

COMPETIȚIA INTERNĂ PENTRU GRANTURI DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ – EDIȚIA 2019

CERERE DE FINANȚARE PENTRU GRANTURI DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ

1. Date personale ale directorului propunerii de proiect:

Nume	Meliț
Prenume	Lorena-Elena
Data nașterii (ZZ/LL/AN)	28.02.1989
Anul absolvirii universității	2013
Locul de muncă în Universitate	
- Facultatea	Medicină
- Departamentul/Disciplină	Departamentul M4 / Disciplina Pediatrie I
- Titlul didactic/științific	Asistent Universitar / Doctorand
Activitate în alte instituții (dacă este cazul)	
- Spital/Clinică/Altă instituție	Spitalul Clinic Județean de Urgență Tg. Mureș / Clinica Pediatrie
- Titlul profesional (medic/farmacist rezident/specialist/primar – specialitatea)	Medic specialist - Pediatrie
- Telefon	0742984744
- E-mail	lory_chimista89@yahoo.com

2. Date referitoare la programul de doctorat: în derulare [X] absolvit []

Titlul tezei de doctorat	Corelații clinico-paraclinice, histologice și genetice în cazul gastritelor la copii
Forma de învățământ	Frecvență, Buget, Bursă
Anul în care a fost admis la doctorat	2015
Data prevăzută pentru susținerea tezei de doctorat / Data susținerii tezei de doctorat (luna/anul)	09 iulie 2019
Conducătorul de doctorat	
Nume, prenume	Mărginean Cristina Oana
Instituția	Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie Tg. Mureș

3. Titlul proiectului propus:

Evaluarea TLR2, TLR9 și NLRP3 în cazul gastritei determinate de infecția cu *Helicobacter pylori* la copii

4. Rezumatul proiectului propus:

Acest proiect își propune să evalueze rolul imunității înnăscute la copiii cu gastrită indusă de infecția cu *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) prin intermediul unui studiu prospectiv, caz-control, în care vom include aproximativ 150 de copii, între 1 și 18 ani, internați în Clinica Pediatrie I Tg. Mureș, în perioada ianuarie 2020

– decembrie 2020. Criteriile de includere constă în simptome gastro-intestinale sugestive pentru gastrită, vârsta între 1 și 18 ani; iar cele de excludere cuprind: antecedente personale patologice de anumite boli cronice care pot asocia gastrită, semne clinice sau paraclinice sugestive pentru patologie infecțioasă, vârsta sub 1 an, imposibilitatea efectuării endoscopiei digestive superioare sau a prelevării de biopsii de la nivelul mucoasei gastrice, alte tipuri de gastrite identificate la examenul histopatologic, refuzul părinților/apartinătorilor de a semna consimțământul informat pentru participare în studiu. Obiectivele acestui studiu sunt: identificarea factorilor de risc care pot duce la persistența infecției cu *H. pylori*, a polimorfismelor cu risc crescut în apariția gastritei induse de această infecție la copii, a simptomatologiei frecvent întâlnite în cazul acestor pacienți, precum și a grupelor de pacienți cu risc crescut de a prezenta rezistența la terapia de eradicare și în consecință de a dezvolta diferite neoplazii gastrice. Toți copiii incluși în studiu vor urma același protocol: anamneză și examen obiectiv; analize de laborator (hemoleucogramă, viteza de sedimentare a hematiilor, proteina C reactivă); endoscopie digestivă superioară cu prelevarea a 4 biopsii, 2 pentru examenul histopatologic și 2 pentru identificarea anumitor polimorfisme ale *TLR2*, *TLR9* și *NLRP3*. În funcție de rezultatul examenului histopatologic, vom obține: lotul de studiu – copii cu gastrită determinată de infecția cu *H. pylori*, și lotul martor – copii fără modificări patologice, urmând să identificăm corelațiile relevante între parametrii analizați.

5. Programul de doctorat:

5.1. Situația doctorandului în cadrul Programului de doctorat (dacă aplicantul este doctorand)

Menționez că am susținut toate referatele, precum și teza.

5.2. Stadiul tezei de doctorat (dacă aplicantul este doctorand)

Susținerea publică a tezei a avut loc în data de 09 iulie 2019, momentan fiind în evaluare la Consiliul Național de Atestare a Titlurilor, Diplomelor și Certificatelor Universitare (CNATDCU).

6. Prezentarea proiectului de cercetare:

6.1. Stadiul actual al cunoașterii în domeniu pe plan național și internațional, raportat la cele mai recente referințe din literatura de specialitate

