

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

FACULTATEA DE MEDICINĂ

***MANIFESTĂRI FIBROTICE LA PACIENȚII CU
SCLERODERMIE SISTEMICĂ***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. VICTOR STOICA

Student –Doctorand

SOARE ALINA MIHAELA (căs. Ramming)

2020

CUPRINS

Introducere.....	6
I. Partea generală	7
1. Sclerodermia sistemică	7
1.1. Asocierea sclerodermiei sistemice cu alte boli autoimune	7
1.2 Sindromul overlap	7
1.3 Sindroame overlap în sclerodermia sistemică.....	7
1.3.1 Sclerodermia sistemică și miozita (sclero-miozita).....	7
1.3.2 Sclerodermia sistemică și Sindromul Sjögren	7
1.3.3 Sclerodermia sistemică și poliartrita reumatoidă.....	7
1.3.4 Sclerodermia sistemică și Lupusul eritematos sistemic	8
1.3.5 Sclerodermia sistemică și sindromul antifosfolipidic	8
1.3.6 Sclerodermia sistemică și vasculitele	8
1.4 Asocierea sclerodermiei sistemice cu boli autoimune de organ	8
1.4.1 Sclerodermia sistemică și afectarea hepatică	8
1.4.2 Sclerodermia sistemică și afectarea imună tiroidiană	8
2 Patogeneza sclerodermiei sistemice.....	8
2.1 Celule implicate în patogeneza fibrozei din cadrul ScS	8
2.2 Mediatorii fibrozei din ScS	9
2.2.1 TGF- β și căile profibrotice asociate cu TGF- β	9
2.2.2 Alți mediatori profibrotici	9
2.2.3 Mediatori ai activității citokinelor	9
2.3 Receptori nucleari: regulatori principali ai vindecării normale a rănilor	9
2.4 Căi morfogene.....	9
2.5 Reglarea epigenetică în fibroză.....	10
2.6 ROS și hipoxia în ScS	10
3. Dipeptidil peptidaza 4 (DPP4) sau CD26.....	10
3.1 Heterogenitatea DPP4 – Modificări posttranslaționale	10
3.2 DPP4 solubil	10
3.3 Expresia DPP4	11

3.4 Substraturile dipeptidil peptidazei 4	11
3.5 Rolurile fiziologice ale DPP4	11
3.6 Rolul DPP4 în patologie.....	11
3.7 Inhibitorii DPP4	11
II. Contribuții personale.....	12
4. Obiective generale.....	12
5. Prevalența bolilor autoimune și a sindroamelor overlap la pacienții cu sclerodermie sistemică	12
5.1 Introducere (Ipoteza de lucru și obiective specifice).....	12
5.2 Pacienți și metode	12
5.3 Statistica	13
5.4 Rezultate.....	13
5.4.1 Prevalența bolilor autoimune la pacienții cu ScS din centrul EUSTAR 100	13
5.4.2 Caracteristicile pacienților cu ScS care prezintă și alte boli autoimune	14
5.4.3 Evoluția pacienților cu ScS și alte boli autoimune	14
5.4.4 Afectarea cutanată la pacienții cu ScS și alte boli autoimune	15
5.4.5 Evoluția ulcerărilor digitale la pacienții cu ScS și alte boli autoimune.....	15
5.4.6 Evoluția afectării pulmonare la pacienții cu ScS și alte boli autoimune	15
5.5 Discuții	15
5.6 Concluzii	15
6. Dipeptidil peptidaza 4 – o posibilă nouă țintă terapeutică în sclerodermia sistemică ...	16
6.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	16
6.2 Materiale, metode și pacienți	16
6.2.1 Materiale și instrumente	16
6.2.2 Pacienți	16
6.2.3 Culturi de fibroblaste umane.....	17
6.2.4 Culturi de fibroblaste cu origine murină	17
6.2.5 Metode.....	17
6.2.6 Studii pe animale și modele de șoarece folosite	17

7. Rezultate	18
7.1 Evaluarea expresiei DPP4 la pacienții cu ScS și în diferite modele experimentale de fibroză	18
7.1.1 Evaluarea expresiei DPP4 în probe cutanate obținute de la pacienții cu ScS	18
7.1.2 Evaluarea expresiei DPP4 la nivelul fibroblastelor în probele obținute de la pacienții cu SSc	18
7.1.3 Evaluarea expresiei DPP4 în diferite modele de animale folosite pentru studiul fibrozei.	19
7.2 Evaluarea mecanismului de acțiune al DPP4 și proprietățile celulelor DPP4 pozitive	20
7.2.1 Evaluarea mecanismelor prin care expresia DPP4 este reglată la nivel celular	20
7.2.2 Caracterizarea celulelor DPP4 pozitive și rolul DPP4	21
7.2.3 Evaluarea mecanismului prin care DPP4 este implicat în promovarea fibrozei	22
7.3 Efectului inhibării genetice sau farmacologice a DPP4 asupra fibrozei cutanate și pulmonare	22
7.3.1 Evaluarea efectului inhibării DPP4 la nivel genetic în modelul animal de fibroză cutanată indusă de bleomicină	22
7.3.2 Evaluarea efectului inhibării genetice și farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză pulmonară indusă de bleomicină	23
7.3.3 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină	23
7.3.4 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de boală cronică grefa contra gazdei sclerodermic.	24
7.3.5 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză cutanată indusă de topoizomeraza I.	24
7.3.6 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză TSK-1	24
7.4 Evaluarea efectului inhibării DPP4 asupra infiltratelor inflamatorii și rolul celulelor inflamatorii DPP4 pozitive în apariția fibrozei	24

7.4.1 Evaluarea efectului inhibării DPP4 asupra infiltratelor inflamatorii din modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină și modelul de boală cronică grefon contra gazdei.....	24
7.4.2 Evaluarea rolului celulelor inflamatorii DPP4 pozitive în apariția fibrozei	24
7.5. Discuții și concluzii	25
8.Concluzii.....	26
8.1 Concluzii generale	26
8.1.1 Concluzii generale Studiul I:	26
8.1.2 Concluzii generale Studiul II	26
8.2 Contributii personale:	28
Bibliografie	31
Lista cu lucrările științifice publicate pe perioada studiilor doctorale	35

Introducere

Sclerodermia sistemică (ScS) este o boală cronică, autoimună ce afectează țesutul conjunctiv și este asociată cu cea mai mare mortalitate și morbiditate din cadrul bolilor de țesut conjunctiv și este considerată prototipul bolilor fibrotice (1).

Sclerodermia sistemică prezintă similarități genetice cu alte boli autoimune și un anumit fond genetic poate predispune la apariția de boli autoimune (2).

ScS este o boală heterogenă, atât prin tabloul clinic cât și prin multiplele mecanisme moleculare activate în această boală. Histologic, în biopsiile cutanate obținute de la pacienții cu ScS, se observă activarea exagerată a fibroblastelor (3).

Dipeptidil-peptidaza-4 (DPP4) este o proteină cu activitate enzimatică a cărei inhibare este folosită cu succes în tratamentul diabetului zaharat de tip 2 (4). Un studiu recent, desfășurat pe șoareci de laborator, demonstrează că DPP4 se regăsește și pe suprafața unui subset de fibroblaste embrionare cu proprietăți unice în repararea tisulară (5).

Privită în ansamblu, lucrarea de față este împărțită în două proiecte de cercetare originale bine delimitate între ele.

În primul studiu desfășurat în centrul Eustar (EUropean Scleroderma Trials and Research) 100 din cadrul Spitalului Clinic Dr. Ion Cantacuzino, București, sub îndrumarea Dr. Șef de Lucrări Carina Mihai și Prof. Dr. Victor Stoica, ne-am propus determinarea prevalenței bolilor autoimune în cohorta de pacienți cu ScS a centrului și să comparăm evoluția acestora cu cea a pacienților cu ScS care nu prezintă alte fenomene autoimune. Rezultatele acestui studiu au fost publicate în Revista Română de Reumatologie Vol XXIV, Nr 2, 2015 (Revista acreditată CNCSIB B+).

Al doilea studiu cuprinde o amplă cercetare fundamentală desfășurată în cadrul laboratorului de cercetare „Biologia aplicată a matricei celulare și cercetarea translațională a fibrozei” condus de Prof. Dr. J. Distler (Heisenberg Group for applied Matrixbiology and translational fibrosis research) din cadrul Universității Friedrich-Alexander din Erlangen-Nürnberg, Spitalul Universitar Erlangen. Pornind de la premiza că DPP4 identifică o subpopulație de fibroblaste responsabilă de acumularea excesivă a componentelor matricei extracelulare (5), ne-am propus în al doilea proiect prezentat în teză să caracterizăm populația fibroblastelor DPP4 pozitive din țesutul fibrotic al pacienților cu ScS și să studiem

efectele antifibrotice ale inhibiției DPP4. (6). Rezultatele acestui studiu au fost publicate în jurnalul american Arthritis & Rheumatology în anul 2020 (Factor de impact 7.750).

Rezultatele obținute în lucrarea de față reprezintă puncte de reper în cercetarea din sclerodermia sistemică atât din punct de vedere clinic cât și din punct de vedere al înțelegerii patogenezei bolii. Prin această contribuție deschidem calea unor posibile noi studii terapeutice în bolile fibrotice.

I. Partea generală

1. Sclerodermia sistemică

Sclerodermia sistemică prezintă similarități genetice cu alte boli autoimune și un anumit fond genetic poate predispune la apariția de boli autoimune (2).

1.1. Asocierea sclerodermiei sistemice cu alte boli autoimune

Poliautoimunitatea a fost raportată în multe boli autoimune, cel mai frecvent în cadrul următoarelor afecțiuni: lupusul eritematos sistemic (41%), sclerodermia sistemică (26%), ciroza biliară primitivă (32%), vitiligo, miastenia gravis, tiroidita autoimună (7, 8).

