

Universitatea de Medicină și Farmacie

« Carol Davila »



NOI BIOMARKERI PROTEOMICI AI EXPRESIEI CLINICE ÎN SCLERODERMIE

– Teză de doctorat –

REZUMAT

Coordonator:

Prof. Dr. Gheorghe Andrei Dan

Doctorand:

Paul-Cristian Bălănescu

București 2016

INTRODUCERE

Lucrarea de față are ca obiectiv principal identificarea și confirmarea unor biomarkeri proteomici candidat pentru sclerodermie descoperiți în studii de proteomică fundamentală. Lucrarea se situează pe traiectoria etapelor pe care biomarkerii le au de parcurs pentru a putea fi implementați în activitatea zilnică clinică. În acest moment marea majoritate a biomarkerilor descoperiți în variatele patologii au urmat o cale „tradiționalistă” mergându-se pe căi de transducție a semnalului și legături logice identificate dintre citokine, receptori și celule. S-a observat de-alungul timpului însă că marea majoritate a biomarkerilor descoperiți prin aceasta abordare nu sunt caracterizați prin valori predictive și valori diagnostice foarte bune, lumea științifică orientându-se acum spre alte căi în vederea identificării biomarkerilor. Această nouă abordare este facilitată și de imensul progres tehnologic din ultimele două decenii prin apariția așa-numitelor sisteme „high-throughput” ce pot identifica o cantitate foarte mare de date care mai departe sunt analizate cu ajutorul unor sisteme bioinformatică moderne ce au la bază concepte matematice complexe. Aceste metode „high-throughput” identifică anumiți biomarkeri candidat pentru o anumită patologie prin faptul că determină prezența unui semnal semnificativ statistic diferit față de semnalul pe care îl au martorii sănătoși pentru respectivului biomarker. Însă acești biomarkeri candidați identificați trebuie ulterior confirmați în cadrul studii separate folosind loturi diferite de pacienți folosind tehnici specifice, țintite pentru aceștia. În cazul biomarkerilor proteomici, confirmarea acestora se realizează folosind o cohortă diferită de pacienți, comparați cu indivizi (martori, control) ce nu prezintă boala respectivă (sănătoși), la baza analizei aflându-se metodele imunologice (Western Blot, tehnici imunoenzimatică, etc).

Sclerodermia este o boală autoimună a cărei fiziopatologii este încă incomplet cunoscută. Descoperirea de biomarkeri pentru sclerodermie reprezintă o provocare pentru cercetători datorită caracterului polimorf al bolii. Deși până acum au fost studiați mai mulți biomarkeri folosind abordarea tradiționalistă, aceștia nu prezintă valori predictive și diagnostice foarte bune. Puține studii au abordat proteomica fundamentală (studii de spectrometrie de masă) ca potențială sursă de biomarkeri proteomici în sclerodermie, iar biomarkerii proteomici candidat descoperiți de acestea încă nu au fost confirmați. Având în vedere caracterul autoimun al bolii, în cazul sclerodermiei cel puțin, probabil că în vederea descoperirii de biomarkeri este de dorit o abordare care să îmbine abordarea tradiționalistă cu cea modernă. Este de așteptat ca valorile diagnostice

ale biomarkerilor să crească prin identificarea (prin studii de proteomică fundamentală), confirmarea și ulterior asocierea acestora cu sursele lor celulare, cu căile de transducție, cu efectorii din aval sau cu promotorii din amonte. Astfel că acești biomarkeri vor putea fi incluși în paneluri (grupe) de biomarkeri a căror sensibilitate, specificitate și valori predictive vor fi mai mari decât atunci când biomarkerii panelului sunt analizați separat. O astfel de abordare va putea sta la baza dezvoltării ideii de medicină personalizată atât de necesară pentru pacienții cu sclerodermie.

EPIDEMIOLOGIA ȘI FACTORII DE RISC ÎN DEZVOLTAREA SCLERODERMIEI

În literatura de specialitate există foarte multe studii care se ocupă de problema incidenței și prevalenței sclerodermiei. O meta-analiză recentă [1] și-a propus să evalueze datele înregistrate până în acel moment. Datele obținute arată că prevalența sclerodermiei variază între 7/1.000.000 cazuri până la 489/1.000.000 cazuri iar incidența de la 0.6/1.000.000 cazuri/an la 122/1.000.000 cazuri/an. Incidența și prevalența sclerodermiei variază foarte mult funcție de regiunea geografică. Aceste diferențe pot fi explicate fie printr-un bagaj diferit genetic al fiecărei regiuni, fie prin expunerea diferențiată față de anumite noxe/factori de risc. În plus există date din literatura care sugerează că în anumite zone există grupe populaționale ce prezintă o prevalență și incidență mai mari pentru sclerodermie. Din păcate pentru țara noastră lipsesc date concrete de incidență și prevalență astfel că se poate face doar o estimare bazându-se pe datele obținute de alte țări.

Supraviețuirea pacienților cu sclerodermie s-a îmbunătățit foarte mult odată cu descoperirile din domeniul patogeniei pentru că la ora actuală pacienții sunt diagnosticați mai devreme iar criza renală sclerodermică beneficiază de un tratament eficient [2]. În schimb s-au schimbat principalele cauze de mortalitate-de la criza renală sclerodermică din trecut (cu o scădere semnificativă grație introducerii inhibitorilor enzimei de conversie) la afectarea pulmonară (hipertensiune pulmonară și fibroză). Aceste aspecte sunt foarte importante și trebuie subliniate pentru dezvoltarea direcțiilor de cercetare în domeniul sclerodermiei (prin analiza factorilor care se asociază/determină afectarea pulmonară și pentru a îmbunătăți speranța de viață a acestor pacienți). Deși ratele de supraviețuire s-au îmbunătățit, ele rămân totuși considerabil inferioare populației generale. Printre predictorii independenți ai mortalității la acești pacienți se

numără: prezența proteinuriei, hipertensiunea pulmonară, sindromul restrictiv intraparenchimos, dispneea, scăderea capacității de difuzie pulmonară, debut tardiv al fenomenelor Raynaud și scorul cutanat Rodnan crescut [3].

Principalii factori de risc pentru dezvoltarea sclerodermiei sunt reprezentați de gen, rasă, vârsta la debut, istoric familial pozitiv și factori de mediu incluzând aici pe cei ocupaționali, infecțioși și alții ce nu se încadrează în niciuna din categoriile anterioare. Calitatea studiilor din literatura de specialitate ce urmăresc relația de cauzalitate dintre factorii de risc și sclerodermie variază foarte mult datorită caracterului polimorf al bolii, al numărului variabil de pacienți recrutați și al efectelor studiate. În plus, asocierea dintre factorii de mediu și sclerodermie este dificil de demonstrat întrucât la marea majoritate a pacienților cu sclerodermie nu există nicio expunere anterioară dezvoltării bolii, precum și reversul, mulți pacienți expuși la factorul respectiv de mediu nu dezvoltă boala. Studiile tip caz control au o relevanță limitată deoarece expunerile la respectivii factori de mediu incriminați în patogeneza sclerodermiei sunt rare. Același lucru este și în cazul studiilor de cohortă, în care foarte puțini pacienți urmăriți din grupul cu factor de risc se îmbolnăvesc. Astfel că studiile sunt de cele mai multe ori cu putere statistică slabă și ele nu pot exclude factorii de risc. Un control al factorilor de confuzie devine astfel foarte important întrucât există un risc foarte mare de includere a unor erori sistematice. O soluție este reprezentată de studiile tip sinteză sistematică cu metanaliză care să certifice asocierea cu un anumit factor de risc prin combinarea mai multor studii similare, crescând astfel puterea statistică. În literatura există deja sinteze sistematice și metaanalize pentru anumiți factori de risc.

CLASIFICAREA FORMELOR CLINICE ALE SCLERODERMIEI

Clasificarea bolii are în primul rând scopul de a împărți pacienții în grupe de boală ce au istorie naturală diferită. Un obiectiv principal în sclerodermie este de a defini criterii care reușesc să clasifice pacienții în grupe de boală ce înglobează manifestări clinice specifice sclerodermiei dar care sunt mai puțin întâlnite în patologii conexe, ce mimează această boală. Acest aspect este destul de dificil, întrucât pacienții prezintă o mare varietate de manifestări clinice și paraclinice.

