

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

***Diagnosticul precoce și evaluarea prognosticului în sclerodermia
sistemică***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. VICTOR STOICA

Student-doctorand:

DR. RUCSANDRA DOBROTĂ

2019

Cuprins

Introducere	3
I. Partea generală	4
1. Sclerodermia sistemică – aspecte generale.....	4
1.1. Epidemiologie	4
1.2. Noțiuni actuale de patogeneză – rolul citokinelor.....	4
1.3. Diagnosticul precoce și clasificarea sclerodermiei sistemice.....	4
1.4. Aspecte clinice și evolutive.....	4
1.4.1. Fibroza cutanată – tablou clinic, diagnostic și evaluarea severității.....	4
1.4.2. Fibroza pulmonară interstițială – tablou clinic, diagnostic și evaluarea severității.....	4
1.4.3. Afectarea vasculară periferică– tablou clinic, diagnostic și evaluarea severității	4
2. Managementul pacienților cu sclerodermie sistemică	5
2.1. Monitorizarea evoluției pacienților cu sclerodermie sistemică – aspecte generale.....	5
2.2. Screeningul și monitorizarea fibrozei interstițiale pulmonare asociate sclerodermiei sistemice	5
2.3. Stratificarea prognostică – stadiul actual al cunoașterii în sclerodermia sistemică	5
2.3.1. Predicția evoluției fibrozei cutanate	5
2.3.2. Predicția evoluției fibrozei pulmonare interstițiale	5
2.3.3. Predicția evoluției afectării vasculare periferice	6
2.4. Biomarkeri serici în sclerodermia sistemică – stadiul actual al cunoașterii	6
2.5. Perspective și provocări pentru stratificarea riscului și studiile clinice în sclerodermia sistemică	6
II. Contribuții personale.....	7
Ipoteza de lucru și obiective generale	7
3. Predictorii pentru regresia fibrozei pielii la pacienți cu sclerodermie sistemică cu afectare cutanată difuză	7
3.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice).....	7
3.2. Pacienți și metode	7
3.2.1. Cohorta și design-ul studiului	7
3.2.2. Analiza statistică	7
3.3. Rezultate.....	8
3.3.1. Populația de studiu	8
3.3.2. Analiza univariabilă	8
3.3.3. Analiza multivariabilă	8
3.3.4. Validarea modelului de predicție pentru regresia fibrozei pielii la un an	8
3.3.5. Valoarea inițială a mRSS și evoluția fibrozei pielii în ScS-d pe parcursul unui an	8
3.4. Discuții	9

3.5. Concluzii	9
4. Screeningul si diagnosticul precoce al pneumopatiei interstițiale fibrozante asociate sclerodermiei sistemice: probele funcționale respiratorii au o rată crescută de rezultate fals negative.....	10
4.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice).....	10
4.2. Pacienți și metode	10
4.2.1. Cohorta de pacienți.....	10
4.2.2. Tomografia computerizată de înaltă rezoluție.....	10
4.2.3. Testele funcționale pulmonare	10
4.2.4. Analiza statistică	10
4.3. Rezultate.....	10
4.3.1. Populația de studiu	10
4.3.2. Performanța FVC pentru diagnosticul ScS-ILD	11
4.3.3. Sensibilitatea și specificitatea PFR pentru diagnosticul ScS-ILD.....	11
4.3.4. Predictorii pentru fibroza pulmonară la pacienții cu FVC normală	12
4.4. Discuții	12
4.5 Concluzii	13
5. Biomarkeri serici în sclerodermia sistemică precoce	13
5.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice).....	13
5.2. Pacienți și metode	13
5.2.1. Pacienți si design-ul studiului	13
5.2.2. Analiza de laborator	13
5.2.3. Selecția markerilor de analizat	14
5.2.4. Analiza statistică	14
5.3. Rezultate.....	14
5.3.1. Populația de studiu	14
5.3.2. Nivelul citokinelor circulante este diferit la pacienții cu ScS precoce față de subiecții sănătoși.....	14
5.3.3. Nivelul citokinelor serice se asociază cu fenotipul ScS	15
5.4. Discuții	16
5.5. Concluzii	16
6. Concluzii și contribuții personale	17
6.1. Concluzii	17
6.2. Contribuții personale	19
Bibliografie (selectivă).....	20

Introducere

Sclerodermia sistemică (ScS) este o afecțiune autoimună complexă, asociată cu o morbiditate și mortalitate semnificativă, în mare parte datorită diagnosticului frecvent tardiv (Allanore et al., 2015). Heterogenitatea bolii face extrem de dificil răspunsul la întrebarea «cine», «când» și cu «care medicament» ar trebui tratat (Dobrota et al., 2014). Necesitatea depistării precoce și a identificării factorilor predictivi pentru o evoluție nefavorabilă, care reprezintă și subiectul tezei de față, sunt priorități în domeniul ScS.

Subiectul diagnosticului precoce al ScS m-a atras începând cu proiectul lucrării de diplomă, sub îndrumarea Domnului Profesor Dr. Victor Stoica și a doamnei Șef de lucrări, Dr. Carina Mihai. Interesul personal și actualitatea și relevanța în domeniu, atât pe plan național cât și internațional, m-au determinat să aleg tema proiectului de cercetare doctorală.

Facilitând de o bursă EULAR (European League Against Rheumatism) și de bursa Articulum pentru tineri cercetători, am realizat proiectele doctorale în cadrul centrului de cercetare în ScS afiliat spitalului universitar din Zurich, sub coordonarea Prof. Oliver Distler. Acest centru monitorizează una dintre cele mai mari cohorte locale de pacienți cu ScS, însumând peste 400 de pacienți, fiind centru fondator EUSTAR (EUropean Scleroderma Trials and Research) și centru de excelență EULAR. Centrul dispune de un laborator de medicină moleculară cu experiență. Proiectele au fost realizate în strânsă colaborare cu echipa din centrul EUSTAR 100 din București, Spitalul Cantacuzino (Dr. Carina Mihai).

Primul studiu, realizat cohorta amplă EUSTAR, identifică scorul de fibroză cutanată la prima vizită drept cel mai important factor predictiv pentru regresia fibrozei cutanate la un an, important pentru aprecierea riscului în practica clinică, și pentru selecția optimă a pacienților înrolați în studii clinice (Dobrota et al., 2016). Al doilea studiu investighează screening-ul fibrozei pulmonare, principala cauză actuală de mortalitate în ScS. Rezultatele noastre au dovedit că folosirea exclusivă a probelor respiratorii funcționale nu este suficientă pentru diagnosticul precoce al fibrozei pulmonare asociate ScS, având o rată înaltă de rezultate fals negative în comparație cu „standardul de aur”, tomografia computerizată de înaltă rezoluție (Suliman*, Dobrota* et al., 2015). Al treilea investighează biomarkeri serici într-o cohortă de pacienți cu ScS precoce. Rezultatele preliminare ale acestei analize oferă dovada că diverși markeri circulanți sunt exprimați diferit față de subiecții sănătoși chiar și în serul acestor pacienți cu manifestări clinice discrete și se asociază cu clasificarea ca ScS și cu elemente clinice specifice.

I. Partea generală

1. Sclerodermia sistemică – aspecte generale

1.1. Epidemiologie

Sclerodermia sistemică este o boală rară, aparținând grupului bolilor orfane (Denton, Khanna, 2017).

1.2. Noțiuni actuale de patogeneză – rolul citokinelor

Citokinele sunt considerate elemente cheie în patogeneza ScS (Baraut, 2010), cu potențial drept posibili biomarkeri. Nu există încă nici un biomarker seric cu valoare prognostică și de evaluare a răspunsului la tratament validat în ScS (Castro, Jimenez, 2010).

1.3. Diagnosticul precoce și clasificarea sclerodermiei sistemice

Diagnosticul precoce al ScS este o prioritate în managementul acesteia (Denton, Khanna, 2017). SS se clasifică în forma cu afectare cutanată difuză, sau limitată (Le Roy et al., 1988), respectiv conform criteriilor ACR/EULAR 2013 (Van den Hoogen et al., 2013).

1.4. Aspecte clinice și evolutive

Tabloul clinic, precum și pattern-ul evolutiv al ScS prezintă un spectru extrem de polimorf, cu afectarea pielii și a organelor interne (Varga, 2008).

1.4.1. Fibroza cutanată – tablou clinic, diagnostic și evaluarea severității

Fibroza pielii este evaluată cu ajutorul scorului cutanat Rodnan modificat (mRSS), atât în practica clinică, cât și studii clinice (Khanna et al., 2017).