1.2 Sindromul overlap

Sindromul overlap se referă la existența unor caracteristici a cel puțin 2 boli de țesut conjunctiv ce pot apărea în același timp sau în momente diferite la același pacient (7).

1.3 Sindroame overlap în sclerodermia sistemică

1.3.1 Sclerodermia sistemică și miozita (sclero-miozita)

Sclero-miozita reprezintă una din cele mai frecvente sindroame overlap la pacienții cu miozită inflamatorie (9).

1.3.2 Sclerodermia sistemică și Sindromul Sjögren

Asocierea sclerodermie sistemică - sindrom Sjögren apare cu o frecvență de aproximativ 18,5% (10). La aproximativ o jumătate din pacienții cu sclerodermie apare fibrozarea glandelor salivare, urmată de scăderea secreției salivare (11).

1.3.3 Sclerodermia sistemică și poliartrita reumatoidă

Această asociere reprezintă a doua cea mai frecventă asociere a ScS cu o altă boală reumatologică. Artrita erozivă reprezintă cea mai frecventă determinare articulară la acești pacienți (12, 13).

1.3.4 Sclerodermia sistemică și Lupusul eritematos sistemic

Sindromul overlap sclerodermie sistemică - lupus eritematos sistemic este o condiție destul de rară, ce apare la un procent de aproximativ 14% dintre pacienții cu sclerodermie (9) (14).

1.3.5 Sclerodermia sistemică și sindromul antifosfolipidic

Incidența acestei asocieri este în jur de 7-13% (15).

1.3.6 Sclerodermia sistemică și vasculitele

Această asocieră este foarte rară. Diagnosticul este dificil întrucât manifestările pulmonare, renale și ischemia tegumentară sunt asemănătoare atât sclerodermiei cât și vasculitelor (16).

1.4 Asocierea sclerodermiei sistemice cu boli autoimune de organ

1.4.1 Sclerodermia sistemică și afectarea hepatică

Dintre bolile hepatice sclerodermia sistemică se asociază cel mai frecvent cu ciroza biliară primitivă (CBP). În general CBP apare la pacienții cu lcScS (93%) și este de cele mai multe ori silențioasă din punct de vedere clinic (17-19).

1.4.2 Sclerodermia sistemică și afectarea imună tiroidiană

Patologia autoimună tiroidiană este destul de frecventă la pacienții cu sclerodermie și alte boli reumatice (20). S-a constatat că tiroidita Hashimoto se asociază mai frecvent cu subtipul limitat al sclerodermiei sistemice (21).

2 Patogeneza sclerodermiei sistemice

2.1 Celule implicate în patogeneza fibrozei din cadrul ScS

Fibroblastele sunt celulele efectoare cheie ale fibrozei în ScS și în alte boli fibrotice, în care par a fi activate cronic (22). Există și alte tipuri de celule disfuncționale în ScS, care joacă roluri importante în afectarea țesuturilor, activarea fibroblastelor și în fibroză precum celulele endoteliale microvasculare, pericitele și celulele sistemului imunitar adaptativ și înăscut, cum ar fi limfocitele T și B, celule dendritice, celule ucigașe naturale, monocite, macrofage, mastocite și eozinofile (23) (24).

2.2 Mediatorii fibrozei din ScS

2.2.1 TGF- β și căile profibrotice asociate cu TGF- β

TGF- β este regulatorul principal al regenerării țesuturilor și al fibrozei, iar prezența anomaliilor semnalizării TGF- β este des întâlnită în ScS. TGF- β poate promova dezvoltarea fibrozei atât prin stimularea producției, cât și prin suprimarea degradării matricei extracelulare (23, 25, 26).

2.2.2 Alți mediatorii profibrotici

Alți mediatorii profibrotici importanți care au fost implicați în patogeneza fibrozei din ScS includ factorul de creștere a țesutului conjunctiv (connective tissue growth factor – CTGF), endotelina-1 (ET-1), factorul de creștere plachetar (platelet derived growth factor – PDGF), interleukina-6 (IL-6), serotonina și chemokine (CXCL4). Au fost detectate niveluri crescute de CTGF în țesutul cutanat al pacienților cu ScS (27).

2.2.3 Mediatorii ai activității citokinelor

Janus kinazele (JAKs) sunt tirozin kinazele asociate receptorilor, cu roluri centrale în semnalizarea mediată de citokine și factori de creștere. Similar cu alți receptori ai tirozin kinazelor (de exemplu, receptorul PDGF), legarea citokinelor induce autofosforilarea și activarea JAK. În ScS, semnalizarea TGF- β poate induce fosforilarea și activarea JAK2, care apoi interacționează cu STAT3 fosforilat pentru a induce răspunsuri fibrotice (28) (29).

2.3 Receptori nucleari: regulatori principali ai vindecării normale a rănilor

Receptorul nuclear 4a1 (NR4a1) a fost identificat ca un regulator endogen al semnalizării TGF- β (30).

Pe lângă NR4a1, receptori nucleari 1H2 și 1H3 (de asemenea, numiți receptori X hepatici), receptori nucleari NR1H2, precum și receptori nucleari 1H1 (care reprezintă receptorul vitaminei D) și receptori activați cu proliferator peroxisom (PPAR peroxisome proliferator-activated receptor)) - γ apar ca regulatori moleculari care controlează vindecarea rănilor și previn fibroza (31-33).

2.4 Căi morfogene

Studii recente au stabilit un rol central al mai multor căi morfogene în activarea fibroblastului și a fibrozei tisulare în ScS. Acestea includ căile Notch, Wnt și Hedgehog,

toate acestea fiind regulatori importanți ai dezvoltării embrionare și homoeostazei țesuturilor adulte (34, 35) (36).

2.5 Reglarea epigenetică în fibroză

Epigenetica cuprinde variații celulare care nu sunt cauzate de modificările secvenței ADN, ci de o multitudine de mecanisme necodate care modulează transcripția genică în interiorul unei celule. Deși acest domeniu este încă în curs de dezvoltare, o serie de investigații au demonstrat deja un rol al mecanismelor epigenetice specifice care joacă roluri centrale în procesele fibrotice (37) (38) (39, 40).

2.6 ROS și hipoxia în ScS

Speciile de oxigen reactiv (ROS) și hipoxia pot avea, de asemenea, un rol crucial în conducerea procesului fibrotic în ScS (1). Este cunoscut faptul că episoadele repetate de vasoconstricție, ischemie cronică și reperfuzie duc la generarea de ROS și stres oxidativ, care sunt puternic implicate în patogeneza ScS. ROS poate stimula fibroblastele prin activarea semnalizării TGF- β și PDGF (41).

3. Dipeptidil peptidaza 4 (DPP4) sau CD26

Dipeptidil-peptidaza-4 (DPP4, cunoscută și ca CD26) este o proteină cu activitate enzimatică care clivează prolina sau alanina de la capătul N-terminal al unei game largi de polipeptide (42, 43). În ultimii ani, DPP4 a fost intens studiată ca țintă terapeutică în tratamentul diabetului zaharat de tip 2 (44).

Un studiu recent desfășurat pe șoareci de laborator demonstrează că DPP4 se regăsește și pe suprafața unui subset de fibroblaste embrionare cu proprietăți unice în repararea tisulară (5). Mai mult, aceste fibroblaste care exprimă DPP4 sunt responsabile de secreția în cantități excesive a componentelor matricei extracelulare în urma unei agresiuni (5).

3.1 Heterogenitatea DPP4 – Modificări posttranslaționale

Carbohidrații reprezintă aproximativ 20% din totalul greutatei moleculare a DPP4. DPP4 conține 9 regiuni cu potențial de glicozilare (45).

3.2 DPP4 solubil

DPP4 există și în formă solubilă, desprinsă de la nivel membranar. Forma solubilă a DPP4 își păstrează activitatea enzimatică (45-47).

3.3 Expresia DPP4

DPP4 este exprimat ubicuitar în multe tipuri de țesuturi cum ar fi țesutul renal, hepatic, pulmonar, intestinal, dar și la nivelul celulelor imune (limfocite B și T, celulele NK sau celulele mieloide) (48).

3.4 Substraturile dipeptidil peptidazei 4

Diferiți hormoni gastrointestinali, factori de creștere, neuropeptide sau chemochine prezintă la capătul N-terminal, X-Pro sau -Ala și sunt clivate de DPP4 (45). Substraturile DPP4 sunt implicate în sistemul neuroendocrin, nociceptiv sau în infecții (45, 49).

3.5 Rolurile fiziologice ale DPP4

DPP4 se poate asocia cu diverse alte molecule declanșând diferite răspunsuri fiziologice sau poate modula răspunsul imun (45).

DPP4 îndeplinește multiple funcții fie prin activitatea enzimatică, fie prin intermediul interacțiunilor cu alte molecule. DPP4 este implicată în procese de nutriție, nocicepție, adeziune celulară, reglarea sistemului neuroendocrin, răspunsul imun sau adaptarea cardiovasculară (45).

3.6 Rolul DPP4 în patologie

DPP4 este implicat în patologia sistemului neuroendocrin, a bolilor autoimune sau inflamatorii, a bolilor infecțioase, a bolilor hematologice maligne sau a tumorilor (45).

DPP4 a fost asociat cu apariția astmului alergic, sclerozei multiple, artritei sau a bolilor inflamatorii digestive (50) (51) (52).

3.7 Inhibitorii DPP4

În prezent exista nouă medicamente aprobate care se găsesc pe piața internațională pentru tratamentul diabetului zaharat de tip 2 (53, 54).

În general inhibitorii DPP4 au profil de siguranță bun, dar în studiile clinice s-a observat o creștere a numărului de infecții ale căilor respiratorii superioare sau ale căilor urinare la pacienții tratați cu aceste medicamente. Alte efecte adverse descrise au fost pancreatita, durerile de cap, greața, angioedem, hipersensitivitatea și reacțiile cutanate, dar și artralgiile (53-55).