Așa cum a fost prezentat anterior, clasificarea pacienților cu sclerodermie se realizează astăzi după gradul de distribuție al îngroșării cutanate astfel : sclerodermie formă difuză și

sclerodermie formă limitată. Aceasta clasificare a pacienților este utilă deoarece istoria naturală și extensia îngroșării cutanate este distinctă. Evaluarea extinderii îngroșării cutanate se realizează folosind scorul Rodnan modificat [4] în care examinatorul evaluează îngroșarea cutanată la nivelul a 17 zone, oferind un punctaj cuprins între 0 (absența îngroșării cutanate) până la 3 (îngroșare severă).

Pacienții cu sclerodermie forma difuză au în evoluția lor naturală o creștere rapidă a scorului Rodnan modificat. Acesta atinge valorile maximă în jur de 12-18 luni de la momentul apariției artralgiilor și se îmbunătățește ușor ulterior. Un aspect interesant este faptul că sunt studii care demonstrează că rata îngroșării cutanate (definită prin scorul Rodnan modificat împărțit la timpul necesar apariției primului simptom atribuibil sclerodermiei de la apariția fenomenelor Raynaud) este un predictor independent pentru mortalitate și al riscului la această subgrupă de pacienți [5]. În momentul agravării scorului Rodnan modificat apar și simptomele și semnele constituționale (inapetența, scăderea în greutate, oboseala, afectarea tendoanelor și a miozitei). Este de remarcat faptul că fenomenul Raynaud apare initial în proporție de 40% la pacienții cu sclerodermie forma difuză, de aceea este foarte important să avem date cât mai precise despre debutul acestuia. Eforturile se îndreaptă spre definirea unor caracteristici clinice și mai ales paraclinice (ce pot fi mult mai ușor obiectivate) pentru definirea subgrupului de boala precoce. Vor fi necesare studii prospective la pacienții care prezintă fenomen Raynaud și eventual modificări capilaroscopice specifice care nu mai au alte caracteristici clinice pentru sclerodermie pentru a putea identifica mai bine acei pacienți ce se afla în faza precoce a bolii. Din punctul de vedere al prezenței anticorpilor specifici, pacienții cu sclerodermie forma difuză prezintă anticorpi anti Scl-70 sau anticorpi anti ARN polimeraza III. Prezența anticorpilor anti Scl-70 este asociată cel mai frecvent cu apariția fibrozei pulmonare interstițiale. Pe de altă parte, prezența anticorpilor anti ARN polimeraza III se asociază cu un risc mai mare pentru apariția crizei renale sclerodermice și cu o îngroșare mai mare a tegumentelor (scorul Rodnan modificat > 30) [6].

Spre deosebire de pacienții cu sclerodermie forma difuză, cei cu forma limitată prezintă o suprafață mai mică a îngroșării cutanate, care nu diseminează, indiferent de durata bolii. Scorul Rodnan modificat crește lent pe măsura evoluției naturale a bolii. Acești pacienți au în general o evoluție și un prognostic superior comparativ cu pacienții cu forma difuză. Pentru definirea sclerodermiei forma limitată precoce a fost stabilit arbitrar pragul de 5 ani după debutul bolii.

Fenomenul Raynaud cu sau fără ulceratii digitale este frecvent un prim simptom la acești pacienți, urmat de apariția artralgiilor chiar și la 3 ani după apariția fenomenului Raynaud. Contracturile severe sunt rare la pacienții cu forma limitată. Aceștia prezintă mult mai puține manifestări viscerale ale bolii, ceea ce le oferă un prognostic mai bun. Doar 10-15% din pacienții cu sclerodermie formă limitată precoce dezvoltă fibroză pulmonară, cel mai probabil datorită asocierii anticorpilor anti-centromer [7]. Pe măsură ce boala evoluează, apar mai multe telangiectazii la nivelul feței, buzelor și degetelor, apar calcificările subcutanate și apare sclerodactilia. Simptomele digestive (pirozisul, disfagia pentru solide) persistă și se agravează odată cu evoluția. Intervențiile medicamentoase însă limitează aceste manifestări digestive și îmbunătățesc calitatea vieții. Afectarea intestinală este mai rară și se manifesta prin diaree și malabsorbție [8]. Datorită spectrului afectărilor cutanate și viscerale la pacienții cu sclerodermie forma limitată, acesta poate fi inclus în acronimul « **CREST** » (**C**-Calcinoza, **R**-fenomen Raynaud, **E**-afectare Esofagiana, **S**-Sclerodactilie, **T**-Telangiectazii).

Complicația cea mai gravă la pacienții cu formă limitată este hipertensiunea pulmonară, ce apare la aproximativ 10% dintre pacienți de obicei la peste 3 ani de la debutul bolii. Ea apare mult mai frecvent la pacienții ce au și anticorpi anti-centromeri și anti U1-RNP. Aproape toți pacienții cu anticorpi anti-centromeri au forma limitată a bolii, însă nu toți pacienții cu formă limitată au și anticorpi anti centromeri. Pacienții care asociază și niveluri scăzute ale complementului seric pot dezvolta în timpul evoluției bolii manifestări autoimune reprezentate de vasculită cu purpură palpabilă, neuropatie periferică, ciroza biliară primitivă și tiroidită autoimună [9,10].

În literatura de specialitate mai este definit încă un subset de boală, sclerodermia sine scleroderma care este însă mult mai rară. Pacienții prezintă fenomen Raynaud și serologie pentru sclerodermie (anticorpi specifici) însă nu prezintă afectare cutanată. Din punctul de vedere al afectării viscerale, aceștia prezintă caracteristici similare pacienților cu sclerodermie forma limitată ceea ce a condus la includerea acestui subset în categoria de sclerodermie forma limitată.

APLICAȚII ALE PROTEOMICII ÎN CLINICĂ: DESCOPERIREA BIOMARKERILOR PROTEOMICI

Proteomica este o ramură a biologiei moleculare ce se ocupă cu studiul structurii și funcției proteinelor. Țelul suprem al proteomicii este identificarea și validarea unor biomarkeri

care să fie capabili să îmbunătățească screening-ul, diagnosticul, monitorizarea sau prognosticul unei anumite patologii. În acest moment în literatura de specialitate există două abordări în cadrul studiilor proteomice [11].

1. Abordarea clasică-în care sunt studiate una sau câteva proteine înrudite între ele fie structural, fie funcțional sau care se găsesc în cai de transducție a semnalului/cai metabolice comune. Această abordare *tradiționalistă* a fost utilizată foarte mulți ani și a adus beneficii asupra cunoașterii funcției și rolului proteinelor. Totuși un dezavantaj al abordării tradiționaliste este că nu ia în considerare totalitatea proteinelor și interacțiunilor dintre acestea, ele referindu-se la un număr restrâns de molecule, precum nici nu ia în considerare noi posibile proteine.

2. Abordarea nouă « *discovery based approach* » -prin care proteinele sunt supuse unui screening global, indiferent de structură, rol în cale metabolică, etc. O astfel de abordare a fost posibilă prin apariția metodelor proteomice “high-throughput” (în traducere - pe scară largă), ce accelerează descoperirea biomarkerilor proteomici prin generarea unei cantități foarte mari de date, care sunt prelucrate cu ajutorul tehnicilor bioinformatic. În plus, acesta abordare este foarte promițătoare în viziunea dezvoltării și aplicării conceptului de *medicină personalizată*. Este foarte important ca cercetătorii să arunce un năvod cât mai larg, crescându-și astfel șansele de a descoperi biomarkeri promițători. Astfel că această abordare începe să câștige din ce în ce mai mult teren și reprezintă o sursă importantă de potențiali biomarkeri candidat care pot fi ulterior confirmați și validați în cadrul studiilor clinice independente.

Translația unui biomarker proteomic din laborator în clinică („bench to bedside”) este un proces dificil datorită heterogenității țesuturilor afectate de boală și a erorilor sistematice ce pot să apară în cadrul studiilor [12]. Pentru descoperirea unor noi biomarkeri se descriu cinci faze [13,14].

Faza I-se referă la studii preclinice, folosind abordarea nouă, « *discovery based approach* ». Biomarkerii astfel identificați sunt prioritizați funcție de capacitățile lor diagnostice, prognostice sau predictive. Probele din care biomarkerii sunt identificate trebuie să provină de la pacienți ale căror caracteristici clinice sunt foarte bine cunoscute. În această fază se folosește un număr redus de probe.

