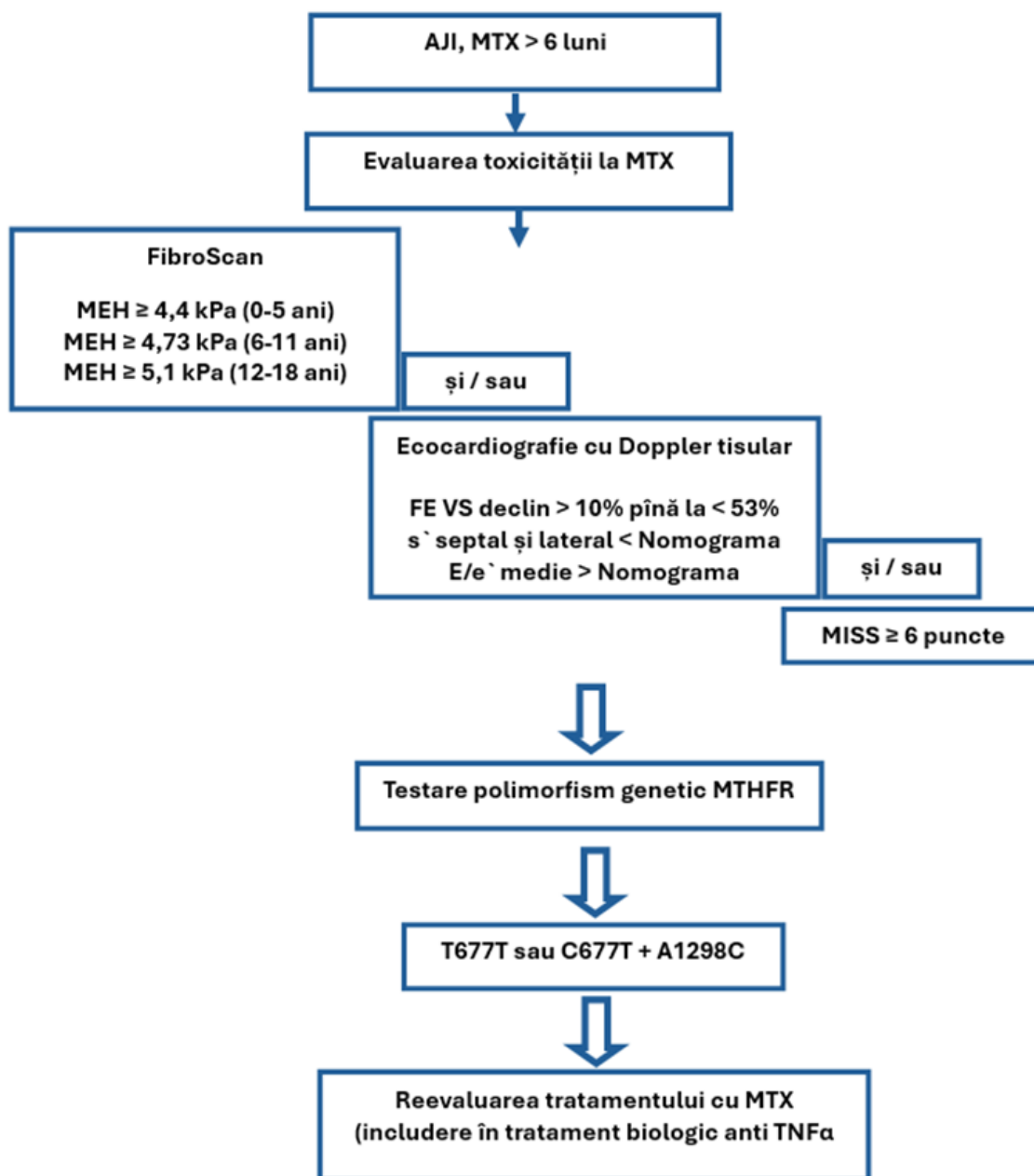


Figura 8. Algoritm de diagnostic al toxicității tratamentului cu MTX

## SINTEZA CAPITOLELOR

Actualmente, aspectele cheie ale medicinei personalizate se bazează pe analiza genetică și anume secvențierea ADN-ului unui individ pentru a identifica variații genetice care pot influența riscul de a dezvolta anumite afecțiuni medicale sau modul în care răspunde la tratament. Cunoașterea profilului genetic al unui individ poate ajuta la identificarea riscului său personal de a dezvolta anumite boli, permițând astfel intervenții preventive mai personalizate și programe de screening mai eficiente.

