

Agnieszka Ogrodowicz

**Ocena częstości występowania i znaczenia klinicznego przeciwciał
przeciwfosfolipidowych u chorych na twardzinę układową.**

Rozprawa na tytuł doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Mariusz Puszczewicz

Katedra i Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2012

Panu dr. hab. med. Mariuszowi Puszczewiczowi
składam szczególne podziękowania za cenne uwagi
i pomoc merytoryczną przy planowaniu badań

Dziękuję koleżankom i kolegom z Katedry i Kliniki Reumatologii
i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
za pomoc w zebraniu materiału klinicznego

Spis treści

Spis treści.....	3
Wykaz skrótów.....	4
1. WSTĘP.....	6
1.1 Wprowadzenie.....	6
1.2 Twardzina układowa.....	7
1.3 Historia.....	9
1.4 Epidemiologia.....	10
1.5 Patogeneza.....	11
1.6 Objawy kliniczne.....	15
1.7 Autoprzeciwciała.....	23
2. CELE PRACY.....	32
3. MATERIAŁ I METODY.....	33
3.1 Diagnostyka laboratoryjna.....	36
3.2 Badania określające stopień zaawansowania choroby.....	46
3.3 Metody opracowania statystycznego.....	55
4. WYNIKI.....	56
4.1 Częstość występowania autoprzeciwciał.....	56
4.2 Badania określające stopień zaawansowania choroby.....	57
5. Dyskusja.....	67
6. Wnioski.....	80
7. Streszczenie.....	81
8. Summary.....	83
9. Spis rycin.....	85
10. Spis tabel.....	86
11. Piśmiennictwo.....	88

Wykaz skrótów

ACA – (*ang. anti-centromere antibodies*) przeciwciała przeciwcentromerowe

aCl – (*ang. anti-cardiolipin antibodies*) przeciwciała przeciwkardiolipinowe

AECA – (*ang. anti-endothelial cell antibodies*) przeciwciała przeciwko komórkom śródbłonna

a β 2GPI – (*ang. anti - β 2 glycoprotein I antibodies*) przeciwciała reagujące z β 2 glikoproteiną I

ANA – (*ang. antinuclear antibodies*) przeciwciała przeciwjądrowe

ANCA – (*ang. anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) przeciwciała przeciwko cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych

APTT – (*ang. activated partial thromboplastin time*) czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

aPl – (*ang. anti-phospholipid antibodies*) przeciwciała przeciwfosfolipidowe

aScl-70 – (*ang. anti-topoisomerase I antibodies*) przeciwciała przeciwko topoizomerazie I

CTGF – (*ang. connective tissue growth factor*) czynnik wzrostu tkanki łącznej

DLCO – (*ang. diffusing capacity of the lung for carbon monoxide*) dyfuzja tlenku węgla w płucach

dRVVT – (*ang. diluted Russel's viper venom time*) czas krzepnięcia osocza po dodaniu jadu węża Russella

FVC – (*ang. forced vital capacity*) natężona pojemność życiowa

GFR – (*ang. glomerular filtration rate*) przesączanie kłębuszkowe

β 2GPI – (*ang. β 2 glycoprotein I*) β 2 glikoproteina I

HRCT – (*ang. high resolution computed tomography*) tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości

IIF – (*ang. indirect immunofluorescence assay*) metoda immunofluorescencji pośredniej

INF γ – (*ang. interferon γ*) interferon γ

LA – (*ang. lupus anticoagulant*) antykoagulant toczniowy

LISS – (*ang. low-ionic strength salt solution*) roztwór o niskiej sile jonowej

PAH – (*ang. pulmonary arterial hypertension*) tętnicze nadciśnienie płucne

PH – (*ang. pulmonary hypertension*) nadciśnienie płucne

PDGF – (*ang. platelet-derived growth factor*) płytkopochodny czynnik wzrostu

RF – (*ang. rheumatoid factor*) czynnik reumatoidalny

RP – (*ang. Raynaud phenomenon*) objaw Raynaud

RU – (*ang. relative unit*) jednostki względne

RVSP – (*ang. right ventricular systolic pressure*) ciśnienie skurczowe w prawej komorze

SSc – (*ang. systemic sclerosis*) twardzina układowa

TGF β – (*ang. transforming growth factor β*) transformujący czynnik wzrostu

TNF α – (*ang. tumor necrosis factor α*) czynnik martwicy nowotworów α

1. WSTĘP

1.1 Wprowadzenie

Choroby reumatyczne to różnorodna pod względem objawów klinicznych grupa nozologiczna, obejmująca ponad 300 odrębnych jednostek. Większość z nich charakteryzuje przewlekły proces zapalny obejmujący tkankę łączną, którego podłożem są reakcje autoimmunologiczne. Etiologia ich jest nieznana.

Zapalenie zapoczątkowane zostaje przez nieznany(e) czynnik(i) w obrębie komórek i ich produktów wchodzących w skład tkanki łącznej. Proces obejmuje cały organizm i ma charakter przewlekłe postępujący. W efekcie dochodzi do zajęcia wielu narządów i układów. Przejawem reakcji autoimmunologicznych w przebiegu chorób reumatycznych jest m.in. obecność autoprzeciwciał w surowicy krwi i płynach ustrojowych. Powstają one w wyniku wadliwej odpowiedzi immunologicznej, która własne antygeny rozpoznaje jako obce. Udział autoprzeciwciał w patogenezie poszczególnych jednostek chorobowych nie został do końca poznany.

Zgodnie z klasyfikacją chorób reumatycznych według ARA (*American Rheumatism Association*)¹ można je podzielić na kilka grup :

- I. Układowe choroby tkanki łącznej:
 1. Reumatoidalne zapalenie stawów
 2. Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów
 3. Toczeń rumieniowaty układowy
 4. Twardzina układowa
 5. Uogólnione zapalenie powięzi
 6. Zapalenie wielomięśniowe, zapalenie skórnomięśniowe
 7. Zapalenia naczyń z martwicą
 8. Zespół Sjögrena
 9. Zespoły nakładania
 10. Inne.
- II. Seronegatywne zapalenia stawów kręgosłupa (spondyloartropatie seronegatywne)
- III. Choroba zwyrodnieniowa stawów
- IV. Zapalenie stawów towarzyszące zakażeniu

- V. Zapalenia stawów towarzyszące chorobom metabolicznym i gruczołów dokrewnych
- VI. Choroby kości i chrząstek
- VII. Dziedziczne choroby tkanki łącznej
- VIII. Zmiany okołostawowe
- IX. Nowotwory i zmiany nowotworopodobne
- X. Zmiany w stawach w przebiegu innych zespołów chorobowych

1.2 Twardzina układowa

Twardzina układowa (*systemic sclerosis* - SSc) należy do układowych chorób tkanki łącznej, które cechuje przewlekły proces zapalny o podłożu autoimmunologicznym. Charakteryzuje się ona uogólnionym zwłóknieniem skóry i narządów wewnętrznych. Postępujące włóknienie jest efektem między innymi nadmiernej syntezy oraz dojrzewania kolagenu, co prowadzi do niewydolności narządów wewnętrznych oraz stwardnienia skóry. U podłoża choroby leży również uszkodzenie naczyń krwionośnych oraz nieprawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego. Twardzina układowa jest chorobą przewlekłą, postępującą, prowadzącą do kalectwa, a rokowanie dotyczące przeżycia zależy od stopnia zajęcia narządów wewnętrznych².

Wyróżnia się dwie postaci choroby: uogólnioną i ograniczoną³. Twardzina układowa uogólniona charakteryzuje się szybko postępującym zwłóknieniem skóry obejmującym proksymalne i dystalne części kończyn oraz tułów i twarz. Zmianom skórnym towarzyszy uszkodzenie narządów wewnętrznych: głównie płuc, serca, układu pokarmowego i nerek. W kapilaroskopii stwierdza się ogniska awaskularyzacji, natomiast w surowicy krwi wykrywane są między innymi przeciwciała przeciwko topoizomerazie I (Scl-70).