Faza II- cuprinde două aspecte foarte importante. Primul aspect este reprezentat de realizarea unei metode de cuantificare a biomarkerului. În contextul studiilor proteomice, este vorba de realizarea unor truse de determinare a proteinelor ce au la baza reacția antigen-anticorp (imunodeterminare). Aceste reacții pot fi de tip Western Blot sau determinări ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) monoplexate sau multiplexate (în cadrul unor platforme proteomice tip Luminex, microarray de proteine). După ce aceste truse au fost elaborate, biomarkerii trebuie evaluați în contextul clinic, pentru a se determina sensibilitatea și specificitatea end-point-ului clinic căutat.

Faza III- cuprinde evaluarea caracteristicilor biomarkerului pentru apariția end-point-ului clinic căutat în condițiile în care acesta încă nu se manifestă clinic. Este momentul studiilor, prospective, mari, în care pacienții sunt recrutați înaintea apariției manifestărilor clinice. Aceste studii sunt mari consumatoare de resurse atât financiare cât și de resursa umană, însă rezultate bune provenite din studiile de faza III duc la validarea clinică a biomarkerului. Studiile de faza III pot fi considerate studii de validare a biomarkerilor.

Faza IV- evaluează caracteristicile biomarkerului având la dispoziție un studiu de cohortă. Abordarea este similară cu studiile din faza III, diferența este că pe baza rezultatelor oferite de biomarkerul validat se alege o anumită strategie terapeutică sau o indicație pentru o procedură diagnostică definitivă (biopsie, etc), procedura care de altfel ar fi scumpă pentru sistemul de sănătate sau invazivă pentru pacient și care ar trebui realizată numai unor pacienți cu indicații clare, date de biomarkerul validat în faza III. De aici se poate concluziona că studiile de faza IV sunt greu de realizat în bolile rare cum este și sclerodermia-ce face obiectul studiului lucrării de față. Pentru aceste patologii rare vor fi necesare cel mai probabil studii transnaționale ce să înglobeze expertiza și pacienții mai multor centre mari universitare din lume.

Faza V- evaluează beneficiile și riscurile utilizării biomarkerului validat. Evident că pentru acesta este nevoie de un studiu pe scară largă, cu o perioadă mare de urmărire a pacienților care este însă foarte costisitor. Studiile din faza IV și V evaluează de altfel beneficiile clinice ale biomarkerului validat (răspund la întrebarea „biomarkerul este validat dar este el și cu adevărat util din punct de vedere economic și social?”). Acestea pot fi considerate studii de implementare clinică a biomarkerilor proteomici.

OBIECTIVE ȘI MOTIVAȚIE

Principalul obiectiv al prezentei lucrări de doctorat este reprezentat de identificarea, evaluarea și confirmarea noilor biomarkeri proteomici candidat pentru sclerodermie descoperiți în studii de proteomică fundamentală (spectrometrie de masă combinată cu electroforeza 2D). În acest moment studiile se concentrează pe identificarea biomarkerilor care pot permite diagnosticul precoce, pot asigura o evaluare corectă a activității bolii sau pot avea un rol prognostic important pentru pacienții cu sclerodermie. Lucrarea se înscrie astfel în tendințele actuale din cercetarea translațională, care se axează pe accelerarea transferului de cunoștințe din studiile fundamentale către patul pacientului („bench to bed approach”). Identificarea din literatură a biomarkerilor proteomici candidat s-a realizat prin evaluarea critică a literaturii de specialitate, având un design și protocol riguros. Astfel că s-a realizat o sinteză sistematică a tuturor studiilor relevante și o bază de date ce cuprinde biomarkerii proteomici candidat alături de produsul patologic din care acesta a fost izolat. Evaluarea și confirmarea unor biomarkeri identificați a fost realizată printr-un studiu caz martor pe un lot independent de pacienți cu sclerodermie și martori sănătoși.

În afară de această abordare nouă pentru evaluarea biomarkerilor în sclerodermie, lucrarea își propune evaluarea unor noi potențiali biomarkeri identificați pe calea patogenică (*hypothesis driven approach*), biomarkeri atractivi care și-au dovedit deja utilitatea în patologii autoimune conexe. Astfel că sunt vizați biomarkeri ai disfuncției endoteliale și autoanticorpi (proveniți din cele două lanțuri patologice, afectarea vasculară și dereglarea răspunsului imun).

Un alt obiectiv este reprezentat de obținerea unor date privind capacitățile predictive ale respectivilor biomarkeri cercetați în cadrul lotului independent cu sclerodermie pentru evaluarea expresiilor clinice la pacienții cu sclerodermie (subgrupe de boală, boala activă, afectare pulmonară, afectare articulară, afectare gastrointestinală). În afară de analiza univariată, biomarkerii vor fi stratificați prin analiză multivariată pentru a decide care este biomarkerul relevant și cu cele mai bune caracteristici predictive pentru o anumită caracteristică clinică.

Impactul lucrării va consta în posibilitatea abordării pacienților cu sclerodermie din privința noilor biomarkeri, ce ar putea deschide drumul către o abordare personalizată a acestor pacienți. Medicina personalizată este un domeniu crescut de interes și promite să devină

standardul de aur. Medicina personalizată se referă la alegerea tratamentului medical și al diagnosticului pe baza caracteristicilor individuale ale pacientului.

Eforturile depuse, rezultatele și probele biologice (serotecă) obținute în cadrul acestei lucrări vor sta la baza unor studii ulterioare, de faza III în privința validării biomarkerilor în sclerodermie, ele integrându-se în fluxul informațional al descoperirii biomarkerilor din cercetarea translațională.

MATERIALE ȘI METODE

Prezentul studiu se încadrează în studiile de faza II a descoperirii biomarkerilor, studiu în care biomarkerii identificați în cadrul cercetărilor fundamentale sunt confirmați în patologia respectivă. Studiul este unul tip caz-martor, în care expresia biomarkerilor în sclerodermie este comparată cu expresia acestora la nivelul indivizilor sănătoși. În plus, studiul prezintă și o abordare transversală în cadrul lotului pacienților cu sclerodermie, încercându-se identificarea asocierii biomarkerilor proteomici cu anumite expresii clinice specifice bolii.

Au fost incluși în studiu două loturi de pacienți-unul cu bolnavi de sclerodermie și unul cu martori sănătoși similar cu cel al pacienților cu sclerodermie din punctul de vedere al distribuției pe vârstă și pe gen. Criteriile de includere au fost reprezentate de: vârsta peste 18 ani, pacienții să îndeplinească criteriile ACR de boala și să se încadreze într-una din categoriile : sclerodermie difuză sau localizată, să înțeleagă și să semneze consimțământul informat. Pacienții care au îndeplinit cel puțin unul din criteriile de mai jos au fost excluși din studiu : insuficiența renală (datorită posibilității prezenței sclerozei cutanate secundare), prezența sindroamului tip overlap, fumători, orice condiție fizică sau psihică ce împiedică pacientul să își dea consimțământul de a participa în studiu, sarcina. În cadrul studiului au fost incluși 40 pacienți cu sclerodermie. În studiu a fost recrutat și un număr de 20 voluntari sănătoși care de asemenea au semnat consimțământ informat și care au constituit lotul martor. Aceștia au fost similari lotului de pacienți sclerodermici din punctul de vedere al repartizării pe gen și pe vârstă.

În cadrul lotului martor au fost măsurate variabilele demografice (gen, vârstă) precum și nivelurile serice ale enodocanului, reticulocalbinului 1, reticulocalbinului 3. În cadrul lotului pacienților cu sclerodermie, au fost măsurate mai multe variabile, atât clinice cât și paraclinice. În plus, la nivelul lotului cu pacienți cu sclerodermie a fost evaluat și un panel extins de anticorpi

antifosfolipidici pentru evaluarea acestora din urmă drept biomarkeri ai expresiei clinice pentru pacienții cu sclerodermie.

Inițial a fost realizată statistica descriptivă a celor două loturi incluse în studiu (cercetând distribuțiile variabilelor continui prin analiza histogramelor și aplicarea testelor tip Kolmogorov Smirnov). Ulterior folosind testul Mann Whitney U s-a testat existența diferențelor din punctul de vedere al concentrațiilor biomarkerilor proteomici testați prin metoda ELISA între martorii sănătoși și lotul pacienților cu sclerodermie. Respingerea ipotezei nule a dus la confirmarea acestor biomarkeri.