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infectează mucoasa gastrică și este prezent la aproximativ 50% din populația globului, putând determina diferite patologii, precum gastrită cronică, ulcer peptic, cancer gastric, limfoame ale țesutului limfoid gastric și adenocarcinoame gastrice. Infecția este în general dobândită în copilărie, iar în lipsa tratamentului aceasta se cronicizează. Atât imunitatea înăscută, cât și cea dobândită contribuie la controlarea infecțiilor (1). Celulele epiteliale de la nivelul mucoasei gastrice sunt considerate prima linie a imunității înăscute împotriva infecției cu *H. pylori* (2). Receptorii de tip „toll-like” (TLRs) fac parte din familia receptorilor de recunoaștere ai patogenilor, iar activarea căilor de semnal ale acestora duc la inducerea de citokine proinflamatorii, chemokine, molecule prezentatoare de antigen și molecule co-stimulatoare (3). Prezența anumitor receptori la nivelul mucoasei gastrice, precum și a anumitor polimorfisme ale acestora, pot duce fie la promovarea, fie la supresia infecției cu *H. pylori* (3). TLR2 acționează ca barieră primară împotriva acestei infecții prin recunoașterea lipopolizaharidului din componența acestuia (4). În același timp, acest receptor este unul din cei mai bine caracterizați, fiind implicat și în recunoașterea altor componente bacteriene, precum lipoproteinele sau peptidoglicanii (3). În plus, a fost demonstrat că expresia TLR2 este crescută în biopsiile gastrice ale pacienților depistați cu această infecție (5). TLR9 este un receptor transmembranar de tip endosom care recunoaște ADN-ul patogenilor sau al celulelor afectate (3). Acest receptor este cel mai special deoarece poate induce atât semnal proinflamator, cât și anti-inflamator în funcție de mediul gastric rezultând astfel un rol dihotom al acestuia în prezența *H. pylori* (3,6). Alți receptori ai imunității înăscute sunt „nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors”

(NLRs), care dețin un rol esențial în declanșarea răspunsurilor imune prezentând sensibilitate citosolică la componentele virale și bacteriene (7). NLRP3 este unul din cei mai puternici inflamazomi care joacă un rol esențial în inducerea inflamației prin recrutarea proteinelor adaptoare, și subsecvent declanșează caspaza 1, cisteina specifică și proteaza aspartat (8). Evaluarea legăturii dintre aceste molecule și infecția cu *H. pylori* nu a fost studiată până în prezent în cazul copiilor cu gastrită indusă de infecția cu *H. pylori*.

1. Smith SM. Role of Toll-like receptors in Helicobacter pylori infection and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014;5(3):133-146.
2. Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, et al. Intact gram-negative Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and Helicobacter hepaticus bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun.* 2004;72(11):6446-6454.
3. Meliș LE, Mărginean CO, Mărginean CD, Mărginean MO. The Relationship between Toll-like Receptors and Helicobacter pylori-Related Gastropathies: Still a Controversial Topic. *J Immunol Res.* 2019; doi:10.1155/2019/8197048.
4. Castaño-Rodríguez N, Kaakoush NO, Pardo AL, et al. Genetic polymorphisms in the Toll-like receptor signalling pathway in Helicobacter pylori infection and related gastric cancer. *Hum Immunol.* 2014;75(8):808-815.
5. Uno K, Kato K, Atsumi T, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by Helicobacter pylori cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(5):G1004-1012.
6. Varga MG, Peek RM. DNA Transfer and Toll-like Receptor Modulation by Helicobacter pylori. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;400:169-193.
7. Kim DJ, Park JH, Franchi L, et al. The Cag Pathogenicity Island and Cooperative Interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 Regulate IL-1 β Production in Helicobacter pylori-Infected Dendritic Cells. *Eur J Immunol.* 2013;43(10): 2650–2658.
8. Yang CS, Shin DM, Jo EK. The Role of NLR-related Protein 3 inflammasome in host defense and inflammatory diseases. *Int Neurol J.* 2012;16(1):2–12.

6.2. Obiectivele și activitățile de cercetare din cadrul programului

An	Obiective	Activități asociate*	Livrabile asociate**
2020	1. Includerea pacienților în studiu, analiza polimorfismelor TLR2 rs3804099 și rs3804100, TLR9 rs352140, precum și NLRP3 rs10754558.	1. Elaborarea și aplicarea fișei de consimțământ informat	Fișa de consimțământ informat pentru 150 pacienți
		2. Obținerea avizului comisiei de etică a UMFST Tg. Mureș	Avizul comisiei de etică
		3. Recoltarea probelor de sânge	Analize de laborator pentru 150 pacienți
		4. Efectuarea endoscopiei digestive superioare cu biopsii gastrice	4 biopsii gastrice: 2 antrale și 2 corporeale; buletin rezultat examen histopatologic- pentru 150 pacienți
		5. Efectuarea testelor genetice	Genotipul pentru fiecare dintre polimorfismele investigate

	6. Determinarea corelațiilor între genotip, simptomatologie, analize de laborator și examen histopatologic	Fișa cuprinzând următoarele informații care reies în urma cercetării - Frecvența genotipului la pacienții cu gastrită determinată de infecția cu <i>H. pylori</i> , factorii care pot crește susceptibilitatea la infecție, simptomele frecvent asociate cu prezența infecției
2. Identificarea corelațiilor relevante între datele obținute	1. Identificarea factorilor de risc asociați cu prezența gastritei determinate de infecția cu <i>H. pylori</i> și a unor markeri prognostici pe baza testelor genetice	Lista factorilor de risc și a markerilor prognostici
	2. Diseminarea rezultatelor obținute	1 comunicare orală, 1 articol ISI cu factor de impact și 1 articol BDI/B+

*Activitățile de cercetare, corespunzătoare obiectivelor științifice, delimitează fazele/etapele atingerii obiectivului. Fiecărui obiectiv îi pot corespunde mai multe activități.

