

Studii clinice și genotico-moleculare cu privire la boala mixtă a țesutului conjunctiv

F. Lupașcu-Volentir¹, L. Groppa¹, N. Barbacar², G. Lupașcu²

¹Catedra Medicină Internă nr.1, USMF „Nicolae Testemitanu”

²Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

Clinical and Genetic-Molecular Research Regarding Connective Tissue Disease

The article presents research on two related topics: 1) connective tissue disease, manifested in the articular modification and in the condition of the joints themselves, and in clinical observation, and, 2) polymorphism in DNA fragments (PCR analyses) of the genes controlling synthesis cytokines - IL 1, IL 6 and CTLA 4. Clusterian analyses revealed the degree of relationship between joint and extrajoint clinical manifestation and the gene mutations from a sample of mixed connective tissue disease patients. These were contrasted with a control sample of patients suffering from i.e., systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis and rheumatoid arthritis.

Key words: connective tissue disease.

Клинические и генотико-молекулярные исследования смешанной болезни соединительной ткани

В статье приводятся данные относительно клинических суставных и внесуставных проявлений при смешанной болезни соединительной ткани (СБСТ), а также полиморфизма фрагментов ДНК (ПЦР-анализ) генов, контролирующих синтез цитокинов ИЛ 1, ИЛ 6 и ЦТЛА-4. Кластерным анализом были выявлены специфические ассоциации клинических суставных и внесуставных проявлений с мутациями, изученных генов у больных СБСТ и контрольных групп – системная красная волчанка, системная склеродермия и ревматоидный артрит.

Ключевые слова: смешанная болезнь соединительной ткани, гены-цитокины.

Introducere

Boala mixtă a țesutului conjunctiv (BMȚC) a fost descrisă în 1972 de către medicul american G. Sharp fiind denumită *Mixed Connective Tissue Disease*. BMȚC prezintă o combinație de date clinice majore, similare cu cele din lupusul eritematos sistemic (LES), sclerodermia sistemică difuză (SSD), poliomiiozită (PM) și artrita reumatoidă (AR). Totodată, în serul bolnavilor de BMȚC se atestă modificări specifice, definite prin titruri înalte de anticorpi antinucleari circulanți, cu specificitate pentru antigenul ribonucleoproteină nucleară U₁-RNPn care participă activ în *processing*-ul ARN-ului.

Răspândirea BMȚC în lume este puțin studiată. Conform unor date, în Japonia BMȚC este prezentată de 2,7% din grupul bolilor difuze ale țesutului conjunctiv [1]. În Republica Moldova, la moment, BMȚC nu este cercetată, deși cazuri se atestă.

BMȚC apare predominant la femeile de vârstă medie (35-37 de ani), *sex ratio* femei/bărbați fiind de 10/1, dar se remarcă și la copiii de sex feminin (8-15 ani), afectând astfel calitatea vieții bolnavei, etapa precoce și etapa de capacitate maximă de muncă [2, 3]. Expunerea îndelungată la soare, frigul, factorii infecțioși (de ex., virusul Ebstein-Barr) și genetici, perturbările hormonale (nașterile, avorturile), stresurile, intervențiile chirurgicale sunt considerate factori de bază în apariția și în dezvoltarea BMȚC [4, 5]. Unii autori consideră că BMȚC nu este o boală distinctă, ci o asociere întâmplătoare de 2 sau de mai multe boli ale țesutului conjunctiv care, după o perioadă de timp dezvoltă o boală tipică – LES sau SSD. Din această cauză, uneori, BMȚC este denumită sindrom de interferență (*overlap syndrome*) [6].

Se cunoaște faptul că, citokinele intervin în multe procese clinice ca mediatori locali în condiții normale sau de boală. Ele

sunt implicate în inflamații acute sau cronice, favorizând mai multe procese, așa ca: stimularea fibrozei tisulare, inducerea destrucțiilor celulare, a angiogenezei și a reactanților fazei acute a inflamației. Sinteza citokinelor, de obicei, însoțește dezvoltarea răspunsului imun, a reacțiilor de inflamație și a proceselor de hematopoieză. În prezent, sunt cunoscute circa 30 de citokine, dintre care interleukinele (IL 1, IL 6 ș.a.) și antigenul *Cytotoxic T lymphocyte-associated 4* (CTLA 4) se consideră cu o importanță majoră în reglarea multor procese inflamatorii care însoțesc bolile reumatice [7, 8].