W postaci ograniczonej zmiany skórne dotyczą głównie twarzy oraz części dalszych kończyn górnych i dolnych, dystalnie od stawów łokciowych i kolanowych. W surowicy krwi obecne są zwykle przeciwciała przeciwcentromerowe (ACA), a w kapilaroskopii najczęściej obserwuje się megakapilary. Postać ta dawniej nazywana była zespołem CREST, który obejmuje: zwapnienia w tkankach miękkich (*Calcinosis*), objaw **R**aynaud, zaburzenia motoryki przełyku (*Esophageal dysmotility*), stwardnienie opuszek palców rąk (*Sclerodactyly*) i **T**eleangiektazje. Rokowanie w twardzinie ograniczonej jest lepsze niż w

postaci uogólnionej, ze względu na powolny przebieg choroby. Wyjątek stanowią osoby, u których po wielu latach rozwija się tętnicze nadciśnienie płucne, stwierdzone w tej grupie nieco częściej niż w postaci uogólnionej oraz pierwotna żółciowa marskość wątroby. W niektórych przypadkach typowym zmianom w narządach wewnętrznych nie towarzyszy stwardnienie skóry – taką postać choroby określa się twardziną układową bez zmian skórnych (*systemic sclerosis sine scleroderma*)⁴. Wprowadzono również pojęcie twardziny wczesnej, charakteryzującej przypadki bez cech stwardnienia skóry i bez zmian narządowych, ale z obecnością typowych przeciwciał przeciwjądrowych, objawu Raynaud oraz zmian kapilaroskopowych typowych dla twardziny układowej.

Kryteria klasyfikacyjne twardziny układowej opracowane zostały w 1980 roku przez Amerykańskie Towarzystwo Reumatologiczne (ARA)⁵. Należą do nich:

A. Kryterium duże:

- 1) Stwardnienie skóry proksymalnie od stawów śródrečno-paliczkowych i/lub śródstopno-paliczkowych

B. Kryteria małe:

- 1) Sklerodaktylia
- 2) "Naparstkowate" blizny na opuszkach palców lub zanik opuszek palców
- 3) Przypodstawne, obustronne włóknienie płuc

Chorobę można rozpoznać, gdy spełnione jest kryterium duże lub dwa kryteria małe, ze specyficznością 98% i czułością 97%. Około 10% chorych z SSc nie spełnia kryteriów ARA. Są to chorzy z wczesną postacią twardziny układowej, jak również osoby z twardziną ograniczoną i zajęciem przewodu pokarmowego lub z nadciśnieniem płucnym bez włóknienia śródmiąższowego płuc. Z tego powodu Le Roy i Medsger zaproponowali dodatkowe kryteria rozpoznania wczesnej postaci twardziny układowej, obejmujące współwystępowanie: objawu Raynaud, typowych dla twardziny układowej zaburzeń w kapilarach wałów paznokciowych i charakterystycznych dla choroby przeciwciał (np. ACA, aScl-70, aPM-Scl)^{6, 7}. SSc może współistnieć z objawami innej układowej choroby tkanki łącznej, co nazwano zespołem nakładania.

1.3 Historia

Pierwsze wzmianki o chorobie skóry przypominającej twardzinę układową można znaleźć już w pismach Hipokratesa pochodzących z około 400r. p.n.e. Jednak szczegółowe opracowanie na temat twardziny powstało w 1753 roku. Carlo Curzio w monografii wydanej w Neapolu opisał przypadek 17-letniej kobiety z uogólnionym stwardnieniem skóry i „napięciem” wokół ust oraz „zimną skórą”, problemami z oddychaniem i zaburzeniami ze strony układu pokarmowego.

W 1847 roku Gintrac zaproponował opisowe określenie „sklerodermie”, od greckich słów „skleros”- twardy i „derma”- skóra.

Zaburzenia ukrwienia obwodowego towarzyszące twardzinie układowej po raz pierwszy opisał Maurice Raynaud w 1865 roku, który u 30 letniego mężczyzny zaobserwował „drętwienie” rąk w czasie zimy oraz stopniowe stwardnienie i ciemnienie skóry rąk. Od jego nazwiska podobne zmiany nazwano objawem Raynaud. Związek objawu Raynaud i twardziny układowej podkreślił również T.K. Monroe w 1899r., który przeanalizował 180 przypadków osób z objawem Raynaud - wśród nich zauważył 13 osób z oznakami stwardnienia skóry ⁸.

W 1894 roku William Osler zwrócił uwagę na układowy charakter choroby, ze szczególną predyspozycją do zajęcia płuc i nerek. Terminu „postępująca twardzina układowa” jako pierwszy użył Robert H. Goetz w 1945 roku, na podstawie badań pośmiertnych, przeprowadzanych na Uniwersytecie w Cape Town, w których stwierdził uszkodzenie narządów wewnętrznych u chorych ze stwardnieniem skóry ⁹.

W 1964 roku Richard H. Winterbauer jako pierwszy zdefiniował i nazwał zespół CRST, obejmujący występowanie podskórnych zwapnień, objawu Raynaud, sklerodaktylii oraz teleangiektazji (*Calcinosis*, *Raynaud's Phenomenon*, *Sclerodactyly*, *Teleangiectasia*), a ponadto charakteryzujący się ograniczonym zajęciem skóry ¹⁰. Nazwa ta rozszerzona była później do akronimu CREST, przez grupę Shulmana, która uznała zajęcie przewodu pokarmowego za jedną z głównych cech zespołu ¹¹.

1.4 Epidemiologia

Twardzina układowa jest rzadko występującą chorobą o nieznannej etiologii. Dostępne źródła określają ogólną częstość występowania od około 50 do 300 przypadków na milion osób. Roczna zachorowalność waha się od 2,3 do 22,8 przypadków na milion^{12,13}. Niejednolite dane są wynikiem zastosowania odmiennych metod badawczych oraz znacznych różnic geograficznych. Ryzyko zachorowania jest większe w USA (276/mln) i Australii (233/mln) niż w Europie (Francja: 158/mln, Anglia: 88/mln), czy Japonii (7/mln).¹³ Szacuje się, że w Polsce choruje na nią około 10000 osób¹⁴.

Wiek, płeć, rasa oraz tło genetyczne są czynnikami osobniczymi, które mają istotny wpływ na skłonność do zachorowania¹⁵.

Twardzina układowa częściej dotyczy kobiet (3 - 4 razy częściej niż mężczyzn, a w późnym wieku rozrodczym nawet > 7:1). Ryzyko zachorowania wzrasta wraz z wiekiem, a szczyt zachorowań przypada między 35 a 65 rokiem życia, dzieci chorują rzadko¹⁶.

Choroba dotyczy wszystkich ras, jednak dwukrotnie częściej występuje wśród Afroamerykanów niż u osób rasy białej i ma cięższy przebieg u tych chorych. Najwięcej przypadków twardziny układowej w jednej grupie etnicznej opisano wśród Indian z plemienia Choctaw w Oklahomie (469 przypadków na 100 000)^{17, 18}. Nie znaleziono w tej populacji czynników środowiskowych, które mogłyby wpływać na występowanie choroby, natomiast duże ryzyko zachorowania wiązane jest ze specyficznym haplotypem 2-cM na chromosomie 15q zawierającym gen dla fibryllaryny-1, jak również z antygenami HLA- B35, Cw4, DRB1(DR2), DQA1, DQB1(DQ7). W innych populacjach odnotowano związek twardziny układowej z antygenami HLA- DQA2, DQB1(DQ7) – indukujące powstawanie przeciwciał przeciwcentromerowych, antygen DRB1 warunkuje natomiast produkcję przeciwciał przeciw topoisomerasie I^{16, 19, 20}. Występowanie twardziny układowej w rodzinie jest istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania. Znane są rodziny z więcej niż jednym przypadkiem wystąpienia twardziny układowej.

U krewnych chorych na twardzinę układową stwierdzono również zwiększoną częstość występowania przeciwciał przeciwjądrowych oraz większe prawdopodobieństwo wystąpienia innych chorób o podłożu autoimmunologicznym niż w ogólnej populacji.