II. Contribuții personale

4. Obiective generale

Obiective studiul 1: Prevalența bolilor autoimune și a sindroamelor overlap la pacienții cu Sclerodermie sistemică:

- determinarea prevalenței bolilor autoimune la pacienții cu ScS
- evaluarea caracteristicilor pacienților cu ScS care prezintă și alte boli autoimune
- evaluarea evoluției pacienților cu ScS și alte boli autoimune

Obiective studiul II: Dipeptidil peptidaza 4 – o posibilă nouă țintă terapeutică în Sclerodermia sistemică

- evaluarea expresiei DPP4 la pacienții cu ScS și în diferite modele experimentale de fibroză
- evaluarea mecanismului de acțiune al DPP4 și proprietățile celulelor DPP4 pozitive
- evaluarea efectului inhibării genetice sau farmacologice a DPP4 asupra fibrozei cutanate și pulmonare
- evaluarea efectului inhibării DPP4 asupra infiltratelor inflamatorii și rolul celulelor inflamatorii DPP4 pozitive în apariția fibrozei.

5. Prevalența bolilor autoimune și a sindroamelor overlap la pacienții cu sclerodermie sistemică

5.1 Introducere (Ipoteza de lucru și obiective specifice)

Sclerodermia sistemică prezintă similarități genetice cu alte boli autoimune și un anumit fond genetic poate predispune la apariția de boli autoimune (2). Studiile epidemiologice la pacienții cu sindroame overlap arată frecvente divergențe (9, 56, 57).

5.2 Pacienți și metode

Am realizat un studiu retrospectiv, în care au fost incluși toți pacienții diagnosticați cu ScS conform criteriilor ACR 1980 sau conform noilor criterii de clasificare ACR/EULAR 2013 (58, 59) în cadrul centrului EUSTAR 100 din Clinica de Medicină Internă și

Reumatologie a Spitalului Clinic „Dr. Ion Cantacuzino“, evaluați în perioada ianuarie 2005 și mai 2014.

În grupul martor au fost incluși toți pacienții cu poliartrită reumatoidă, evaluați în Clinica de Medicină Internă și Reumatologie a Spitalului Clinic „Dr. Ion Cantacuzino“ în perioada ianuarie 2005 și mai 2014.

5.3 Statistica

Toate datele au fost introduse într-un tabel Excel iar prelucrarea statistică a informațiilor s-a realizat cu ajutorul programului SPSS varianta 20.0.

5.4 Rezultate

Au fost incluși 144 de pacienți cu sclerodermie sistemică și 511 pacienți cu poliartrită reumatoidă. Ca urmare a împărțirii pe categorii de sexe, în lotul bolnavilor cu sclerodermie 128 de pacienți (88.9%) sunt femei și 16 (11.1%) bărbați. În lotul cu poliartrită reumatoidă ponderea este de 419 (82%) femei și 92 (18%) bărbați.

5.4.1 Prevalența bolilor autoimune la pacienții cu ScS din centrul EUSTAR 100

Pacienții cu sclerodermie au fost împărțiți în 3 grupuri și anume: pacienții cu lcScS (49.3%) fără alte boli autoimune asociate, pacienții cu dcScS (31.3%) fără alte boli autoimune asociate și pacienții care prezintă boli autoimune asociate (19.4%). Dintre pacienții cu ScS și alte boli autoimune 89.3% aparțin lcScS.

Prevalența bolilor autoimune în cohorta pacienților cu ScS a fost de 19.4%, în timp ce un procent de 4.7% dintre pacienții cu PR au prezentat și alte boli autoimune. Bolile autoimune cel mai frecvent întâlnite la pacienții cu ScS au fost PR (11.1%), LES (5.6%), și tiroiditele autoimune (4.9%).

În grupul pacienților cu PR, cele mai frecvente boli autoimune întâlnite au fost SS (2.3%) și tiroidita autoimuna (1.8%).

Pacienții cu ScS prezintă semnificativ mai frecvent asocierea cu alte boli autoimune în comparație cu pacienții cu PR (Tabelul 5.4.1.1).

Tabel 5.4.1.1. *Frecvența comorbidităților autoimune la pacienții cu ScS în comparație cu pacienții cu PR*

	Pacienți ScS	Pacienți PR	p
Orice boala autoimuna	19.4% (28)	4.7% (24)	<0.001
Poliartita reumatoidă	11.1%(16)	-	-
Lupusul eritematos sistemic	5.6%(8)	0.4%(2)	<0.001
Tiroidita autoimună	4.9%(7)	1.8%(9)	0.059
Sindromul Sjögren	4.2%(6)	2.3%(12)	n.s
Dermatomiozita/Polimiozita	2,1%(6)	0	0.01
Ciroza biliară primitivă	0.7%(1)	0	n.s
Diabetul zaharat de tip1	0.7%(1)	0	n.s
Sindromul antifosfolipidic	0.7%(1)	0.2%(1)	n.s

5.4.2 Caracteristicile pacienților cu ScS care prezintă și alte boli autoimune

Nu s-au înregistrat diferențe semnificative în ceea ce privește datele demografice la pacienții cu ScS fără boli autoimune în comparație cu cei care asociază și alte boli autoimune.

Cele mai frecvente simptome întâlnite la pacienții cu ScS și alte boli autoimune au fost artralgiile (71.4% vs. 59.5%, $p=0.24$). Un număr crescut de pacienți cu ScS și alte boli autoimune au prezentat artrită (29.6% vs. 18.3%, $p=0.18$). Slăbiciunea musculară (32.1% vs. 26.5%, $p=0.55$) și xerostomia (32.0% vs. 26.9%, $p=0.6$) au fost, de asemenea, mai des întâlnite la pacienții cu ScS și alte boli autoimune.

5.4.3 Evoluția pacienților cu ScS și alte boli autoimune

S-a observat o tendință spre o evoluție mai bună a afectării cardiace, vasculare sau pulmonare a pacienților cu ScS care prezintă și o altă boală autoimună.

În grupul pacienților cu ScS și alte boli autoimune s-au înregistrat, pe perioada urmăririi, 7.1% decese, iar în grupul pacienților cu ScS fără alte boli autoimune 10.3%. Pacienții cu ScS fără alte boli autoimune prezintă mai frecvent aritmii, tulburări de ritm, ulceratii digitale, fricțiuni tendinoase, telangiectazii sau calcinoză.

5.4.4 Afectarea cutanată la pacienții cu ScS și alte boli autoimune

S-a observat că pacienții cu ScS și alte boli autoimune, dar și cei cu afectare cutanată limitată prezintă un scor mRSS relativ stabil pe perioada urmăririi. Pacienții cu afectare cutanată difuză prezintă pe perioada urmăririi un scor mRSS care scade cu timpul.

5.4.5 Evoluția ulcerărilor digitale la pacienții cu ScS și alte boli autoimune

Ulcerările digitale sunt considerate un factor de prognostic defavorabil la pacienții cu ScS. Pacienții cu ScS și alte boli autoimune au prezentat o frecvență scăzută a ulcerărilor digitale în comparație cu pacienții cu ScS fără alte boli autoimune.

5.4.6 Evoluția afectării pulmonare la pacienții cu ScS și alte boli autoimune

Pacienții cu ScS și alte boli autoimune tind să prezinte o afectare pulmonară mai blândă în comparație cu ScS fără alte comorbidități autoimune.

5.5 Discuții

Această lucrare este un studiu retrospectiv pe o cohortă urmărită longitudinal prospectiv, reprezentată de pacienții cu sclerodermie urmăriți într-un interval de 11 ani (01.2004- 05.2014) în Clinica de Medicină Internă și Reumatologie a Spitalului Clinic „Dr. Ion Cantacuzino” – Centrul EUSTAR 100. Am obținut o prevalență a bolilor autoimune la pacienții cu ScS de 19.4%. Rata de supraviețuire la pacienții cu ScS și alte boli autoimune a fost mai mare comparativ cu cea a pacienților cu dcScS fără alte boli autoimune.

Procentul pacienților cu ScS și alte comorbidități autoimune care au prezentat o agravare a funcției pulmonare a fost relativ similar cu cel al pacienților cu lcScS, dar mai mic decât cel al pacienților cu dcScS.

5.6 Concluzii

Prevalența bolilor autoimune este mult mai mare la pacienții cu ScS, comparativ cu pacienții cu PR (19.4% vs 5.7%, $p < 0.001$). Cele mai frecvente boli autoimune în lotul pacienților cu sclerodermie au fost PR, LES și tiroiditele autoimune.

Pacienții cu ScS și alte boli autoimune tind să asocieze o patologie cutanată și pulmonară mai blândă iar ulcerările digitale intervin într-un procent mult mai mic la pacienții cu ScS și alte boli autoimune.

6. Dipeptidil peptidaza 4 – o posibilă nouă țintă terapeutică în sclerodermia sistemică

6.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)

Patogeneza sclerodermiei sistemice nu este încă pe deplin înțeleasă. Cu toate că de curând a fost aprobată o nouă terapie pentru tratamentul fibrozei pulmonare din ScS, morbiditatea și mortalitatea ScS rămân cele mai crescute în rândul bolilor reumatice (1, 60, 61).

Un studiu recent, desfășurat pe șoareci de laborator, arată că DPP4 identifică un subset de fibroblaste embrionare responsabile de secreția în cantități excesive a componentelor matricei extracelulare în urma unei agresiuni (5). Acest concept nu a fost testat sau demonstrat în sclerodermia sistemică. Astfel, ne propunem în studiul următor investigarea rolului DPP4 în patogeneza ScS.