**Se vor menționa livrabilele asociate fiecărei activități din cadrul proiectului.

6.3. Descrierea propriu-zisă a proiectului și contribuțiile potențiale ale proiectului raportate la realizările în domeniu

Receptorii de recunoaștere ai patogenilor joacă un rol esențial în supresia sau promovarea diferitelor infecții. Astfel că în funcție de prezența unor diferite tipuri de polimorfisme, mai mult sau mai puțin reactive, există pacienți cu o anumită susceptibilitate genetică de a dezvolta anumite infecții, sau chiar anumite patologii. Dată fiind strânsa legătură între infecția cu *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) și neoplaziile gastrice, clasificate pe locul trei ca și cauză de deces datorită cancerului în lume (1), identificarea factorilor care pot influența dobândirea infecției și cronicizarea acesteia la vârstele pediatrice ar putea scădea incidența cancerului gastric în perioada de adult. Diferitele polimorfisme ale toll-like receptorului 2 (TLR2) au fost asociate cu susceptibilitatea de a dezvolta cancer gastric la diferite etnii, printre care japonezi, chinezi sau caucazieni (3). Astfel, ambele polimorfisme *TLR2* rs3804099 și rs3804100 au fost raportate a fi asociate cu un risc crescut de cancer gastric legat de infecția cu *H. pylori* (4,5). În ciuda rolului dihotom al *TLR9*, studiile recente au subliniat nivele crescute ale acestui receptor la nivelul celulelor epiteliale gastrice ale persoanelor din zone cu risc crescut de cancer gastric în comparație cu cele care provin din zone cu incidență scăzută a acestei patologii (6). Mai mult de atât, a fost dovedit că *H. pylori* poate induce secreția de interleukină 1 β la nivelul celulelor imunității înăscute, simbolizând activitatea inflamazomului *NLRP3* (7). Astfel, polimorfismul *NLRP3* rs10754558 a fost asociat cu un risc crescut de cancer gastric (8).

Obiectivele acestui studiu constau în identificarea factorilor de risc care pot duce la persistența infecției cu *H. pylori*, a polimorfismelor cu risc crescut în apariția gastritei induse de această infecție la copii, a simptomatologiei frecvent întâlnite în cazul acestor pacienți, precum și a grupelor de pacienți cu risc crescut de a prezenta rezistența la terapia de eradicare și în consecință de a dezvolta diferite neoplazii gastrice.

Prezentul proiect presupune efectuarea unui studiu prospectiv, de tip caz-control, cu scopul de a evalua rolul imunității înăscute la copiii cu gastrită indusă de infecția cu *H. pylori*, prin identificarea legăturii dintre anumiți receptori și prezența acestei bacterii la nivelul mucoasei gastrice. Astfel, în acest studiu vom include aproximativ 150 de copii, cu vârsta între 1 și 18 ani, internați în Clinica Pediatrie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Tg. Mureș, în perioada ianuarie 2020 – decembrie 2020. Criteriile de includere în acest studiu constă în simptome gastro-intestinale sugestive pentru gastrită (ex. grețuri, vărsături, dureri abdominale difuze, epigastralgie, inapetență, scădere ponderală, hematemă, melenă, etc.), vârsta între 1 și 18 ani (datorită caracteristicilor endoscopului din dotare). Criteriile de excludere cuprind: antecedente personale patologice de anumite boli cronice care pot asocia gastrită (ex. boli inflamatorii intestinale, boli autoimune, etc.), semne clinice sau paraclinice sugestive pentru patologie infecțioasă (febră, reactanți de fază acută crescuți – proteina C-reactivă, viteza de sedimentare a hematiilor), vârsta sub 1 an, imposibilitatea efectuării endoscopiei digestive superioare sau a prelevării de biopsii de la nivelul mucoasei gastrice, alte tipuri de gastrite identificate la examenul histopatologic, refuzul părinților sau aparținătorilor de a semna consimțământul informat pentru participare în studiu. După includerea în studiu a copiilor conform criteriilor menționate mai sus, vom efectua o anamneză și un examen clinic amanunțit fiecărui pacient pentru a putea analiza informațiile legate de debutul, frecvența și intensitatea simptomelor; însă și referitoare la antecedentele heredo-colaterale și personale relevante, condiții de viață sau medicația administrată anterior internării. După această etapă, vor fi analizate din nou cazurile în funcție de criteriile de includere și excludere pentru a elimina pacienții care nu îndeplinesc aceste criterii. Ulterior, toți copiii vor beneficia de analize de laborator, și anume: hemoleucogramă, viteza de sedimentare a hematiilor și proteina C-reactivă pentru a putea identifica atât o infecție acută ce ar fi putut determina simptomele gastro-intestinale, dar și pentru a putea evalua ulterior statusul inflamator sistemic ce se asociază cu prezența acestei infecții la nivelul mucoasei gastrice. Copiii care vor prezenta semne de laborator sugestive pentru o patologie infecțioasă acută vor fi excluși din studiu. Toți pacienții din lotul final vor fi supuși endoscopiei digestive superioare cu prelevarea a 4 biopsii de la nivelul mucoasei gastrice: 2 antrale și 2 corporeale. Dintre acestea, 2 biopsii (una antrală și una corporeală) vor fi trimise la Departamentul de Anatomopatologie pentru efectuarea examenului histopatologic, iar celelalte două vor fi evaluate din punct de vedere genetic pentru identificarea anumitor polimorfisme ale *TLR2*, *TLR9* și *NLRP3*. În funcție de examenul histopatologic, pacienții vor fi împărțiți în două loturi, și anume copii cu gastrită determinată de infecția cu *H. pylori* – lotul de studiu, și copii fără modificări patologice la examenul histopatologic din biopsiile gastrice – lotul martor. În ceea ce privește polimorfismele menționate mai sus, ne propunem să analizăm următoarele „single-nucleotide polymorphisms” (SNPs): *TLR2* rs3804099 și rs3804100, *TLR9* rs352140, precum și *NLRP3* rs10754558. Toate aceste date clinice, paraclinice și genetice vor fi interpretate în funcție de prezența sau absența infecției cu *H. pylori*. Probele de biopsie destinate testării genetice se vor recolta și transporta la Laboratorul de Genetică și Biologie Moleculară BIOMOL din cadrul Centrului Avansat de Cercetări Medico-Farmaceutice (CCAMF) al Universității de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie Tg. Mureș în tuburi cu soluție de stabilizare a ADN-ului. Testarea genetică implică: izolarea ADN-ului din proba de biopsie ce se va face folosind kitul de extracție PureLink Genomic DNA Mini Kit (California, USA); Cuantificarea ADN-ului extras se va efectua utilizând spectrofotometrul (BioSpectrometer, Eppendorf, Germany) în vederea stabilirii purității și a concentrațiilor obținute. Proba de ADN va fi stocată la congelator, -20°C, până în momentul analizei ulterioare. Analiza de genotipare se va efectua utilizând sistemul 7500 Fast Dx-Real Time PCR Applied Biosystems și sondele TaqMan specifice pentru polimorfismele *TLR2* rs3804099 și rs3804100, *TLR9* rs 352140, precum și *NLRP3* rs10754558.