1.4.2. Fibroza pulmonară interstițială – tablou clinic, diagnostic și evaluarea severității

ILD reprezintă principala cauză de deces în ScS (Tyndall et al., 2012). Nu există încă o definiție standardizată pentru ScS-ILD. Studii bazate pe investigații computer-tomografice de înaltă rezoluție (HRCT) au raportat o prevalență între 60 și 91% (Moore et al., 2013). Evaluarea ILD în practica clinică include probe funcționale respiratorii (PFR), testul de mers 6 minute (6MWT) și metode imagistice (radiografie pulmonară, HRCT), fără a exista însă un consens asupra protocolului optim de diagnostic și monitorizare (Dobrota et al., 2015).

1.4.3. Afectarea vasculară periferică– tablou clinic, diagnostic și evaluarea severității

Clinic se observă sindromul Raynaud, ischemia digitală și ulcerațiile digitale, iar la videocapilaroscopia periunghială specificul «pattern sclerodermic» (Cutolo et al., 2000).

2. Managementul pacienților cu sclerodermie sistemică

ScS este asociată cu una dintre cele mai ridicate rate de morbiditate și mortalitate dintre bolile de țesut conjunctiv (Varga, 2008). Diagnosticul precoce, evaluarea și managementul personalizat, stratificat conform riscului evolutiv, reprezintă concepte esențiale în managementul modern al ScS (Dobrota, 2014).

2.1. Monitorizarea evoluției pacienților cu sclerodermie sistemică – aspecte generale

Monitorizarea SSc include vizite anuale pentru o evaluare sistemică (Walker, 2007), necesitând algoritme de screening pentru fiecare organ țintă în parte (Allanore et al., 2015).

2.2. Screeningul și monitorizarea fibrozei interstițiale pulmonare asociate sclerodermiei sistemice

Explorarea pulmonară este esențială la diagnostic și la evaluarea în evoluție (Denton et al., 2018), prin PFR și radiografia pulmonară sau HRCT (Denton et al., 2018). Standardul de aur pentru diagnosticul ScS-ILD este HRCT pulmonar, care permite și stabilirea pattern-ului de afectare și al extinderii bolii (Denton et al., 2018). Uzual se recomandă HRCT pulmonar pacienților cu suspiciune clinică sau la PFR pentru ILD (Bussone, Mouthon, 2011). Pentru monitorizare, PFR sunt recomandate ca investigație de primă intenție.

2.3. Stratificarea prognostică – stadiul actual al cunoașterii în sclerodermia sistemică

O primă etapă cheie în îngrijirea pacienților cu ScS este definirea fenotipului bolii și a stadiului de evoluție (Shah, Wigley, 2013).

2.3.1. Predicția evoluției fibrozei cutanate

Identificarea predictorilor de modificare a mRSS în cursul evoluției bolii este de mare interes atât pentru un management clinic adaptat la risc cât și pentru proiectarea studiilor clinice (Lafyatis, 2012). Predictorii ai progresiei cutanate în ScS-d sunt durata scurtă a bolii (<15 luni), sinovita și mRSS scăzut la baseline ($>7/51$ și $\leq 22/5$) (Maurer et al., 2015). Predictorii ameliorării fibrozei cutanate la pacienții cu ScS rămân prea puțin înțeleși.

2.3.2. Predicția evoluției fibrozei pulmonare interstițiale

În ScS, deși ILD este frecventă și potențial severă, nu toți pacienții prezintă o afectare pulmonară semnificativă clinic. Extensia ILD la baseline în HRCT pare a fi cel mai important predictor pentru o evoluție negativă și factorul decisiv în decizia inițierii tratamentului (Moore et al., 2013; Denton et al., 2018).

2.3.3. Predicția evoluției afectării vasculare periferice

Videocapilaroscopia (Dobrota et al., 2014; Mihai et al., 2018) sau biomarkerii serici sunt posibil predictorii de interes, de exemplu PGIF sau IL-6 pentru UD (Avouac et al., 2012; Alivernini, 2009).

2.4. Biomarkeri serici în sclerodermia sistemică – stadiul actual al cunoașterii

În ansamblu, profilul citokinelor asociate cu limfocitele T helper tip 2 (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, MCP-1) și cu limfocitele T helper tip 1 (TGF- α , IL-2, CXCL-10) este crescut în sângele periferic al pacienților cu ScS decât în populația sănătoasă (Baraut et al., 2010).

În ScS nu există încă biomarkeri validați. Heterogenitatea studiilor și a metodologiei utilizate, precum și loturile relativ mici de pacienți, este un impediment. Realizarea de studii pe cohorte bine definite, urmărite longitudinal, este necesară pentru evaluarea optimă a potențialilor biomarkeri circulanți documentați în ScS (Hummers, 2010).

2.5. Perspective și provocări pentru stratificarea riscului și studiile clinice în sclerodermia sistemică

Nici o abordare terapeutică nu s-a dovedit până în prezent general eficientă în ScS (Allanore et al., 2015). Este esențială dezvoltarea de algoritmi pentru stratificarea pacienților la risc, precum și adaptarea conformă managementului clinic. Combinarea de metode serologice (de exemplu, profilul anticorpilor sau citokine circulante), cu date moleculare și genetice provenite din analiza de biopsii cutanate poate fi o strategie în acest sens (Denton, Khanna, 2017). Recunoașterea pacienților cu risc înalt pentru o evoluție nefavorabilă, precum și utilizarea metodelor optime de screening periodic pentru identificarea unor posibile complicații, este extrem de importantă pentru prevenția afectării severe a organelor interne și pentru inițierea tratamentului la momentul oportun, individualizat fiecărui pacient (McHannan, Hummers, 2013; Dobrota et al., 2014). Studii clinice „proof of concept” incluzând markeri serici și/sau analiza histologică a biopsiilor cutanate ar putea reprezenta o cale de a transloca descoperiri promițătoare în cercetarea de laborator către domeniul aplicabilității drept noi ținte terapeutice (Dobrota et al., 2017). Un alt aspect important este strategia de recrutare în studiile clinice, la care trebuie ținut cont de implementarea de metode de îmbogățire a cohortelor cu pacienți cu risc semnificativ de progresie a bolii, care ar putea profita cel mai mult de efectul tratamentului testat și ar permite identificarea unui efect semnificativ (Chung et al., 2012; Dobrota et al., 2017).

II. Contribuții personale

Ipoteza de lucru și obiective generale

Ipotezele și obiectivele generale ale celor trei proiecte de cercetare originale prezentate în capitolele următoare pot fi rezumate după cum urmează:

1. Predicția fibrozei cutanate și optimizarea metodelor de selecție în studiile clinice axate pe fibroză – predicția regresiei mRSS (Dobrota et al., 2016).
2. Optimizarea metodelor de screening în sclerodermia sistemică – rolul probelor respiratorii funcționale în fibroza pulmonară interstițială (Dobrota et al., 2015).
3. Identificarea de predictori pentru evoluția bolii și manifestările de organ – explorarea de biomarkeri serici din familia citokinelor la pacienți cu ScS precoce.

3. Predictori pentru regresia fibrozei pielii la pacienți cu sclerodermie sistemică cu afectare cutanată difuză

3.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)

Regresia fibrozei cutanate face parte din evoluția naturală a ScS-d, dar factorii care prezic această ameliorare sunt încă necunoscuți.

Ne-am propus identificarea de predictori pentru regresia fibrozei cutanate la pacienții cu ScS-d, pentru optimizarea criteriilor de recrutare a pacienților în studii clinice axate pe fibroză și pentru orientarea evaluării riscului evolutiv în practica clinică.

3.2. Pacienți și metode

3.2.1. Cohorta și design-ul studiului

Am realizat un studiu observațional al cohortei internaționale de pacienți cu sclerodermie sistemică EUSTAR, incluzând pacienți cu ScS-d, îndeplinind criteriile de clasificare ACR 1980, cu mRSS ≥ 7 la prima vizită (baseline) și valori disponibile pentru mRSS la 12 ± 2 luni. Datele EUSTAR sunt colectate prospectiv în toate centrele participante pe baza unui protocol standardizat (Muller-Ladner et al., 2014; Walker et al., 2007).

3.2.2. Analiza statistică

Principalul outcome, regresia fibrozei cutanate, a fost definit ca o scădere a mRSS cu peste 5 puncte și cu $\geq 25\%$ pe parcursul unui an. Aceste valori prag au fost stabilite pentru a respecta diferența minimă clinic importantă definită anterior (Khanna et al., 2006). Progresia fibrozei cutanate (outcome secundar) a fost definită ca o creștere a mRSS de peste

5 puncte și cu ≥ 25 % pe parcursul unui an (Maurer et al., 2015). A fost aplicat un model de regresie logistică multivariabilă după imputarea datelor lipsă, validat prin bootstrap.