Utilizarea informațiilor genetice poate ajuta la diagnosticarea mai precisă a anumitor afecțiuni medicale și la diferențierea subtipurilor de boli care pot necesita abordări terapeutice diferite.

Printre subiecții cu artrită juvenilă idiopatică, atât în lotul experimental, cât și în lotul de control, a fost atestată o prevalență a numărului de fețițe asupra numărului de băieți. Aceste date se reflectă din punct de vedere statistic și în literatura de specialitate [20–22]. În același timp, există o relație bine determinată dintre aceste valori și forma de AJI manifestă, în particular forma oligoarticulară și poliarticulară seronegativă. În AJI forma seronegativă, teste de laborator specifice, cum ar fi factorul reumatoid și factorul antinuclear, sunt negative sau nu sunt prezente în cantități semnificative. Aceasta face ca diagnosticul să fie mai dificil și necesită o evaluare clinică și imagistică mai atentă. Prognosticul poate varia în funcție de severitatea simptomelor și de răspunsul la tratament. Unii copii pot avea o remisiune completă a bolii în timp, în timp ce alții pot experimenta simptome persistente sau complicații asociate.

Rezultatele noastre arată o prevalență a comorbidităților din partea sistemului gastro-intestinal, ceea ce este de importanță majoră pentru atingerea unui efect terapeutic scontat, dar și pentru generarea potențialului efect toxic medicamentos. Cât despre distribuția pe sexe, am demonstrat o pondere mai mare a celor mai frecvente comorbidități, inclusiv obezitatea, la copiii cu AJI de sex masculin.

Răspîndirea variantelor alelice pentru *MTHFR* în populații este destul de variată, cu prevalență la grupul mexican și italieni privind raportul de homozigoți [23]. Polimorfismul cu un singur nucleotid al acestei gene reduce termostabilitatea enzimei *MTHFR* datorită activității scăzute la 37° C sau mai mult. Activitatea enzimei *MTHFR* la subiecții homozigoți este cu 50-60% mai mică la 37° C și cu 65% mai mică la 46° C [23,24].

În studiul nostru am demonstrat omogenitatea distribuției alelice în relație cu echilibrul Hardy-Weinberg la subiecții cu AJI. La fel, am efectuat o analiză cantitativă a tipului de variante polimorfe pentru ambele loturi de studiu, care a constituit circa o treime din eșantion.

Am stabilit valori predictive înalte ale scorurilor de apreciere a activității bolii pentru subiecții din lotul de cazuri. Pentru scorul JADAS – 71 am înregistrat valori comparabile cu cele din literatura medicală [25]. Pentru scorul DAS 28 subiecții din lotul de studiu au demonstrat o activitate moderată a bolii pe când cei din lotul de control o activitate minimală. Considerăm că este foarte important a menționa faptul că activitatea bolii este un parametru dinamic și se măsoară la fiecare adresare sau spitalizare a pacientului cu AJI.

Rezultatele noastre pot fi comparabile cu alte studii privind scorul MISS, valoarea maximă a punctajului obținut la pacienții din lotul de cercetare depășind de trei ori valoarea maximă pentru lotul de control. Am demonstrat că este necesar de atras atenția la simptomele comportamentale ale pacientului pentru a înțelege una din cauzele răspunsului slab la tratament, rezultat din non – complianță.

Deoarece s-a demonstrat că atât cantitatea, cât și durata expunerii la MTX corelează cu toxicitatea, s-a sugerat că nivelurile serice de MTX ajută la prezicerea anumitor tipuri de toxicitate,

cum ar fi toxicitatea gastrointestinală și mielosupresia [26,27]. Cu toate acestea, deoarece MTX dispare din ser în 24 de ore de la administrare, nivelurile serice nu sunt suficient de precise pentru a prezice toxicitatea [28]. Prin urmare, au fost stabiliți pașii pentru monitorizarea toxicității MTX, în special pentru hepatotoxicitate, care nu implică măsurarea nivelurilor serice [27]. Mai mult, potențialul rar de afectare toxică gravă la copii și consecvența programului de monitorizare în timpul tranziției îngrijirii pediatrice la adulți au influențat decizia noului ghid ACR 2021 de a oferi o recomandare puternică pentru monitorizarea frecventă [29].