După confirmarea biomarkerilor proteomici s-a căutat asocierea acestora cu variatele manifestări clinice (în cadrul lotului cu sclerodermie, pe baza variabilelor clinice care în mare măsură sunt binarizate « tip da/nu » și a fost testată ipoteza existenței unei diferențe din punctul de vedere al concentrației biomarkerilor proteomici între aceste subloturi ale grupului de sclerodermie-de exemplu sublotul pacienților cu sclerodermie forma difuză versus forma localizată). Au fost aplicate teste neparametrice de tipul Mann-Whitney U. Pentru evaluarea existenței unei corelații între variabile au fost utilizați coeficienții de corelație Pearson sau Spearman Rho (funcție de respectarea condițiilor pentru aplicarea acestor coeficienți). Au fost realizate și curbele ROC pentru evaluarea capacității diagnostice pentru diferite manifestări clinice a biomarkerilor proteomici identificați. Parametrii testelor diagnostice (specificitate, sensibilitate, valoare predictivă pozitivă, valoare predictivă negativă) împreună cu intervalul de încredere 95% au fost calculate utilizând un soft on-line gratuit la adresa <http://ktclearinghouse.ca/cebm/toolbox/statscale>.

În final, variabilele care s-au asociat și corelat cu o anumită expresie clinică a sclerodermiei au fost testate dacă pot fi predictorii independenți ai respectivei manifestări fiind incluși în model de regresie logistică (întrucât variabilă răspuns este o variabilă de tip binar-da/nu).

Modelele obținute au fost analizate iar coeficienții standardizați au permis ordonarea predictorilor independenți în ordinea importanței lor. Pentru realizarea modelelor de regresie logistică, predictorii au fost introduși folosind mai multe abordări-abordarea standard și « stepwise ». Prin compararea parametrilor modelelor de regresie au fost alese cele mai bune modele obținute. Coeficienții de corelație dintre variabilele predictorii au fost determinați pentru a evita apariția fenomenului de multicolinearitate ce ar determina instabilitatea modelelor

obținute și veridicitatea coeficienților standard. Dacă au fost mai multe variabile care s-au corelat cu un coeficient de corelație >0.70 , în modelul de regresie logistică a fost introdusă doar o singură variabilă (celelalte au fost excluse). Pragul de semnificație statistică a fost $p < 0.05$. Modelarea statistică și analiza grafică au fost realizate utilizând softurile Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versiunea 16 și Statistica versiunea 7.

Pentru realizarea sintezei sistematice căutările s-au realizat în două baze de date: PubMed (din 1950 până în prezent) și EMBASE (din 1988 până în prezent), căutarea având loc în luna februarie a anului 2014 (momentul inițierii acestei teze de doctorat). Au fost citite abstractele articolelor găsite. Au fost excluse articolele tip „review”, seriile de cazuri, „letter to the editor”. Au fost excluse studiile pe modele animale, precum și articolele ce se refereau la alte boli autoimune sistemice (găsite prin motoarele de căutare datorită includerii cuvântului „systemic”, în special lupus eritematos sistemic și scleroza multiplă, precum și polimiozita sau dermatomiozita) Au fost revizuite numai articolele în limba engleză. Din contingentul de articole rămase, au fost incluse în analiza „în extenso” numai studiile ce conțineau metode de proteomică fundamentală (spectrometrie de masă) ce comparau probele biologice ale pacienților cu sclerodermie cu un grup martor.

REZULTATE

Studiul secundar-sinteza sistematică

Un total de 20 de înregistrări au fost incluse în această sinteză sistematică. Dintre acestea, 17 înregistrări au fost articole originale, ele fiind citite și sumarizate [15-31]. 3 înregistrări au fost prezentări la diferite congrese de reumatologie iar datele au fost preluate exclusiv din abstractul obținut.

În cadrul studiului secundar au fost identificați 116 biomarkeri proteomici candidați pentru sclerodermie. 91 dintre aceștia au avut expresie crescută în probele biologice față de lotul martor. 20 de biomarkeri proteomici au avut expresie scăzută față de lotul martor iar pentru 5 biomarkeri, rezultatele studiilor au fost contradictorii (unele studii au găsit biomarkerii cu expresie crescută, alții cu expresie scăzută). Acești 5 biomarkeri sunt: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, $\beta 2$ microglobulina, glutathion S transferaza P, disulfid izomeraza ER-60 și calgranulin B. Majoritatea biomarkerilor au fost identificați din lichidul de lavaj bronhiolo-

alveolar (48 de biomarkeri), întrucât foarte multe studii au căutat biomarkeri din această probă biologică. 40 de biomarkeri au fost identificați din analiza proteomului provenit din culturi celulare de la pacienții cu sclerodermie. 22 de biomarkeri candidat au fost identificați din biopsiile cutanate. Numai 15 biomarkeri au fost identificați din serul sau plasma pacienților. Sunt important de notat și biomarkerii care s-au identificat din mai multe probe biologice (și implicit care au fost identificați în mai multe studii). 17 biomarkeri au fost identificați în cel puțin 2 probe biologice. Aceștia sunt: tropomiozina, vimentina, precursorul calreticulinei, ciclofilina A, α -1 antitripsina, β 2-microglobulina, calgranulin A, calgranulin B, haptoglobina, transtiretina, albumina, glutatión-S-transferaza P, calumenina, factorul H al sistemului complement, apolipoproteina I, lizozimul C, disulfid-izomeraza ER 60.

Pentru a sumariza biomarkerii identificați în sinteza sistematică, aceștia au fost clasificați în 14 categorii după funcția pe care aceștia o îndeplinesc. Aceste categorii sunt reprezentate de: dezvoltarea și diferențierea epidermului, molecule de adeziune intercelulară, chaperoni (proteinele „dădace”), proteine ale citoscheletului, reactanți de faza acută, biomarkeri implicați în metabolismul energetic celular, proteine ale sistemului oxido-reducător celular, componente ale matricei extracelulare, citokine, chemokine și imunomodulatori, proteine ale sistemului complement, proteine asociate metabolismului lipidic, proteine de transducție a semnalului intracelular.

Studiul caz-martor pe lotul independent de pacienți

În cadrul studiului de confirmare al biomarkerilor proteomici identificați în cadrul sintezei sistematice și selecționați, a fost construit un lot de pacienți cu sclerodermie alături de care a fost inclus și un lot martor (cu sănătoși). Au fost incluși 40 de pacienți consecutivi diagnosticați cu sclerodermie, internați în Clinicile Medicină Internă și Reumatologie ale Spitalului Clinic Colentina din luna octombrie 2013 până în luna septembrie 2015. În lotul cu pacienți cu sclerodermie au fost incluși 24 pacienți cu sclerodermie formă difuză (60%) și 16 pacienți cu sclerodermie formă limitată (40%). 36 pacienți au fost de gen feminin (90%) și 4 pacienți au fost de gen masculin (10%). Mediana duratei bolii a fost de 87 luni (valoare minimă 5 luni, valoare maximă 240 luni). Pacienții cu formă difuză de boala au avut prevalența mai mare a bolii interstițiale pulmonare (18 pacienți, 75% versus 6 pacienți, 37.5%, test Fischer exact, $p=0.02$). Totodată pacienții cu formă difuză au avut un procent DLCO prezis semnificativ mai

mic decât cei cu boală limitată (test Mann Whitney U, $p=0.05$). Prezența ulcerelor digitale a fost semnificativ statistic mai mare la pacienții cu formă difuză (11 pacienți, 45.8% versus 0 pacienți, test exact Fischer, $p=0.01$). De altfel pacienții cu formă difuză au avut și scorul de activitate al bolii mai mare comparativ cu grupul de pacienți cu formă limitată (test Mann Whitney U, $p=0.001$).

Martorii sănătoși au fost similari ca distribuție din punctul de vedere al genului și al vârstei cu cei din lotul cu sclerodermie. 18 martori sănătoși au fost de sex feminin (90%) și 2 au fost de gen masculin (10%). Mediana vârstei martorilor sănătoși a fost de 49 ani (valoare minimă 38 ani, valoare maximă 63 ani).

Nivelurile serice ale endocanului la pacienții cu sclerodermie au fost de 2.52 ng/mL (valoare minimă 0.96 ng/mL, valoare maximă 9.44 ng/mL) comparat cu martorii sănătoși unde mediana valorilor serice ale endocanului a fost semnificativ statistic mai mică (test Mann Whitney U, $p<0.001$) mediana 0.79 ng/mL, valoare minimă 0.44 ng/mL, valoare maximă 2 ng/mL). În plus, având în vedere că până în acest moment în literatură nu au fost studii ce evaluează distribuția endocanului la nivelul populației sănătoase, s-a stabilit o valoare prag pentru a defini valori crescute ale endocanului. Astfel că mediei obținute pe lotul de martori sănătoși (de 1.07 ng/mL) se adaugă de două ori valoarea deviației standard obținută (valoarea obținută fiind de 0.57) va obține o valoare prag a endocanului de 2.21 ng/mL. Pacienții a căror concentrație serică a endocanului a depășit această valoare au fost incluși în grupul cu endocan crescut (high endocan).