3.3. Rezultate

3.3.1 Populația de studiu

Au fost analizați în total 919 pacienți cu ScS-d; 218/919 (24%) au prezentat o ameliorare a fibrozei pielii după un an, 78.3% de sex feminin, cu mRSS minim de 7 puncte (conform criteriilor de includere), până la un maxim de 51 de puncte.

3.3.2. Analiza univariabilă

Valoarea mRSS la baseline a prezentat asocierea cea mai semnificativă cu regresia fibrozei pielii la un an ($p < 0.001$).

3.3.3. Analiza multivariabilă

Conform analizei multivariabile, cel mai important predictor pentru regresia fibrozei cutanate la un an în analiza de regresie logistică după unică imputare a valorilor lipsă a fost valoarea inițială a mRSS la baseline ($p < 0,001$). Alți predictorii semnificativi au fost absența fricțiunilor tendinoase și negativitatea anticorpilor Anti-topo.

3.3.4. Validarea modelului de predicție pentru regresia fibrozei pielii la un an

Modelul de predicție a fost validat cu succes prin metoda bootstrap.

3.3.5. Valoarea inițială a mRSS și evoluția fibrozei pielii în ScS-d pe parcursul unui an

Confirmând rezultate anterioare (Maurer et al, 2015), 95/919 (10%) din pacienții ScS-d care au prezentat progresie a pielii în termen de un an a avut un mRSS inițial mai mic ($p < 0,001$). Valoarea inițială mRSS este, prin urmare, un predictor al tiparului de progresie, respectiv de regresie a fibrozei pielii. Pacienții cu scoruri mRSS mai mici la baseline sunt predispuși la progresie, iar cei cu scoruri mai mari sunt predispuși la regresia fibrozei pielii, în următoarele 12 luni. Pentru optimizarea cohortelor pentru studii clinice, este necesară includerea unui număr maxim de pacienți progresivi și unui număr cât mai redus minim de pacienți cu o tendință spontană de regresie. În această cohortă, o valoare superioară prag a mRSS de 18 puncte s-a comportat cel mai bine, incluzând cea mai mare proporție de pacienți cu risc de progresie (78,9%), și cea mai mică proporție de pacienți cu tendință către regresia fibrozei pielii (35,3%, Figura II.2.). Dat fiind faptul că un scor cutanat superior de 18 puncte ar putea limita includerea multor pacienți cu fibroză în eventual studii, am analizat performanța ridicării limitei superioare a mRSS. Rezultatele au arătat că pentru includerea în studiile clinice axate pe fibroză un interval al mRSS la baseline între 7 și 25 de puncte ar performa acceptabil.

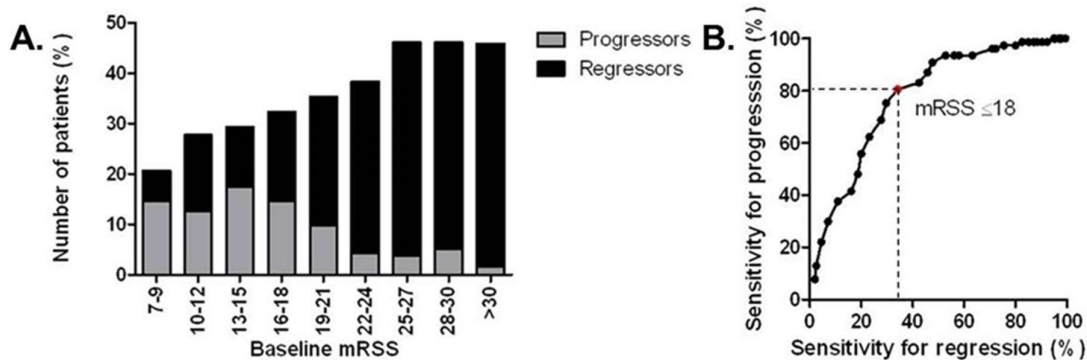


Figura II.2.

A. Procentajul pacienților cu progresie, respectiv cu regresie, a fibrozei pielii raportat la valoarea inițială a mRSS. Pacienții cu scor cutanat mai redus sunt mai susceptibili de a progresa, cei cu scoruri cutanate mai crescute sunt mult mai susceptibili de a regresa.

B. Sensibilitatea pentru progresie și regresie a diferitelor valori prag pentru mRSS la baseline. Un scor mRSS de 18 puncte a avut sensibilitatea optimă.

(Sursa: Dobrota R, Maurer B, Graf N, Jordan S, Mihai C, Kowal-Bielecka O, Allanore Y, Distler O, co-autorii EUSTAR. Prediction of improvement in skin fibrosis in diffuse cutaneous systemic sclerosis – a EUSTAR analysis. Ann Rheum Dis. 2016 Oct; 75(10):1743-8.)

3.4. Discuții

În această amplă analiză EUSTAR incluzând 919 pacienți cu ScS-d am identificat parametrii care pot prezice o îmbunătățire a fibrozei cutanate pe parcursul a 12 luni de monitorizare, cel mai puternic predictor fiind valoarea inițială a mRSS. Aceasta este prima raportare a unui model bazat pe dovezi pentru predicția regresiei fibrozei cutanate într-un grup neselectat de pacienți cu ScS-d.

3.5. Concluzii

- Valoarea mRSS la baseline este cel mai important factor predictiv pentru regresia fibrozei cutanate după un an.
- Pacienții cu scoruri de fibroză cutanată ridicate la baseline și care nu prezintă fricțiuni tendinoase au o probabilitate crescută de a se ameliora după un an.
- Scorul mRSS la baseline poate fi utilizat în clinică pentru estimarea și stratificarea riscului de progresie / regresie a fibrozei pielii în ScS-d.
- În această cohortă, un interval al mRSS între 7 și 25 puncte a permis includerea unui procent maxim de pacienți cu progresia fibrozei pielii și un procent acceptabil de pacienți care au regresat după un an de urmărire.

4. Screeningul și diagnosticul precoce al pneumopatiei interstițiale fibrozante asociate sclerodermiei sistemice: probele funcționale respiratorii au o rată crescută de rezultate fals negative

4.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)

Fibroza pulmonară interstițială (ILD) este frecventă în ScS și reprezintă principala cauză de mortalitate (Tyndall et al., 2012). PFR, deși larg folosite, nu au fost încă validate pentru screening sau pentru formele incipiente de ScS-ILD. Un astfel de test ar trebui să prezinte o sensibilitate crescută și o specificitate cât mai bună. Ne-am propus să testăm performanța și utilitatea PFR drept teste pentru screening-ul și diagnosticul precoce al ScS-ILD, folosind HRCT pulmonar drept standard de referință.

4.2. Pacienți și metode

4.2.1. Cohorta de pacienți

În studiu au fost incluși pacienți din practica clinică curentă între mai 2010 și noiembrie 2013, care au îndeplinit criteriile de clasificare ACR 1980 pentru ScS și care nu prezentau afecțiuni pulmonare severe, care ar fi putut influența interpretarea HRCT sau PFR.

4.2.2. Tomografia computerizată de înaltă rezoluție

Imaginile HRCT au fost evaluate în orb de doi experți radiologi, pentru absența sau prezența ILD și conform sistemului de stadializare semi-cantitativă definit de Goh et al.

4.2.3. Testele funcționale pulmonare

PRF au fost măsurate conform ghidurilor în vigoare, cu echipamentul standard. Au fost testate diferite combinații ale PFR și eficacitatea fiecăreia în detectarea ScS-ILD.

4.2.4. Analiza statistică

Au fost calculați următorii indicatori de performanță ai PFR pentru diagnosticarea ILD, luând în considerare HRCT toracal ca standard de referință: sensibilitate, specificitate, rata probabilității pozitive (LR(+), raportul dintre pacienții cu un rezultat pozitiv al testului în prezența bolii și cei cu un rezultat pozitiv în absența bolii), rata probabilității negative (LR(-), raportul dintre cei cu un rezultat negativ al testului în prezența bolii și cei cu rezultat negativ al testului în absența bolii), rata fals negativă, rata fals pozitivă.