Contribuțiile potențiale ale acestui proiect sunt multiple și pot aduce informații de o reală valoare atât în domeniul pediatriei, cât și al gastroenterologiei, oncologiei, bolilor infecțioase și chiar microbiologiei. Astfel, principala contribuție a acestui proiect constă în identificarea factorilor de risc care stau la baza apariției gastritei determinate de infecția cu *H. pylori* și persistența acestei infecții la nivelul mucoasei gastrice. Este bine cunoscut faptul că deși aproximativ jumătate din populația globului prezintă această infecție, majoritatea

sunt asimptomatici, astfel că nu necesită tratament. Pe de altă, mecanismele prin care această infecție determină procesul inflamator gastric sau care duc la persistența acesteia sunt complexe, însă incomplet elucidate. Elucidarea acestor factori de risc, printre care și susceptibilitatea genetică, este de o importanță majoră dată fiind bine-cunoscuta legătură dintre infecția cu *H. pylori*, inflamația cronică și cancerul gastric. Astfel, prin corelarea polimorfismelor menționate mai sus cu prezența infecției la nivelul mucoasei gastrice, am putea identifica pacienții cu risc crescut pentru persistența infecției, iar în timp pentru apariția cancerului gastric. O altă contribuție potențială, în strânsă legătură, cu cea menționată anterior, ar putea consta în elaborarea unor terapii genice ținute pentru această categorie de pacienți cu risc crescut. Mai mult, emergența tulpinilor bacteriene rezistente la tratament este tot mai mare, cel mai probabil datorită utilizării în exces a antibioticelor la scară largă fără o justificare bazată pe dovezi de cele mai multe ori. Cu toate acestea o altă explicație ar putea fi legată și de susceptibilitatea individuală prin existența unor deficiențe ale imunității înăscute traduse prin prezența unor polimorfisme hiporeactive ce favorizează persistența infecției și a inflamației cronice asociind complicații cu risc vital pe termen lung. Astfel, receptorii imunității înăscute, atât cei de tip TLRs, cât și NLRs, dețin un rol major în apariția gastropatiilor mediate de infecția cu *H. pylori*, iar identificarea polimorfismelor care cresc această susceptibilitate individuală ar fi de o reală valoare în domeniul pediatriei, al gastroenterologiei, și chiar al oncologiei, reprezentând o bază utilă pentru cercetări ulterioare în ceea ce privește scăderea incidenței cancerului gastric. O altă particularitate a acestui proiect este reprezentată de vârsta populației pe care se va desfășura studiului deoarece datele din literatură referitoare la rolul imunității înăscute în apariția gastritei induse de infecția cu *H. pylori* la copii sunt puține, acesta fiind poate primul studiu care își propune să evalueze această temă pe un lot atât de mare de copii la care diagnosticul de gastrită *H. pylori* mediată este stabilit prin endoscopie digestivă superioară și examen histopatologic. Studiile efectuate pe copiii cu gastrită indusă de această infecție la care diagnosticul s-a stabilit prin examen histopatologic sunt foarte puține, iar cele raportate au inclus un număr mult mai mic de pacienți. În plus, noi nu am identificat până în prezent un studiu care să evalueze 3 receptori ai imunității înăscute la copiii cu gastrită *H. pylori*-pozitivă comparativ cu martorii sănătoși pentru a putea identifica grupele de risc pentru apariția acestei infecții. Astfel, dat fiind faptul că infecția cu *H. pylori* este dobândită în perioada copilăriei, incidența acesteia scăzând o dată cu înaintarea în vârstă, identificarea polimorfismelor cu risc crescut pentru apariția gastritei induse de această infecție la vârstele pediatrice ar reprezenta cu certitudine o metodă foarte utilă de profilaxie primară împotriva acestei infecții, anulând riscul de complicații pe termen lung. Pe de altă parte, prin realizarea acestui proiect, ar putea fi identificați și alți factori de risc pentru apariția gastritei induse de infecția cu *H. pylori*, și anume statutul socio-economic, condițiile de viață, numărul membrilor din familie, prezența refluxului gastro-esofagian sau al celui biliar. Mai mult de atât, ar putea fi detectată și incidența infecției pe grupe de vârstă pentru a putea face o stratificare conform vârstei. Acest fapt ar fi util pentru a putea determina grupele de vârstă cu cel mai mare risc echivalente cu populația țintă la care ar trebui aplicate testele genetice și metodele de profilaxie primară menționate mai sus. Date fiind costurile foarte mari aferente metodelor menționate anterior, este imposibil ca acestea să fie utilizate la populația generală. Astfel, în condițiile în care ar fi cunoscute grupele cu risc crescut, testarea genetică a acestor pacienți pentru identificarea polimorfismelor receptorilor imunității ar putea reprezenta pe viitor o metodă de screening utilă și cu reale beneficii pe termen lung atât pentru pacient, cât și pentru sistemul național de sănătate. O altă contribuție potențială a acestui proiect ar consta în identificarea simptomatologiei frecvent asociată gastritei induse de infecția cu *H. pylori*. În majoritatea cazurilor, la vârstele pediatrice, simptomatologia asociată acestei patologii este fie nespecifică, fie absentă. O explicație pentru acest lucru ar fi reprezentată tocmai de puținele studii efectuate la copii care să evalueze simptomatologia acestora în raport cu gastrita *H. pylori*-pozitivă confirmată prin examen histopatologic. Astfel, studiul nostru ar putea adăuga date importante referitoare la tabloul clinic frecvent întâlnit la copiii cu gastrită determinată de această infecție, care alături de cele existente în literatură ar putea crea un pattern al simptomatologiei la acești pacienți. Ținând cont că trendul actual este acela de a utiliza metode cât mai puțin invazive de diagnostic, cunoașterea tabloului clinic specific pentru acești pacienți, combinat cu alte metode non-invazive de diagnostic al acestei infecții ar putea crește acuratețea diagnosticului fără a utiliza endoscopia digestivă superioară cu biopsie în