A fost testată și capacitatea endocanului de a fi test diagnostic pentru sclerodermie. Astfel că, la analiza curbei ROC, folosind o valoare prag de 1.93 ng/mL, endocanul are o specificitate de 100% și sensibilitate de doar 67.5% pentru diagnosticul de sclerodermie (AUC-0.89, 95% interval de încredere 0.79-0.99).

Analizând concentrația endocanului la nivelul lotului cu sclerodermie se poate observa că nivelurile endocanului sunt semnificativ statistic mai mari la pacienții cu sclerodermie formă difuză (mediană 2.67 ng/mL, minim 1.10 - maxim 9.44 ng/mL) comparativ cu cei cu formă limitată (mediană 1.64 ng/mL, minim 0.96 - maxim 7.00 ng/mL), test Mann Whitney U, $p=0.03$). În plus a fost testată și capacitatea endocanului de a fi test diagnostic pentru subtipul de sclerodermie (difuză sau limitată). Astfel că, la analiza curbei ROC, folosind o valoare prag de

1.96 ng/mL, endocanul are o sensibilitate de 87.5 % și specificitate de 69.1% % pentru diagnosticul de sclerodermie (AUC-0.72, 95% interval de încredere 0.55-0.90).

Pacienții care au avut durata bolii peste 3 ani au avut concentrații serice mai ridicate ale endocanului (mediana 2.70 ng/mL minim 1.10 maxim 9.44 ng/mL) comparativ cu pacienții ce prezentau o formă precoce (mediana 2.25 ng/mL minim 0.96 maxim 7.00 ng/mL, test Mann Whitney U, $p=0.01$). Pacienții care au avut scorul Rodnan modificat > 14 au avut concentrații serice ale endocanului semnificativ statistic mai mari comparativ cu cei cu scorul Rodnan ≤ 14 (mediana 2.69 ng/mL, minim 1.10, maxim 9.44 ng/mL versus mediana 1.64 ng/mL, minim 0.96, maxim 7.00 ng/mL, test Mann Whitney U, $p=0.03$).

A fost testată și capacitatea endocanului de a fi test diagnostic pentru apartenența grupului cu scor Rodnan modificat peste 14. La analiza curbei ROC folosind o valoare prag de 1.96 ng/mL, endocanul are o specificitate de 67.7% și sensibilitate de 90.9% pentru diagnosticul scorului Rodnan modificat >14 (AUC-0.70, 95% interval de încredere 0.51-0.88).

Pacienții cu boală activă (scor EUSTAR ≥ 3) au avut niveluri serice mai mari ale endocanului (boală inactivă mediana 1.95 ng/mL, minim 0.96 maxim 7 ng/mL versus boală activă mediana 2.68 ng/mL, minim 1.10, maxim 9.44 ng/mL, test Mann Whitney U, $p=0.04$).

A fost testată capacitatea endocanului de a fi test diagnostic pentru apartenența grupului boală activă. La analiza curbei ROC folosind o valoare prag de 2.01 ng/mL, endocanul are o specificitate de 58.9% și sensibilitate de 81.1 % pentru diagnosticul de sclerodermie (AUC-0.64, 95% interval de încredere 0.50-0.82).

De altfel, concentrația serică a endocanului a avut o tendință să fie mai mare la pacienții cu ulcere digitale (mediana 3.15 ng/mL minim 1.10, maxim 9.44 ng/mL versus mediana 2.4 ng/mL minim 0.96 maxim 7 ng/mL, test Mann Whitney U, $p=0.08$), la cei cu hipocomplementemie (mediana 3.73 ng/mL, minim 1.28, maxim 7 ng/mL versus mediana 2.4 ng/mL, minim 0.96, maxim 9.44 ng/mL test Mann Whitney U, $p=0.09$) și la pacienții cu manifestări zilnice ale fenomenului Raynaud (mediana 2.62 ng/mL minim 0.96, maxim 9.44 ng/mL versus mediana 1.95 ng/mL, minim 1.10, maxim 4.95 ng/mL, test Mann Whitney U, $p=0.20$). Nu au fost descrise alte corelații ale expresiei endocanului seric cu fenotipul clinic.

Nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 la pacienții cu sclerodermie au fost de 7.99 ng/mL (valoare minimă 4.02 ng/mL, valoare maximă 48.42 ng/mL) valori comparabile cu cele ale martorilor sănătoși unde mediana valorilor serice ale reticulocalbinei 1 a fost similară (test

Mann Whitney U, $p=0.45$) mediana 10.3 ng/mL, valoare minimă 6.32 ng/mL, valoare maximă 36.2 ng/mL).

În cadrul lotului cu sclerodermie nu s-a observat nicio diferență semnificativă statistic între concentrațiile reticulocalbinei 1 la pacienții cu sclerodermie formă difuză versus pacienții cu sclerodermie formă limitată (test Mann Whitney U, $p=0.61$). În cadrul manifestărilor clinice ale sclerodermiei nu s-au găsit diferențe între nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 și prezența/absența ulcerelor digitale (deși exista o tendință pentru niveluri serice mai mici la cei cu ulcerații active, test Mann Whitney U, $p=0.09$).

Pacienții cu sclerodactilie au avut niveluri serice ale reticulocalbinei 1 mai mari comparativ cu cei fără sclerodactilie (test Mann Whitney U, $p=0.05$). Nu au fost diferențe între concentrațiile reticulocalbinei 1 între pacienții cu telangiectazii și cei fără (test Mann Whitney U, $p=0.09$). Nici prezența calcinozei nu s-a asociat cu niveluri mai mari ale reticulocalbinei 1 (test Mann Whitney U, $p=0.15$).

Pacienții cu hipomotilitate esofagiană aveau niveluri serice mai mari ale reticulocalbinei 1 comparativ cu pacienții ce nu aveau modificări ale motilității esofagiene (test Mann Whitney U, $p=0.02$).

Nu au fost diferențe semnificative între concentrațiile serice ale reticulocalbinei 1 la pacienții ce aveau sau nu aveau niveluri scăzute ale complementului seric (test Mann Whitney U, $p=0.13$). De asemenea nu au fost diferențe semnificative între concentrațiile acestui biomarker la pacienții ce aveau fibroză pulmonară versus cei fără fibroză pulmonară (test Mann Whitney U, $p=0.71$).

La pacienții cu boală activă s-a observat o tendință de creștere a concentrației reticulocalbinei 1 (test Mann Whitney U, $p=0.20$) însă aceasta nu a fost semnificativă statistic.

Tratamentul pacienților nu a influențat nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 (teste Mann Whitney U, $p=0.51$ -pentru corticoterapie, $p=0.21$ -pentru blocații de canale de Ca^{++} , $p=0.10$ -pentru sintrom și $p=0.4$ -pentru inhibitorii enzimei de conversie).

Deși nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 nu s-au corelat cu scorul Rodnan modificat (test Spearman, $r=-0.086$, $p=0.42$) acestea au fost corelate cu scorul de activitate al bolii EUSTAR (test Spearman, $r=0.36$, $p=0.02$). În același timp, numărul plachetelor s-a corelat pozitiv cu concentrația serică a reticulocalbinei 1 (test Spearman, $r=0.36$, $p=0.02$).

Nivelurile serice ale reticulocalbinei 3 la pacienții cu sclerodermie au fost de 4.68 ng/mL (valoare minimă 2.89 ng/mL, valoare maximă 43.7 ng/mL) valori comparabile cu cele ale martorilor sănătoși unde mediana valorilor serice ale reticulocalbinei 3 a fost similară (test Mann Whitney U, $p=0.69$) mediana 6.38 ng/mL, valoare minimă 3.72 ng/mL, valoare maximă 29.53 ng/mL).