Analizowano także częstość występowania twardziny układowej u bliźniąt jedno- i dwujajowych, stwierdzając stosunkowo niski odsetek twardziny układowej u obojga rodzeństwa - 4,7 %, podobny w obu grupach, co świadczy o mniejszym znaczeniu czynników

genetycznych, a większym czynników środowiskowych. Natomiast przeciwciała przeciwjądrowe u każdego z rodzeństwa stwierdzono aż w 90% przypadków bliźniąt jednojajowych i 40% dwujajowych²¹.

W patogenezie choroby mogą brać również udział czynniki zakaźne. Nie ma bezpośrednich dowodów na wirusową etiologię twardziny układowej, jednak w szpiku chorych stwierdzano antygeny parwowirusa B19. Odnotowano również zwiększoną ilość przeciwciał skierowanych przeciw białkom cytomegalowirusa.

W patogenezie choroby istotną rolę odgrywają czynniki środowiskowe. Znaczne ryzyko rozwoju choroby niesie ekspozycja na pył krzemowy. U pracowników kopalni węgla kamiennego i złota zaobserwowano dwukrotnie większą zachorowalność, niż w ogólnej populacji. Przypadki twardziny układowej opisano również u osób narażonych na chlorek winylu, żywice epoksydowe, wodorowęglany aromatyczne, takie jak benzen, toluen i trójchloroetylen oraz po spożyciu oleju rzepakowego zanieczyszczonego aniliną lub kwasem erukowym. Podobny związek z chorobą obserwowano u osób leczonych bleomycyną, karbidopą, lekami zmniejszającymi apetyt, jak również u osób znieczulanych za pomocą pentazocyny, czy stosujących kokainę²².

1.5 Patogeneza

Najbardziej znamiennej cechą twardziny układowej jest nadmierna produkcja i odkładanie się kolagenu oraz innych białek macierzy pozakomórkowej (fibronektyny, fibryliny1, tenascyny i glikozaminoglikanów) w skórze i narządach wewnętrznych, na skutek zwiększonej aktywacji fibroblastów. Ponadto u podłoża choroby leży uszkodzenie naczyń, przebiegające z pobudzeniem komórek śródbłonna, jak również aktywacja i nieprawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego.

Uszkodzenie tkanek w twardzinie układowej cechują wczesne zmiany w mikrokrążeniu, nacieki z komórek jednojądrzastych oraz postępujące włóknienie. W późniejszych stadiach choroby obserwuje się nagromadzenie kolagenu w skórze, z postępującą jej atrofią.

Zmiany w naczyniach krwionośnych poprzedzają proces włóknienia. Uszkodzeniu ulegają małe tętnice, tętniczki i naczynia włosowate, co prowadzi do występowania objawu Raynaud już we wczesnej fazie choroby. U większości pacjentów jest to pierwszy objaw choroby. Zmiany w obrębie naczyń występują we wszystkich narządach wewnętrznych. Początkowo dochodzi do tworzenia się ubytków między komórkami śródbłonna i utraty jego

ciągłości, jak również powstawania licznych wakuoli w cytoplazmie komórek śródbłonka. Uszkodzenie śródbłonka i błony podstawnej naczyń prowadzi do wewnątrznaczyniowego krzepnięcia krwi i aktywacji płytek krwi. Dochodzi do uwolnienia z płytek krwi i komórek śródbłonka wielu aktywnych substancji biologicznych, odpowiedzialnych między innymi za proliferację błony wewnętrznej naczyń i komórek mięśni gładkich. Zmianom tym towarzyszy odkładanie kolagenu w ścianie naczyń oraz włóknienie okołonaczyniowe, prowadzące do zwężenia lub nawet zamknięcia światła naczynia. Stopniowe nasilanie zaburzeń w mikrokrążeniu prowadzi do stałego niedokrwienia. Uszkodzenie drobnych naczyń, pozbawionych mięśni gładkich, prowadzi do poszerzenia ich światła i teleangiektazji. W kapilaroskopii naczyń wału paznokciowego obserwuje się współistnienie poszerzonych, nieregularnych pętli naczyniowych oraz obszarów pozbawionych naczyń.

Czynnikami uszkadzającymi śródbłonek są: kolagenaza typu IV (granzyme 1), uwalniana przez cytotoksyczne limfocyty T oraz przeciwciała przeciwko komórkom śródbłonka (AECA). AECA, poza przyspieszaniem apoptozy komórek śródbłonka, stymulują ekspresję cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ICAM), cząsteczek adhezji komórkowej naczyń (VCAM) oraz selektyny P, selektyny E na powierzchni śródbłonka. Stymulują one również syntezę czynników chemotaktycznych, np. białka chemotaktycznego dla monocytów, interleukiny 1 (IL-1), IL-8, co prowadzi do gromadzenia limfocytów T i B, komórek NK i monocytów w przestrzeni okołonaczyniowej. AECA częściej występują u chorych z uogólnioną postacią twardziny układowej, a ich obecność wiąże się z martwicą palców, nadciśnieniem płucnym i zmniejszeniem dyfuzji gazów w płucach.

Uszkodzone komórki śródbłonka wytwarzają mniejszą ilość prostacykliny, substancji rozszerzającej naczynia, pełniącej również rolę inhibitora agregacji płytek krwi. Następstwem jej niedoboru jest zwiększona skłonność naczyń do skurczu i w konsekwencji niedokrwienie tkanek. Aktywowane płytki krwi, zgromadzone na uszkodzonej powierzchni naczynia, wytwarzają **tromboksan**, substancję silnie naczyniokurczącą, jak również płytkopochodny czynnik wzrostu (**PDGF**), który stymuluje wzrost i namnażanie komórek mięśni gładkich i fibroblastów. Płytki krwi wytwarzają ponadto transformujący czynnik wzrostu β (**TGF β**), który pobudza fibroblasty do syntezy kolagenu. Konsekwencją powyższych procesów jest włóknienie ściany naczynia. Zdolność do stymulowania fibroblastów i komórek mięśni gładkich naczyń posiada również **endotelina 1**. Wytwarzana przez śródbłonek pod wpływem zimna, działa silnie naczyniokurcząco, odgrywając istotną rolę w powstawaniu niedokrwienia²³. U chorych na twardzinę układową odnotowano zwiększone wytwarzanie endoteliny 1, przy jednoczesnym zmniejszeniu wytwarzania,

rozszerzającego naczynia, tlenku azotu (NO). Do przewagi procesów naczyniokurczących przyczynia się również zwiększona wrażliwość receptorów α_2 -adrenergicznych w naczyniach skóry. Skłonność naczyń do skurczu nasila dodatkowo uszkodzenie komórek śródbłonna.

Stopniowo zaburzenia naczyniowe i procesy zapalne zastępowane są przez postępujące włóknienie. Jest ono przyczyną większości objawów choroby. Włóknienie rozpoczyna się w skórze właściwej i górnych warstwach tkanki podskórnej, towarzyszy mu utrata unaczynienia, redukcja ilości przydatków i zaburzenia struktury skóry. Istotną rolę w pobudzaniu fibroblastów oraz w procesie włóknienia pełnią mechanizmy odpowiedzi komórkowej. Biorą w niej udział limfocyty T, makrofagi, komórki śródbłonna oraz wydzielane przez nie cytokiny np. fibronektyna, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, PDGF. Wokół małych naczyń skóry, szczególnie we wczesnej fazie choroby, obecne są nacieki z komórek jednojądrzastych, składające się głównie z pomocniczych limfocytów T (Th2). We krwi stwierdza się zwiększony stosunek CD4+ do CD8+ oraz podwyższone stężenie cytokin: IL-2 i IL-4, stymulujących proliferację fibroblastów, wytwarzanych przez aktywne limfocyty Th2.

Produkowany przez limfocyty Th1 interferon γ (INF- γ) pobudza makrofagi, hamując jednocześnie syntezę kolagenu przez fibroblasty. U chorych na twardzinę układową wytwarzanie INF- γ jest zmniejszone, co przyczynia się do mniejszej zdolności hamowania procesu włóknienia.