toate cazurile pentru confirmarea diagnosticului. Aceasta s-ar impune doar în cazurile absolut necesare, ce ar putea fi încadrate în grupele de risc menționate anterior.

Pe baza tuturor celor menționate mai sus, considerăm că realizarea acestui proiect ar putea aduce multiple contribuții esențiale atât în domeniul pediatriei prin însăși tema propusă, evaluând o patologie frecvent întâlnită în practica pediatrică, dar și în alte domenii precum gastroenterologia, imunologia, microbiologia sau oncologia.

Bibliografie:

1. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr* 2016;7(2):418-419.
2. Meliș LE, Mărginean CO, Mărginean CD, Mărginean MO. The Relationship between Toll-like Receptors and Helicobacter pylori-Related Gastropathies: Still a Controversial Topic. *J Immunol Res* 2019; doi:10.1155/2019/8197048
3. Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Pardo AL, et al. Genetic polymorphisms in the Toll-like receptor signalling pathway in Helicobacter pylori infection and related gastric cancer. *Hum Immunol* 2014;75:808–815.
4. Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Mitchell HM. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front Immunol* 2014;5:336.
5. Varga MG, Shaffer CL, Sierra JC, et al. Pathogenic Helicobacter pylori strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system. *Oncogene* 2016;35(48):6262–6269.
6. Kim DJ, Park JH, Franchi L, Backert S, Nunez G. The Cag pathogenicity island and interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 regulate IL1 beta production in Helicobacter pylori infected dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2013;43(10):2650–8.
7. Castano-Rodriguez N, Kaakoush NO, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM. The NOD-like receptor signalling pathway in Helicobacter pylori infection and related gastric cancer: A case-control study and gene expression analyses. *PLoS One*. 2014;9(6). e98899.

- 6.4. Prezentarea infrastructurii / echipamentelor din cadrul UMFST Târgu Mureș care se dorește a fi utilizate în cadrul proiectului (se va indica link-ul către www.erris.gov.ro). Se acordă până la maxim 11 puncte pentru utilizarea resursei umane, a expertizei și echipamentelor existente în cadrul CCAMF și până la maxim 2 puncte pentru utilizarea echipamentelor disponibile în alte structuri din cadrul UMFST Târgu Mureș.