De menționat, că unele genotipuri ale IL 1 au fost asociate cu riscul de a dezvolta LES [9, 10]. De asemenea, la pacienții cu LES, nivelul de IL 6 corelează cu activitatea bolii, în special, la afectarea organică, dar nu și cu creșterea de IgG, anticorpilor ds-DNA și ai indicilor de fază acută. S-a constatat, că polimorfismul promotorului genei IL 6 - 174G/C constituie un factor de susceptibilitate genetică pentru LES și/sau manifestările sale. Totodată, polimorfismul câtorva loci, printre care al celui pentru complexul major de histocompatibilitate, receptorii imunoglobulinici și citokine este asociat cu implicarea genelor responsabile de LES. Datele clinice și experimentale au demonstrat că IL 6 are un rol important în patogenia LES-ului prin hiperactivitatea policlonală a celulelor B și prin producerea de anticorpi. Polimorfismul genei influențează nivelul de transcripție a IL 6 și la persoanele sănătoase [11].

Se cunoaște că gena CTLA 4 este importantă în reglarea activității celulelor T, polimorfismul CLTA 4 + 49 G prezentând un factor de risc pentru AR [12], iar prin activarea sau inactivarea limfocitelor T, gena CTLA 4 are un rol important în patogenia LES [7].

Sub aspect de diagnostic al maladiilor, inclusiv al celor reumatice, markerii ADN depășesc cu mult potențialul fermenților și al diverselor proteine. Aceasta este determinat

de faptul că markerii moleculari nu au o specificitate tisulară și pot fi detectați la orice etapă de dezvoltare a bolii. Tocmai din aceste considerente, markerii ADN au schimbat în mod radical posibilitățile de diagnostic și de determinare a riscului genetic pentru multe maladii umane, inclusiv cele reumatice [13]. În legătură cu cele menționate, scopul studiului nostru a fost elucidarea particularităților clinice ale bolnavelor de BMȚC în baza sindromului articular și stabilirea legăturilor asociative ale unor manifestări clinice, cu mutații pentru genele citokine.

Material și metode

Pacientele cu BMȚC au fost diagnosticate conform criteriilor Sharp [14]. În calitate de loturi de control au servit bolnavele cu LES, SSD și cu AR, conform criteriilor ARA 1982, 1980, 1987 [15, 16, 17]. Manifestările articulare, la debut și la stare, au fost cercetate amplu, conform unui program de examinare clinică complexă.

În calitate de criterii de clasificare a bolnavelor, în baza manifestărilor articulare, la debut și la stare au servit indicii (*artralgi* 1-11): 1 – în regiunea cervicală a coloanei vertebrale; 2 – scapulo-humerale; 3 – coate; 4 – radiocarpene; 5 – MCF; 6 – IFP palmare; 7 – coxofemorale; 8 – genunchilor; 9 – talocrurale; 10 – MTF; 11 – IFP plantare; *artrită* (12-20): 12 – scapulo-humerale; 13 – coate; 14 – radiocarpene; 15 – MCF; 16 – IFP palmare; 17 – genunchi; 18 – talocrurale; 19 – MTF; 20 – IFP plantare.

În realizarea reacției PCR, pentru gena **IL 1 s**-au utilizat următoarele perechi de primeri: IL 1 R1A – 5¹-GATCATTG-GATGTTGCATGG-3¹, IL 1 R1B – 5¹-GGACTTCAGGTA-AGACAGAG-3¹;

IL 6: IL 6 rev. 5¹-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3¹, IL 6 for 5¹-GGAGTCACAGACTCCACCT-3¹;

CTLA 4: CTLA 4.1 for. 5¹-GTTCAAACA-CATTTCAAAGCTTC-3¹, CTLA 4.1 rev. 5¹-AAATGACT-GCCCTTGACTGC-3¹, CTLA 4.2 for. 5¹-TAATGAATT-GGACTGGATTG-3¹, CTLA 4.2 rev. 5¹-TTACGAGA-AAGGAAGCCGTG-3¹.

Scanarea multidimensională (*multidimensional scaling*) a bolnavelor în baza indicilor clinici, prezintă repartiția acestora în spațiul *n*-metric tridimensional și s-a efectuat în baza matriței distanțelor euclidiene [18].

Analiza clusterienă a *k*-mediilor [19, 20] a pus în evidență asocierea manifestărilor clinice și a alelelor mutante (apreciate calitativ – absență/prezență: 0/1) prin repartiția acestora în 3 cluster, numărul cărora a fost stabilit în legătură cu existența în studiu a 3 gene. Datele au fost prelucrate statistic în pachetul de *soft STATISTICA 7.0*.