O altă metodă imagistică utilizată cu minim impact asupra țesutului a fost FibroScan. Cu ajutorul ei am reușit să determinăm valorile densității hepatice în locurile cele mai vulnerabile pentru inițierea schimbării morfologice ca urmare a efectului toxic generat de MTX.

Studiile, inclusiv cele naționale, care au fundamentat necesitatea și oportunitatea metodei pentru AJI, au demonstrat sensibilitate și specificitate veridică comparabilă cu biopsia hepatică nu doar la pacienții simptomatici [30–32].

Astfel, putem explica rezultatele proprii care denotă valori înalte a mediane elasticității hepatice pentru grupul de control comparativ cu grupul de bază, cumulara MTX poliglutamizat la care are loc mai intens prin efect antagonist față de acidul folic la nivel celular [33]. Mai mult decât atât, e necesar de menționat că valoarea reprezentativă este demonstrată la subiecții cu monoterapie cu MTX.

Ținând cont de necesitatea evaluării funcției cardiace la pacienții cu AJI, studiul nostru a utilizat metode neinvazive funcționale și imagistice tradiționale. ECG și ecocardiografia transtoracică cu Doppler tisular sunt incluse în lista investigațiilor obligatorii conform ghidurilor Societății Europene de Cardiologie, în special la pacienții care utilizează medicație de profil antitumoral [34–37]. Spre exemplu studiul lui Witczak et al. demonstrează necesitatea aplicării acestor metode cu compararea indicilor electrocardiografici și de Doppler tisular la pacienții cu diferite maladii ale țesutului conjunctiv [38]. Sigur că investigațiile expuse aduc o valoare informativă imensă pentru clinician, dar există și alte teste non-invazive imagistice care demonstrează funcția longitudinală și circulară a miocardului, fiind limitate la moment pentru populația pediatrică în contextul lipsei nomogramelor grupelor de vârstă [39].

### **Limitări**

Ca urmare a numărului foarte mic de subiecți care administrează MTX, este posibil ca aceștia să nu reprezinte seria de particularități clinice și paraclinice în AJI. Am utilizat scoruri și indici reprezentativi care de comun cu datele imagistice ale pacienților, sunt fără îndoială specifice fiecărui copil individual, astfel, ar predispușe la subiectivitate în ceea ce ține de populație. Simptomele fizice și comportamentale în condițiile de staționar sunt apreciate verbal de către copil sau părinții lui, care nu sunt mereu cuantificate și se pot schimba odată cu schimbarea activității bolii sau în dependență de gradul de complianță medic-pacient. Cu toate acestea, încrederea în scorurile care au la bază și parametri cantitativi, precum și evaluarea globală de către medic și pacient a stării sale, face ca aceste limitări să diminueze. Scorul MISS ca test de evaluare a toxicității gastrointestinale poate arăta rezultate obiective fiind folosit de rutină la fiecare spitalizare pentru follow-up a pacientului.

## CONCLUZII GENERALE

1. Variantele polimorfe ale *MTHFR* au fost identificate la peste o treime din subiecții înrolați. Acești pacienți pot fi caracterizați printr-un nivel sporit de heterozigozitate combinată ( $H_o = 0,43 / 0,44$ ) și homozigozitate izolată 0,48 observată pentru polimorfismele rs1801133 și rs1801131.
2. Studiul a demonstrat importanța scorurilor clinice (DAS 28 și JADAS 71) pentru estimarea riscului de prezență a variantelor polimorfe în gena *MTHFR*, confirmarea genetică a non-respondenților la terapia cu *metotrexat*. Prin relația de sensibilitate – specificitate, au fost determinate valorile prag pentru testarea polimorfismului *MTHFR* (DAS 28  $\geq 3,245$ ; JADAS 71  $\geq 11$ ). Indicele ACR Pedi 30 a demonstrat o rată de pînă la 40 % de atingere a efectului clinic la distanță de peste 6 luni de administrare de *metotrexat*, dintre care sub 10 % din subiecți se aflau la monoterapie cu acest preparat.
3. Chestionarul MISS a demonstrat intoleranța clinică la *metotrexat* pentru pacienții cu variante polimorfe în gena *MTHFR*, prin dezvoltarea simptomelor comportamentale de intensitate moderată (refuzul de administrare de *metotrexat*), ca urmare a constituirii durerilor abdominale (n=14).
4. Studiul markerilor biochimici tradiționali pentru injuria hepatică nu au demonstrat semnificație statistică de hepatotoxicitate la *metotrexat*. Examinarea prin elastografia hepatică tranzitorie unidimensională a evidențiat valori înalte ale medianei elasticității hepatice în lotul copiilor fără variante polimorfe în gena *MTHFR*, iar pacienții cu variante polimorfe în gena *MTHFR*, în terapie cu *metotrexat*, au înregistrat valori medii ale medianei elasticității hepatice de 1,13 ori mai mare de cît media elasticității la copiii sănătoși.
5. Studiul cardiotoxicității la copiii cu terapie cu *metotrexat* a evidențiat majorarea indicelui E/e' medie determinat prin ecocardiografia cu Doppler tisular, fapt care indică o probabilă disfuncție diastolică a ventriculului stîng în cadrul cardiotoxicității medicamentoase.
6. În studiu au fost determinate criteriile de evaluare a eficacității și toxicității la *metotrexat*: scor DAS 28, JADAS 71, MISS peste valoarea prag, prezența polimorfismului patologic pentru rs1801133 și rs1801131 la nivelul genei *MTHFR*, depistarea valorilor joase ale medianei elasticității hepatice (în monoterapia cu *metotrexat*) și a valorilor sporite ale indicilor sistolici și diastolici ai VS la Doppler tisular.