Pentru desfășurarea acestui proiect vom utiliza infrastructura și echipamentele Laboratorului de Genetică și Biologie Moleculară BIOMOL din cadrul Centrului Avansat de Cercetări Medico-Farmaceutice (CCAMF) din cadrul UMFST Tg. Mureș, precum și ale Clinicii Pediatrie din cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență Tg. Mureș. Astfel, din cadrul CCAMF, vom utiliza sistemul automat de izolare a acizilor nucleici Prep Purification Instrument, BioSpectrometer pentru cuantificarea acizilor nucleici, pregătire plăci pentru sistemul real time se va face cu ajutorul stației de pipetare epMotion P5073 și sistemul Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument va fi utilizat pentru analiza de genotipare, de asemenea se vor utiliza hote cu flux laminar, centrifugă pentru plăci, mini-spin-uri, vortex (<http://erris.gov.ro/CCAMF>) pentru efectuarea testelor genetice; în timp ce în cadrul Clinicii Pediatrie, avem în dotare stație video-endoscopie digestivă, videogastroendoscop pediatric Olympus și pensă de biopsie adaptată calibrului endoscopului, care ne vor fi extrem de utile în efectuarea endoscopiei digestive superioare. Pe lângă aceste echipamente vitale pentru realizarea proiectului, desfășurarea și implementarea cu succes a acestuia va avea la bază și resurse umane valoroase, printre care medici geneticieni și asistenți de laborator cu experiență din cadrul CCAMF, dar și medici anatomopatologi, pediatri și gastroenterologi pediatri cu vastă experiență în domeniul endoscopiei digestive superioare.

6.5. Descrierea potențialelor riscuri asociate implementării proiectului și a modului prin care aceste riscuri ar urma să fie abordate

Unul din riscurile asociate implementării acestui proiect ar fi refuzul părinților/aparținătorilor de a semna consimțământul informat pentru participarea copiilor în studiu. Acest risc ar putea fi abordat prin metode mai eficiente de comunicare a eventualelor riscuri asociate efectuării studiului (recoltarea de sânge, endoscopia digestivă superioară) asigurând părinții că aceste manevre sunt efectuate de persoane înalt calificate, cu experiență în domeniu, precum și că acest proiect ar aduce beneficii nu doar cercetării medicale, ci și copilului. Un alt risc ar consta în refuzul copiilor de a efectua endoscopia digestivă, lucru de altfel frecvent întâlnit în practica zilnică, ce ar putea fi abordat prin abilități de comunicare corespunzătoare vârstei și nivelului de înțelegere ale copilului, acordându-i timpul necesar pentru a-și învinge teama. Mai mult, am menționa că am participat ca membru într-un proiect internațional (SoftisPed) care s-a axat tocmai pe abilitățile de comunicare specifice pediatriei. Alterarea probelor de sânge sau a celor bioptice prelevate este un alt risc ce poate surveni pe parcursul acestui proiect, astfel că acestea vor fi manipulate de persoane cu experiență și depozitate în condiții corespunzătoare până în momentul analizării. Variația costurilor materialelor necesare efectuării testelor propuse ar putea duce la riscul ca bugetul prevăzut în acest proiect să nu fie suficient, fiind astfel necesar să apelăm la resurse financiare externe pentru finalizarea proiectului. De asemenea, întrucât costul reactivilor necesari este destul de ridicat, cheltuielile aferente mobilităților pentru diseminarea rezultatelor vor fi acoperite din resursele financiare proprii ale cercetătorului.

6.6. Justificarea bugetului solicitat

Achiziție	Justificare	Preț estimativ (în lei)
Kit extracție ADN, 200 izolari	Izolarea ADN-ului	2200
Sonda TaqMan, 4 buc	Genotiparea persoanelor incluse în studiu	11000
Placute cu 96 de godeuri, 1 cutie cu 10 placi	Genotipare	500
MasterMix pentru reacția de genotipare, TaqMan MasterMix	Genotipare	3300
Folii optice adezive, 1 cutie cu 50 de folii	Genotipare	700
Varfuri cu filtru, de 0.5-10/ 20-300/ 50-1000	Izolare ADN și pregătirea mixului de amplificare	0 *
Albumina serica bovina (BSA), Apa pură pentru biologie moleculară, kit purificare ADN	Pregătirea mixului de amplificare în vederea genotipării	0 *
Mobilități – manifestări științifice		Buget
Zilele UMFST Tg. Mureș, Conferința Națională de Pediatrie		0 lei

*Consumabile care s-au achiziționat prin fondurile anuale oferite de către Școala Doctorală