Rezultatele obținute

Analiza scanării multidimensionale a pus în evidență particularitățile de distribuție a pacientelor în baza manifestărilor articulare la debut și la stare. După cum rezultă din figurile 1-

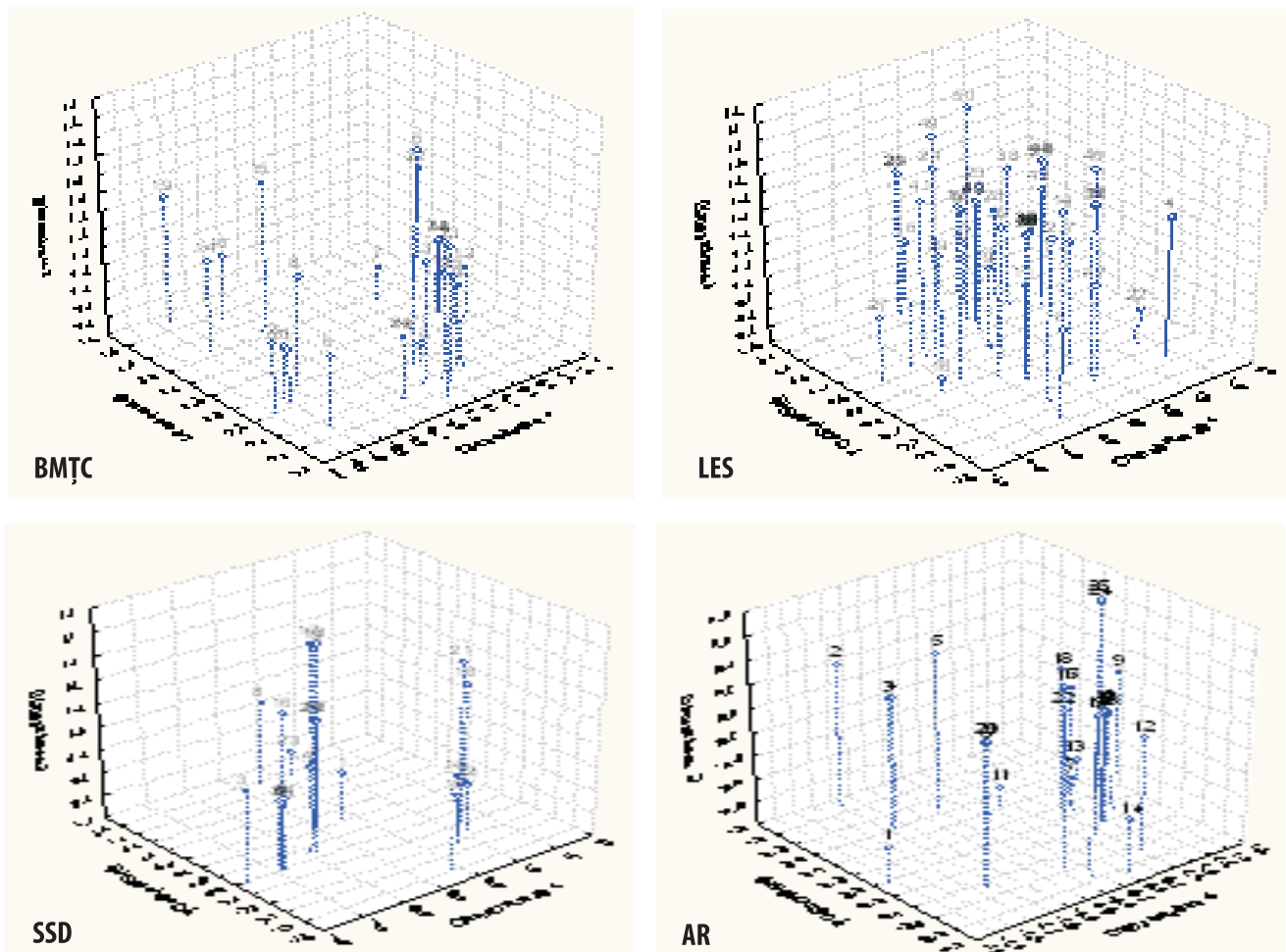


Fig. 1. Scanarea multiplă a bolnavelor în baza manifestărilor articulare la debut.

2, bolnavele examinate, reprezentate prin puncte/clustere de puncte, au o localizare diferită în spațiul tridimensional. Aceasta denotă că atât în cazul BMȚC, cât și al loturilor de control, s-a manifestat un polimorfism clinic pronunțat al manifestărilor articulare. Unele paciente au format clustere de puncte destul de apropiate sau au prezentat chiar puncte suprapuse, ceea ce denotă similitudinea de asociere a manifestărilor clinice la acestea; alte bolnave au avut o localizare spațială destul de diferită, astfel, relevându-se, deosebirea acestora de majoritatea lotului datorită asocierilor specifice de manifestări clinice. De exemplu, în lotul BMȚC, în cazul semnelor articulare la debut, bolnavele 4, 8, 16, 22 au prezentat o localizare distanțată de majoritatea lotului datorită deosebirii acestora prin manifestarea asociată a semnelor clinice: 4 – *artralгии* talocrurale, *artrite* talocrurale; 8 – *artralгии* scapulohumerale, coate, radiocarpene, MCF, IFP palmare, *artrite* MCF, IFP palmare, talocrurale; 16 – *artralгии* scapulohumerale, coate, radiocarpene, IFP palmare, ale genunchilor, talocrurale, IFP plantare, *artrite* radiocarpene, MCF, IFP palmare; 22 – *artralгии* – coate, IFP palmare, ale genunchilor, talocrurale, *artrite* MCF, talocrurale.