Obiectivele studiului:

1. Evaluarea expresiei DPP4 la pacienții cu ScS și în diferite modele experimentale de fibroză
2. Evaluarea mecanismului de acțiune al DPP4 și proprietățile celulelor DPP4 pozitive
3. Efectului inhibării genetice sau farmacologice a DPP4 asupra fibrozei cutanate și pulmonare
4. Evaluarea efectului inhibării DPP4 asupra infiltratelor inflamatorii și rolul celulelor inflamatorii DPP4 pozitive în apariția fibrozei

6.2 Materiale, metode și pacienți

6.2.1 Materiale și instrumente

Lista materialelor și instrumentelor folosite în realizarea studiului sunt enumerate în Anexa 1 a tezei.

6.2.2 Pacienți

Biopsiile cutanate au fost obținute de la 29 de pacienți cu sclerodermie sistemică diagnosticați conform criteriilor Colegiului American de Reumatologie (ACR) / Liga Europeană împotriva Reumatismului (EULAR) (59) și de la 10 voluntari sănătoși de vârstă și sex apropiate.

6.2.3 Culturi de fibroblaste umane

Fibroblaste umane au fost generate din biopsii cutanate de la pacienții cu ScS sau donatori sănătoși.

6.2.4 Culturi de fibroblaste cu origine murină

Fibroblastele murine au fost izolate din biopsii cutanate de la șoareci deficienți în DPP4 sau de la șoareci tipul sălbatic (62).

6.2.5 Metode

Au fost folosite următoarele metode: Nucleofecția, Analiza proliferării și migrării fibroblastelor, Analiza ARN mesager, Analiza proteinelor prin Western blot, Cuantificarea colagenului în culturile celulare, Testul de determinare a colagenului în probele tisulare utilizând metoda hidroxiprolinei, Separarea celulelor prin citometrie în flux.

Au fost efectuate următoarele colorații: Colorația cu hematoxină și eozină, Colorația Masson-Trichrom, Colorația Sirius Red, Cuantificarea miofibroblastelor, Colorațiile imunohistochimice și de imunofluorescență

6.2.6 Studii pe animale și modele de șoarece folosite

Au fost folosite următoarele modele de șoareci: Șoarecii DPP4 knockout (DPP4^{-/-}), Modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină, Modelul de șoarece cu fibroză pulmonară indusă de bleomicină, Modelul de șoarece Boala cronică grefon contra gazdă sclerodermic (scl-cGvHD), Modelul de fibroză cutanată indus de topoizomeraza 1, Șoarecii Tsk-1 și Generarea de șoareci hibrizi cu expresia DPP4 doar la nivelul celulelor hematopoietice sau la nivelul celulelor non-hematopoietice (mezenhimale).

7. Rezultate

7.1 Evaluarea expresiei DPP4 la pacienții cu ScS și în diferite modele experimentale de fibroză

7.1.1 Evaluarea expresiei DPP4 în probe cutanate obținute de la pacienții cu ScS

În urma colorației imunohistochimice cu anticorpi specifici anti-DPP4 a probelor cutanate obținute de la pacienții cu SSc, se observă un număr crescut de celule DPP4 pozitive în comparație cu probele cutanate obținute de la donatori sănătoși (Figura 7.1.1.1).

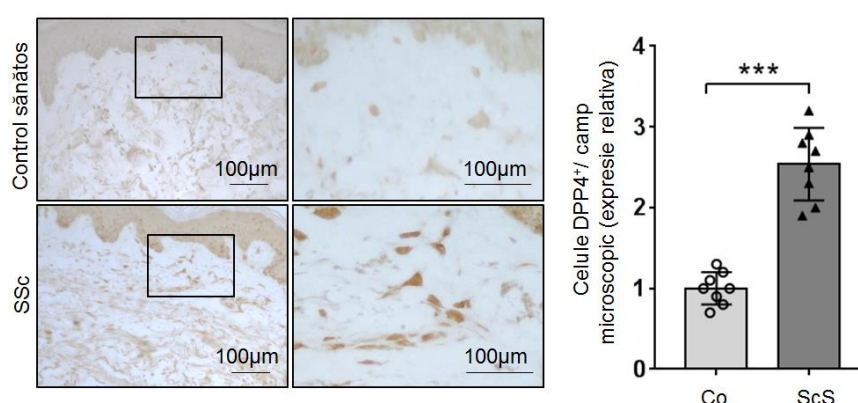


Figura 7.1.1.1 Imagini reprezentative ale colorației prin imunohistochimie a probelor cutanate la pacienții cu ScS și donatori sănătoși. Alături este redată cuantificarea imaginilor de imunohistochimie. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,000$.

În urma colorației cu prolil-4-hidroxilaza (P4H), un marker de identificare al fibroblastelor umane, s-a observat că majoritatea celulelor DPP4 pozitive la pacienții cu ScS sunt pozitive și pentru P4H. Mai mult, un număr semnificativ de fibroblaste DPP4 pozitive exprimă pe suprafața lor markerul actinei musculare netede α (α smooth muscle actin = α SMA) în comparație cu fibroblastele DPP4 negative.

7.1.2 Evaluarea expresiei DPP4 la nivelul fibroblastelor în probe obținute de la pacienții cu SSc

În lizatul celular obținut din fibroblastele izolate de la pacienții cu ScS s-a observat un nivel crescut al proteinei DPP4 în comparație cu lizatul celular obținut din fibroblastele izolate de la donatori sănătoși (Figura 7.1.2.1).

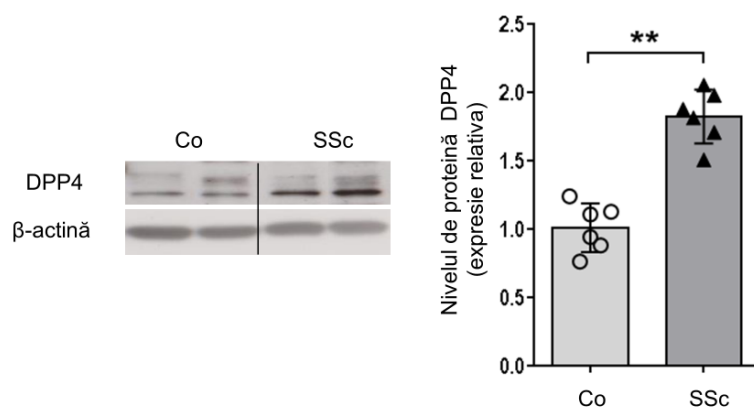


Figura 7.1.2.1 Imagini de Western blot pentru identificarea nivelului de proteină DPP4 în fibroblastele izolate de la pacienții cu SSc sau donatori sănătoși. Alăturat se află cuantificarea benzilor de Western Blot folosind programul Image J. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,000$.

7.1.3 Evaluarea expresiei DPP4 în diferite modele de animale folosite pentru studiul fibrozei.

Nivelul DPP4 evaluat prin colorații imunohistochimice și western blot este crescut în probele cutanate obținute de la șoarecii cu fibroză cutanată indusă de bleomicină (Figura 7.1.3.1) și în modelul bolii cronice grefon versus gazdă.

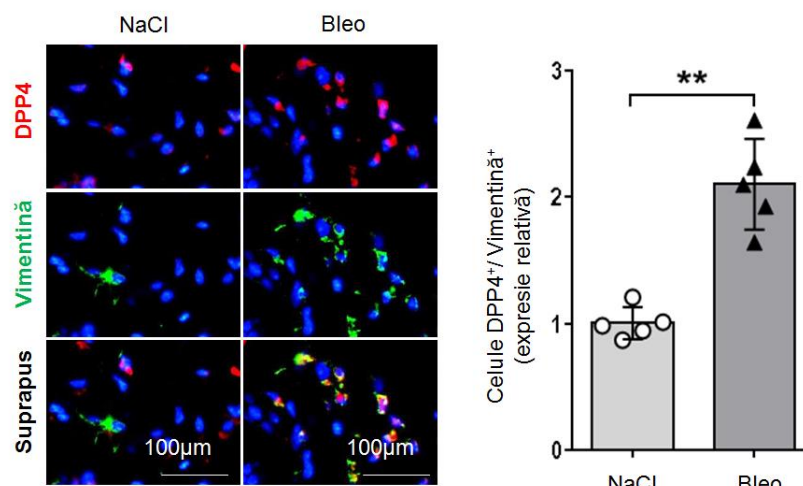


Figura 7.1.3.1. Imagini reprezentative ale colorației prin imunofluorescență a probelor cutanate obținute de la șoarecii fibrotici tratați cu bleomicină și control folosind DPP4 și vimentină, ca marker pentru fibroblaste. Alături este redată cuantificarea imaginilor de imunofluorescență. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,000$.

7.2 Evaluarea mecanismului de acțiune al DPP4 și proprietățile celulelor DPP4 pozitive

7.2.1 Evaluarea mecanismelor prin care expresia DPP4 este reglată la nivel celular

Prin incubarea timp de 24 și 48 de ore a fibroblastelor umane recoltate de la donatori sănătoși cu factorul de creștere transformant beta (tumor growth factor β , TGF- β), am observat o creștere a nivelului de proteină DPP4 analizat prin Western Blot (Figura 7. 2.1.1).

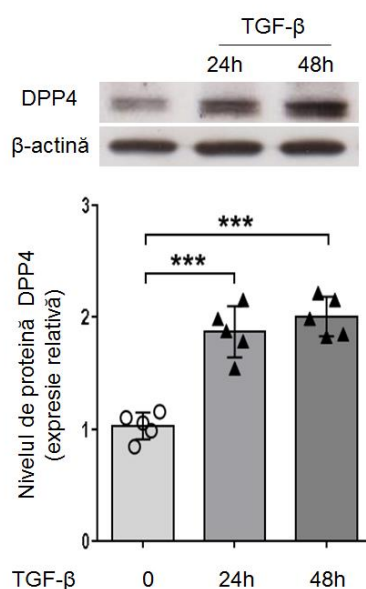


Figura 7.2.1.1 Imagini de Western blot pentru identificarea nivelului de proteină DPP4 în lizatul celular obținut din culturile de fibroblaste izolate de la donatori sănătoși și incubate cu TGF- β timp de 24 și 48 de ore. Dedesubt se află cuantificarea benzilor de Western Blot folosind programul Image J. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,000$.