4.3. Rezultate

4.3.1. Populația de studiu

Lotul de studiu, însumând 102 pacienți, cuprinde 77% pacienți de sex feminin, cu vârsta medie de 58.5 ani, 41% cu ScS-d, cu durata medie a bolii de 6 ani. Majoritatea

pacienților sunt ANA pozitivi (97%); 39% cu anticorpi Anti-topo, 27% ACA, iar 10% Anti-ARN-Pol3, 81% cu dispnee ușoară, NYHA I-II, 5% cu hipertensiune arterială pulmonară.

Mai puțin de o treime dintre pacienți (27/102, 26%) au prezentat un FVC patologic ($<80\%$), îndeplinind astfel definiția uzuală a sindromului respirator restrictiv în ScS. Un $TLC < 80\%$ scăzut s-a observat la 23.5%, iar $DLCO < 70\%$ la 40%. Folosind o definiție mai largă a sindromului restrictiv (orice scădere a PFR și $FEV1/FVC$ normal), 52/77 (67.5%) dintre pacienții cu date valide au putut fi clasificați drept având sindrom respirator restrictiv.

Pe de altă parte, folosind modificările la HRCT pulmonar, fibroza pulmonară a fost detectată la 64/102 (63.0%) dintre pacienți.

4.3.2. Performanța FVC pentru diagnosticul ScS-ILD

În total, 59/102 (57.0%) dintre pacienți au prezentat o concordanță corectă între FVC și standardul de referință, HRCT pulmonar. Dintre aceștia, 35/102 (34.0%) dintre pacienți au prezentat atât valori normale ale FVC cât și ale HRCT (FVC-/HRCT-), în timp ce 24/102 (23.0%) au prezentat atât $FVC < 80\%$ cât și fibroză pulmonară la HRCT (FVC+/HRCT+).

Pacienții cu FVC+/HRCT+ au prezentat valori mai scăzute ale DLCO, desaturare după efort mai frecventă, precum și rezistență la efort mai scăzută, în comparație cu pacienții din grupa FVC-/HRCT- (toate semnificative statistic, $p < 0.05$).

Un **diagnostic fals pozitiv** al ScS-ILD folosind FVC a fost rar în cohorta de studiu (3/38 pacienți. **Rezultate fals negative** (FVC-/HRCT+), au fost prezente la un număr considerabil de 40/75 pacienți (53.0%). Astfel, dacă am folosi doar FVC, am calculat o rată de rezultate fals negative de 62.5%.

Fibroza pulmonară în grupul „fals negativ” a fost moderată la 34/40 ($<20\%$), intermediară la 1/40, severă la 5/40 ($>20\%$). Majoritatea au prezentat simptome respiratorii ușoare (dispnee NYHA I-II în proporție de 91% la cei cu $ILD < 20\%$ și 80% la cei cu $ILD > 20\%$). Majoritatea au prezentat ScS-I limitată, iar durata bolii a fost variată, de la < 3 ani până la peste 10 ani.

4.3.3. Sensibilitatea și specificitatea PFR pentru diagnosticul ScS-ILD

După cum se vede în Tabelul II.7., o dată cu adăugarea mai multor elemente la definiția sindromului restrictiv, rata fals negativă a scăzut gradual, iar sensibilitatea a crescut, cu prețul unei scăderi a specificității. (Tabelul II.7.).

Probabilitatea negativă persistent ridicată, de 0.6, sugerează însă că probabilitatea unui pacient cu ILD de a avea PFR normale este de până la 60% din aceea a unui pacient fără ILD (Tabelul II.7.).

Tabelul II.7. Evaluarea performanței testelor respiratorii funcționale pentru diagnosticul ScS-ILD, folosind diferite definiții (adaptat după Dobrota et al., 2015)

Parametru	FVC<80 %	FVC<80% sau $\Delta FVC \geq 10$ %*	FVC<80 % sau TLC<80 %	FVC<80% sau DLCO<70 %	FVC<80% sau TLC<80% sau DLCO<70 %	FVC<80% sau $\Delta FVC \geq 10$ % sau TLC<80% sau DLCO<70% [§] și FEV1/FVC> 0.7**
Rata fals negativă	62.5% (40/64)	44.7% (21/47)	55.0% (35/64)	41.0% (26/64)	37.0% (24/64)	27.0% (15/54)
Rata fals pozitivă	7.9% (3/38)	31.0% (6/19)	13.2% (5/38)	34.3% (13/38)	37.0% (14/38)	56.0% (13/23)
Sensibilitate	37.5% [0.3-0.5]	55.3% [0.4-0.7]	45.0% [0.3-0.5]	59.0% [0.4-0.7]	62.0% [0.5-0.7]	72.0% [0.6-0.8]
Specificitate	92% [0.8-1.0]	68.4% [0.5-0.8]	86.0% [0.7-0.9]	65.8% [0.5-0.7]	63.0% [0.4-0.7]	43.0% [0.3-0.6]
Probabilitatea pozitivă	4.7 [1.5-14.7]	1.7 [0.8-3.5]	3.4 [1.4-8.1]	1.7 [1.0-2.8]	1.7 [1.0-2.6]	1.3 [0.9-1.9]
Probabilitatea negativă	0.7 [0.5-0.8]	0.6 [0.4-1.0]	0.6 [0.4-0.8]	0.6 [0.4-0.9]	0.6 [0.4-0.8]	0.6 [0.3-1.2]

4.3.4. Predictorii pentru fibroza pulmonară la pacienții cu FVC normală

La analiza multivariabilă, absența ACA a fost predictor independent al fibrozei pulmonare la pacienții cu FVC normal (OR 0.3, 95%CI [0.07-0.89], p 0.033).

4.4. Discuții

Conform rezultatelor prezentate, PFR au o sensibilitate scăzută pentru detectarea ScS-ILD, mai ales pentru cazurile precoce și cvasiasimptomatice. În această cohortă, sensibilitatea PFR pentru diagnosticul ScS-ILD a variat de la 37.5% pentru FVC<80% până la 72.0% pentru definiția folosind combinația tuturor PFR. Cu atât mai important, am observat o rată de rezultate fals negative foarte ridicată, de 62.5% pentru FVC, respectiv 27.0% pentru definiția folosind toate PFR, și o rată ridicată a probabilității negative. Astfel, folosirea exclusivă a PFR este insuficientă pentru a exclude prezența ILD în ScS. Discordanțe semnificative între PFR și HRCT au fost semnalate și de alte studii din literatură

(Remy-Jardin et al., 1993). Important, în această cohortă, nu numai cazuri moderate de ILD au fost „ratate” prin folosirea PFR, ci și cazuri cu afectare pulmonară severă, >20%.

4.5 Concluzii

- PFR prezintă o rată a probabilității negative pentru diagnosticul ILD prea ridicată pentru a se califica drept test de screening, respectiv de diagnostic precoce.
- PFR au performat în această cohortă suboptimal în screeningul și diagnosticul ScS-ILD în comparație cu standardul de aur, HRCT.
- Metode de investigație suplimentare PFR trebuie luate în considerare pentru screeningul și diagnosticul precoce al ScS-ILD, mai ales în cazul pacienților ACA-negativi.

5. Biomarkeri serici în sclerodermia sistemică precoce

5.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)

Citokinele sunt elemente cheie în cascada patogenetică a ScS (Baraut et al., 2010), prezentând interes drept biomarkeri cu rol prognostic al evoluției, respectiv al complicațiilor bolii, dar nu există încă nici un biomarker validat care să îndeplinească acest deziderat în ScS (Castro, Jimenez, 2010). Ne propunem explorarea citokinelor circulante și identificarea de biomarkeri circulanți cu rol predictiv pentru dezvoltarea și evoluția ScS la pacienții cu forme precoce de boală, care ar putea fi folosiți în practica clinică și în studiile clinice.

5.2. Pacienți și metode

5.2.1. Pacienți și design-ul studiului

Acest proiect translațional include pacienți majori cu sclerodermie sistemică precoce, definită conform criteriilor diagnostice propuse de EUSTAR (Avouac et al., 2011; Matucci-Cerinic et al., 2009): prezența fenomenului Raynaud, puffy fingers, sclerodactiliei incipiente, anticorpilor antinucleari sau specifici (Anti-topo, ACA), sau a patternului capilaroscopic sclerodermic. Pacienții au fost urmăriți clinic prospectiv conform standardelor EUSTAR și au fost analizate probele de ser de la prima vizită, precum și un lot martor, reprezentat de voluntari sănătoși înregistrați la centrul de cercetare din Zurich.

5.2.2. Analiza de laborator

Pentru analiza markerilor serici selectați a fost folosită metoda Luminex, o metodă modernă care permite testarea simultană a mai multor analiți într-o cantitate mică de ser. Toate probele au fost testate în duplicat, de către RD, cu analizorul Bio-Rad Bio-Plex.