Pobudzone makrofagi wydzielają szereg cytokin: IL-1, IL-6, TNF α (czynnik martwicy nowotworów α), TGF- β i PDGF - nasilających syntezę kolagenu oraz wielkocząsteczkowe białko macierzy – fibronektynę, która wiąże fibroblasty i komórki jednojądrzaste w obrębie zmian twardzinowych za pośrednictwem receptorów nazywanych integrynami.

Komórki tuczne, stymulowane przez limfocyty T, również odgrywają istotną rolę w procesie włóknienia. Produkowany przez nie tryptofan pobudza syntezę kolagenu, a histamina jest przyczyną obrzęku skóry występującego we wczesnej fazie choroby.

Kluczowe znaczenie w patogenezie twardziny mają fibroblasty, które wytwarzają kolagen oraz glikozaminoglikany i fibronektynę. U chorych na twardzinę układową fibroblasty są w stanie przewlekłej aktywacji, podtrzymywanej przez wysokie stężenie TGF β , czynnika wzrostu tkanki łącznej (*connective tissue growth factor* - CTGF) i IL-1. Na powierzchni fibroblastów wykazano zwiększoną ekspresję receptora dla TGF β . Proliferację fibroblastów stymulują TGF β oraz PDGF, uwalniane przez makrofagi i fibroblasty. TGF β jest wytwarzany ponadto przez limfocyty T, komórki śródbłonna naczyń i keratynocyty. Indukuje

on syntezę CTGF przez fibroblasty, co stymuluje ich namnażanie i syntezę białek macierzy pozakomórkowej, w tym również kolagenu. Fibroblasty biorą również czynny udział w podtrzymywaniu reakcji zapalnej poprzez produkcję szeregu cytokin, np. $TGF\beta$ – co wskazuje na rolę procesów autoendokrynych w podtrzymywaniu włóknienia. Interakcja między fibroblastami a limfocytami T odgrywa istotną rolę w początkowej fazie aktywacji fibroblastów. Na powierzchni fibroblastów wykazano zwiększoną ekspresję antygenów CD40, które umożliwiają interakcje z komórkami posiadającymi ligand dla CD40, takimi jak limfocyty T, co prowadzi do aktywacji obu tych komórek²⁴.

Przewlekły proces zapalny odgrywa ważną rolę w patogenezie twardziny układowej. W przebiegu choroby stwierdza się zaburzenia odpowiedzi immunologicznej, zarówno typu komórkowego jak i humoralnego. Ich przejawem jest między innymi obecność przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) w surowicy krwi i płynach ustrojowych. W ponad połowie przypadków stwierdza się poliklonalną hipergammaglobulinemię – głównie IgG. Choć mechanizmy syntezy ANA nie są w pełni poznane, zjawisko autoimmunizacji jest uważane za czynnik biorący istotny udział w etiologii i patogenezie twardziny układowej¹⁷.

1.6 Objawy kliniczne

1.6.1 Objaw Raynaud.

Najbardziej typową cechą wczesnego okresu twardziny układowej jest objaw Raynaud (RP). Stanowi on najwcześniejszą manifestację uszkodzenia naczyń. Charakteryzuje się on napadowymi zmianami koloru skóry: blednięciem, sinieniem, a następnie zaczerwienieniem palców rąk i stóp, w odpowiedzi na niską temperaturę lub stres emocjonalny. RP może występować również w obrębie warg, czubka nosa, czy małżowin usznych. RP spowodowany jest przez odwracalny skurcz małych tętniczek palców rąk i stóp. Zasinieniu lub blednięciu skóry towarzyszy uczucie bólu i drętwienia oraz ziębnienie palców. Nie u wszystkich chorych obserwuje się wszystkie trzy fazy objawu. Za najbardziej charakterystyczną uważa się fazę zblednięcia. Objaw Raynaud jest jednym z najczęściej obserwowanych objawów twardziny układowej: występuje u 90-95% chorych. Zwykle jest pierwszym objawem choroby, który na wiele lat może wyprzedzać występowanie zmian skórnych, szczególnie w postaci ograniczonej. RP w przebiegu twardziny układowej zwykle jest ciężki i może przebiegać z obecnością owrzodzeń na opuszkach palców rąk ²⁵. Objaw ten jest efektem zaburzeń strukturalnych oraz nadreaktywności naczyń obwodowych. W twardzinie układowej stwierdza się znaczne zaburzenia kształtu oraz dystrybucji naczyń w obrębie wałów paznokciowych palców, które odzwierciedlają stopień zaawansowania zmian naczyniowych we wszystkich narządach wewnętrznych. Metodą pozwalającą na ocenę naczyń jest **kapilaroskopia**. Jest ona kluczową metodą, pozwalającą odróżnić pierwotny objaw Raynaud od wtórnego, towarzyszącego chorobom reumatycznym, jak również jest przydatna we wczesnym rozpoznawaniu twardziny układowej oraz określaniu aktywności choroby. Kapilary wałów paznokciowych łatwo uwidocznic podczas badania ponieważ ich oś długa przebiega równolegle do skóry. Charakterystyczne dla twardziny układowej zmiany obserwowane w kapilaroskopii to: poszerzenie pętli naczyniowych, megakapilary - olbrzymie pętle włóśniczek, których średnica w jakimkolwiek miejscu przekracza 50µm, „czapczkowate” wybroczyny układające się powyżej szczytów włóśniczek, strefy pozbawione naczyń (obszary awaskularyzacji: <30 pętli/5 mm) oraz ogniska neoangiogenezy, występujące pod postacią rozgałęzionych, krzaczystych pętli naczyniowych ²⁶. Poszerzone kapilary rozmieszczone są chaotycznie, często ze zmniejszoną gęstością. Zmiany te po raz

pierwszy opisał Maricq²⁷. Charakterystyczne zaburzenia występują u 83-93% chorych. Dla twardziny układowej uogólnionej typową zmianą są obszary beznacyniowe, podczas gdy megakapilary częściej występują w postaci ograniczonej. Zaobserwowano również korelację zmian kapilaroskopowych z czasem trwania choroby i objawu Raynauda. Poszerzenie kapilar oraz megakapilary są pierwszym sygnałem mikroangiopatii, rzadziej natomiast występują u chorych z dłuższym czasem trwania choroby. W następnej kolejności obserwuje się redukcję liczby kapilar oraz pętle rozgałęzione – ogniska nowotworzenia naczyń, które nie występują zwykle u chorych z wczesną postacią twardziny układowej. W chorobie Raynaud, którą charakteryzuje występowanie izolowanego objawu Raynaud, nie stwierdza się nieprawidłowych kapilar wałów paznokciowych lub są one jedynie skrócone.

Strukturalne zmiany naczyń włosowatych określane mianem mikroangiopatii typowej dla twardziny układowej występują u większości pacjentów i pojawiają się już we wczesnym stadium choroby. W 2000 r. Cutolo i wsp. dokonali klasyfikacji zmian kapilaroskopowych w twardzinie układowej, dzieląc je na zmiany o typie wczesnym, aktywnym oraz późnym²⁸.

Faza wczesna charakteryzuje się nielicznymi poszerzonymi pętlami naczyniowymi, faza aktywna - licznymi megakapilarami, wybroczynami oraz redukcją pętli naczyniowych, natomiast dla fazy późnej typowe są kapilary rozgałęzione i rozległe obszary pozbawione naczyń.

Zmiany naczyniowe odzwierciedlają stopień zaawansowania twardziny układowej, pozwalają potwierdzić rozpoznanie, a następnie monitorować postęp choroby. Są niezależnym czynnikiem prognostycznym progresji choroby Raynaud w twardzinę układową^{29, 30}.

Zaburzenia w obrazie kapilaroskopowym mogą być również obserwowane w zespole antyfosfolipidowym. U chorych z zakrzepicą w wywiadzie oraz obecnością przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPI) w surowicy krwi opisywano wybroczyny w okolicy szczytów pętli naczyniowych oraz linijne złogi hemosyderyny³¹.