Prezentând aceleași raționamente pentru manifestările articulare la stare, constatăm un polimorfism clinic pronunțat la bolnavele cu BMȚC, precum și la cele din loturile de control, ceea ce relevă că maladiile difuze ale țesutului conjunctiv prezintă un sistem de afecțiuni, cu un specific pronunțat pentru fiecare bolnavă. Totodată, s-a stabilit că la stare bolnavele au prezentat o localizare diferită versus cea de la debut, ceea ce relevă că în evoluția bolii s-au produs schimbări în asocierile

de semne clinice, acestea reflectându-se asupra gradului de similitudine a bolnavelor.

Examinarea manifestărilor articulare în perioada de stare (fig. 3) a demonstrat că spre deosebire de loturile de control, în BMȚC mai rar se manifestă artralgiile coatelor (2) și ale talocruralelor (8), în schimb mult mai frecvent – artralgiile coxofemorale (32%), pentru LES, SSD și pentru AR indicele prezentând 16, 16 și 0% (6), respectiv.

Analiza PCR a pus în evidență locii polimorfi pentru genele ce controlează sinteza citokinelor IL 1, IL 6 și CTLA 4. Prin utilizarea primerilor indicați în *Material și metode*, s-a produs amplificarea fragmentelor de ADN în intervalul de lungime moleculară 350-500 de perechi de nucleotide (p.n.) pentru fragmentul de genă IL 1; 550-700 p.n. – pentru IL 6; și 375-450 p.n. – pentru CTLA 4. Spectrul electroforetic al fragmentelor de ADN pentru IL 6 este prezentat în figura 4.

Pentru genele aflate în studiu (IL 1, IL 6 și CTLA 4) s-au amplificat câte 2 benzi, iar prezența sau absența lor la diferiți bolnavi denotă faptul că locii detectați sunt polimorfi, ceea ce oferă oportunități informative înalte. Genotipurile fără mutații în locii analizați (NN) au fost reprezentate de banda de 500 p.n. pentru IL 1; banda de 700 p.n. – IL 6; și banda 450 p.n. – CTLA 4; genotipurile heterozigote (Na) – de 2 benzi la toate gene; genotipurile homozigote pentru alela mutantă (aa) – de banda de 350 p.n. pentru IL 1; banda de 550 p.n. – IL 6; și banda de 375 p.n. – CTLA 4.

După cum rezultă din datele tabelului 1, la bolnavele de BMȚC s-a constatat un nivel mutațional înalt pentru genele