5.2.3. Selecția markerilor de analizat

După o cercetare amplă a literaturii, am ales 10 markeri „candidați”, conform opiniei expertului (Prof. Distler): IL-6 (Interleukina 6), MCP-1 (proteina chemotactică monocitară 1), ICAM-1 (molecula de adezivitate intercelulară), VCAM-1 (molecula de adezivitate vasculară), VEGF (factorul de creștere vascular endotelial), E-selectina, P-selectina, PIGF (factorul de creștere placentar), Thrombospondina-2, Osteopontina.

5.2.4. Analiza statistică

Au fost analizate date clinice și serologice de la baseline, precum și, acolo unde au fost disponibile, datele clinice de la vizita de follow-up următoare (la 12±3 luni). Performanța markerilor pentru identificarea ScS precoce a fost analizată prin metoda receiver operating curve (ROC). Pentru comparațiile între grupuri au fost folosite testele Mann-Whitney și Kruskal-Wallis, respectiv Chi-pătrat. Pentru a investiga eventuali factori de risc pentru dezvoltarea ScS în evoluție a fost aplicată analiza predictivă prin regresie logistică binară. Analiza statistică a fost efectuată în programul SPSS versiunea 19.0.

5.3. Rezultate

5.3.1. Populația de studiu

Am analizat 122 de pacienți cu ScS precoce din trei centre distincte, și 54 de probe constituind lotul martor (voluntari sănătoși), din Zurich. Majoritatea subiecților au fost de sex feminin (91%), cu vârsta mediană de 55 ani și o mediană de 5 ani de la debutul sindromului Raynaud. Cel mai frecvent au fost observate teleangiectaziile (27%) și „puffy fingers” (48%), sclerodactilie (17%) și sinovită (17%), serologic ANA (95%), ACA (53%), rar Anti-topo (10%) sau Anti-ARN-Pol3 (7%); 54% au prezentat modificări capilaroscopice tipice ScS, puțini ScS-ILD (13%) sau PAH (5%); 46% dintre pacienți au îndeplinit criteriile de clasificare ACR/EULAR 2013 pentru ScS la baseline, iar 8 pacienți adiționali (13% dintre pacienții inițiali negativi), au fost nou clasificați ca ScS după un an.

5.3.2. Nivelul citokinelor circulante este diferit la pacienții cu ScS precoce față de subiecții sănătoși

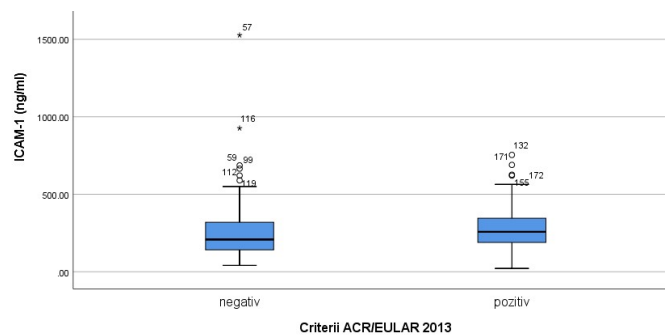
Dintre markerii analizați, cei care au prezentat diferențe semnificative statistic între pacienți și lotul de control au fost P-selectina ($p < 0.001$), Osteopontina ($p = 0.026$), Thrombospondina-2 ($p = 0.004$) și PIGF ($p = 0.001$).

Cei patru markeri au prezentat o performanță moderată pentru identificarea ScS precoce la analiza ROC (AUC [95%CI], p): Osteopontina (0.605 [0.509-0.702], $p = 0.033$), PIGF (0.655 [0.567-0.742], $p = 0.001$), Thrombospondina-2 (0.637 [0.551-0.723], $p = 0.002$), P-selectina (0.714 [0.632-0.796], $p < 0.001$), cu cele mai bune rezultate.

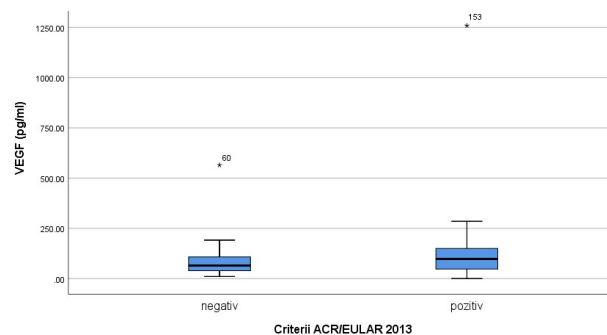
5.3.3. Nivelul citokinelor serice se asociază cu fenotipul ScS

Pacienții cu pattern sclerodermic capilaroscopic au prezentat valori serice mai ridicate ale Thrombospondinei-2, ICAM-1 și VEGF ($p = 0.024$, $p = 0.044$, respectiv $p = 0.006$, Mann-Whitney). Prin regresie logistică binară ajustată pentru vârstă, sex și ceilalți markeri testați, Thrombospondina-2 și VEGF au fost identificați drept factori predictivi pentru prezența patternului sclerodermic (p respectiv OR [95%CI]: 0.034, 1.07 [1.005-1.137]; respectiv 0.007, 1.015 [1.004-1.026]). Rarefierea s-a asociat cu valori ridicate ale: VEGF ($p = 0.006$), ICAM-1 ($p = 0.014$), MCP-1 ($p = 0.035$), P-selectinei ($p = 0.013$), iar megacapilarele cu ale VEGF ($p = 0.001$), Thrombospondinei-2 ($p = 0.006$) și E-selectinei ($p = 0.038$).

Pacienții care au îndeplinit criteriile de clasificare ACR/EULAR2013 pentru ScS la baseline au prezentat valori serice semnificativ mai ridicate ale ICAM-1 și VEGF decât pacienții care nu au întrunit aceste criterii, Figura II.9.



A. ICAM-1 ($p = 0.038$, Mann-Whitney)



B. VEGF ($p = 0.020$, Mann-Whitney)

Figura II.9. (A-B) Expresia diferită a citokinelor circulante în funcție de îndeplinirea criteriilor de clasificare ACR/EULAR 2013 pentru ScS

5.4. Discuții

Rezultatele acestei analize a unei cohorte de pacienți cu ScS precoce oferă dovada că markeri circulanți implicați în procese patogenice de vasculopatie, inflamație și fibroză sunt detectabili chiar și în serul acestor pacienți cu manifestări clinice discrete și au un profil distinct de acela al subiecților sănătoși. În plus, au fost identificate asocieri semnificative între valori crescute ale anumitor markeri și prezența de manifestări specifice ScS, precum Thrombospondina-2 și VEGF pentru vasculopatia periferică sau ICAM-1 și VEGF pentru formele clinice mai avansate, îndeplinind criteriile de clasificare ACR/EULAR 2013. Relevanța acestor markeri pentru severitatea, respectiv progresia ScS rămâne de demonstrat pe cohorte mai ample, urmărite longitudinal. Unul dintre punctele forte ale acestui studiu este faptul că examinează o cohortă de subiecți prezentând modificări clinice discrete, incipiente, și dintre care, cel mai probabil, doar o parte vor dezvolta forme clinice de ScS stabilită. Acesta oferă șansa unică de a observa fazele incipiente ale dezvoltării bolii, respectiv de a identifica markeri circulanți care ar putea ajuta la diagnosticul precoce, precum și la stratificarea prognostică a pacienților la risc de a dezvolta ScS.

5.5. Concluzii

- Nivelul seric al Osteopontinei, PIGF, P-selectinei și Thrombospondinei-2 este semnificativ diferit la subiecții sănătoși față de pacienții cu ScS precoce.
- Thrombospondina-2 și VEGF ar putea reprezenta biomarkeri pentru afectarea vasculară din ScS precoce.
- ICAM-1 și VEGF au prezentat niveluri serice semnificativ mai crescute la pacienții cu forme incipiente sau ușoare de ScS, care îndeplinesc criteriile de clasificare ACR/EULAR 2013, față de pacienții cu ScS foarte precoce sau “la risc” de a dezvolta boala. Acești markeri prezintă potențial pentru cercetări viitoare, longitudinale, drept biomarkeri pentru progresia către ScS în populația la risc.
- Aceste rezultate inițiale trebuie confirmate de studii ulterioare, pe cohorte mai mari de pacienți, eventual folosind și metode de laborator alternative pentru validare (ELISA). În acest scop, proiectul va fi continuat în anul următor.