Activitatea enzimatică a DPP4 în fibroblastele ScS sau sănătoase nu prezintă diferențe semnificative, în schimb, stimularea cu TGF- β a condus la creșterea activității enzimatice în fibroblastele ScS.

Similar cu rezultatele obținute *in vitro*, am observat în probele cutanate recoltate de la șoarecii care prezintă specific la nivelul fibroblastului, o variantă mutantă a receptorului TGF- β de tip 1 constitutiv activ, un nivel crescut de proteină DPP4 în comparație cu probele control.

Expresia DPP4 este reglată preponderent de semnale provenind de pe calea non-canonice de semnalizare a TGF- β în special prin intermediul ERK.

7.2.2 Caracterizarea celulelor DPP4 pozitive și rolul DPP4

Fibroblastele cutanate sau pulmonare DPP4-pozitive prezintă niveluri crescute de ARN-mesager pentru transcrierea genelor *Col1a1*, *Col1a2* și *Acta2*, în comparație cu fibroblastele DPP4-negative. Fibroblastele deficiente în DPP4 sunt mai puțin responsive la stimularea cu TGF- β , tranziția de la fibroblast la miofibroblast indusă de TGF- β este împiedicată (cantitate redusă de α SMA și formarea fibrelor de stres este redusă) și prezintă o capacitate migratorie redusă.

Pe lângă o abordarea genetică, a fost folosită inhibiția DPP4 folosind și o abordare farmacologică. Incubarea cu Sitagliptin a redus efectele stimulative ale TGF- β asupra fibroblastelor, fără a avea efecte toxice asupra celulelor.

Exprimarea forțată a DPP4 la nivelul fibroblastelor umane recoltate de la donatori sănătoși prin folosirea unui plasmid DPP4, a condus la creșterea cantității de ARN mesager pentru genele *ACTA2*, *COL1A1* și *COL1A2* în comparație cu fibroblastele transfectate cu un plasmid control.

Tratamentul cu Sitagliptin al fibroblastelor umane izolate de la donatori sănătoși și stimulate cu TGF- β a redus transdiferențierea fibroblastelor la miofibroblaste, după cum rezultă din colorația de imunofluorescență cu α SMA și fibre de stres (Figura 7.2.2.9).

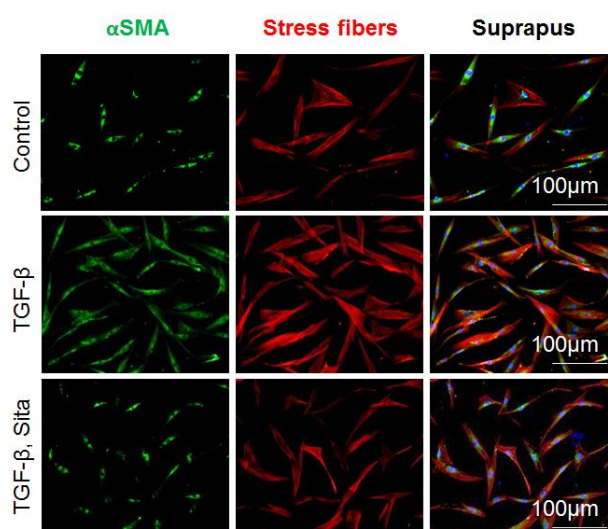


Figura 7.2.2.9. Imagini reprezentative ale colorației prin imunofluorescență a fibroblastelor izolate de la donatori sănătoși incubate cu Sitagliptin (Sita) în urma stimulării cu TGF- β , folosind ca marker de identificare pentru miofibroblaste fibrele de stres și α SMA.

7.2.3 Evaluarea mecanismului prin care DPP4 este implicat în promovarea fibrozei

Tratamentul fibroblastelor umane recoltate de la donatori sănătoși cu sitagliptin a prevenit efectele stimulative a TGF- β asupra căii de semnalizare ERK, conducând la niveluri reduse de ERK fosforilat (pERK), forma activă a ERK (Figura 7.2.3.1.)

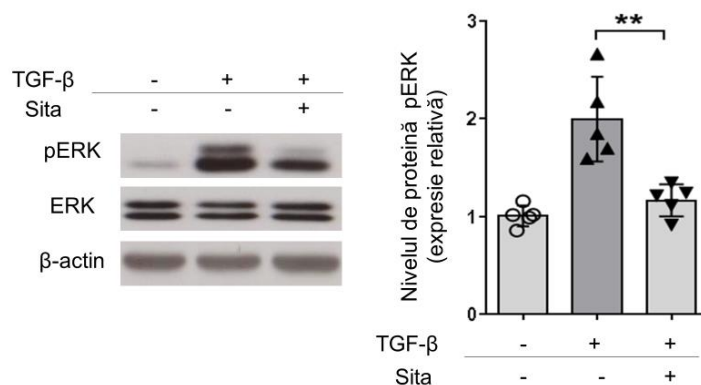


Figura 7.2.3.1 Imagini de Western blot pentru identificarea nivelului de proteină pERK în urma stimulării cu TGF- β și apoi incubarea cu sitagliptin în lizatul celular obținut din culturile de fibroblaste umane recoltate de la donatori sănătoși. Dedesubt se află cuantificarea benzilor de Western Blot folosind programul Image J. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,000$.

În schimb, inhibarea farmacologică a DPP4 în fibroblastele umane folosind sitagliptin nu a interferat cu nivelul de SMAD3, STAT3, SRC, AKT, cJUN sau Fra2 induse de TGF- β .

7.3 Efectului inhibării genetice sau farmacologice a DPP4 asupra fibrozei cutanate și pulmonare

7.3.1 Evaluarea efectului inhibării DPP4 la nivel genetic în modelul animal de fibroză cutanată indusă de bleomicină

Soarecii cu deficiență de DPP4 dezvoltă, în comparație cu cei de tip sălbatic, mai puțină fibroză cutanată conform analizei grosimii dermului, conținutului de hidroxiprolină sau numărului de miofibroblaste.

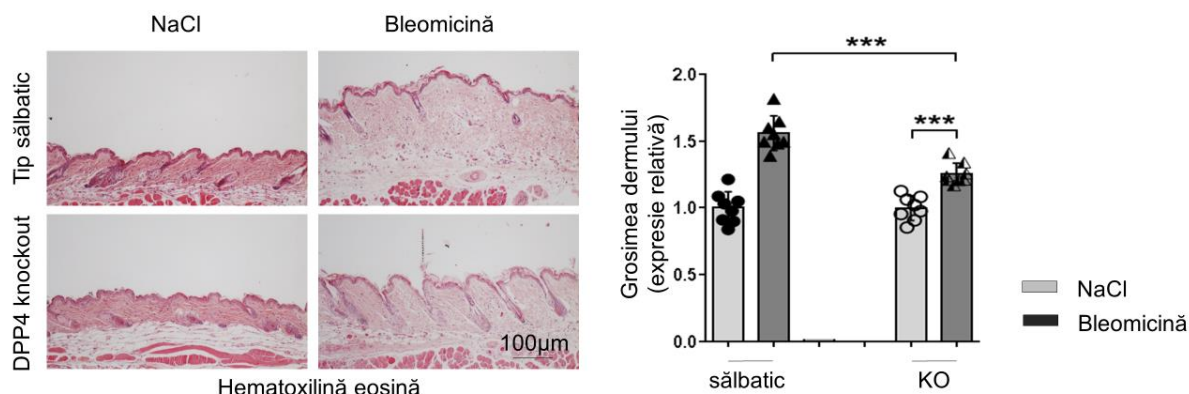


Figura 7.3.1.1. Imagini reprezentative de hematoxină eosină ale șoarecilor DPP4 knockout și cei de tip sălbatic injectați subcutanat cu bleomicină timp de 3 săptămâni. Alături, analiza grosimii dermului exprimată ca expresie relativă. Rezultatele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,000$.

7.3.2 Evaluarea efectului inhibării genetice și farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză pulmonară indusă de bleomicină

În urma instilării bleomicinei intratraheal șoarecii cu deficiență de DPP4 sunt parțial protejați de a dezvolta fibroză pulmonară conform evaluărilor tomografice, histologice dar și a conținutului de collagen din probe (Figura 7.3.2.1).

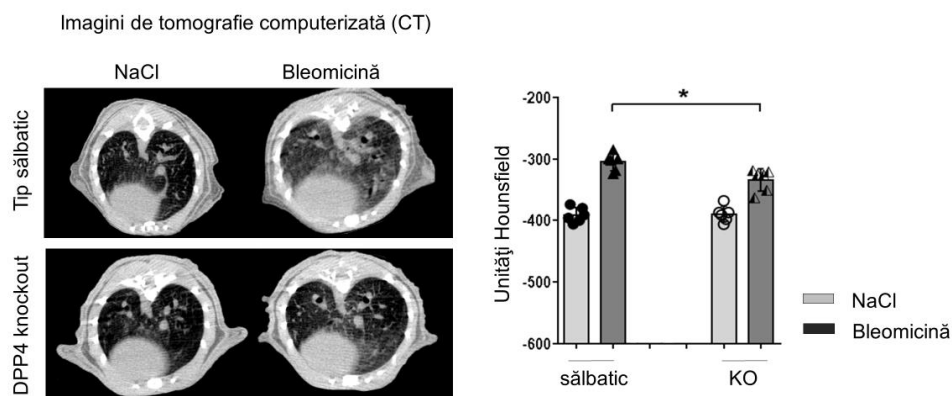


Figura 7.3.2.1 Imagini reprezentative de CT pulmonar ale șoarecilor de tip sălbatic și DPP4 knockout tratați cu ser fiziologic (NaCl 9%) sau cu bleomicină intratraheal și cuantificarea imaginilor prin analizarea densității țesutului pulmonar măsurat în unități Hounsfield (HU).