## RECOMANDĂRI PRACTICE

- 1) Se recomandă testarea genetică pentru *MTHFR* la atingerea/menținerea valorii prag identificate pentru scorurile DAS 28 și/sau JADAS 71.
- 2) Se recomandă utilizarea scorului de severitate a intoleranței la *metotrexat* ca metodă de predicție a efectului de complianță terapeutică ulterior inițierii tratamentului cu *metotrexat*.
- 3) Se recomandă utilizarea tehnicilor de elastografie hepatică și Doppler tisular pentru aprecierea afectării subclinice a organelor țintă ficat și cord în cadrul administrării *metotrexatului*.
- 4) Testarea variantelor polimorfe ale genei *MTHFR* este recomandată pentru pacienții la care eficacitatea clinică și/sau paraclinică estimată în cadrul administrării *metotrexatului*, nu a fost atinsă.



## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Revenco N, Cracea A. Artrita Juvenilă Idiopatică în practica medicului de familie. *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2020;2(84):79–84.
2. Beukelman T, Patkar NM, Saag KG, Tolleson-Rinehart S, Cron RQ, DeWitt EM, et al. 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: Initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2011 Apr 30;63(4):465–82. Available from: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.20460>
3. Huizinga T, Nigrovic P, Ruderman E, Schulze-Koops H. 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: Initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features. *Commentary*. Vol. 9, *International Journal of Advances in Rheumatology*. 2011.
4. Revenco N, Cracea A, Foca S, Bogonovschi L. Particularitățile afectării sistemului musculoscheletal și indicii paraclinici în artrita juvenilă idiopatică. *Buletin de Perinatologie*. 2016;1(69):76–83.
5. Ringold S, Weiss PF, Beukelman T, DeWitt EM, Ilowite NT, Kimura Y, et al. 2013 Update of the 2011 American College of Rheumatology Recommendations for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Modern Rheumatology Journal* [Internet]. 2014 Sep 22;(3):9. Available from: <http://mrj.ima-press.net/index.php/mrj/article/view/567>
6. Cracea A, Revenco N. Impactul diferitor scheme de tratament asupra indicilor clinici și a modificărilor radiologice în artrita juvenilă idiopatică. *Buletin de Perinatologie*. 2019;3(84):36–41.
7. Herlin M, Herlin T. Update on Genetic Susceptibility and Pathogenesis in Juvenile Idiopathic Arthritis. *EMJ Rheumatology*. 2014;
8. Pastore S, Stocco G, Favretto D, De Iudicibus S, Taddio A, D'Adamo P, et al. Genetic determinants for methotrexate response in juvenile idiopathic arthritis. Vol. 6, *Frontiers in Pharmacology*. 2015.
9. Kurzawski M, Malinowski D, Szarmach N, Nowak A, Goryniak A, Pawlik A, et al. ATIC missense variant affects response to methotrexate treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2016;17(18).
10. Bulatović M, Heijstek MW, Van Dijkhuizen EHP, Wulffraat NM, Pluijm SMF, De Jonge R. Prediction of clinical non-response to methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(9).
11. Hlistun V, Scurtu V, Boiciuc C, Ușurelu N, Sacară V. Dereglări la nivelul genelor ciclului folat și metioninic la femeii cu pierderi reproductive. *Buletin de Perinatologie* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 9];3(63):39–43. Available from: [https://www.mama-copilul.md/images/buletin-perinatologic/BP\\_2014/3\\_2014.pdf](https://www.mama-copilul.md/images/buletin-perinatologic/BP_2014/3_2014.pdf) <http://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/17765>
12. Moșin V, Hotineanu A, Visternicean E, Crețu A. Homocisteina și polimorfismele genei MTHFR la femeile cu avort spontan recurent. *Arta Medica* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jan 9];1(62):24–7. Available from: HOMOCISTEINA ȘI POLIMORFISMELE GENEI MTHFR LA FEMEILE CU AVORT SPONTAN RECURENT
13. Kozma K, Jurca C, Bembea M. Polimorfismul genei MTHFR (677 și 1298) la femeile cu avorturi spontane din județul Bihor. *Revista Medicală Română*. 2015;LXII(2):195–9.
14. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Rodriguez L, Miranda-Filloo JA, Fernandez-Gutierrez B, et al. A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2).
15. Бергер У, Ларионова В, Черкашин Д. Структурные полиморфизмы С677Т в гене 5, 10 метилентетрагидрофолатредуктазы и А2756G в гене метионинсинтазы у мужчин, страдающих ишемической болезнью сердца. *Вестник Российской Военно-Медицинской*