7. Activitatea științifică a directorului propunerii de proiect:

7.1. Premii obținute la manifestări științifice

7.2. Participarea cu lucrări la manifestări științifice

1. **Meliț LE**, Mărginean CO, Bănescu C, Mocanu S, Iancu M. The associations between TLR4 rs4986790 gene polymorphism and Helicobacter pylori infection in children with gastritis. National Conference of Pediatrics, 3-6 aprilie 2019, București. Romanian Journal of Pediatrics 2019;68(suppl1):62, ISSN 1454-0398, e-ISSN 2069-6175
2. **Meliț LE**, Mărginean MO, Mocan S, Mărginean CO. The role of neutrophil/leukocyte ration in children's gastritis. Scientific Session of University Academic Staff, The 11th Conference of PhD Students and Young Doctors, 10-14th December 2018, Tg. Mureș, Book of Abstracts 1/2018, pg 138, ISSN 2602-1609
3. **Meliț LE**, Mărginean MO, Mărginean CO. Hemorrhagic gastritis after iron supplementation – case report and a review of the literature. The 9th Conference of PhD Students, The 6th Conference of Postdoc Fellows in Medicine and Pharmacy, 7 decembrie 2015, Acta Medica Marisiensis 2016, 62(suppl 8): 8, ISSN 2068-33-24, CNCSIS 103, B+, indexată EBSCO/ PubMed/ EMBASE <http://www.ammjournal.ro/>
4. **Meliț LE**, Mărginean MO, Mărginean CO. Clinical, paraclinical and histological aspects of gastritis in children. The 8th Conference of PhD Students, The 5th Conference of Postdoc Fellows in Medicine and Pharmacy, 9-10 decembrie 2015, Acta Medica Marisiensis 2015, 61(suppl 7): 7, ISSN 2068-33-24, CNCSIS 103, B+, indexată EBSCO/ PubMed/ EMBASE <http://www.ammjournal.ro/>
5. **Meliț LE**, Mărginean MO, Armean I, Covaci A, Lațcu A, Mărginean CO. O asociere rară între diverticuloza colonică și colita ulcerativă la vârsta pediatrică – prezentare de caz. A XXX-a Conferința Națională cu Participare Internațională Zilele Pediatriei Ieșene „N.N. Trifan”, Iași, 5-7 octombrie 2017, volum de rezumate, pg. 78, ISSN: 2537-1401

7.3. Publicații in extenso

1. **Meliț LE**, Mărginean CO, Mărginean CD, Mărginean MO. *The Relationship between Toll-like Receptors and Helicobacter pylori-Related Gastropathies: Still a Controversial Topic*. Journal of Immunology Research 2019; Article ID 8197048, <https://doi.org/10.1155/2019/8197048>, FI: 3.404
2. **Meliț LE**, Mărginean MO, Mărginean CO, Mocanu S. *The usefulness of inflammatory biomarkers in diagnosing child and adolescent's gastritis*. Medicine 2019;98:26(e16188), <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000016188>, FI: 1.87
3. Mărginean MO, Mărginean CO, **Meliț LE**, Voidăzan S, Moldovan V, Bănescu C. *The impact of host's genetic susceptibility on Helicobacter pylori infection in children*. Medicine 2017, 96:30(e7612), ISSN0025-7974, <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000007612>, FI: 2.028
4. **Meliț LE**, Mărginean CO, Mocanu S, Mărginean MO. A rare case of iron-pill induced gastritis in a female teenager. Medicine 2017, 96:30(e7550), ISSN0025-7974, <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000007550>, FI: 2.028
5. Mărginean MO, **Meliț LE**, Mocanu S, Săsăran V. Ibuprofen, a potential cause of acute hemorrhagic gastritis in children – a case report. JCCM 2018;4(4):143-146, doi: 10.2478-jccm-2018-0022, indexată

ESCI Web of Science Thomson Reuters, Celdes, CNKI Scholar, corresponding author, <http://jccm.ro/wp-content/uploads/2018/10/jccm-2018-0022.pdf>

7.4. Participarea în programe / granturi de cercetare-dezvoltare naționale și internaționale, stagii de pregătire în străinătate

1. Nume proiect: „Softis-Ped - Softskills for Children's Health”; Proiect Erasmus Plus (România, Austria, Italia, Spania, Ungaria, Slovenia), 2016-1-RO01-KA203-024630; Instituția finanțatoare: Agenția Națională pentru Programe Comunitare în Domeniul Educației și Formării Profesionale, Suma: 258470 Euro, Perioada: septembrie 2016 – septembrie 2018, Poziția: membru; Legătura cu tema propusă constă în abilitățile de comunicare în pediatrie dobândite în cadrul acestui proiect care vor fi extrem de utile în implementarea cu succes a prezentului proiect dat fiind faptul că implică tot populație de vârstă pediatrică; Rezultatele obținute:
 - a. 1 articol ISI cu FI: Mărginean CO, **Meliț LE**, Chinceșan M, Mureșan S, Georgescu AM, Suci N, Pop A, Azamfirei L. *Communication skills in pediatrics – the relationship between pediatrician and child*. Medicine 2017; 96:43(e8399), ISSN0025-7974, FI: 2.028, autor de corespondență
 - b. 1 carte: Mărginean O, Pop A, Martellini L, **Meliț L**, Chinceșan M, et al. *Softskills in pediatrics*. Editura University Press Tîrgu Mureș 2018, 123 pg, ISBN 978-973-169-528-0
 - c. 3 prezentări la manifestări științifice
2. Nume proiect: „Rolul determinismului genetic al mamei în obezitatea copilului, corelat cu masuratori de bioimpedanță și antropometrie”; Instituția finanțatoare: UMFST Tg. Mureș; Suma: 20 000 Euro; Perioada: ianuarie 2017 – ianuarie 2019; Poziția: membru; Legătura cu tema propusă constă în experiența acumulată, acest proiect incluzând mame și copii, care au fost evaluați antropometric, paraclinic și genetic, precum și în gestionarea anumitor riscuri ce pot apărea în desfășurarea unui proiect; Rezultate obținute:
 - a. 9 articole ISI cu FI, dintre care cele mai reprezentative:
 - Mărginean C, Mărginean CO, Iancu M, **Meliț LE**, Tripon F, Bănescu C. *MC4R and ENPP1 gene polymorphisms and their implication in maternal and neonatal risk for obesity*. Sci Rep 2019;9:10858, | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47402-2>, FI: 4.011
 - Mărginean CO, Mărginean C, Bănescu C, **Meliț LE**, Tripon F, Iancu M. *The relationship between MMP9 and ADRA2A gene polymorphisms and mothers-newborns' nutritional status: an exploratory path model*. Ped Res 2019; FI: 2.88, <http://doi.org/10.1038/s41390-019-0347-2>
 - b. 1 articol ISI fără FI
 - c. 2 prezentări la manifestări științifice
3. Nume proiect: „Elaborarea unui ghid inovator de diagnostic al copilului prin evaluare genetică, antropometrică, de bioimpedanță și ecografică”; Instituția finanțatoare: UEFISCDI; Suma: 200 000 Euro; Perioada: iulie 2017 – decembrie 2019; Poziția: membru; Legătura cu tema propusă constă în experiența acumulată, acest proiect incluzând tot pacienți de vârstă pediatrică, ce au fost evaluați antropometric, paraclinic și genetic, precum și în gestionarea anumitor riscuri ce pot apărea în desfășurarea unui proiect; Rezultate obținute:
 - a. 8 articole ISI cu FI, dintre care cele mai reprezentative:
 - Mărginean CO, **Meliț LE**, Ghiga DV, Mărginean MO. *Early inflammatory status related to pediatric obesity*. Front Pediatr 2019;7:241, DOI 10.3389/fped.2019.00241, FI: 2.349, autor de corespondență
 - Mărginean CO, **Meliț LE**, Gozar L, Mărginean CD, Mărginean MO. *Incomplete Refractory Kawasaki Disease in an Infant—A Case Report and a Review of the Literature*. Front Pediatr 2018;6:210. doi: 10.3389/fped.2018.00210, FI: 2.349, autor de corespondență