7.3.3 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină

Tratamentul cu sitagliptin și vildagliptin la șoarecii cu fibroză cutanată indusă de

bleomicină are efecte anti-fibrotice. Astfel am observat la acești șoareci o grosime semnificativ mai mică a dermului, un conținut redus de collagen în probele cutanate cât și un număr semnificativ redus de miofibroblaste.

7.3.4 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de boală cronică grea contra gazdei sclerodermic.

Inhibarea DPP4 are efecte semnificativ antifibrotice și în modelul bolii cronice grea versus gazdă (cGvHD). În urma tratamentului cu inhibitorii DPP4 timp de 3 săptămâni, grosimea dermului, dar și conținutul de collagen și numărul de miofibroblaste sunt semnificativ reduse în comparație cu șoarecii fibrotici control.

7.3.5 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză cutanată indusă de topoizomeraza I.

În modelul fibrozei cutanate indusă de topoizomeraza I am obiectivat efectele antifibrotice ale inhibării farmacologice a DPP4.

7.3.6 Evaluarea efectului inhibării farmacologice a DPP4 în modelul de fibroză TSK-1

Pe lângă efectele antifibrotice ale inhibării DPP4 în modelele de fibroză cutanată indusă prin mecanisme inflamatorii, sitagliptin are efecte antifibrotice semnificative și în modelul de fibroză hipodermică la șoarecii transgenici Tsk-1.

7.4 Evaluarea efectului inhibării DPP4 asupra infiltratelor inflamatorii și rolul celulelor inflamatorii DPP4 pozitive în apariția fibrozei

7.4.1 Evaluarea efectului inhibării DPP4 asupra infiltratelor inflamatorii din modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină și modelul de boală cronică grea contra gazdei

În urma tratamentului cu sitagliptin și vildagliptin, ambele concentrații folosite au redus infiltratele inflamatorii în modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină și cGvHD.

7.4.2 Evaluarea rolului celulelor inflamatorii DPP4 pozitive în apariția fibrozei

Șoarecii cu inactivarea genetică a DPP4 în celulele hematopoietice au prezentat o extindere comparabilă a fibrozei pulmonare cu cea observată la șoarecii de tip sălbatic transplantați singenetic, pe când șoarecii cu inactivarea DPP4 în celule mezenhimale (fibroblaste) au prezentat rezultate asemănătoare cu șoarecii deficienți în DPP4 atât la nivelul

celulelor hematopoietice cât și în cele de origine mezenhimală (Figura 7.4.2.3). Rezultate similare am observat și în modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină realizat pe șoarecii chimerici.

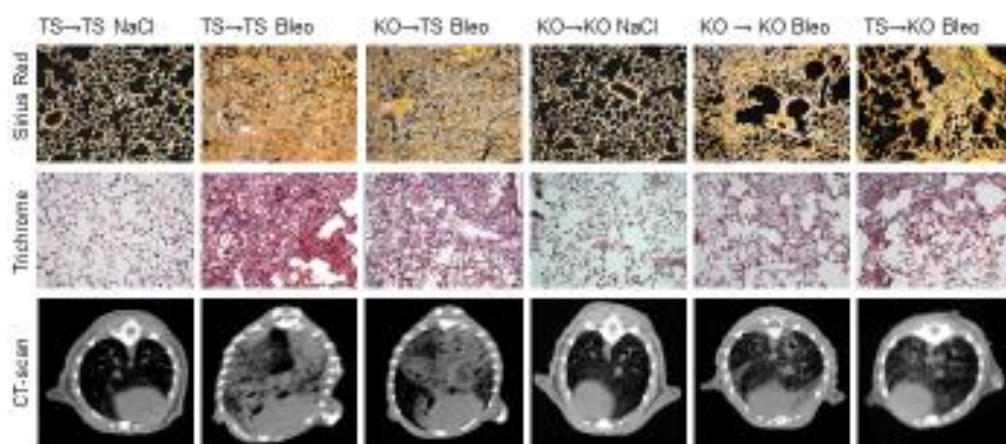


Figura 7.4.2.3. Imagini reprezentative de CT pulmonar, colorații Trichrome și Sirius Red la șoarecii chimerici tratați cu bleomicină intratraheal sau control.

7.5. Discuții și concluzii

În acest studiu am arătat ca DPP4 este exprimat în fibroblastele de la pacienții cu ScS. Inducerea DPP4 este strâns legată de calea de semnalizare non-canonică a TGF- β . Fibroblastele DPP4-pozitive prezintă un fenotip activat. Expresia DPP4 este crescută și în diverse modele de animale fibrotice. Inhibarea DPP4 genetică sau farmacologică are efecte antifibrotice în mai multe modele animale complementare de studiu al fibrozei. Inhibarea DPP4 are și efecte antiinflamatorii, dar efectele antifibrotice sunt datorate preponderent efectului lor asupra fibroblastelor.

Aceste rezultate pot avea implicații translaționale directe, deoarece inhibitorii DPP4 sunt deja în uz clinic în tratamentul diabetului zaharat de tip 2.

8. Concluzii

8.1 Concluzii generale

8.1.1 Concluzii generale Studiul I:

1. Prevalența bolilor autoimune este mult mai mare la pacienții cu ScS, comparativ cu pacienții cu PR (19,4% vs 5.7%, $p < 0.001$). Cele mai frecvente boli autoimune în lotul pacienților cu sclerodermie au fost PR, LES și tiroiditele autoimune.
2. Frecvența deceselor la pacienții cu ScS și alte boli autoimune este mai mică decât la pacienții cu ScS fără alte boli autoimune asociate.
3. Pacienții cu ScS și alte boli autoimune tind să asocieze o patologie cutanată și pulmonară mai blândă, iar ulcerările digitale intervin într-un procent mult mai mic la pacienții cu ScS și alte boli autoimune, iar cele care apar nu sunt persistente.

8.1.2 Concluzii generale Studiul II

În acest capitol am arătat ca expresia DPP4 este crescută la pacienții cu ScS și în diferite modele experimentale de fibroză:

1. Expresia DPP4 este crescută în probele cutanate ale pacienților cu ScS, în special la nivelul fibroblastelor (Cap 7.1.1)
2. Expresia DPP4 este crescută în fibroblastele dermice izolate de la pacienții cu ScS (Cap 7.1.2)
3. Expresia DPP4 este crescută în modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină și în modelul bolii cronice grefa versus gazda (cGvHD) (Cap 7.1.3)

Mai departe, am arătat că TGF- β este un factor important în inducerea celulelor DPP4-pozitive. Am demonstrat pe mai multe niveluri experimentale că semnalizarea non-canonice TGF- β stimulează expresia DPP4:

1. Stimularea fibroblastelor dermice cultivate cu TGF- β recombinant conduce la creșterea expresiei proteinei DPP4 în fibroblastele dermale normale (Cap 7.2.1).
2. TGF- β induce activitatea enzimatică a DPP4 în fibroblastele izolate de la pacienții cu ScS (Cap 7.2.1).
3. Expresia excesivă a receptorului mutant al TGF- β crește expresia DPP4 la nivel cutanat, confirmând astfel că TGF- β este suficient pentru a crește expresia DPP4 în fibroblastele *in vitro* și *in vivo* (Cap 7.2.1).

4. Expresia DPP4 este reglată prin calea non-canonică de semnalizare a TGF- β (Cap 7.2.1).
5. Inhibarea mediatorului non-canonic de semnalizare TGF- β ERK, inhibă efectele stimulative ale TGF- β asupra expresiei DPP4 (Cap 7.2.1).
6. Fibroblastele DPP4 pozitive prezintă un nivel crescut de gene profibrotice (Cap 7.2.2).
7. Inhibarea genetică și farmacologică a DPP4 este asociată cu împiedicarea tranziției fibroblast la miofibroblast (Cap 7.2.2).
8. Fibroblastele DPP4 negative prezintă o capacitate migratorie inferioară fibroblastelor DPP4 pozitive (Cap 7.2.2).
9. Inhibarea DPP4 conduce la reducerea pERK, un mediator al căii non-canonică a TGF- β (7.2.3).

Inhibarea DPP4 în diverse modele experimentale de studiu al fibrozei are efecte antifibrotice:

1. Inhibarea genetică a DPP4 din șoarecii DPP4 knockout previne fibroza cutanată și pulmonară induse de bleomicină (Cap 7.3.1 și Cap 7.3.2).
2. Inhibarea farmacologică a DPP4 prin sitagliptin și vildagliptin reduc grosimea dermului în modelele inflamatorii de studiu al fibrozei: modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină, cGvHD și modelul de fibroză cutanată indusă de topoizomeraza I (Cap 7.3.3, Cap 7.3.4 și Cap 7.3.5).
3. Inhibarea farmacologică a DPP4 are efecte antifibrotice și într-un model fibrotic experimental: modelul TSK-1 (Cap 7.3.6).

Mai departe, am demonstrat că DPP4, chiar dacă are efecte antiinflamatorii, efectele antifibrotice datorate inhibării DPP4 sunt exercitate preponderent prin acțiunea directă la nivelul fibroblastelor.

1. Tratamentul cu inhibitorii DPP4 reduc infiltratele inflamatorii din pielea șoarecilor fibrotici (modelul de fibroză cutanată indusă de bleomicină și cGvHD) (Cap 7.4.1)
2. Efectele pro-fibrotice ale DPP4 necesită predominant expresia DPP4 în celulele rezidente de țesut, cum ar fi fibroblastele (Cap 7.4.2)

8.2 Contributii personale:

Privită în ansamblu, această lucrare prezintă două capitole de cercetare originale bine delimitate între ele, care aduc informații noi și de actualitate în domeniul Sclerodermiei sistemice.