În cadrul lotului cu sclerodermie nu s-a observat nicio diferență semnificativă statistic între concentrațiile reticulocalbinei 3 la pacienții cu sclerodermie formă difuză versus pacienții cu sclerodermie formă limitată (test Mann Whitney U, $p=0.91$). În cadrul manifestărilor clinice ale sclerodermiei nu s-au găsit diferențe între nivelurile serice ale reticulocalbinei 3 și prezența/absența ulcerărilor digitale (test Mann-Whitney U, $p=0.189$); un aspect diferit față de reticulocalbina 1 este cel legat de prezența/absența sclerodactiliei unde nu s-au găsit diferențe între nivelurile serice ale reticulocalbinei 3 (test Mann-Whitney U $p=0.304$). În schimb concentrația reticulocalbinei 3 a fost mai mare în subgrupul de pacienți cu telangiectazii comparat cu pacienții sclerodermici fără telangiectazii (test Mann-Whitney U, $p=0.03$). La pacienții cu calcinoză prezentă a existat o tendință de creștere a nivelurilor serice ale reticulocalbinei 3 însă fără semnificație statistică (test Mann-Whitney U $p=0.09$). Ca și în cazul reticulocalbinei 1, nivelurile serice ale reticulocalbinei 3 au fost mai mari la pacienții ce aveau prezentă hipomotilitate esofagiană (test Mann-Whitney U, $p=0.02$).

Nu au fost diferențe semnificative între concentrațiile serice ale reticulocalbinei 3 la pacienții ce aveau sau nu niveluri scăzute ale complementului seric (test Mann Whitney U, $p=0.075$ -totuși a existat o tendință a valorilor mai mici ale reticulocalbinei 3 la pacienții cu hipocomplementemie). De asemenea nu au fost diferențe semnificative între concentrațiile acestui biomarker la pacienții ce aveau fibroză pulmonară versus cei fără fibroză pulmonară (test Mann Whitney U, $p=0.61$).

Similar cu cazul reticulocalbinei 1, și nivelurile reticulocalbinei 3 au avut tendința să fie mai mari la pacienții cu boală activă, deși nesemnificativ statistic (test Mann Whitney U, $p=0.28$).

Tratamentul pacienților nu a influențat nivelurile serice ale reticulocalbinei 3 (teste Mann Whitney U, $p=0.80$ -pentru corticoterapie, $p=0.40$ -pentru blocații de canale de Ca^{++} , $p=0.12$ -pentru sintrom și $p=0.19$ -pentru inhibitorii de enzimă de conversie).

Nivelurile reticulocalbinei 1 și ale reticulocalbinei 3 au fost strâns corelate (test Spearman, $r=0.86$, $p<0.001$).

Spre deosebire de reticulocalbina 1, nivelurile reticulocalbinei 3 nu s-au corelat cu scorul EUSTAR (test Spearman, $r=0.29$, $p=0.07$). În plus, numărul plachetelor sanguine a fost corelat pozitiv cu concentrația reticulocalbinei 3 (test Spearman, $r=0.34$, $p=0.013$).

Având în vedere că nivelurile reticulocalbinei 1 dar nu și 3 au fost semnificativ asociate cu scorul EUSTAR în analiza bivariată, pentru evaluarea relației dintre cele două variabile după ajustarea sexului și vârstei pacienților s-a realizat o analiză multivariată ce a avut ca variabilă independentă concentrația serică a reticulocalbinei 1 și ca variabile dependente sexul, vârsta și scorul EUSTAR. Scorul EUSTAR a rămas semnificativ statistic asociat cu concentrația reticulocalbinei 1 după această ajustare (valoarea R^2 ajustată a modelului a fost de 0.17, coeficientul B pentru EUSTAR a fost de 2.28 cu interval de încredere 95% între 0.12 și 4.43, $p=0.03$).

În plus, analizând concentrațiile reticulocalbinei 1 și 3 comparativ cu martorii sănătoși, deși nu au fost diferențe semnificative se poate observa faptul că din grupul de pacienți cu sclerodermie se evidențiază pacienți care prezintă niveluri crescute serice ale concentrației acestor doi biomarkeri. Având în vedere faptul că în cadrul literaturii de specialitate nu sunt prezentate valori normale ale reticulocalbinei 1 și 3 la martorii sănătoși, valori crescute au fost considerate valorile care au depășit media plus 2 deviații standard ale sănătoșilor selecționați în studiu. Populația de pacienți cu sclerodermie a fost împărțită în două grupuri- pacienți cu valori „normale” ale reticulocalbinei 1 și 3 (34 pacienți, 85%) și pacienți cu valori „crescute” ale reticulocalbinei 1 și 3 (6 pacienți, 15%) . Pentru că nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 și 3 sunt corelate, a fost analizat numai cazul reticulocalbinei 1 care prezintă concentrații serice mai mari comparativ cu reticulocalbina 3.

Nu s-au observat diferențe semnificative statistic din punctul de vedere al majorității expresiilor clinice în sclerodermie la pacienții cu niveluri „normale” versus pacienții cu valori „crescute” ale reticulocalbinei 1. De remarcat este faptul că pacienții din grupul cu valori mai mari ale concentrației serice ale reticulocalbinei 1 aveau o prevalență mai mare a ulcerelor digitale comparativ cu restul pacienților cu sclerodermie (4 pacienți, 66.7% versus 7 pacienți- 20.6%, $OR=7.71$ (95% IC 1.16-51.01, $p=0.03$). A existat de altfel o tendință ca pacienții din grupul cu valori mai mari ale concentrației serice ale reticulocalbinei 1 să aibă o prevalență mai

mare a calcinozei (3 pacienți-50% versus 5 pacienți-14.5%, $p=0.08$), o tendință pentru o prevalență mai mare a telangiectaziilor (6 pacienți-100% versus 20 pacienți-58.8%, $p=0.07$) și o tendință pentru o prevalență mai mare a hipomotilității esofagiene (6 pacienți-100% versus 20 de pacienți-58.8%, $p=0.07$).

Un aspect interesant de notat este faptul că deși nu au fost diferențe semnificative între nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 la pacienți cu sclerodermie formă localizată versus formă difuză, pacienții din grupul cu niveluri crescute ale reticulocalbinei 1 au aparținut exclusiv grupului de pacienți cu formă difuză (test Fischer, $p=0.056$, 6 pacienți versus 0 pacienți din grupul cu sclerodermie formă limitată).

Pacienții aparținând grupului cu niveluri serice crescute ale reticulocalbinei 1 avut un scor al activității gastro-intestinale semnificativ statistic mai mare (test Mann Whitney U, $p=0.05$). În plus, pacienții cu niveluri crescute au avut și număr mai mare de plachete (test Mann Whitney U, $p=0.01$). S-a observat și o tendință pentru scoruri EUSTAR de activitate a bolii mai mari la pacienții cu niveluri crescute ale reticulocalbinei 1 (test Mann Whitney U, $p=0.10$). Semnificația statistică nu a fost atinsă, cel mai probabil datorită numărului mic de pacienți din grupul celor cu reticulocalbină 1 crescută (6 pacienți).

Pacienților cu sclerodermie selecționați le-a fost evaluat un panel extins de anticorpi antifosfolipidici (ce a constat din analiza fracției IgM și IgG a anticorpilor anti fosfatidiletanolamină, anti cardiolipină, anti fosfatidilserină, anti protrombină și anti beta2-glicoproteina 1). Aceștia nu au prezentat în momentul recrutării cât nici în antecedente semne și simptome ale sindromului antifosfolipidic (nu au raportat niciodată tromboze sau avorturi spontane recurente). Anticorpii antifosfolipidici au fost prezenți la o proporție relativ mare dintre pacienții analizați (14 pacienți au avut cel puțin un tip de anticorp antifosfolipidic). Majoritatea au avut numai un singur tip de anticorp (8 pacienți). 2 pacienți au avut două tipuri de anticorpi, 2 pacienți au avut 3 tipuri de anticorpi și 2 pacienți au avut 4 tipuri de anticorpi antifosfolipidici). Prin tip de anticorp antifosfolipidic se înțelege prezența a fie IgM sau IgG ale aceleiași clase de anticorp ce recunoaște un antigen specific (fosfolipid). Cel mai frecvent tip de anticorp antifosfolipidic prezent (folosind valoarea prag sugerată de producătorul trusei utilizate) a fost IgM anti fosfatidiletanolamină (11 pacienți).