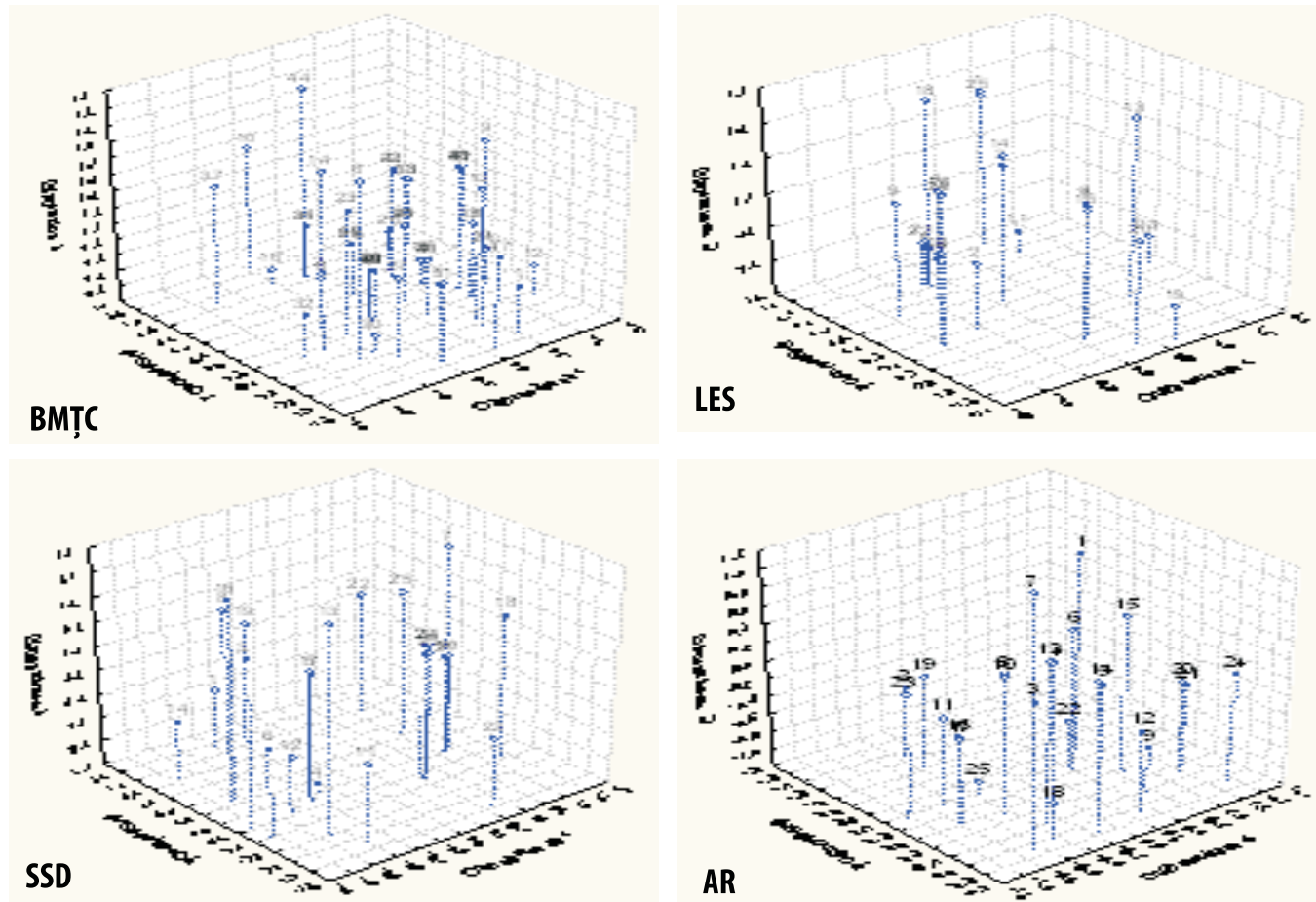


Fig. 2. Scanarea multiplă a bolnavelor în baza manifestărilor articulare la stare.

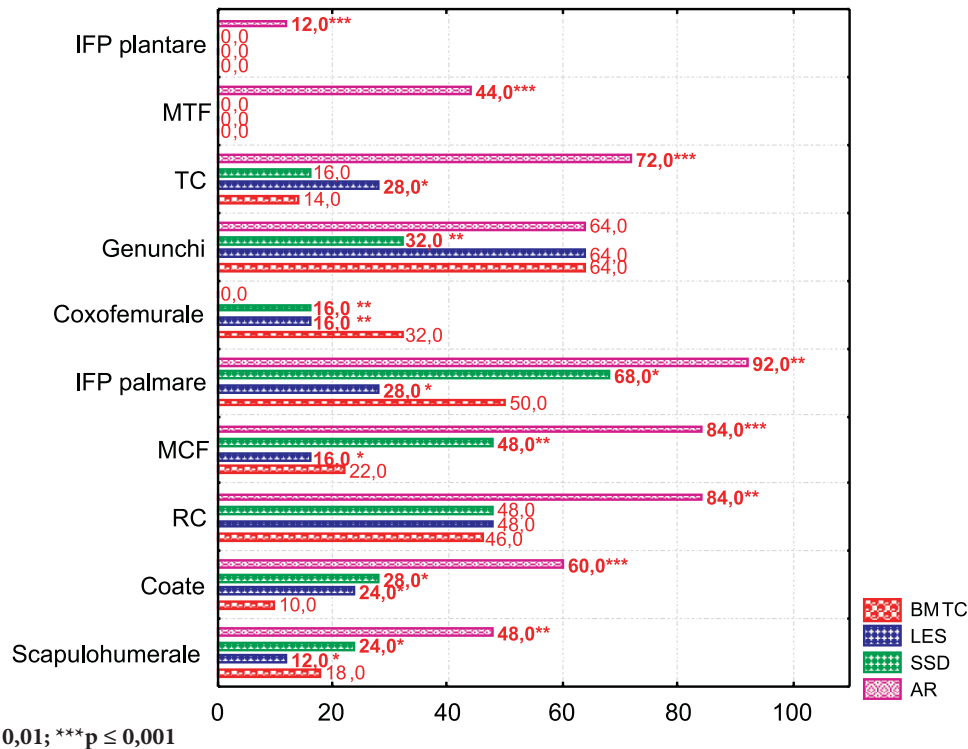


Fig. 3. Repartizarea topografică a sindromului articular la stare, %.