În realizarea celor două proiecte originale de cercetare cuprinse în teza de doctorat, sub îndrumarea Șef Lucrări Carmen Marina Mihai și Prof. Dr. Univ. Victor Stoica (Studiul 1), Prof. dr. Jörg Distler și Prof. dr. Georg Schett (studiul 2), am fost responsabilă de planificarea studiului, colectarea de date și analiza acestora, de planificarea, efectuarea și interpretarea experimentelor de laborator, pregătirea textelor pentru publicație cât și procesul de peer-review al acestora.

Datele din cele două proiecte prezentate au fost făcute publice la congrese naționale (Congresul Societății Române de Reumatologie, Congresul Societății Germane de Reumatologie) și internaționale (Congresul EULAR, Congresul Societății Americane de Reumatologie, Congresul Mondial de Sclerodermie Sistemică, Simpozionul Keystone din Statele Unite ale Americii).

Primul studiu aduce informații noi despre prevalența bolilor autoimune la pacienții cu Sclerodermie sistemică din centrul Eustar 100 din cadrul Spitalului Clinic „Dr. I. Cantacuzino” din București. Până la momentul publicării acestui studiu în Revista Română de Reumatologie Vol XXIV, Nr 2, 2015 (Revista acreditată CNCSIB B+), acesta a fost primul studiu din țară care a cercetat sindroamele overlap la pacienții cu ScS. În acest studiu am arătat că prevalența bolilor autoimune la pacienții cu ScS este mai mare decât la pacienții cu poliartrită reumatoidă. Alături de alte studii din domeniu, am arătat că prognosticul acestor pacienți este mai favorabil în comparație cu pacienții cu ScS cu afectare cutanată difuză. Acest studiu a fost realizat cu ajutorul unei burse cofinanțate din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013 Contract POSDRU/159/1.5/S/138907 „Excelență în cercetarea științifică, interdisciplinară, doctorală și postdoctorală, în domeniile Economic, Social și Medical – EXCELIS” implementat de Academia de Studii Economice din București în parteneriat cu Universitatea din București și Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București.

Al doilea studiu cuprinde o amplă cercetare de laborator desfășurată în cadrul laboratorului de cercetare „Biologia aplicată a matricei celulare și cercetarea translațională a fibrozei” condus de Prof. Dr. J. Distler (Heisenberg Group for applied Matrixbiology and

translational fibrosis research) din cadrul Universității Friedrich-Alexander din Erlangen-Nürnberg, Spitalul Universitar Erlangen. Pe perioada studiilor doctorale am beneficiat de o bursa EULAR (European League Against Rheumatism) care mi-a permis deplasarea în Centrul de Excelență în Reumatologie din cadrul Universității Friedrich-Alexander din Erlangen-Nürnberg - Spitalul Universitar Erlangen. Pe perioada acestei burse am desfășurat primele experimente de laborator care au pus baza proiectului de față. Pe lângă bursa EULAR, am beneficiat în continuarea acesteia, de bursa ARTICULUM pentru tineri cercetători care mi-a permis continuarea studiului în cadrul Spitalului Universitar din Erlangen.

Rezultatele preliminare obținute în cel de-al doilea studiu au constituit baza unui grant de cercetare ce mi-a permis finalizarea experimentelor. Prin câștigarea acestui grant din partea ELAN (Finanțarea proiectelor conduse de tineri cercetători) am primit fonduri pentru desfășurarea experimentelor și pentru angajarea unui tehnician de laborator pe o perioadă de un an (valoare aproximativă 50.000 Eur).

Întrucât pentru realizarea acestui studiu au fost necesare diverse modele de animale fibrotice am realizat un review despre modele experimentale de studiu al fibrozei întâlnite în ScS. Acesta a fost publicat în *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, Vol 1, Issue 3, Sept-Dec 2016. Pe lângă acest review am contribuit și la scrierea unui alt review despre noi perspective asupra patogenzei bolilor fibrotice, în special ScS, cu un accent asupra bazei moleculare a studiilor clinice în curs de desfășurare în ScS. Acesta a fost publicat în *Arthritis and Rheumatology* Feb 2017 (Factor de impact 7.750).

Al doilea studiu prezentat aduce un plus de cunoaștere în domeniul patogenzei sclerodermiei sistemice. Aici am demonstrat pentru prima dată că expresia DPP4 este crescută la pacienții cu ScS, iar expresia DPP4 este reglementată în principal de calea de semnalizare a TGF- β , mediatorul principal al bolilor fibrotice. Experimentele *in vivo*, desfășurate pe șoarecii de laborator oferă un punct de pornire în studierea unei posibile noi strategii terapeutice în sclerodermia sistemică. Studiul de față are implicații translaționale majore întrucât inhibitorii DPP4 sunt deja folosiți în tratamentul diabetului zaharat de tip 2. Rezultatele acestui studiu au fost publicate în binecunoscutul Jurnal american *Arthritis & Rheumatology* în anul 2020 (Factor de impact 7.750) (6).

Rezultatele obținute în lucrarea de față reprezintă puncte de reper în cercetarea din sclerodermia sistemică atât din punct de vedere clinic cât și din punct de vedere al înțelegerii

patogenezei bolii. Prin această contribuție deschidem calea unor posibile noi studii terapeutice în bolile fibrotice.

Pe lângă cele două studii prezentate în lucrarea de față, am participat activ pe durata studiilor doctorale și în realizarea altor proiecte, care au fost publicate cu succes în jurnale de top din domeniul medical (Nature, Nature Medicine, Annals of rheumatic diseases, The Journal of Immunology, Clinical Rheumatology) având ca focus atât patogeneza fibrozei/scleroderma sistemică cât și artritele (vezi lista publicații).

Bibliografie

1. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *The New England journal of medicine*. 2009;360(19):1989-2003.
2. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(2):203-10.
3. Ramming A, Dees C, Distler JH. From pathogenesis to therapy--Perspective on treatment strategies in fibrotic diseases. *Pharmacological research*. 2015;100:93-100.
4. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie*. 1966;7(3):197-201.
5. Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M, et al. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science*. 2015;348(6232):aaa2151.
6. Soare A, Gyorfi HA, Matei AE, Dees C, Rauber S, Wohlfahrt T, et al. Dipeptidylpeptidase 4 as a Marker of Activated Fibroblasts and a Potential Target for the Treatment of Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2020;72(1):137-49.
7. Anaya JM. The Autoimmune Tautology with a Focus on Systemic Sclerosis. *Isr Med Assoc J*. 2017;19(3):186-7.
8. Rojas-Villarraga A, Amaya-Amaya J, Rodriguez-Rodriguez A, Mantilla RD, Anaya JM. Introducing polyautoimmunity: secondary autoimmune diseases no longer exist. *Autoimmune Dis*. 2012;2012:254319.
9. Iaccarino L, Gatto M, Bettio S, Caso F, Rampudda M, Zen M, et al. Overlap connective tissue disease syndromes. *Autoimmun Rev*. 2013;12(3):363-73.
10. Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013;12(11):1052-7.
11. Avouac J, Sordet C, Depinay C, Ardizzone M, Vacher-Lavenu MC, Sibilia J, et al. Systemic sclerosis-associated Sjogren's syndrome and relationship to the limited cutaneous subtype: results of a prospective study of sicca syndrome in 133 consecutive patients. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(7):2243-9.
12. Szucs G, Szekanecz Z, Zilahi E, Kapitany A, Barath S, Szamosi S, et al. Systemic sclerosis-rheumatoid arthritis overlap syndrome: a unique combination of features suggests a distinct genetic, serological and clinical entity. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(6):989-93.
13. Ueda-Hayakawa I, Hasegawa M, Kumada S, Tanaka C, Komura K, Hamaguchi Y, et al. Usefulness of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor to detect rheumatoid arthritis in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(11):2135-9.
14. Alharbi S, Ahmad Z, Bookman AA, Touma Z, Sanchez-Guerrero J, Mitsakakis N, et al. Epidemiology and Survival of Systemic Sclerosis-Systemic Lupus Erythematosus Overlap Syndrome. *J Rheumatol*. 2018;45(10):1406-10.
15. Pope JE, Thompson A. The frequency and significance of anticardiolipin antibodies in scleroderma. *J Rheumatol*. 2000;27(6):1450-2.
16. Quemeneur T, Mouthon L, Cacoub P, Meyer O, Michon-Pasturel U, Vanhille P, et al. Systemic vasculitis during the course of systemic sclerosis: report of 12 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92(1):1-9.
17. Efe C, Wahlin S, Ozaslan E, Berlot AH, Purnak T, Muratori L, et al. Autoimmune hepatitis/primary biliary cirrhosis overlap syndrome and associated extrahepatic autoimmune diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012;24(5):531-4.
18. Mari-Alfonso B, Simeon-Aznar CP, Guillen-Del Castillo A, Rubio-Rivas M, Trapiella-Martinez L, Todoli-Parra JA, et al. Hepatobiliary involvement in systemic sclerosis and the cutaneous subsets: Characteristics and survival of patients from the Spanish RESCLE Registry. *Semin Arthritis Rheum*. 2018;47(6):849-57.