1.6.2 Skóra.

Najbardziej charakterystycznym objawem twardziny układowej jest twardnienie skóry. Początkowo dochodzi do obrzęku rąk, nieco rzadziej stóp, podudzi oraz twarzy. Po fazie obrzękowej, trwającej kilka tygodni lub miesięcy dochodzi do stopniowego pogrubienia skóry. Zmiany skórne rozpoczynają się w obrębie palców i postępują proksymalnie. Mogą obejmować twarz, dystalne części kończyn górnych i dolnych – w postaci ograniczonej, jak i cały tułów i bliższe części kończyn - w postaci uogólnionej. Skóra staje się napięta, twarda, pogrubiała, związana z tkanką podskórną. Jest to przyczyną powstawania trudno gojących się owrzodzeń, szczególnie w okolicy stawów rąk i wyprostnych części przedramion, często ulegających zakażeniu. Stwardnienie i napięcie skóry, jak i włóknienie pochewek ścięgnistych i powięzi, jest również przyczyną ograniczenia ruchomości w stawach i przykurczów zgięciowych, głównie w obrębie rąk. Na opuszkach palców tworzą się charakterystyczne naporstkowe blizny, paznokcie mogą ulegać zanikowi, może nawet dochodzić do resorpcji i skracania paliczków dalszych rąk. W niektórych przypadkach skóra twarzy ulega wygładzeniu, zanikają fałdy skórne, czerwień wargowa ulega zwężeniu a wokół ust pojawiają się promieniście ułożone zmarszczki. Chorzy nie mogą otworzyć szeroko ust co utrudnia higienę jamy ustnej oraz jedzenie. Często obserwuje się również ciemne przebarwienia skóry, którym mogą towarzyszyć obszary hipopigmentacji, szczególnie w okolicy mieszków włosowych, dając obraz „soli i pieprzu”. Zanikowi ulegają gruczoły łojowe i potowe, dochodzi do utraty owłosienia, skóra staje się sucha i szorstka. Czasami można obserwować teleangiektazje oraz podskórne zwapnienia, szczególnie charakterystyczne dla zespołu CREST.

Faza stwardnieniowa trwa kilka miesięcy do kilku lat. Szybki postęp zmian skórnych związany jest z dużym ryzykiem wczesnego zajęcia narządów wewnętrznych, szczególnie płuc, serca i nerek. Stwardnienie skóry jest najbardziej nasilone po 3-5 latach trwania choroby, następnie zmiany skórne nieco ustępują lub przechodzą w fazę atrofii. U chorych z postacią ograniczoną stwardnienie skóry następuje wolniej, ale zwykle postępuje.

Nasilenie zmian skórnych ocenia się wg zmodyfikowanej **skali Rodnana**, która ilościowo szacuje stopień stwardnienia skóry, oznaczany w 17 okolicach ciała. Uzyskany wynik mieści się w przedziale od 0 (brak stwardnienia) do 51 (ciężkie stwardnienie skóry we wszystkich 17 okolicach). Skala Rodnana określa stopień zaawansowania zmian skórnych jako: postać łagodną (1-14 punktów), umiarkowaną (15-29), ciężką (30-39) lub stadium końcowe (≥ 40)^{32, 33}. Stanowi ona również istotny czynnik wpływający na rokowanie. Rozległe stwardnienie skóry z wysokim wynikiem w skali Rodnana wiąże się z cięższymi powikłaniami, podczas gdy mniejsze zajęcie skóry jest dobrym czynnikiem rokowniczym^{34, 35}.

1.6.3 Przewód pokarmowy.

W obrazie klinicznym u większości chorych stwierdza się zaburzenia czynności przewodu pokarmowego. Włóknienie może obejmować cały przewód pokarmowy: najczęściej dotyczy przełyku w 75 – 90%, żołądek zajęty jest w co najmniej 50%, jelito cienkie w 40 – 70%, natomiast jelito grube w 25 -50 %, a odbytnica w 50 – 70%. Proces włóknienia toczący się w ścianie przewodu pokarmowego powoduje atrofię błony mięśniowej oraz uszkodzenie zwojów nerwowych jelit. Zmiany te w przełyku i jelitach prowadzą do poszerzenia ich światła oraz zwolnienia motoryki, co może się przyczyniać do nieprawidłowego rozrostu bakteryjnego w ich świetle oraz zespołu złego wchłaniania, przebiegającego z utratą masy ciała i niedokrwistością. Hipokineza przełyku manifestuje się trudnościami w połykaniu, zwłaszcza stałych pokarmów, natomiast zaburzenia ruchów perystaltycznych jelit przejawiają się zaparciami, występującymi naprzemiennie z biegunką. Chorzy skarżą się na uczucie pełności w nadbrzuszu, piekący ból za mostkiem oraz zarzucanie treści pokarmowej. Niekiedy dochodzi do zapalenia przełyku i krwawienia do jego światła. Obserwuje się również poszerzenie, atonię i opóźnienie opróżniania żołądka.

1.6.4 Układ oddechowy.

Do zajęcia układu oddechowego dochodzi u większości chorych. W płucach obserwuje się rozsiane włóknienie śródmiąższowe, zwłóknienia wokół oskrzeli oraz opłucnej, pogrubienie błony podstawnej i zmniejszenie ilości pęcherzyków płucnych biorących udział w wymianie gazowej. Włóknienie śródmiąższowe płuc jest przyczyną małej tolerancji wysiłku, duszności, szczególnie w trakcie aktywności fizycznej oraz suchego, uporczywego kaszlu.

W badaniach radiologicznych widoczne są zagęszczenia lub obraz „plastra miodu” zajmujące dolne pola płucne. Zmiany śródmiąższowe, szczególnie we wczesnej fazie choroby, obrazuje najlepiej tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości (*high resolution computed tomography* – HRCT). Aktywny proces zapalny w tkance śródmiąższowej widoczny jest w HRCT jako „mleczna szyba”.

Badania objętościowe płuc są zwykle nieprawidłowe. Stwierdza się zmniejszenie całkowitej pojemności życiowej płuc, podatności płuc oraz zdolności dyfuzji gazów w płucach. Zmiany restrykcyjne mogą wynikać ze zmian śródmiąższowych w płucach, jak również ograniczenia ruchomości klatki piersiowej, spowodowane stwardnieniem skóry.

Zmniejszenie natężonej pojemności życiowej (*forced vital capacity* - FVC) poniżej dolnej granicy normy, przy braku cech obturacji, wskazuje na zmiany o charakterze restrykcyjnym. Pewne rozpoznanie zaburzeń restrykcyjnych wymaga pomiaru całkowitej pojemności płuc (*total lung capacity* - TLC) metodą bodypletyzmoigrafii. Najwcześniejszym jednak przejawem zajęcia płuc u chorych na twardzinę układową, jest zmniejszenie zdolności dyfuzyjnej tlenu węgla w płucach (*diffusing capacity for carbon monoxide* – DLCO). Obniżenie wartości DLCO stwierdza się w chorobach śródmiąższowych płuc, między innymi we włóknieniu płuc, jak również w pierwotnym nadciśnieniu płucnym oraz innych chorobach, np. w przewlekłej zatorowości płucnej, paleniu tytoniu. W przypadku zaburzeń typu restrykcyjnego, spowodowanych ograniczeniem ruchomości ścian klatki piersiowej lub chorobami nerwowomięśniowymi, wartość DLCO pozostaje w granicach normy, obniża się natomiast w chorobie śródmiąższowej płuc. Zmniejszenie DLCO przy prawidłowym wyniku spirometrii i objętości płuc może sugerować niedokrwistość, chorobę naczyń płucnych, wczesne stadium choroby śródmiąższowej płuc lub rozedmy. Obniżenie się DLCO poniżej 40% wartości należytnej stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny związany z wysoką umieralnością chorych na twardzinę układową³⁶.

Włóknienie śródmiąższowe płuc stanowi najczęstszą przyczynę zgonu chorych na twardzinę układową.