Concentrația serică a anticorpilor antifosfolipidici nu a fost diferită între pacienții cu sclerodermie formă difuză și forma limitată. Nu au fost diferențe semnificative statistic între

concentrațiile anticorpilor antifosfolipidici nici între diferitele manifestări ale bolii. Nu s-au găsit asocieri între prezența anticorpilor antifosfolipidici și numărul de trombocite sau parametrii morfologici plachetari. Totuși, pacienții cu anticorpi IgM anti fosfatidiletanolamină au prezentat și hipocomplementemie (definită ca niveluri scăzute fie de C3, fie de C4 sau ambele) (5 pacienți, 45.5% pacienți cu anticorpi IgM anti fosfatidiletanolamină versus 0 pacienți fără anticorpi IgM anti fosfatidiletanolamină, $p < 0.001$, test exact al lui Fischer, OR=41.46, 95% interval de încredere 2.02-850.87). Un aspect interesant de remarcat este faptul că toți pacienții cu hipocomplementemie aveau și anticorpi tip IgM anti fosfatidiletanolamină. Și pacienții cu anticorpi tip IgG anti beta2-glicoproteina 1 aveau tendința să fie hipocomplementemici (2 pacienți, 100% din grupul cu anticorpi IgG anti beta2-glicoproteina 1 versus 3 pacienți 7.8% din grupul fără anticorpi IgG anti beta2-glicoproteina 1, test exact al lui Fischer, OR=43.57, 95% interval de încredere 1.72-1103). În fine, pacienții ce au prezentat anticorpi tip IgM anti protrombină aveau și ei tendința spre niveluri scăzute ale valorilor serice ale complementului (4 pacienți, 100% din grupul cu anticorpi IgM anti protrombină versus 1 pacient, 2.7% din grupul fără anticorpi IgM anti protrombină, test exact al lui Fischer, OR=183, 95% interval de încredere 6.41-5217.09).

Pacienții ce aveau anticorpi tip IgM antifosfatidiletanolamină și hipocomplementemie aveau și o durată mai lungă a bolii comparativ cu ceilalți pacienți (mediana 120 luni, minim 70 luni-maxim 240 luni, versus mediana 70 luni, minim 5 luni, maxim 204 luni, test Mann Whitney U $p = 0.045$). Nu a fost observată nicio diferență privind prezența/absența anticorpilor antifosfolipidici și prezența lupusului anticoagulant. Totodată nu a fost observată nicio asociere între terapia ce a fost administrată pacienților și prezența anticorpilor antifosfolipidici.

Pentru a evalua existența unei asocieri independente între concentrația serică a anticorpilor antifosfolipidici (considerată variabilă dependentă, continuă) și prezența hipocomplementemiei la pacienții cu sclerodermie a fost realizată o regresie liniară multiplă pentru ajustarea după gen și vârstă. Astfel că în modelul de regresie, după ajustarea după gen și vârstă, hipocomplementemia (variabilă independentă din modelul statistic) se asociază independent cu concentrația serică a anticorpilor tip IgM anti fosfatidiletanolamină și cu concentrația serică anticorpilor tip IgG anti beta2 glicoproteina 1 (ca variabile dependente). După ajustare nu se menține asocierea independentă dintre anticorpii tip IgM anti protrombină și prezența hipocomplementemiei.

După analiza individuală a biomarkerilor vis-a-vis de asocierea acestora cu manifestările clinice, a fost realizată și analiza corelativă între biomarkerii studiați pentru a decide biomarkerii cu cea mai bună relevanță și capacitate clinică predictivă.

Astfel că nivelurile serice ale endocanului s-au corelat pozitiv cu nivelurile serice ale anticorpilor tip Ig M anti fosfatidiletanolamină ($r=0.34$, $p=0.03$). În schimb nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 au fost corelate pozitiv cu titrul de anticorpi tip Ig G anti fosfatidiletanolamină ($r=0.33$, $p=0.04$). De altfel, a existat o tendință a endocanului de a avea valori semnificativ mai mari la pacienții cu anticorpi tip Ig M antifosfatidil etanolamină pozitivi (test Mann Whitney U, $p=0.072$).

Pe de altă parte, pacienții ce au avut concentrații crescute serice ale endocanului (valoarea prag superioară a “normalului” pentru valorile serice ale endocanului fiind calculată din datele obținute de la martorii sănătoși ca valoarea medie plus 2 deviații standard) au avut concentrații crescute ale anticorpilor tip IgM anticardiolipidici (test Mann Whitney U, $p=0.03$), anti fosfatidiletanolamină (test Mann Whitney U, $p=0.01$), anti beta2 glicoproteina 1 (test Mann Whitney U, $p=0.006$) și anti fosfatidilserină (test Mann Whitney U, $p=0.002$). Un aspect interesant de remarcat este faptul că nu au fost observate diferențe între concentrațiile anticorpilor antifosfolipidici între pacienții aparținând grupului “high RCN1” și cei din grupul cu concentrații normale ale reticulocalbinei 1.

Pentru evaluarea capacității biomarkerilor de a evalua independent scorul EUSTAR de activitate al bolii s-a realizat un model de regresie liniară. Scorul EUSTAR a fost introdus în model ca variabilă dependentă și ca variabile independente au fost introduși biomarkerii asociați cu scorul EUSTAR din analiza univariată (endocan și reticulocalbina 1), alături de VSH, prezența ulcerelor digitale și scorul Rodnan (ultimele trei fiind componente ale scorului EUSTAR).

Așa cum era de așteptat, valorile VSH-ului și ale scorului Rodnan modificat s-au asociat independent cu scorul EUSTAR. Endocanul nu s-a mai asociat în analiza multivariată cu scorul EUSTAR însă concentrațiile serice ale reticulocalbinei 1 au fost independent asociate de VSH, scorul Rodnan modificat și de prezența ulcerelor digitale cu scorul EUSTAR.

Din modelul de regresie multivariată se poate remarca faptul că pentru determinarea scorului EUSTAR, prezența ulcerelor digitale, scorul Rodnan modificat și VSH-ul joacă cel mai important rol urmași fiind de nivelurile serice ale reticuloalbinei 1 (aranjați descrescător după

coeficienții β). Analizând aceste date se poate observa faptul că la o creștere a valorilor serice ale reticulocalbinei 1 la pacienții cu sclerodermie cu 1 ng/mL, scorul EUSTAR crește în medie cu 0.03 unități (în realitate, conform intervalului de încredere 95% al coeficientului B scorul EUSTAR poate crește de la 0.02 unități până la 0.055 unități). Astfel că la o concentrație de aproximativ 40-50 ng/mL, scorul EUSTAR ar crește cu o unitate (de reamintit este faptul că pacienții din grupul high RCN1 aveau niveluri serice în jurul acestor valori).

Acest aspect este interesant de remarcat având în vedere că nivelurile serice ale reticulocalbinei 1 nu au o foarte bună valoare diagnostică pentru evaluarea bolii active (definită de un scor EUSTAR ≥ 3 , AUC=0.61, interval de încredere 95% 0.43-0.79).

CONCLUZII

1. Evaluarea studiilor de proteomică fundamentală ce au ca obiectiv analiza proteomului produselor patologice evidențiază biomarkerii proteomici candidat din respectivul produs patologic dintr-o anumită patologie. Sumarizarea biomarkerilor identificați ușurează procesul de implementare al biomarkerilor în clinică prin identificarea celor ce pot fi ulterior analizați în studii cu design superior. Sumarizarea celor 116 biomarkeri proteomici candidat pentru sclerodermie identificați prin sinteza sistematică reprezintă o valoroasă bază de date pentru viitoare studii ce vor aborda biomarkeri proteomici pentru expresia clinică din sclerodermie. O astfel de abordare este însă aplicabilă și altor patologii ce necesită biomarkeri diagnostici sau prognostici.
2. Endocanul seric (biomarker asociat disfuncției endoteliale) este un bun biomarker pentru diferențierea formei difuze de sclerodermie de cea localizată.
3. Endocanul seric s-a dovedit a fi un biomarker cu o bună capacitate predictivă pentru diferențierea fibrozei cutanate severe (definită printr-un scor Rodnan modificat >14).

4. Valorile endocanului seric par să crească pe măsură ce boala avansează, concentrațiile serice ale acestuia fiind mai mari la pacienții ce au avut durată bolii mai lungă de 3 ani. Așadar endocanul nu pare să fie un biomarker potrivit pentru evaluarea stadiilor timpurii ale bolii.
5. Endocanul seric are o capacitate relativ bună diagnostică pentru formele active de sclerodermie însă de o mai mică valoare comparativ cu reticulocalbina 1.
6. Reticulocalbina 1 serică este intens corelată cu reticulocalbina 3 atât la martorii sănătoși cât și la pacienții cu sclerodermie. Este primul studiu care a evaluat concentrația serică a reticulocalbinei 1 și 3 la pacienții cu sclerodermie.
7. Reticulocalbina 1 serică pare să fie un biomarker superior reticulocalbinei 3 serice pentru evaluarea pacienților cu sclerodermie deoarece expresia serică a reticulocalbinei 1 este superioară iar valorile reticulocalbinei 1 au fost mai bine asociate manifestărilor clinice ale pacienților cu sclerodermie.
8. Reticulocalbina 1 serică este mai degrabă un biomarker pentru stratificarea bolii sclerodermice întrucât nu s-au constatat diferențe semnificative statistic față de martorii sănătoși. Totuși se delimitează un subgrup de pacienți (aproximativ 15%) care au valori serice ale reticulocalbinei 1 semnificativ mai mari comparativ cu martorii sănătoși. Aceștia au o prevalență mai mare a afectării cutanate, vasculare și gastrointestinale (ulcere digitale, calcinoză, telangectazii, hipomotilitate esofagiană, sclerodermie formă difuză).
9. Comparativ cu endocanul seric, reticulocalbina 1 serică este un mai bun predictor al scorului EUSTAR, fiind independent asociat cu acesta.