IL 1, IL 6 și CTLA 4. Astfel, în cazul BMȚC, LES, SSD și AR 91,9, 72,0, 57,9, 87,5%, respectiv, dintre paciente au prezentat genotipuri cu mutații în stare hetero- sau homozigotă, cel puțin pentru una dintre cele 3 gene studiate.

În scopul stabilirii legăturilor asociative ale genelor mutante pentru citokinele IL 1, IL 6 și CTLA 4 cu unele dintre manifestările clinice frecvente în MDȚC, în loturile de bolnave aflate în studiu, s-a efectuat analiza clusteriană a *k*-mediilor. Pentru aceasta, fiecare lot de bolnave testate molecular cu privire la polimorfismul ADN a fost repartizat în 3 clustere în baza posibilităților asociate cu genotipul pentru IL 1, IL 6 și CTLA 4 (tab. 2, 3, 4, 5).

Datele obținute relevă faptul că asocierile frecvență înaltă a mutațiilor IL 1, IL 6, CTLA 4 și frecvență înaltă a

manifestărilor clinice sunt diferite pentru loturile investigate. De exemplu, în cazul BMȚC incidența înaltă a alelelor mutante IL 1 și IL 6 a manifestat legături asociative cu incidența înaltă a artralgiilor radiocarpene la debut, *rash malar*, *livedo reticularis* (ș.a.), iar a alelei mutante CTLA 4 – cu artralgiile IFP, artrita în radiocarpene, artrita talocruralelor (ș.a.).

În cazul LES, artralgiile radiocarpene la debut, *rash malar*, artrita talocruralelor nu s-au asociat cu careva mutații; *livedo reticularis* și artralgiile IFP s-au asociat cu mutațiile pentru toate cele 3 gene; artrita în radiocarpene – nici cu o mutație. Ca și în cazul LES, pentru SSD și AR, de asemenea, s-au constatat tipuri de asocieri, deosebite de cele pentru BMȚC, ceea ce denotă că mutațiile detectate pentru obiectul de studiu – BMȚC sunt specifice, valabile pentru diagnosticul,

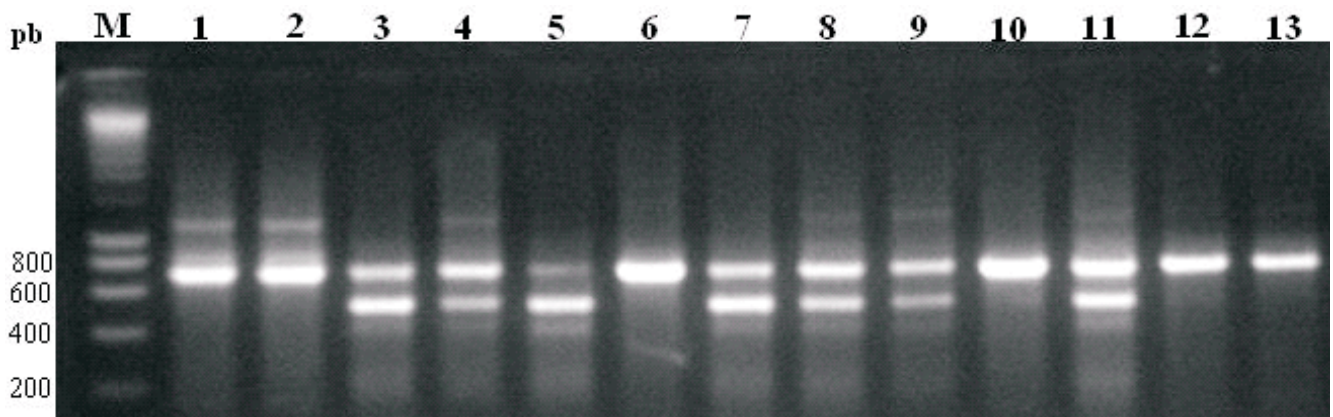


Fig. 4. Analiza electroforetică, în gel de agaroză cu concentrația de 2%, a fragmentelor amplificate cu ajutorul primerilor din structura genei IL 6.

M – markerii de lungime moleculară 800 pb, 600 pb, 400 pb, 200 pb (Eurogenetech).

1....12 – pacienți: 1 – AR; 2 – LES; 3 – AR; 4 – AR; 5 – AR; 6 – AR; 7 – AR; 8 – SSD; 9 – BMȚC; 10 – BMȚC; 11 – BMȚC; 12 – SSD; 13 – BMȚC.