1.6.5 Układ krążenia.

Zmiany w sercu przebiegają pod postacią zapalenia osierdzia lub zaburzeń rytmu. Włóknienie aparatu bodźco-przewodzącego serca może manifestować się występowaniem bloku na każdym poziomie drogi przewodzenia. Arytmie mogą być również wyrazem kardiomiopatii wywołanej włóknieniem mięśnia sercowego w przebiegu choroby. W echokardiografii można stwierdzić cechy włóknienia zastawek serca, szczególnie ich pierścieni włóknistych.

Chorzy niekiedy skarżą się na występowanie bólu w klatce piersiowej o charakterze niedokrwiennym, odczuwanego pomimo braku zmian miażdżycowych w badaniu koronarograficznym. Wywołany jest on skurczem naczyń wieńcowych, analogicznym do objawu Raynaud.

Poza sercem zmiany obejmują również tętniczki płucne, których błona mięśniowa i wewnętrzna ulegają przerostowi i pogrubieniu, prowadząc do zwiększenia oporu naczyniowego, co w konsekwencji doprowadza do nadciśnienia płucnego (PH). Nadciśnienie płucne jest to nieprawidłowy wzrost ciśnienia w tętnicy płucnej. Rozpoznanie ustala się wówczas gdy średnie ciśnienie w tętnicy płucnej przekracza 25mmHg w spoczynku, w bezpośrednim pomiarze hemodynamicznym. PH w twardzinie układowej może występować pierwotnie, na skutek zaburzeń w naczyniach płucnych lub wtórnie do śródmiąższowej choroby płuc i niewydolności lewej komory serca. Tętnicze nadciśnienie płucne (PAH) występuje u 7 – 12 % chorych na twardzinę układową³⁷, najczęściej u chorych z postacią ograniczoną. W twardzinie uogólnionej wcześniej dochodzi do włóknienia śródmiąższowego płuc, które z kolei przyczynia się do powstawania nadciśnienia płucnego. W postaci wtórnej leki stosowane w PAH (analogi prostacykliny, inhibitory 5'fosfodiesterazy, antagoniści endoteliny) są nieskuteczne.

Nadciśnienie płucne jest czynnikiem znacznie pogarszającym jakość życia. Typowymi objawami nadciśnienia płucnego jest duszność i cechy prawokomorowej niewydolności serca. Zwiększenie oporu w tętnicach płucnych przekłada się na zwiększenie ciśnienia skurczowego w prawej komorze, jej przerostu, a w konsekwencji prowadzi do niewydolności serca. Obecność nadciśnienia płucnego można stwierdzić wyłącznie podczas cewnikowania jam

serca i tętnic płucnych. Bardziej prostą i nieinwazyjną metodą, którą można stosować jako badanie skriningowe, jest echokardiografia z funkcją Dopplera. Pozwala ona oszacować ciśnienie w tętnicy płucnej na podstawie maksymalnego gradientu wstecznego przez zastawkę trójdzielną. Nadciśnienie płucne definiuje się wówczas jako ciśnienie skurczowe w prawej komorze (*right ventricular systolic pressure* - RVSP) większe niż 30 mmHg.

Wystąpienie nadciśnienia płucnego znacznie pogarsza rokowanie – średni czas przeżycia wynosi około 2 lat. Należy zaznaczyć, że istnieje różnica między nadciśnieniem płucnym w przebiegu twardziny układowej a postacią idiopatyczną – w SSc podobne upośledzenie FVC, frakcji wyrzutowej oraz dysfunkcji prawej komory stwierdza się już przy niższych wartościach ciśnienia w tętnicy płucnej, ponadto leczenie nie jest tak efektywne, a prognoza – gorsza.

Ostatecznie może dochodzić do niewydolności lewokomorowej serca spowodowanej nadciśnieniem tętniczym oraz do niewydolności prawokomorowej, wtórnej do nadciśnienia płucnego.

1.6.6 Nerki.

Zajęcie nerek jest również poważnym czynnikiem pogarszającym rokowanie u chorych na twardzinę układową, a do niedawna było główną przyczyną zgonu w tej chorobie. Objawy uszkodzenia nerek występują u 40 – 80% chorych, częściej w postaci uogólnionej. Zmiany obejmują przerost błony wewnętrznej tętnic międzypłacikowych i kłębuszka oraz pogrubienie błony podstawnej kłębuszka nerkowego. Ponadto może dochodzić do skurczu tętniczek międzypłacikowych w odpowiedzi na zimno, podobnie jak w przebiegu objawu Raynaud. Klinicznie najczęściej obserwuje się nadciśnienie tętnicze, a czasami również niewydolność nerek. Rzadziej dochodzi do wystąpienia „kryzy” nerkowej. Obserwuje się ją u 11-20% chorych, najczęściej u pacjentów z wczesnym gwałtownie postępującym włóknieniem skóry. Zmiany w nerkach prowadzą do wystąpienia złośliwego nadciśnienia tętniczego, z towarzyszącą szybko postępującą niewydolnością nerek, co określane jest jako „twardzinowy przełom nerkowy”. Chorzy często skarżą się na bóle głowy, podwójne widzenie oraz drgawki poprzedzające wystąpienie nadciśnienia tętniczego. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się krwinkomocz i białkomocz, zwiększone stężenie reniny, cystatyny C w surowicy krwi oraz cechy niewydolności nerek. Przyczyną przełomu nerkowego jest aktywacja układu renina-angiotensyna-aldosteron, dlatego możliwe jest zastosowanie skutecznego leczenia.

Wdrożenie inhibitorów konwertazy angiotensyny znacznie poprawiało rokowanie u tych chorych.

W naturalnym przebiegu choroby dochodzi do powolnego, stopniowego pogarszania się funkcji nerek, czego wyrazem jest obniżanie się filtracji kłębuszkowej (*glomerular filtration rate* - GFR). Ponadto w badaniach laboratoryjnych obserwuje się białkomocz oraz erytrocyturię u około 20% chorych. Na podstawie GFR oraz obecności cech uszkodzenia nerek można określić stadium choroby nerek. Stwierdzenie filtracji kłębuszkowej poniżej 60 ml/min/1,73 m², niezależnie od tego, czy równocześnie występują cechy uszkodzenia nerek czy też nie, jednoznacznie upoważnia do rozpoznania przewlekłej choroby nerek³⁸.

Podczas oceny chorych na twardzinę układową należy określić aktywność choroby oraz postęp zmian nieodwracalnych. Nasilenie procesu zapalnego ma kluczowe znaczenie w doborze leczenia. U chorych w aktywnej fazie choroby wiele zaburzeń ma charakter odwracalny, podlegający modyfikacji, co powinno skłaniać do wdrożenia intensywnej terapii immunosupresyjnej. Ocena aktywności choroby w tym przypadku nie jest jednak prosta, z uwagi na brak ewidentnych cech zapalenia, poza tym trudniej oszacować uszkodzenie naczyń oraz włóknienie tkanki łącznej niż zapalenie. W tym celu opracowano 10- punktową skalę aktywności choroby – *Valentini Disease Activity Index (VDAI)*, obejmującą między innymi stopień zaawansowania zmian skórnych, nasilenie się dolegliwości w układzie krążenia i oddechowym, DLCO, martwicę palców, zapalenie stawów, odczyn Biernackiego³⁹. Z uwagi na to, że twardzina układowa gwałtownie postępuje w pierwszych 2 – 4 latach choroby, później następuje stabilizacja objawów, VDAI jest najbardziej przydatny na początku choroby.

Nasilenie objawów choroby, a więc stopień nieodwracalnego uszkodzenia tkanek, ocenia się używając skali ciężkości choroby. Ma to na celu oszacowanie zmian zachodzących w przebiegu choroby w czasie jej trwania, jak i ocenę skuteczności leczenia. Najczęściej wykorzystywana jest skala zaproponowana przez Medsger⁴⁰. Opiera się ona na ocenie 9 objawów klinicznych i narządowych, z których każdy jest punktowany od 0 do 4, w zależności od nasilenia (zmiany łagodne, umiarkowane, ciężkie, stadium końcowe). Obejmuje ona występowanie objawu Raynaud, owrzodzeń i martwicy palców, nasilenia zmian skórnych w skali Rodnana, zapalenia stawów, osłabienia siły mięśniowej, zaburzeń w obrębie przewodu pokarmowego, zajęcia płuc określanego na podstawie DLCO i FVC, jak również ocenę wydolności serca oraz czynność nerek.