- Академии [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 9];4(48):98–104. Available from: <https://www.vmeda.org/wp-content/uploads/2016/pdf/98-104.pdf>
16. Mavros M, Chiriță V, Popescu O, Ferencz B. Polimorfismul genetic al genei MTHFR in schizofrenie. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2008;112(1).
  17. Bucerzan S, Anghel Popp R, Vlad RM, Lazea C, Nicolaescu R, Grigorescu-Sido P. Polimorfismul C677T si A1298C al genei MTHFR ca factor de risc matern pentru trisomia 21 (Studiu monocentric). *Rev Rom Med Lab*. 2017;25(1).
  18. Ueland PM. Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. In: *MTHFR Polymorphisms and Disease*. 2021.
  19. Scheuern A, Fischer N, McDonald J, Brunner HI, Haas JP, Hügler B. Mutations in the MTHFR gene are not associated with Methotrexate intolerance in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Rheumatology*. 2016;14(1).
  20. Hersh AO, Prahalad S. Genetics of Juvenile Idiopathic Arthritis. Vol. 43, *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2017.
  21. Beukelman T, Nigrovic PA. Juvenile idiopathic arthritis: An idea whose time has gone? Vol. 46, *Journal of Rheumatology*. 2019.
  22. Revenco N, Drușcă A, Scripnic E, Pletosu I, Foca S. Indicii de sugestivitate prognostică pentru evoluția artritei juvenile idiopatice. *Curierul Medical*. 2012;3(327):280–1.
  23. Liew SC, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. Vol. 58, *European Journal of Medical Genetics*. 2015.
  24. Matthews RG. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: Biochemistry and molecular biology. *European Journal of Pediatrics, Supplement*. 1998;157(2).
  25. Becker ML, Rosé CD, Cron RQ, Sherry DD, Bilker WB, Lautenbach E. Effectiveness and toxicity of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis: Comparison of 2 initial dosing regimens. *Journal of Rheumatology*. 2010;37(4).
  26. Kyvsgaard N, Mikkelsen TS, Thastum M, Christensen AE, Wehner PS, Nysom K, et al. Increased methotrexate intolerance in juvenile idiopathic arthritis compared to acute lymphoblastic leukaemia in children. *PLoS One*. 2019;14(7).
  27. Raaby L, Zachariae C, Østensen M, Heickendorff L, Thielsen P, Grønbaek H, et al. Methotrexate use and monitoring in patients with psoriasis: A consensus report based on a danish expert meeting. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(4).
  28. Ranganathan P, Eisen S, Yokoyama WM, McLeod HL. Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? Vol. 62, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003.
  29. Onel KB, Horton DB, Lovell DJ, Shenoi S, Cuello CA, Angeles-Han ST, et al. 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Recommendations for Nonpharmacologic Therapies, Medication Monitoring, Immunizations, and Imaging. *Arthritis and Rheumatology*. 2022;74(4).
  30. Tokuhara D, Cho Y, Shintaku H. Transient elastography-based liver stiffness age-dependently increases in children. *PLoS One*. 2016;11(11).
  31. Dietrich CF, Sirli R, Ferraioli G, Popescu A, Sporea I, Pienar C, et al. Current knowledge in ultrasound-based liver elastography of pediatric patients. Vol. 8, *Applied Sciences (Switzerland)*. 2018.
  32. Berliba E, Dumbrava V-T, Peltec A, Ghercavi D, Rusanovschi V. Metode neinvazive de evaluare a fibrozei hepatice. *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*. 2016;4(68):35–8.