Tabelul 1

Particularitățile de frecvență a genotipurilor în populațiile de bolnavi, %

Gena	BMȚC, n=37			Loturi de control								
				LES, n=25			SSD, n=19			AR, n=24		
	N/N	N/a	a/a	N/N	N/a	a/a	N/N	N/a	a/a	N/N	N/a	a/a
IL 1	27,0	70,3	2,7	32,0	60,0	8,0	63,2	36,8	0,0	25,0	37,5	37,5
IL 6	32,4	67,6	0,0	44,0	48,0	8,0	42,1	57,9	0,0	25,0	66,7	8,3
CTLA 4	70,3	16,2	13,5	64,0	36,0	0,0	79,0	21,1	0,0	62,5	37,5	0,0

Tabelul 2

Analiza clusteriană a asocierii frecvențelor manifestărilor clinice cu alelele mutante pentru IL 1, IL 6 și CTLA 4 la bolnavele cu BMȚC

Alelă mutantă/indice clinic
Clusterul 1
IL 1, IL 6 Artralгии radiocarpene la debut; rash malar, <i>livedo reticularis</i> ; disfagie, neuropatie a nervilor periferici, hipertensiune pulmonară, insuficiența valvei tricuspide, îngroșarea septului interventricular
Clusterul 2
Artralгии și artrite ale genunchilor la debut; artralгии radiocarpene și ale genunchilor la stare, Steinbröcker palmar și plantar I
Clusterul 3
CTLA 4 Artralгии în coate, RC, MCF, IFP și TC la stare; mialgii, oboseală musculară; edemul dur al falangelor, afectarea feței; Steinbröcker palmar și plantar II-IV; hipertrofia ventriculului stâng, pneumofibroză interstițială difuză, accentuarea desenului trabeculat pulmonar

Tabelul 3

Analiza clusteriană a asocierii de frecvență a manifestărilor clinice cu alelele mutante pentru IL 1, IL 6 și CTLA 4, la bolnavii LES

Alelă mutantă/indice clinic
Clusterul 1
Artralгии și artrită RC la debut-stare; mialgie, rash malar; Steinbröcker palmar și plantar I; insuficiența valvei tricuspide, hipertrofia ventriculului stâng, accentuarea desenului trabeculat pulmonar
Clusterul 2
IL 1, IL 6, CTLA 4 Artralгии și artrită ale genunchilor la debut-stare, artralгии MCF la stare, <i>livedo reticularis</i> , dispnee de efort moderat, lipsa afectării pulmonare
Clusterul 3
Artralгии IFP la debut, artrită în talocrurale la debut, artralгии în coate și IFP la stare Steinbröcker palmar și plantar II, III, IV

prognosticul evoluției bolii și riscul genetic și confirmă opiniile autorilor care susțin concepția existenței maladiei ca nosologie distinctă.

Concluzii

1. Prin analiza scanării multidimensionale (*multidimensional scaling*) s-a constatat existența unui polimorfism clinic pronunțat la bolnavele cu BMȚC, în ceea ce privește manifestările articulare la debut și la stare, relevându-se, astfel, asocierile specifice de semne clinice, practic, pentru fiecare bolnavă. În evoluția bolii au loc rearanjamente ale asocierilor de manifestări clinice articulare.

2. În BMȚC, spre deosebire de loturile de control – *lupus eritematos* sistemic, sclerodermie difuză de sistem și artrită reumatoidă, mai rar se manifestă artralgiile coatelor și ale talocruralelor, în schimb mult mai frecvent – artralgiile coxofemorale.

3. Au fost stabilite legăturile asociative *frecvență înaltă a mutațiilor* IL 1, IL 6 și CTLA 4 și *frecvență înaltă a manifestărilor clinice* în cadrul diferitelor organe/sisteme de organe.

4. Studiile clinice ale BMȚC pentru organele/sistemele de organe în evoluția bolii, testarea polimorfismului ADN pentru genele citokine IL 1, IL 6 și CTLA 4 și procesarea datelor prin tehnologii informaționale moderne pot servi ca bază de elaborare a sistem-suportului de decizii pentru diagnosticul BMȚC, ceea ce optimizează strategia de tratament a maladiei.

Bibliografie

- Hoffman R. W., Greidinger E. L. Mixed connective tissue disease. www.emedicine.com, Aug 2008.
- Mier R. J., Shishov M., Higgins G. C. et al. Pediatric-onset mixed connective tissue disease. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, August, 2005, Vol. 31, N. 3, p. 483-496.
- Мазуров В. И. Клиническая ревматология. Санкт-Петербург, ООО «Издательство Фолиант», 2001, 416 с.