6. Concluzii și contribuții personale

6.1. Concluzii

Privită în ansamblu, lucrarea de față prezintă **trei proiecte de cercetare originale** care aduc **noi date bazate pe dovezi privind diagnosticul precoce și evaluarea prognostică în sclerodermia sistemică.**

Realizarea primului obiectiv, depistarea de predictor ai regresiei fibrozei cutanate, a fost atins prin analiza cohortei de mari dimensiuni EUSTAR. Am putut demonstra și valida prin analiza longitudinală a peste 900 de pacienți cu ScS-d faptul că valoarea mRSS la baseline este cel mai important factor predictiv pentru regresia fibrozei cutanate după un an la pacienții cu ScS cu afectare cutanată difuză. Rezultatele analizei au arătat că pacienții cu fibroză cutanată severă la baseline și care nu prezintă fricțiuni tendinoase au o probabilitate crescută de a se ameliora după un an. De asemenea, studiul a validat date anterioare (Maurer et al., 2015) care arată că pacienții cu fibroză cutanată mai puțin severă la baseline prezintă un risc crescut de a progresa după un an. Așadar, scorul mRSS la baseline poate fi utilizat pentru estimarea și stratificarea riscului de progresie, respectiv de regresie a fibrozei pielii în ScS-d. Perioada de un an este relevantă pentru că reprezintă durata medie a participării în studiile clinice randomizate, precum și intervalul standard dintre vizitele de control conform recomandărilor EUSTAR. În această cohortă, un mRSS între 7 și 25 puncte la baseline ar fi permis includerea unui procent maxim de pacienți care au progresat la un an și un procent acceptabil de pacienți care au regresat. Luarea în considerare a relației nou dovedite dintre mRSS și evoluția fibrozei pielii poate optimiza recrutarea în studii clinice a pacienților care ar avea un posibil beneficiu maxim de pe urma tratamentului de studiu.

Articolul rezultat drept urmare a cercetărilor efectuate a fost publicat în cea mai importantă revistă din domeniul reumatologiei, *Annals of rheumatic diseases*, cu un factor de impact de 12.350 (Dobrota et al., 2016). La publicare, articolul a fost selectat de către editor pentru acces gratuit și a dat tema editorialului numărului respectiv (Pope, 2016), fapt care subliniază suplimentar importanța acordată temei și rezultatelor prezentate.

Al doilea obiectiv, optimizarea metodelor de screening pentru afectarea organică în ScS cu accent pe fibroza pulmonară, a fost atins prin demonstrarea faptului că o evaluare a pacienților cu ScS folosind exclusiv probele funcționale respiratorii este asociată cu o rată foarte mare de rezultate fals negative, în comparație cu standardul de aur, HRCT.

Aceast studiu observațional, transversal, efectuat pe o cohortă clinică de pacienți urmăriți în centrul de ScS din Zurich, arată că **testele funcționale respiratorii sunt insuficient de sensibile pentru a fi folosite drept test unic pentru screeningul și diagnosticul precoce al ScS-ILD, mai ales în cazul pacienților cu forme moderate de boală. Este important de menționat că nu doar forme de ScS-ILD moderată, ci și cazuri cu fibroză pulmonară severă, dar cu FVC normal și cu simptome clinice minime, au fost observate în această cohortă. Această constatare subliniază încă o dată importanța combinării de metode imagistice (tip HRCT, în acest caz) la investigațiile respiratorii standard ale pacienților cu ScS.** Studiul a fost recepționat cu interes, fiind publicat în revista *Arthritis and Rheumatology*, a doua clasată din domeniul reumatologiei, cu un factor de impact de 7.873 (Suliman*, Dobrota* et al., 2015). Numărul de 52 de citări până în prezent reflectă de asemenea relevanța și utilitatea acestei analize.

Al treilea obiectiv, identificarea de posibili biomarkeri serici pentru complicațiile clinice și/sau progresia ScS la pacienții cu ScS precoce, a fost realizat prin investigarea unei cohorte multicentrice internaționale. Rezultatele au arătat **concentrații serice al Osteopontinei, PIGF, P-selectinei și Thrombospondinei-2 semnificativ diferite la subiecții sănătoși față de pacienții cu ScS precoce. În plus, Thrombospondina-2, VEGF și ICAM-1 au prezentat asocieri semnificative cu prezența vasculopatiei, în special a pattern-ului capilaroscopic tipic ScS, putând astfel prezenta potențial ca biomarkeri pentru afectarea vasculară din ScS precoce. Interesant, ICAM-1 și VEGF au prezentat niveluri serice semnificativ mai crescute la pacienții care îndeplinesc criteriile de clasificare ACR/EULAR 2013, față de pacienții negativi, cu ScS „foarte precoce” sau „la risc” de a dezvolta boala. Acești markeri prezintă așadar potențial pentru explorarea în cercetări viitoare, pe cohorte urmărite longitudinal, drept posibili biomarkeri pentru progresia către ScS în populația „la risc”.**

Bazat pe aceste rezultate promițătoare, **proiectul este continuat printr-o a doua parte**, în care urmărim validarea rezultatelor pe o cohortă mai amplă de pacienți și subiecți sănătoși, printr-o metodă de laborator alternativă, bine stabilită (ELISA). Această etapă se află în desfășurare și va conține și o parte longitudinală, urmărind evoluția pacienților la vizitele de follow-up pe parcursul mai multor ani, pentru a urmări progresia pacienților cu forme precoce către ScS definită și identificarea de predictorii evolutivi.

În concluzie, după cum este argumentat în detaliu în rândurile de mai sus, cele trei studii principale realizate în cadrul cercetării doctorale contribuie semnificativ și concret la stadiul actual al cunoașterii în domeniul ScS.

6.2. Contribuții personale

În partea de documentare, am realizat o cercetare amănunțită a stadiului actual al cunoașterii asupra temei de cercetare (secțiunea I. Partea generală, capitolul 1 și 2), un review asupra medicinei personalizate în ScS (Dobrota et al., 2014; Anexa 3 a tezei), precum și un review despre management-ul actual al ScS-ILD (Dobrota et al., 2015) și am participat la validarea unui protocol HRCT pentru ScS-ILD (Frauenfelder et al., 2014). Legat de optimizarea studiilor clinice în ScS, interes dezvoltat prin proiectul regresiei fibrozei cutanate în ScS, am scris ca prim-autor un capitol de carte despre perspective și considerații pentru abordarea modernă a studiilor clinice în ScS (Dobrota et al., 2017).

În realizarea proiectelor originale de cercetare doctorală prezentate în Partea a II-a a lucrării, Contribuția personală (Capitolele 3, 4 și 5), am fost principal responsabilă, sub coordonarea echipei de experți, de toate etapele, începând de la design-ului studiului, la stabilirea metodologiei și a planului de analiză statistică, la scrierea manuscrisului și trecerea prin procesul de peer-review spre publicare. Pentru studiul EUSTAR (Capitolul 3) am lucrat împreună cu un expert statistician care a realizat analiza statistică conform planului realizat împreună cu echipa de experți, iar la celelalte două studii prezentate (Capitolul 4 și 5) am efectuat personal și analiza statistică. Pentru studiul translațional asupra biomarkerilor serici în ScS precoce (Capitolul 5), am implementat și realizat personal testele de laborator prin metoda Luminex. Am fost, de asemenea, responsabilă de organizarea studiilor, stabilirea de colaborări, obținerea datelor și de gestionarea resurselor de studiu.

Am avut ocazia de a disemina rezultatele cercetării prin prezentări științifice anuale (comunicări orale și/sau postere) la congrese naționale (aici menționez că am fost onorată de două ori cu Premiul Societății Elvețiene de Reumatologie pentru cel mai bun abstract), precum și internaționale (congresele principale de reumatologie din Europa, EULAR, respectiv din SUA, congresul ACR, și Congresul Mondial de Sclerodermie sistemică). Lista completă poate fi consultată la sfârșitul rezumatului acestei lucrări.

Este important de menționat că proiectele realizate au fost realizate în strânsă legătură cu centrul coordonator din cadrul Spitalului Dr.I. Cantacuzino din București. Centrul de ScS afiliat a participat cu date clinice și cu probe de ser pentru studiul pacienților cu ScS precoce, precum și ca centru EUSTAR pentru analiza longitudinală pentru predicția regresiei fibrozei pielii. De asemenea, Dna. Dr. Mihai Carina, coordonatoarea acestui centru, a fost membru în echipa de studiu și co-autor la multe dintre lucrările publicate (după cum se poate vedea din lista de lucrări inclusă).