33. Tuková J, Chládek J, Hroch M, Němcová D, Hoza J, Doležalová P. 677TT genotype is associated with elevated risk of methotrexate (MTX) toxicity in juvenile idiopathic arthritis: Treatment outcome, erythrocyte concentrations of MTX and folates, and MTHFR polymorphisms. *Journal of Rheumatology*. 2010;37(10).
34. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. Vol. 37, *European Heart Journal*. 2016.
35. Lyon AR, López-Fernández T, Couch LS, Asteggiano R, Aznar MC, Bergler-Klei J, et al. 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). *Eur Heart J*. 2022;43(41).
36. Koca B, Kasapçopur Ö, Bakari S, Çelik E, Calay Ö. QT dispersion and cardiac involvement in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32(10).
37. Koca B, Bakari S, Kasapçopur Ö, Çelik E, Öztunç F, Eroğlu AG, et al. P wave dispersion in juvenile idiopathic arthritis patients with diastolic dysfunction. *Iran J Pediatr*. 2012;22(4).
38. Witczak BN, Hetlevik SO, Sanner H, Barth Z, Schwartz T, Flatø B, et al. Effect on cardiac function of longstanding juvenile-onset mixed connective tissue disease: A controlled study. *Journal of Rheumatology*. 2019;46(7).
39. Lianza AC, Leal GN, Aikawa NE, Kozu KT, De Fátima MDR, Sawamura KSS, et al. Heart function in juvenile idiopathic arthritis patients: A biventricular two-dimensional speckle-tracking echocardiography study. *Mod Rheumatol*. 2022;32(6).

## LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE

a dlui **Vladimir Iacomi**, asistent universitar, **Departamentul Pediatrie**,  
realizate la teza de doctor în științe medicale,  
cu tema „**Impactul farmacogenomic al polimorfismului genei metilentetrahidrofolat  
reductazei în artrita juvenilă idiopatică**”, 322.01 Pediatrie și neonatologie,  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie ”Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

### LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE

#### ✓ **Monografii colective:**

1. Revenco N., Rotaru N., Crivceanschi M., **Iacomi V.** Criterii clinice și funcționale în evaluarea copilului cu artrită. În: Revenco N., ș.a. *Reumatologie Pediatrică*. Chișinău: Reclama, 2018, pp. 7-39 ISBN 978-9975-58-147-9

#### ✓ **Articole în reviste științifice peste hotare:**

##### ✓ **articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale**

2. Revenco N., Cracea A., Mazur-Nicorici L., Foca S., Eremciuc R., **Iacomi V.** Treatment with golimumab in juvenile idiopathic arthritis. In: *Arch. Balk. Med. Union*. 2022, 57(2):136-143. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2022.57.2.02>
3. Revenco N., Cracea A., Mazur-Nicorici L., Foca S., Eremciuc R., Gaidarji O., **Iacomi V.**, Bogonovschi L. The clinical and paraclinical efficacy of tocilizumab in juvenile idiopathic arthritis. In: *Arch. Balk. Med. Union*. 2021, 56(2):185-192. <https://doi.org/10.31688/ABMU.2021.56.2.07>

#### ✓ **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**

##### ✓ **articole în reviste de categoria B**

4. Revenco N., Cracea (Drușca) A., Foca S.-G., Eremciuc R., Gaidarji O., **Iacomi V.**, Bogonovschi L. Tratatamentul cu preparatul Tocilizumab la pacienții cu artrită juvenilă idiopatică – eficiența clinică și paraclinică. În: *Buletin de Perinatologie*, 2021, nr. 2(91), pp. 6-10. ISSN 1810-5289