b. 3 prezentări la manifestări științifice

8. Structura bugetului*:

Pentru domeniile sănătate și inginerie:

Nr crt.	DENUMIRE CAPITOL BUGET	VALOARE (lei)
1.	CHELTUIELI DE LOGISTICĂ (consumabile de laborator, reactivi, echipamente, taxe de acces la infrastructura de cercetare a terților, etc.)**	17 700
2.	CHELTUIELI DE MOBILITĂȚI (vizite de studii, participări la manifestări științifice interne și internaționale, cheltuieli de transport, cazare, diurnă, taxă de participare) (maxim 20% din suma solicitată)	0
3.	CHELTUIELI DE REGIE (20% din valoarea totală a proiectului)	4 425

*Bugetul maxim alocat unui proiect este echivalentul în lei a 5.000 Euro.

**Nu sunt eligibile cheltuieli de subcontractare, precum și echipamente IT (computere, laptopuri, imprimante etc.).

Pentru domeniul socio-uman:

Nr crt.	DENUMIRE CAPITOL BUGET	VALOARE (lei)
1.	CHELTUIELI DE LOGISTICĂ cheltuieli de achiziții publicații de specialitate în domeniul grantului, (cărți, reviste și alte abonamente), etc. **	
2.	CHELTUIELI DE MOBILITĂȚI (vizite de studii, participări la manifestări științifice interne și internaționale, cheltuieli de transport, cazare, diurnă, taxă de participare) (maxim 20% din suma solicitată).	
3.	CHELTUIELI DE REGIE (20% din valoarea totală a proiectului)	

*Bugetul maxim alocat unui proiect este echivalentul în lei a 2.000 Euro.

**Nu sunt eligibile cheltuieli de subcontractare, precum și echipamente IT (computere, laptopuri, imprimante etc.).

DATA: 09.09.2019

DIRECTOR PROPUNERE DE PROIECT

Nume, prenume: Meliț Lorena-Elena

Semnătură:



Lista de verificare:

- Directorul propunerii de proiect este angajat cu contract de muncă în UMFST Târgu Mureș, având gradul didactic de asistent universitar sau șef de lucrări/lector, sau este doctorand al unei Școli Doctorale a UMFST Târgu Mureș;
- Directorul propunerii de proiect a depus un singur proiect în această competiție, incluzând ambele tipuri de granturi (granturi individuale și granturi colective), nu are un alt proiect în derulare în competiția internă de granturi (nici granturi individuale, nici granturi colective) și nu are un alt proiect în derulare cu aceeași temă, finanțat din alte surse;
- Directorul propunerii de proiect are maxim 40 de ani la data limită a depunerii proiectului pentru doctoranzi și maxim 45 de ani la data limită a depunerii proiectului pentru aplicanții postdoctorali;
- Nu pot participa în competiția pentru granturi interne, pe o perioadă de 3 ani, acele persoane care au obținut un grant intern și nu și-au îndeplinit criteriile asumate prin contract. Termenul de 3 ani se calculează de la data finalizării contractului de grant intern perfectat cu UMFST din Târgu Mureș.
- Proiectul are o durată de 12 luni (începând de la data de 1 ianuarie a anului următor);
- Bugetul a fost completat în "lei" și respectă maximul sumei admise.