19. Zheng B, Vincent C, Fritzler MJ, Senecal JL, Koenig M, Joyal F. Prevalence of Systemic Sclerosis in Primary Biliary Cholangitis Using the New ACR/EULAR Classification Criteria. *J Rheumatol*. 2017;44(1):33-9.
20. Ferrera F, Rizzi M, Spreccacenero B, Balestra P, Sessarego M, Di Carlo A, et al. AIRE gene polymorphisms in systemic sclerosis associated with autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol*. 2007;122(1):13-7.
21. Toki S, Motegi S, Yamada K, Uchiyama A, Ishikawa O. Demographic and clinical features of autoimmune thyroid disorder in Japanese patients with systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2014;41(12):1053-7.
22. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol*. 2012;180(4):1340-55.
23. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15002.
24. Manetti M. Deciphering the alternatively activated (M2) phenotype of macrophages in scleroderma. *Exp Dermatol*. 2015;24(8):576-8.
25. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.
26. Bhattacharyya S, Kelley K, Melichian DS, Tamaki Z, Fang F, Su Y, et al. Toll-like receptor 4 signaling augments transforming growth factor-beta responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma. *Am J Pathol*. 2013;182(1):192-205.
27. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;8(1):42-54.
28. Dees C, Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Distler A, Beyer C, Lang V, et al. JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor beta in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(9):3006-15.
29. Zhang Y, Liang R, Chen CW, Mallano T, Dees C, Distler A, et al. JAK1-dependent transphosphorylation of JAK2 limits the antifibrotic effects of selective JAK2 inhibitors on long-term treatment. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(8):1467-75.
30. Palumbo-Zerr K, Zerr P, Distler A, Fliehr J, Mancuso R, Huang J, et al. Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor-beta signaling and fibrosis. *Nat Med*. 2015;21(2):150-8.
31. Wei J, Bhattacharyya S, Jain M, Varga J. Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma: A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. *Open Rheumatol J*. 2012;6:103-15.
32. Beyer C, Skapenko A, Distler A, Dees C, Reichert H, Munoz L, et al. Activation of pregnane X receptor inhibits experimental dermal fibrosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(4):621-5.
33. Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Huang J, Distler A, et al. Vitamin D receptor regulates TGF-beta signalling in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(3):e20.
34. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun*. 2012;3:735.
35. Beyer C, Distler JH. Morphogen pathways in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(1):299.
36. Liang R, Sumova B, Cordazzo C, Mallano T, Zhang Y, Wohlfahrt T, et al. The transcription factor GLI2 as a downstream mediator of transforming growth factor-beta-induced fibroblast activation in SSc. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(4):756-64.
37. Wang Y, Fan PS, Kahaleh B. Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLI1 gene in scleroderma fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(7):2271-9.

38. Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun.* 2014;5:5797.
39. Wohlfahrt T, Rauber S, Uebe S, Lubert M, Soare A, Ekici A, et al. PU.1 controls fibroblast polarization and tissue fibrosis. *Nature.* 2019;566(7744):344-9.
40. Bergmann C, Brandt A, Merlevede B, Hallenberger L, Dees C, Wohlfahrt T, et al. The histone demethylase Jumonji domain-containing protein 3 (JMJD3) regulates fibroblast activation in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2018;77(1):150-8.
41. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *The New England journal of medicine.* 2006;354(25):2667-76.
42. Klemann C, Wagner L, Stephan M, von Horsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clinical and experimental immunology.* 2016;185(1):1-21.
43. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology.* 2001;54(3):249-64.
44. Mulvihill EE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocrine reviews.* 2014;35(6):992-1019.
45. Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical reviews in clinical laboratory sciences.* 2003;40(3):209-94.
46. Durinx C, Neels H, Van der Auwera JC, Naelaerts K, Scharpe S, De Meester I. Reference values for plasma dipeptidyl-peptidase IV activity and their association with other laboratory parameters. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(2):155-9.
47. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(11):1723-47.
48. Abbott CA, Baker E, Sutherland GR, McCaughan GW. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics.* 1994;40(5):331-8.
49. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir AM, De Meester I. The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol.* 2015;6:387.
50. van der Velden VH, Wierenga-Wolf AF, Adriaansen-Soeting PW, Overbeek SE, Moller GM, Hoogsteden HC, et al. Expression of aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV in the healthy and asthmatic bronchus. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* 1998;28(1):110-20.
51. Lun SW, Wong CK, Ko FW, Hui DS, Lam CW. Increased expression of plasma and CD4+ T lymphocyte costimulatory molecule CD26 in adult patients with allergic asthma. *J Clin Immunol.* 2007;27(4):430-7.
52. Reinhold D, Biton A, Pieper S, Lendeckel U, Faust J, Neubert K, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) and aminopeptidase N (APN, CD13) as regulators of T cell function and targets of immunotherapy in CNS inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(13-14):1935-42.
53. Scheen AJ. DPP-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes: a critical review of head-to-head trials. *Diabetes Metab.* 2012;38(2):89-101.
54. Schuetz CA, Ong SH, Bluhm M. Clinical trial simulation methods for estimating the impact of DPP-4 inhibitors on cardiovascular disease. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2015;7:313-23.
55. Baetta R, Corsini A. Pharmacology of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: similarities and differences. *Drugs.* 2011;71(11):1441-67.
56. Jablonska S, Blaszczyk M. Scleroderma overlap syndromes. *Adv Exp Med Biol.* 1999;455:85-92.

57. Jablonska S, Blaszyk M. Scleromyositis (scleroderma/polymyositis overlap) is an entity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004;18(3):265-6.
58. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15(2):202-5.
59. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(11):1747-55.
60. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *The New England journal of medicine*. 2019;380(26):2518-28.
61. Distler JH, Feghali-Bostwick C, Soare A, Asano Y, Distler O, Abraham DJ. Review: Frontiers of Antifibrotic Therapy in Systemic Sclerosis. *Arthritis & rheumatology*. 2017;69(2):257-67.
62. Manetti M, Rosa I, Milia AF, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(9):1700-9.

Lista cu lucrările științifice publicate pe perioada studiilor doctorale

Articole publicate ca prim-autor

1. **Soare A**, Gyorfi HA, Matei AE, Dees C, Rauber S, Wohlfahrt T, et al. Dipeptidylpeptidase 4 as a Marker of Activated Fibroblasts and a Potential Target for the Treatment of Fibrosis în Systemic Sclerosis. Arthritis & rheumatology. 2020;72(1):137-49. **(Factor de impact 7.750)**

Link: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.41058>

2. **Soare A**, Weber S, Maul L, Rauber S, Gheorghiu AM, Lubert M, et al. Cutting Edge: Homeostasis of Innate Lymphoid Cells Is Imbalanced în Psoriatic Arthritis. J Immunol. 2018;200(4):1249-54. **(Factor de impact 5.06)**

Link: <https://www.jimmunol.org/content/200/4/1249.long>

3. **Soare A**, Gheorghiu AM, Arama V, Bumbacea D, Dobrota R, Oneata R, et al. Risk of active tuberculosis în patients with inflammatory arthritis receiving TNF inhibitors: a look beyond the baseline tuberculosis screening protocol. Clin Rheumatol. 2018;37(9):2391-7. **(Factor de impact 2.380)**

Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10067-017-3916-y>

4. **Soare A**, Ramming A, Avouac J, Distler JH. Updates on animal models of systemic sclerosis. Jsr. 2016;1(3):266-76.

Link: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.5301/jsrd.5000220>

5. **Soare A**, Pintilie S, Gherghie AM, Radu A, Dobrota R, Sasu M, Bojinca M, Stoica V, Mihai C. Patients with systemic sclerosis associating other autoimmune diseases have milder disease course. Romanian Journal of Rheumatology Vol XXIV, No2, 2015, 111-4. **(Revista acreditată CNCSIB B+)**

Link: <https://rjr.com.ro/patients-with-systemic-sclerosis-associating-other-autoimmune-diseases-have-a-milder-disease-course/>

Articole publicate ca și co-autor

6. Schmidkonz C, Rauber S, Atzinger A, Agarwal R, Gotz TI, **Soare A**, et al. Disentangling inflammatory from fibrotic disease activity by fibroblast activation protein imaging. Annals of the rheumatic diseases. 2020. **(Factor de impact 16.102)**

7. Zhang Y, Zhu H, Layritz F, Luo H, Wohlfahrt T, Chen CW, **Soare, A**, et al. Recombinant Adenosine Deaminase Ameliorates Inflammation, Vascular Disease, and Fibrosis in Preclinical Models of Systemic Sclerosis. *Arthritis & rheumatology*. 2020. **(Factor de impact 7.750)**
8. Wohlfahrt T, Rauber S, Uebe S, Lubert M, **Soare A**, Ekici A, et al. PU.1 controls fibroblast polarization and tissue fibrosis. *Nature*. 2019;566(7744):344-9. **(Factor de impact 43.070)**
9. Matei AE, Beyer C, Gyorfı AH, **Soare A**, Chen CW, Dees C, et al. Protein kinases G are essential downstream mediators of the antifibrotic effects of sGC stimulators. *Annals of the rheumatic diseases*. 2018;77(3):459. **(Factor de impact 12.350)**
10. Rauber S, Lubert M, Weber S, Maul L, **Soare A**, Wohlfahrt T, et al. Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells. *Nature medicine*. 2017;23(8):938-44. **(Factor de impact 30.641)**
11. Palumbo-Zerr K, **Soare A**, Zerr P, Liebl A, Mancuso R, Tomcik M, et al. Composition of TWIST1 dimers regulates fibroblast activation and tissue fibrosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(1):244-51. **(Factor de impact 12.350)**
12. Huang J, Maier C, Zhang Y, **Soare A**, Dees C, Beyer C, et al. Nintedanib inhibits macrophage activation and ameliorates vascular and fibrotic manifestations in the Fra2 mouse model of systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017;76(11):1941-8. **(Factor de impact 12.350)**
13. Dees C, Beyer C, Distler A, **Soare A**, Zhang Y, Palumbo-Zerr K, et al. Stimulators of soluble guanylate cyclase (sGC) inhibit experimental skin fibrosis of different aetiologies. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(8):1621-5. **(Factor de impact 12.350)**
14. Gorga M, Mihai C, **Soare AM**, Dobrota R, Gherghe AM, Stoica V. A Romanian version of the UCLA Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract Instrument. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(4 Suppl 91):S61-7. **(Factor de impact 2.724)**
15. Distler JH, Feghali-Bostwick C, **Soare A**, Asano Y, Distler O, Abraham DJ. Review: Frontiers of Antifibrotic Therapy in Systemic Sclerosis. *Arthritis & rheumatology*. 2017;69(2):257-67. **(Factor de impact 7.750)**