#### • **Articole în lucrările conferințelor științifice:**

##### ✓ **naționale cu participare internațională**

5. **Iacomi V.**, Revenco N., Cracea A., Eremciuc R., Foca S., Bogonovschi. Determinantele genetice în aprecierea rezultatelor tratamentului în artrita juvenilă idiopatică. În: *Materialele simpozionului național cu participare internațională "Registrul maladiilor reumatice la copii: experiența Republicii Moldova"*. Chișinău, 2022, pp. 53-61. ISBN 978-9975-58-285-8

#### ✓ **Naționale**

6. **Iacomi V.**, Revenco N., Eremciuc R., Foca S., Cracea A., Gaidarji O., Monitorizarea terapiei cu *metotrexat* în artrita juvenilă idiopatică: variații farmacogenetice. În: *Materialele conferinței naționale "Managementul interdisciplinar al copilului"*, Ediția a 5-a. Chișinău, 2022, pp. 17-23. ISBN 978-9975-58-274-2

7. Revenco N., Cracea A., Foca S., Eremciuc R., **Iacomi V.**, Eficiența clinică și paraclinică a preparatului golimumab în artrita juvenilă idiopatică. În: *Materialele conferinței naționale "Managementul interdisciplinar al copilului"*, Ediția a 5-a, Chișinău, 2022, pp. 11-16. ISBN 978-9975-58-274-2

✓ **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**

✓ **Drept de autor**

8. Revenco N., **Iacomi V.** *Predicția eficacității tratamentului cu metotrexat în artrita juvenilă idiopatică la copii și adolescenți.* Nr. de înregistrare 2574, Seria OȘ Nr. adevărului: 7776 din 23.01.2024. În: Baze de date internaționale de proprietate intelectuală  
<http://www.db.agepi.md/opere/Details.aspx?id=7348712753145146865846455381&nr=7348712753145746867846455386>

✓ **Certificate de inovație**

9. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea polimorfismelor genetice T677T și C677T/A1298C ale metilentetrahidrofolat reductazei în artrita juvenilă idiopatică.* Certificat de inovator Nr. 5981 din 07.02.2023.
10. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea toxicității hepatice a metotrexatului în artrita juvenilă idiopatică prin FibroScan.* Certificat de inovator Nr. 5982 din 07.02.2023.
11. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea scorului de severitate a intoleranței la metotrexat în artrita juvenilă idiopatică.* Certificat de inovator Nr. 5985 din 09.02.2023.
12. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea polimorfismelor genetice T677T și C677T/A1298C ale metilentetrahidrofolat reductazei în artrita juvenilă idiopatică.* Certificat de inovator Nr. 508 din 07.02.2023.
13. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea toxicității hepatice a metotrexatului în artrita juvenilă idiopatică prin FibroScan.* Certificat de inovator Nr. 509 din 07.02.2023.
14. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea scorului de severitate a intoleranței la metotrexat în artrita juvenilă idiopatică.* Certificat de inovator Nr. 510 din 09.02.2023.

✓ **Acte de implementare**

15. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea polimorfismelor genetice T677T și C677T/A1298C ale metilentetrahidrofolat reductazei în artrita juvenilă idiopatică.* Act de implementare Nr. 12 din 07.02.2023.
16. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea polimorfismelor genetice T677T și C677T/A1298C ale metilentetrahidrofolat reductazei în artrita juvenilă idiopatică.* Act de implementare Nr. 508 din 07.02.2023.
17. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea toxicității hepatice a metotrexatului în artrita juvenilă idiopatică prin FibroScan.* Act de implementare Nr. 13 din 07.02.2023.
18. Revenco Ninel, **Iacomi Vladimir.** *Evaluarea toxicității hepatice a metotrexatului în artrita juvenilă idiopatică prin FibroScan.* Act de implementare Nr. 509 din 07.02.2023.

19. Revenco Ninel, **Iacomî Vladimir**. *Evaluarea scorului de severitate a intoleranței la metotrexat în artrita juvenilă idiopatică*. Act de implementare Nr. 15 din 09.02.2023.

20. Revenco Ninel, **Iacomî Vladimir**. *Evaluarea scorului de severitate a intoleranței la metotrexat în artrita juvenilă idiopatică*. Act de implementare Nr. 510 din 09.02.2023.