Bibliografie (selectivă)

- Alivernini S, De Santis M, Tolusso B, et al. (2009) Skin ulcers in systemic sclerosis: determinants of presence and predictive factors of healing. *J Am Acad Dermatol*. 60(3):426–35.
- Allanore Y, Simms R, Distler O, et al. (2015) Systemic sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 1:1-21.
- Avouac J, Fransen J, Walker UA, et al. (2011) Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Ann Rheum Dis*. 70:476–81.
- Avouac J, Meune C, Ruiz B, et al. (2012) Angiogenic biomarkers predict the occurrence of digital ulcers in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 71(3):394–9.
- Baraut J, Michel L, Verecchia F, et al. (2010) Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 10:65–73.
- Bussone G, Mouthon L (2011) Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 10:248–255.
- Castro S, Jimenez S. (2010) Biomarkers in systemic sclerosis. *Biomarkers Med*. 4(1): 133–147.
- Chung L, Denton C, Distler O, et al. (2012) Clinical trial design in scleroderma: where are we and where do we go next? *Clin Exp Rheumatol*. 30(2, Suppl 71):S97-102.
- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, et al. (2000) Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 27:155–60.
- Denton CP, Wells AU, Coughlan JG (2018) Major lung complications of systemic sclerosis. *Nature Rev Rheumatol*. 14:511–27.
- Denton CP, Khanna D (2017) Systemic sclerosis. *Lancet* 7;390(10103):1685–99.
- Dobrota R**, Distler O, Wells A, Humbert M (2015) Management of scleroderma-associated pulmonary involvement. *Curr Treatm Opt Rheumatol*. 1:51-67.
- Dobrota R**, Maurer B, Graf N, et al. (2016) Prediction of improvement in skin fibrosis in diffuse cutaneous systemic sclerosis – a EUSTAR analysis. *Ann Rheum Dis*. 75(10):1743-8.
- Dobrota R**, Mihai C, Distler O (2014) Personalized medicine in systemic sclerosis: facts and promises. *Curr Rheumatol Rep*. 16:425.

Dobrota R, Müller-Ladner U, Distler O. Capitolul: Innovative Approaches to Clinical Trials in Systemic Sclerosis. În cartea: Varga J, Denton C, Wigley F, Allanore Y, Kuwana M (Editori), Scleroderma: From pathogenesis to comprehensive management (pp. 649-656), Ediția a 2-a (2017), Springer.

Frauenfelder T, Winklehner A, Nguyen TD, **Dobrota R**, et al. (2014) Screening for interstitial lung disease in systemic sclerosis: performance of high-resolution CT with limited number of slices: a prospective study. *Ann Rheum Dis.* 73(12):2069-73.

Hummers, L. (2010) The current state of biomarkers in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep.* 12(1): 34–39.

Khanna D, Furst DE, Clements PJ, et al. (2017) Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord.* 2(1):11–18.

Khanna D, Furst DE, Hays RD, et al. (2006) Minimally important difference in diffuse systemic sclerosis: results from the D-penicillamine study. *Ann Rheum Dis.* 65(10):1325–9.

Lafyatis R (2012) Application of biomarkers to clinical trials in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep.* 14(1):47–55.

LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. (1998) Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 15(2):202–5.

Matucci-Cerinic M, Allanore Y, Czirják L, et al. (2009) The challenge of early systemic sclerosis for the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) community. It is time to cut the Gordian knot and develop a prevention or rescue strategy. *Ann Rheum Dis.* 68(9):1377–80.

Maurer B, Graf N, Michel BA, et al. (2015) Prediction of worsening of skin fibrosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis using the EUSTAR database. *Ann Rheum Dis.* 74(6):1124–31.

McMahan ZH, Hummers LK (2013) Systemic sclerosis-challenges for clinical practice. *Nat Rev Rheumatol.* 9(2):90-100.

Mihai C, Smith V, **Dobrota R**, Gheorghiu AM, Cutolo M, Distler O (2018) The emerging application of semi-quantitative and quantitative capillaroscopy in systemic sclerosis. *Microvascular Research* 118:113–120.

Moore OA, Goh N, Corte T, Rouse H, Hennessy O, Thakkar V, et al. (2013) Extent of disease on high-resolution computed tomography lung is a predictor of decline and

mortality in systemic sclerosis-related interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford)* 52(1):155–60.

Muller-Ladner U, Tyndall A, Czirjak L, et al. (2014) Ten years EULAR Scleroderma Research and Trials (EUSTAR): what has been achieved? *Ann Rheum Dis.* 73(2):324–7.

Pope J (2016) Predicting improvement in diffuse scleroderma: lessons learnt. *Ann Rheum Dis.* 75(10):1741–2.

Remy-Jardin M, Giraud F, Remy J, et al. (1993) Importance of ground-glass attenuation in chronic diffuse infiltrative lung disease: pathologic-CT correlation. *Radiology.* 189(3):693-8.

Shah AA, Wigley FM. (2013) My approach to the treatment of scleroderma. *Mayo Clin. Proc.* 88:377–393.

Suliman YA*, **Dobrota R***, Huscher D, Nguyen-Kim TDL, Maurer B, Jordan S, Speich R, Frauenfelder T*, Distler O* (*contribuție egală, cu drept de prim-autor) (2015) Pulmonary function tests: high rate of false negatives in the early detection and screening of scleroderma interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* 67(12):3256-61.

Tyndall AJ, Bannert B, Monk V, et al. (2010) Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis.* 69(10):1809–1815.

Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. (2013) 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum.* 65(11):2737–47.

Varga J (2008) Systemic sclerosis. An update. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 66(3):198-202.

Walker UA, Tyndall A, Czirják L, et al. (2007) Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis.* 66(6):754-63.

Lista lucrărilor științifice publicate pe perioada studiilor doctorale

Capitole publicate în cărți:

1. **Dobrota R**, Matucci-Cerinic M, Hachulla E. Capitolul: Microvascular and macrovascular disease in systemic sclerosis, with reference to the digits. În cartea: Hachulla E, Mihai C, Bruni C (Editori), EULAR Textbook on systemic sclerosis, Ediția a 2-a (2019), BMJ.
2. **Dobrota R**, Müller-Ladner U, Distler O. Capitolul: Innovative Approaches to Clinical Trials in Systemic Sclerosis. În cartea: Varga J, Denton C, Wigley F, Allanore Y, Kuwana M (Editori), Scleroderma: From pathogenesis to comprehensive management (pp. 649-656), Ediția a 2-a (2017), Springer.

Articole publicate în reviste de specialitate cotate ISI:

Articole publicate ca prim-autor:

1. **Dobrota R**, Maurer B, Graf N, Jordan S, Mihai C, Kowal-Bielecka O, Allanore Y, Distler O, co-autorii EUSTAR (2016) Prediction of improvement in skin fibrosis in diffuse cutaneous systemic sclerosis – a EUSTAR analysis. Annals of Rheumatic Diseases Oct;75(10):1743-8.

Factor de impact: 12.350

Număr de citări la 8.07.2019: 31

Link: <https://ard.bmj.com/content/75/10/1743.short>

2. Suliman YA*, **Dobrota R***, Huscher D, Nguyen-Kim TDL, Maurer B, Jordan S, Speich R, Frauenfelder T**, Distler O** (*contribuție egală, cu drept de prim-autor; **contribuție egală ca ultim autor) (2015) Pulmonary function tests: high rate of false negatives in the early detection and screening of scleroderma interstitial lung disease. Arthritis & Rheumatology Dec;67(12):3256-61.

Factor de impact: 7.873

Număr de citări la 8.07.2019: 52

Link: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.39405>

3. **Dobrota R**, Distler O, Wells A, Humbert M (2015) Management of scleroderma-associated pulmonary involvement. Current Treatment Options in Rheumatology 1:51-67.

Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40674-014-0011-2>

4. **Dobrota R**, Mihai C, Distler O (2014) Personalized medicine in systemic sclerosis: facts and promises. Current Rheumatology Reports 16:425.

Factor de impact: 3.079

Număr de citări la 8.07.2019:10

Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11926-014-0425-8>

Articole publicate ca și co-autor:

5. Walker UA, Jaeger VK, Bruppacher KM, **Dobrota R**, Arlettaz L, Banyai M, Beron J, Chizzolini C, Groechnig E, Mueller RB, Spertini F, Villiger PM, Distler O (2018) Prospective evaluation of the capillaroscopic skin ulcer risk index in systemic sclerosis patients in clinical practice: a longitudinal, multicentre study. Arthritis Research & Therapy Oct 25;20(1):239. **(Factor de impact 4.269)**

6. Wu W, Jordan S, Becker MO, **Dobrota R**, Maurer B, Fretheim H, Ye S, Siegert E, Allanore Y, Hoffmann-Vold AM, Distler O (2018) Prediction of progression of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis: the SPAR model. Annals of Rheumatic Diseases Sep;77(9):1326-1332. **(Factor de impact 12.350)**

7. Soare A, Gheorghiu AM, Aramă V, Bumbăcea D, **Dobrotă R**, Oneață R, Pintilie S, Milicescu M, Ancuța I, Martin A, Sasu M, Ciofu C, Macovei L, Stoica V, Bojincă M, Mihai C (2018) Risk of active tuberculosis in patients with inflammatory arthritis receiving TNF inhibitors: a look beyond the baseline tuberculosis screening protocol. Clinical Rheumatology Sep;37(9):2391-2397.