10. Reticulocalbina 1 serică este și un biomarker al afectării gastrointestinale, concentrațiile serice ale acesteia fiind mai mari la pacienții cu hipomotilitate esofagiană.
11. Anticorpilor antifosfolipidici nu sunt biomarkeri pentru afectare clinică în sclerodermie la pacienții fără semne și simptome ale sindromului antifosfolipidic. Totuși, asocierea independentă a anticorpilor tip IgM antifosfatidiletanolamină și IgG ale anticorpilor anti beta2 glicoproteina I cu valorile scăzute ale complementului impune necesitatea urmăririi atente a pacienților cu sclerodermie și valori scăzute ale complementului pentru evitarea dezvoltării caracteristicilor clinice ale sindromului antifosfolipidic.
12. Pacienții cu sclerodermie care prezintă anticorpi antifosfatidiletanolamină, hipocomplementemie și niveluri crescute ale endocanului ar putea prezenta un fenotip mult mai activ al celulelor endoteliale comparativ cu ceilalți pacienți. Datele obținute susțin asupra posibilității de a diferenția în cadrul pacienților cu sclerodermie anumite grupe de risc bazate pe activarea și disfuncția endotelială funcție de prezența sau absența anticorpilor antifosfatidiletanolamină tip IgM, al nivelurilor scăzute ale complementului și al nivelurilor serice ale endocanului.

BIBLIOGRAFIE

1. Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2008;37(4):223-35.
2. Steen VD, Medsger TA. Changes in the causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:940–4.
3. Gurman AB, Damjanov N, Mueller A et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1809–15.

4. Kahaleh MB, Sultany GL, Smith EA, Huffstutter JE, Loadholt CB, LeRoy EC. A modified scleroderma skin scoring method. *Clin Exp Rheumatol* 1986;4:367-9.
5. Domsic RT, Rodriguez-Reyna T, Lucas M, Fertig N, Medsger Jr TA. Skin thickness progression rate: a predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:104–9.
6. Domsic RT. Scleroderma: the role of serum autoantibodies in defining specific clinical phenotypes and organ system involvement. *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(6):646-52.
7. P.J Clements. *Systemic Sclerosis*. 2nd edition. Lippincott Williams and Wilkins; 2004; 129-50.
8. Rose S, Young MA, Reynolds JC. Gastrointestinal manifestations of scleroderma. *Gastroenterol Clin North Am*. 1998;27:563–94.
9. Oddis CV, Eisenbeis Jr CH, Reidbord HE, Steen VD, Medsger Jr TA. Vasculitis in systemic sclerosis: a subset of patients with the CREST variant, Sjögren's syndrome and neurologic complications. *J Rheumatol*. 1987;14:942–8.
10. Gordon MB, Klein I, Dekker A, Rodnan GP, Medsger Jr TA. Thyroid disease in progressive systemic sclerosis: increased frequency of glandular fibrosis and hypothyroidism. *Ann Intern Med*. 1981;95:431–5.
11. Baak JP, Janssen EA, Soreide K, Heikkilae R. Genomics and proteomics--the way forward. *Ann Oncol*. 2005;16 Suppl 2:ii30-44.
12. Kumar M, Shiv KS. Biomarkers of diseases in medicine. *Current Trends of Science Platinum Jubilee Special, Indian Academy of Sciences, Bangalore, India* 2009: 403-417.
13. Sullivan Pepe M. Phases of biomarker development for early detection of cancer; *J. Natl. Cancer Inst*, 2001;93:1054–61.
14. Tanase C, Neagu M, Constantin C et al. *Proteomica de la cercetare la clinica*. Editura Viata Medicala Romaneasca, Bucuresti, 2013:18.
15. Aden N, Shiwen X, Aden D, Black C, Nuttall A, Denton CP et al. Proteomic analysis of scleroderma lesional skin reveals activated wound healing phenotype of epidermal cell layer. *Rheumatology (Oxford)* 2008 ; 47:1754-60.
16. Baldini C, Giusti L, Ciregia F, Da Valle Y, Giacomelli C, Donadio E et al. Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjogren's syndrome from

- secondary Sjogren's syndrome and other sicca syndromes. *Arthritis Res Ther* 2011;13: R194.
17. Bargagli E, Olivieri C, Prasse A, Bianchi N, Magi B, Cianti R et al. Calgranulin B (S100A9) levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Inflammation* 2008; 31:351-4.
 18. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Singleton CB, Bethard JR, Silver RM. Proteomic analysis of CTGF-activated lung fibroblasts: Identification of IQGAP1 as a key player in lung fibroblast migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295: L603-1.
 19. Chiang TM, Postlethwaite AE. Increase in phosphatidylinositol-3 kinase activity by nitrotyrosylation of lysates of platelets from patients with systemic sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760: 32-7.
 20. De Santis M, Inzitari R, Bosello SL, Peluso G, Fanali C, Iavarone F et al. (beta)-Thymosins and interstitial lung disease: study of a scleroderma cohort with a one-year follow-up. *Respir Res* 2011;12:22.
 21. Del Galdo F, Shaw MA, Jimenez SA. Proteomic analysis identification of a pattern of shared alterations in the secretome of dermal fibroblasts from systemic sclerosis and nephrogenic systemic fibrosis. *Am J Pathol* 2010;177:1638-46.
 22. Guerranti R, Bertocci E, Fioravanti A, Papakostas P, Montella A, Guidelli GM et al. (2010). Serum proteome of patients with systemic sclerosis: Molecular analysis of expression and prevalence of haptoglobin alpha chain isoforms. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23: 901-9.
 23. Fietta A, Bardoni A, Salvini R, Passadore I, Morosini M, Cavagna L et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res. Ther* 2006;8:R160.
 24. Giusti L, Bazzichi L, Baldini C, Ciregia F, Mascia G, Giannaccini G et al. Specific proteins identified in whole saliva from patients with diffuse systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007;34:2063-9.
 25. Landi C, Bargagli E, Bianchi L, Gagliardi A, Carleo A, Bennett D et al. Towards a functional proteomics approach to the comprehension of idiopathic pulmonary fibrosis,

sarcoidosis, systemic sclerosis and pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *J Proteomics* 2013;83:60-75.

26. Larsen K, Malmstrom J, Wildt M, Dahlqvist C, Hansson L, Marko-Varga G et al. Functional and phenotypical comparison of myofibroblasts derived from biopsies and bronchoalveolar lavage in mild asthma and scleroderma. *Respir Res* 2006;7.
27. Rottoli P, Magi B, Perari MG, Liberatori S, Nikiforakis N, Bargagli E et al. Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systematic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* 2005;5:1423-30.
28. Scambi C, La V, De Franceschi L, Barausse G, Poli F, Benedetti F et al. (2010). Comparative proteomic analysis of serum from patients with systemic sclerosis and sclerodermatous GVHD. Evidence of defective function of factor H. *PLoS One* 2010; 5:e12162.
29. Shirahama R, Miyazaki Y, Okamoto T, Inase N, Yoshizawa Y. Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in lung fibrosis associated with systemic sclerosis. *Allergol Int* 2010;59:409-15.
30. Van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L et al. Proteome-wide Analysis and CXCL4 as a Biomarker in Systemic Sclerosis. *N.Engl.J Med* 2014;370:433-43.
31. Xiang Y, Matsui T, Matsuo K, Shimada K, Tohma S, Nakamura H et al. Comprehensive investigation of disease-specific short peptides in sera from patients with systemic sclerosis: Complement C3f-des-arginine, detected predominantly in systemic sclerosis sera, enhances proliferation of vascular endothelial cells. *Arthritis Rheum* 2007;56:2018-30.