Tabelul 4

**Analiza clusteriană a asocierii frecvențelor manifestărilor clinice
cu alelele mutante pentru IL 1, IL 6 și CTLA 4 la bolnavii SSD**

Alelă mutantă/indice clinic
Clusterul 1
IL 6 Artralgiile radiocarpene la debut; dispnee de efort moderat; disfagie; neuropatie periferică; Steinbröcker palmar și plantar I; hipertensiune pulmonară, insuficiența valvei tricuspide, îngroșarea septului interventricular, pneumofibroză interstițială difuză
Clusterul 2
Artralgiile radiocarpene, MCF și ale genunchilor la stare; simptom pungă, hipertrofia ventriculului stâng
Clusterul 3
IL 1 CTLA 4 Artragii și artrite ale genunchilor la debut, artralgiile radiocarpene, IFP palmare și talocrurale la debut, artralgiile în coate și MCF la stare, indurație tegumentară, Steinbröcker palmar și plantar II, III, IV; accentuarea desenului trabeculat pulmonar, lipsa afectării pulmonare

Tabelul 5

**Analiza clusteriană a asocierii frecvențelor manifestărilor clinice
cu alelele mutante pentru IL 1, IL 6 și CTLA 4 la bolnavele AR**

Alelă mutantă/indice clinic
Clusterul 1
CTLA 4 Artralgiile ale genunchilor și IFP la debut; artralgiile în coate și IFP la stare, Steinbröcker palmar și plantar III
Clusterul 2
Artrită în articulațiile radiocarpene, genunchilor, talocrurale la debut. Steinbrocker palmar-plantar I și IV; accentuarea desenului trabeculat pulmonar
Clusterul 3
IL 1 IL 6 Artralgiile radiocarpene la debut și la stare; artralgiile MCF și ale genunchilor la stare. Steinbrocker palmar și plantar II; insuficiența valvei tricuspide, hipertrofia ventriculului stâng, lipsa afectării pulmonare

- Iвашкин В. Т., Султанов В. К. Болезни суставов. Пропедевтика, дифференциальный диагноз, лечение. Москва, Издательство «Литтера», 2005, 552 с.
- Ionescu R. Esențialul în reumatologie, Editura medicală „Almatea” 2006, 426p.
- Black C., Isenberg D. A. Mixed Connective Tissue Disease goodbye to all that. *Br. J. Rheumatol.*, October, 1992, Vol. 31, N. 10, p. 695-700.
- Ahmed S., Ihara K., Kanemitsu S. et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology*, 2001, vol.40, p.662-667.
- Кадагидзе З. Г. Цитокины. *Практ. онколог.*, 2003, № 4, с. 131-139.
- Cooper G. S., Dooley M. A., Treadwell E. L. et al. Hormonal and reproductive risk factors for development of systemic lupus erythematosus: results of a population-based, case-control study. *Arthritis. Rheum.*, 2002, Vol. 46, p. 1830-1839.
- Parks C. G., Cooper G. S., Dooley M. A. et al. Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, Vol. 63, p. 91-94.
- Schotte H., Schlüter B., Rust S. et al. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 2001, Vol. 40, p. 393-400.
- Lei C., Dongqing Z., Yeqing S. et al. Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2005, Vol. 13, N. 7, p. 823-828.
- Барбакарь Н., Гроппа Л., Хаджави О. Генетические аспекты ревматоидного артрита. *Материалы конференции АŞ a RM „Probleme actuale ale geneticii, biotehnologiei și ameliorării”*. Chișinău, 2005, p. 66-77.
- Sharp G. C., Irvin W. S., Tan E. M. et al. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.*, 1972, Vol. 52, N. 2, p. 148-159 www.uptodate.com/patients/content/topic.do?topic Key = ~o G55S _ q6B_QV8G.
- Tan E. M., Cohen A. S., Fries J. F. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1982, N. 11, Vol. 25, p. 1271-1277.
- Groppa L., Moșneaga M., Zgârcu L. et al. Criteriile de diagnostic și clasificare a maladiilor reumatice. *Indicații metodice*, Chișinău, 1999, 31p.
- Arnett F. C., Edworthy S. M., Bloch D. A. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.*, 1988, Vol. 31, p. 315-324.
- Cheung K. W., So H. C. A multidimensional scaling framework for mobile location using time-of arrival measurements. *Signal. Processing*, 2005, Vol. 53, N. 2, p. 460-470.
- Tseng G. C. Penalized and weighted K-means for clustering with scattered objects and prior information in high-throughput biological data. *Bioinformatics*, 2007, Vol. 23, N. 17, p. 2247-2255.
- Huang Y., Tseng G. C., Yuan S. et al. A Data-Mining Scheme for Identifying Peptide Structural Motifs Responsible for Different MS/MS Fragmentation Intensity. *Proteome Res.*, 2008, Vol. 7, N. 01, p. 70-79.

Felicia Lupașcu-Volentir, doctorandă
Catedra Medicină Internă nr.1
Facultatea Rezidențiat și Secundariat Clinic
USMF „Nicolae Testemițanu”
Chișinău, str. Alecu Russo, 11
Tel.: 425963

Recepționat 03.02.09