✓ **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**

✓ **Internaționale**

21. **Iacomî V.**, Revenco N., Variații genetice cu impact asupra răspunsului la *metotrexat* în AJI. A 7-a Ediție a Conferinței Naționale de Reumatologie Pediatrică cu Participare Internațională. Iași, România, 14-16 Septembrie 2023.

22. **Iacomî V.**, Revenco N., Tratatamentul Personalizat în Artrita Juvenilă Idiopatică. Conferința Națională cu Participare Internațională "Bienala Sibiu-Chișinău", Ediția a 3-a. Sibiu, România, 3-6 Octombrie 2019.

23. **Iacomî V.**, Revenco N., Screening the C677T polymorphism of the *MTHFR* gene in assessing disease severity and response to methotrexate treatment in children with juvenile idiopathic arthritis. 7th International Medical Congress for Students and Young Doctors *MedEspera*. Chișinău, 3-5 Mai 2018.

24. **Якоми В.**, Ревенко Н., Оценка эффективности лечения метотрексатом полиартикулярного варианта ЮИА у детей с мутацией C677T гена *MTHFR*. XXIII Конгресс Педиатров России с международным участием "Актуальные проблемы педиатрии". Москва, Российская Федерация, 5-7 Марта 2021.

25. **Iacomî V.**, Revenco N., Application of FibroScan in Juvenile Idiopathic Arthritis Patients. VI International Black Sea Coastline Countries Symposium. Giresun, Turkey, 28-30 April 2021.

✓ **naționale**

26. **Iacomî V.**, Revenco N., Aspecte noi de monitorizare a tratamentului cu *metotrexat* la pacienții cu AJI. Conferința Națională de Pediatrie Progrese în Tratatamentul Artritei Juvenile Idiopatică. Chișinău, 19 Decembrie 2020.

27. **Iacomî V.**, Revenco N., Monitorizarea terapiei cu *Metotrexat* în artrita juvenilă idiopatică: variații farmacogenetice. Conferința Națională cu Participare Internațională "Bienala Chișinău-Sibiu", Ediția a 5-a. Chișinău, 13-14 Mai 2022.

28. **Iacomî V.**, Eremciuc R., Gaidarji O., Cracea A., Revenco N. Importanța scorului de severitate a intoleranței la metotrexat în artrita juvenilă idiopatică. Conferința Științifică Anuală "Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță". Chișinău, 19-21 Octombrie 2022.

29. **Iacomî V.**, Revenco N., Prevalența intoleranței la *metotrexat* în diferite forme ale artritei juvenile idiopatică. Conferința Națională cu Participare Internațională "Bienala Chișinău-Sibiu", Ediția a VI-a. Chișinău, 26-27 Mai 2023.

30. **Iacomî V.**, Revenco N., Amploarea componentei genetice în tratamentul AJI. *Conferința Științifică Anuală "Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță"*. Chișinău, 18-20 Octombrie 2023.

**Participări cu postere la forumuri științifice:**

✓ **internaționale**

31. **Iacomî V.**, Revenco N., Methylenetetrahydrofolate reductase 677 nucleotide mutation is a predictive tool in methotrexate non-responsive JIA patients. *The 25th PReS Congress*. Lisbon, Portugal, 5-8 September 2018.
32. **Iacomî V.**, Bursacovschi D., Revenco N., Monitoring methotrexate-induced liver toxicity in juvenile idiopathic arthritis: new perspectives. *The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*. Chișinău, 24–26 Septembrie 2020.
33. **Iacomî V.**, Revenco N., Eremciuc R., Monitorizarea tratamentului AJI prin elastografie hepatică. *Conferința Națională cu Participare Internațională "Zilele Pediatrie Ieșene N.N.Trifan", Ediția XXXIV*. Iași, România, 15-18 iunie 2022.
34. **Iacomî V.**, Revenco N., Eremciuc R., Liver Stiffness in Low-Dose Methotrexate Use in JIA Patients. *The 28th PReS Congress*. Prague, Czech Republic, 20-23 September 2022.
35. **Iacomî V.**, Revenco N., Clinical results of methotrexate treatment in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Conferința Națională cu Participare Internațională "Zilele Pediatrie Ieșene N.N.Trifan", Editia XXXV*. Iași, România, 22-24 iunie 2023.
36. **Iacomî V.**, Revenco N., Clinical Outcome of Methotrexate Treatment in JIA. *The 29 PReS Congress*. Rotterdam, The Netherlands, 28 September–01 October 2023.