1.7 Autoprzeciwciała

Istotne znaczenie dla powstawania i rozwoju choroby mają zaburzenia immunologiczne. U większości chorych w surowicy krwi stwierdza się autoprzeciwciała. Obok typowych dla twardziny układowej przeciwciał przeciwjądrowych, u pacjentów obserwuje się również inne, nieswoiste dla choroby autoprzeciwciała. Należą do nich przeciwciała przeciwfosfolipidowe, przeciwko cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA), czynnik reumatoidalny (RF).

1.7.1 Przeciwciała przeciwjądrowe w twardzinie układowej

Przeciwciała przeciwjądrowe (*antinuclear antibodies* - ANA) wykrywane są u 85 – 97 % chorych na twardzinę układową, z czułością 85% oraz niską swoistością - 54% (przy użyciu metody immunofluorescencji pośredniej)⁴¹. Reagują one głównie z antygenami jąderka. W przeciwieństwie do innych układowych chorób tkanki łącznej ANA skierowane są przeciwko jednemu antygenowi. ANA u chorych na twardzinę układową występują zwykle w wysokim mianie oraz są głównie klasy IgG i IgM. Znaczenie kliniczne jest uzależnione od swoistości antygenowej tych autoprzeciwciał.

Za przeciwciała ściśle związane z twardziną układową uważa się przeciwciała przeciwcentromerowe (ACA) oraz przeciwko topoizomerazie I (określane również jako anti-Scl-70). Ponadto obserwuje się przeciwciała skierowane przeciwko antygenom jąderka: polimerazie- RNA I, II, III (RNAP), fibrylarynie/U3 rybonukleoproteinie, Th/To, PM-Scl. Do mniej swoistych przeciwciał należą przeciwciała przeciw-Ku, przeciw-Sm, przeciw U1 rybonukleoproteinie (przeciw-U1 RNP) - obecne w ok. 8% przypadków, występujące w wysokim mianie w zespole nakładania oraz przeciw SS-A (ok. 35%) stwierdzane u chorych z wtórnym zespołem Sjögrena. Ostatnio coraz większą uwagę zwraca się również na występowanie przeciwciał przeciwfosfolipidowych i ich znaczenie dla obrazu klinicznego.

W metodzie immunofluorescencji pośredniej ANA mogą dawać różne typy fluorescencji w zależności od swoistości antygenowej: jąderkowy, plamisty lub centromerowy. Przeciwciała przeciwko Scl-70, U1 RNP oraz RNAP II i III dają plamisty obraz fluorescencji jądra komórkowego, podczas gdy przeciwciała przeciwko Th/To, PM-Scl, fibrylarynie oraz RNAP I – jąderkowy typ fluorescencji.

W praktyce klinicznej, aby rozpoznać twardzinę układową, wykorzystuje się miano i rodzaj fluorescencji jądra komórkowego. Istotne klinicznie miano ANA u chorych na twardzinę układową wynosi zwykle powyżej 1/160. Natomiast typ fluorescencji jest na tyle swoisty, że umożliwia ustalenie prawidłowego rozpoznania. Szczególnie przydatny jest typ jąderkowy, charakterystyczny dla twardziny układowej uogólnionej oraz centromerowy, występujący u chorych na twardzinę ograniczoną. W przypadku, gdy objawy kliniczne sugerują rozpoznanie twardziny układowej, a w metodzie immunofluorescencji pośredniej obecne są ANA o plamistym typie fluorescencji, należy wówczas ocenić swoistość antygenową tych auto-przeciwciał. Do tego celu służy metoda ELISA lub immunoblot i określenie przy ich pomocy obecności przeciwciał reagujących z topoizomerazą 1. Obecność ANA, rodzaj fluorescencji oraz określenie swoistości antygenowej umożliwia rozpoznanie choroby⁴².

Przeciwciała oprócz znaczenia diagnostycznego, mają również znaczenie prognostyczne, gdyż ich obecność koreluje z objawami klinicznymi.

1.7.1.1 Przeciwciała przeciwcentromerowe (ACA)

Głównym antygenem jest sześć białek kinetochorów znajdujących się w obrębie centromerów, szczególnie w CENP-B (80-kD) oraz z CENP-A (17 kD), CENP-C (140- kD) i CENP-D. Wszystkie przeciwciała określane mianem przeciwciał przeciwcentromerowych reagują głównie z CENP-B⁴³. W metodzie immunofluorescencji pośredniej przeciwciała te dają centromerowy typ fluorescencji. Charakteryzuje się on obecnością małych jednakowej wielkości ziarnistości równomiernie rozłożonych w jądrze komórkowym.

ACA obecne są u 20-30% chorych na twardzinę układową⁴⁴. Uważa się, że przeciwciała przeciwcentromerowe są swoiste dla twardziny ograniczonej lub zespołu CREST - występują u 60-80% chorych z tą postacią. Rzadko są obecne u chorych z postacią uogólnioną (2-5%). Ich obecność koreluje z obecnością objawu Raynaud i jest związana z lepszym rokowaniem niż w przypadku wykrycia innych przeciwciał związanych z chorobą. Rzadziej obserwuje się zmiany śródmiąższowe w płucach, chociaż zwiększa się ryzyko wystąpienia pierwotnego nadciśnienia płucnego u chorych na SSc, jak również martwicy palców, czy zwapnień w tkankach. Zaburzenia naczyniowe obserwowane w kapilaroskopii wałów paznokciowych są mniej nasilone, niż w przypadku wykrycia przeciwciał przeciw Scl-70, częściej obserwuje się

poszerzenie naczyń i megakapilary, niż zmiany typowe dla fazy późnej. Wykazano także, że ich obecność zwiększa ryzyko choroby nowotworowej⁴⁵. Przeciwciała te stwierdza się u chorych na zapalenie tarczycy typu Hashimoto, którym towarzyszył objaw Raynaud⁴⁶ oraz pierwotnej żółciowej marskości wątroby u chorych z objawami twardziny układowej⁴⁷, a także u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów.

1.7.1.2 Przeciwciała przeciw topoizomerazie I (Scl-70)

Reagują one z regionem katalitycznym DNA topoizomerazy I, który bierze udział w przecinaniu superhelixy, w czasie procesu transkrypcji lub replikacji DNA. Scl-70 występują u 22-40% chorych na twardzinę układową. Są wykładnikiem rozległych zmian skórnych oraz zajęcia bliższych części kończyn⁴⁸. Wykazano, że osoby które posiadają te przeciwciała mają długi przebieg choroby charakteryzujący się włóknieniem płuc oraz zajęciem mięśnia sercowego⁴⁹. W niektórych badaniach wykazano również ich związek z występowaniem przełomów nerkowych⁵⁰. Zaobserwowano również ich związek z nasilonymi zmianami naczyniowymi w kapilaroskopii – obecnością ognisk neoangiogenezy oraz obszarów awaskularyzacji.

Przeciwciała te wspólnie z przeciwciałami przeciw centromerom służą do zróżnicowania twardziny układowej i miejscowej. U pacjentów z objawem Raynaud oraz u których wykryto aScl-70 lub ACA w surowicy krwi można w przyszłości spodziewać się wystąpienia SSc. Około 40% chorych na twardzinę układową uogólnioną nie posiada przeciwciał aScl-70, zaś mniej niż 1% chorych może posiadać przeciwciała przeciw centromerom, jak i przeciw Scl-70⁵¹. Ostatecznie jednak zarówno przeciwciała przeciw centromerom i aScl-70 można stwierdzić także u chorych na inne układowe choroby tkanki łącznej.