8. Mihai C, Smith V, **Dobrota R**, Gheorghiu AM, Cutolo M, Distler O (2018) The emerging application of semi-quantitative and quantitative capillaroscopy in systemic sclerosis. Microvascular Research Jul;118:113-120.

9. Graf L, **Dobrota R**, Jordan S, Wildi LM, Distler O, Maurer B (2018) Nodular regenerative hyperplasia of the liver: a rare vascular complication in systemic sclerosis. *Journal of Rheumatology* Jan;45(1):103-106. **(Factor de impact 3.187)**

10. Mihai C, Antic M, **Dobrota R**, Bonderman D, Chadha-Boreham H, Coghlan JG, Denton CP, Doelberg M, Grünig E, Khanna D, McLaughlin VV, Müller-Ladner U, Pope JE, Rosenberg DM, Seibold JR, Vonk MC, Distler O (2018) Factors associated with disease progression in early-diagnosed pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis: longitudinal data from the DETECT cohort. *Annals of Rheumatic Diseases* Jan;77(1):128-132. **(Factor de impact 12.350)**

11. Lazzaroni MG, Cavazzana I, Colombo E, **Dobrota R**, Hernandez J, Hesselstrand R, Varju C, Nagy G, Smith V, Caramaschi P, Riccieri V, Hachulla E, Balbir-Gurman A, Chatelus E, Romanowska-Próchnicka K, Araújo AC, Distler O, Allanore Y, Airò P, EUSTAR co-authors (2017) Malignancies in patients with anti-RNA Polymerase III antibodies and systemic sclerosis: analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research Cohort and possible recommendations for screening. *Journal of Rheumatology* May;44(5):639-647. **(Factor de impact 3.187)**

12. Gorga M, Mihai C, Soare AM, **Dobrotă R**, Gherghe AM, Stoica V (2015) A Romanian version of the UCLA Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract Instrument. *Clinical Experimental Rheumatology* Jul-Aug;33(4 Suppl 91):S61-7.

13. Frauenfelder T, Winklehner A, Nguyen TD, **Dobrota R**, Baumuehler S, Maurer B, Distler O (2014) Screening for interstitial lung disease in systemic sclerosis: performance of high-resolution CT with limited number of slices: a prospective study. *Annals of Rheumatic Diseases* Dec;73(12):2069-73. **(Factor de impact 12.350)**

Lucrări prezentate la congrese științifice naționale și internaționale:

1. **Dobrota R**, Becker M, Fligelstone K, Fransen J, Tyrrell Kennedy A, Allanore Y, Carreira P, Czirjak L, Denton C, Hesselstrand R, Sandqvist G, Kowal-Bielecka O, Bruni C, Matucci-Cerinic M, Mihai C, Gheorghiu A, Müller-Ladner U, Vonk M, Olsen I, Heiberg T, Distler O (2018) The eular systemic sclerosis impact of disease (SCLEROID) score – a new patient-reported outcome measure for patients with systemic sclerosis. *Annals of Rheumatic Diseases* 77:1527. *Congresul EULAR, Amsterdam, 2018.*

2. **Dobrota R***, Jordan S*, Juhl P, Maurer B, Wildi L, Bay-Jensen AC, Karsdal M, Siebuhr AS*, Distler O* (*contribuție egală) (2017) Biomarkers formed through extracellular matrix turnover predict progression of fibrosis in systemic sclerosis. *Congresul Societății Elvețiene de Reumatologie, Interlaken, 2017 – Premiul pentru cel mai bun abstract.*

3. **Dobrota R***, Jordan S*, Juhl P, Maurer B, Wildi L, Bay-Jensen AC, Karsdal M, Siebuhr AS*, Distler O* (*contribuție egală) (2017) Prediction of fibrosis progression in systemic sclerosis by collagen Biomarkers. *Arthritis & Rheumatology 69 (Suppl 10). Congresul ACR, San Diego, 2017.*

4. **Dobrota R**, Maurer B, Graf N, Kowal-Bielecka O, Matucci-Cerinic M, Airo P, Caramanschi P, Riemekasten G, Rosato E, Allanore Y, Distler O, EUSTAR co-authors (2016) Active skin disease at baseline does not predict progression of skin fibrosis at one year follow-up – a EUSTAR analysis. *Annals of Rheumatic Diseases 75:756-757. Congresul EULAR, Londra, 2016.*

5. **Dobrota R**, Maurer B, Graf N, Jordan S, Mihai C, Kowal-Bielecka O, Allanore Y, Distler O, EUSTAR co-authors (2015) Modified Rodnan skin score thresholds for the optimization of cohort enrichment in clinical trials in skin fibrosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatology 67 (Suppl 10). Congresul ACR, San Francisco, 2015.*

6. Läubli J*, **Dobrota R***, Maurer B, Jordan S, Misselwitz B, Fox M, Distler O (*contribuție egală) (2015) Deficiency in micronutrients is a frequent burden in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatology 67 (Suppl 10). Congresul ACR, San Francisco, 2015.*

7. Suliman YA*, **Dobrota R***, Huscher D, Nguyen-Kim TDL, Maurer B, Jordan S, Speich R, Frauenfelder T*, Distler O* (*contribuție egală) (2015) Pulmonary function tests: high rate of false negatives in the early detection and screening of scleroderma interstitial lung disease. *Congresul Societății Elvețiene de Reumatologie, Lausanne, 2015.*

8. **Dobrota R**, Maurer B, Graf N, Mihai C, Kowal-Bielecka O, Allanore Y, Distler O, on behalf of the EUSTAR investigators and co-authors (2015) Prediction of improvement in skin fibrosis in diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Congresul Societății Elvețiene de Reumatologie, Lausanne, 2015 – Premiul pentru cel mai bun abstract.*

9. **Dobrota R**, Maurer B, Graf N, Mihai C, Kowal-Bielecka O, Allanore Y, Distler O, EUSTAR co-authors (2015) Prediction of improvement in skin fibrosis in diffuse cutaneous systemic sclerosis – a EUSTAR Analysis. *Annals of Rheumatic Diseases* 74(Suppl 2):819. *Congresul EULAR, Roma, 2015*.
10. **Dobrota R**, Maurer B, Graf N, Mihai C, Kowal-Bielecka O, Allanore Y, Distler O, EUSTAR co-authors. Prediction of Improvement in Skin Fibrosis in Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis (2014) *Arthritis & Rheumatology* 66:S1–S1402. *Congresul ACR, Boston, 2014*.
11. Frauenfelder T, Winklehner A, Nguyen TDL, **Dobrota R**, Baumuegger S, Maurer B, Distler O (2014) Screening for interstitial lung disease in systemic sclerosis: performance of high-resolution computed tomography with limited number of slices - a prospective study. *Arthritis & Rheumatology* 66:11(Suppl):S1311. *Congresul ACR, Boston, 2014*.
12. **Dobrota R**, Soare A, Gherghe SM, Predescu T, Gorga M, Ionitescu R, Jurcut R, Magda S, Constantinescu T, Sfrent-Cornateanu R, Stoica V, Bojinca M, Mihai C. (2014) Performance of the 2013 ACR/EULAR classification criteria for systemic sclerosis in a single center setting. *Clinical Experimental Rheumatology*, 32:2(Suppl 81):S7. *Congresul mondial de Sclerodermie, Roma, 2014*.
13. Soare A, Mihai C, **Dobrota R**, Gherghe AM, Vancea C, Gorga M, Ionitescu R, Jurcut R, Magda S, Constantinescu T, Sfrent-Cornateanu R, Ancuta I, Sasu M, Milicescu M, Macovei L, Ciofu C, Martin A, Shorab A, Bojinca M, Stoica V (2014) Five year survival rate and predictors of death and disease worsening in a single-center cohort of patients with systemic sclerosis. *Annals of Rheumatic Diseases* 73(Suppl)1:A42. *Congresul EULAR, Paris, 2014*.