Natomiast przeciwciała przeciwko antygenom jąderka występują u około 15 – 40% chorych z twardziną układową⁵²:

1.7.1.3 Przeciwciała przeciw polimerazie RNA (RNAP)

Przeciwciała te reagują z RNA polimerazami komórek eukariotycznych, które zawierają trzy klasy enzymów. RNA-polimeraza I bierze udział w syntezie prekursorów rRNA w jąderku komórkowym. RNA-polimeraza II bierze udział w transkrypcji genów małych RNA, RNA-polimeraza III syntetyzuje małe jądrowe RNA oraz 5S rRNA i tRNA.

Przeciwciała te występują u 4 do 23% chorych na twardzinę układową, ich obecność związana jest z uogólnionym stwardnieniem skóry oraz zajęciem narządów wewnętrznych⁵³. Spośród przeciwciał reagujących z RNA-polimerazami, najbardziej swoiste dla twardziny układowej są przeciwciała reagujące z RNA polimerazą I i III. Te ostatnie uważane są za wykładnik serologiczny przełomu nerkowego u chorych na twardzinę układową⁵⁴.

1.7.1.4 Przeciwciała przeciw fibrylarynie (U3snoRNP)

Nazwa „fibrylaryna” pochodzi od powiązania białka z fibrylarnymi strukturami jąderka . Jest białkiem jąderkowym uczestniczącym w dojrzewaniu prekursorowego rRNA⁵⁵. Antygenem jest białko będące składową U3 małych jąderkowych rybonukleoprotein (snRNP).

Przeciwciała reagujące z fibrylaryną występują u 8 - 10% chorych na twardzinę układową. U 90% chorych posiadających te autoprzeciwciała stwierdza się zajęcie serca oraz płuc. Przyjmuje się, że ich obecność związana jest z układową postacią twardziny, charakteryzującą się zajęciem narządów mięszzowych⁵⁶. Wykazano ich obecność również u chorych na postać miejscową twardziny⁵⁷, jednak nie wykazano żadnej korelacji klinicznej ani laboratoryjnej.

1.7.1.5 Przeciwciał przeciw Th snRNP

Przeciwciała reagują z Th snRNP, znajdującą się głównie w jądrze komórkowym i biorącą udział w tworzeniu prekursorów tRNA , replikacji mitochondrialnego DNA oraz biogenezie rybosomów⁵⁸.

Przeciwciała przeciw Th snRNP występują u 4 do 10% chorych na twardzinę układową. Stwierdzono, że u osób posiadających tego typu przeciwciała częściej stwierdza się cechy twardziny ograniczonej, obrzęki palców, zajęcie jelita cienkiego, niedoczynność tarczycy oraz bóle i zapalenie stawów⁵⁹.

1.7.1.6 Przeciwciała przeciw PM-Scl

Przeciwciała tego typu stwierdza się u 3% chorych na twardzinę układową, zwykle z ograniczonym zajęciem skóry. Obecne są u osób ze zmianami o charakterze twardziny układowej z zajęciem ścięgien oraz z zajęciem nerek⁶⁰, są również markerem nadciśnienia

płucnego. Przeciwciała te posiada około 50% chorych z zespołem nakładania twardziny i zapalenia wielomięśniowego.

1.7.2 Przeciwciała przeciwfosfolipidowe (aPI)

Stanowią one heterogenną grupę immunoglobulin skierowaną przeciwko ujemnie naładowanym fosfolipidom oraz ich kompleksom z białkami takimi jak: β 2 glikoproteina I wiążąca kardiolipinę, protrombina, białko C, S, aneksyna V, jak również przeciwciała przeciwko utlenionym lipoproteinom niskiej gęstości (*oxidized low-density lipoprotein* - anty-oxy-LDL). Przeciwciała te charakterystyczne są dla zespołu antyfosfolipidowego (*antiphospholipid syndrome* - APS) (tab. 1), ale mogą również występować w wielu innych chorobach o podłożu infekcyjnym, zapalnym i autoimmunologicznym. Szczególnie często można je stwierdzić w toczeniu rumieniowatym układowym, zespołach limfoproliferacyjnych oraz takich chorobach infekcyjnych jak mononukleozą zakaźną, wirusowe zapalenie wątroby typu A, kiła, czy malaria⁶¹. aPI skojarzone są z występowaniem tętniczych i żylnych zakrzepów, szczególnie u młodych osób, nie wyłączając udaru mózgu, czy zawału serca, powtarzających się niepowodzeń położniczych, trombocytopenii i siności siateczkowej (*livedo reticularis*).

Tabela 1. Zmodyfikowane kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego z 2004 r. ⁶²

Zmodyfikowane kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego (Sydney, 2004)
<p>Kliniczne:</p> <p>1) <u>Zakrzepica naczyń:</u> ≥ 1 epizodów zakrzepicy w naczyniach tętniczych, żylnych lub włosowatych (z wyjątkiem zakrzepicy żył powierzchniowych), potwierdzona w badaniu obrazowym, dopplerowskim lub histopatologicznym (nie powinno występować zapalenie ściany naczynia)</p> <p>2) <u>Niepowodzenia położnicze</u></p> <p>a) ≥ 1 obumarcie morfologicznie prawidłowego płodu od 10 tygodnia ciąży (prawidłowa morfologia płodu w USG lub w badaniu bezpośrednim)</p> <p>b) ≥ 1 przedwczesny poród morfologicznie prawidłowego noworodka przed 34 tygodniem ciąży w związku ze stanem przedrzucawkowym, rzucawką lub ciężką niewydolnością łożyska</p> <p>c) ≥ 3 samoistne poronienia przed 10 tygodniem ciąży o niewyjaśnionej przyczynie, z wykluczeniem zmian anatomicznych, hormonalnych u matki oraz chromosomalnych u obojga rodziców</p>
<p>Laboratoryjne:</p> <p>1) Antykoagulant toczniowy, wykryty ≥ 2 w odstępie ≥ 12 tygodni</p> <p>2) Przeciwciała przeciwkardiolipinowe obecne w średnim lub wysokim stężeniu (>40 GPL lub MPL), stwierdzone ≥ 2 w odstępie ≥ 12 tygodni</p> <p>3) Przeciwciała przeciwko $\beta 2$ glikoproteinie I, stwierdzone ≥ 2 w odstępie ≥ 12 tygodni</p>
<p><u>Zespół antyfosfolipidowy rozpoznaje się</u> gdy spełnione jest ≥ 1 kryterium kliniczne i ≥ 1 kryterium laboratoryjne</p> <p>Kryteriów tych nie należy stosować, gdy objawy kliniczne choroby wystąpiły w okresie < 12 tygodni lub > 5 lat od momentu wykrycia aPL</p>

Pomimo, że wtórny zespół antyfosfolipidowy występuje rzadko w twardzinie układowej (u mniej niż 1% chorych⁶³), aPI stwierdzić można w około 20 - 25% przypadków⁴⁴ (w niektórych badaniach nawet do 65%). W ogólnej populacji antykoagulant toczniowy występuje u około 1% osób zdrowych, natomiast aCl - u 2-5%, odsetek ten zwiększa wraz z wiekiem i po 70 roku życia osiąga aż 50%. Wśród członków rodzin chorych na APS ryzyko wykrycia aPI sięga 8-31%.

Rola tych przeciwciał w patogenezie i kształtowaniu obrazu klinicznego twardziny układowej nie jest jasna. Ustalono, że przy obecności aPL ryzyko wystąpienia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej wzrasta średnio 11-krotnie. Największe zagrożenie stanowi obecność antykoagulanta toczniowego (LA) w skojarzeniu z przeciwciałami przeciw $\beta 2$ glikoproteinie I (a $\beta 2$ GPI) lub przeciwko protrombinie⁶⁴. Ryzyko zakrzepicy zmienia się w zależności od klasy przeciwciał. Zazwyczaj immunoglobuliny klasy G są izotypem przeważającym u chorych z zakrzepicą i poronieniem w wywiadzie, ale objawy zespołu antyfosfolipidowego mogą być związane również z immunoglobulinami klasy M, a nawet IgA⁶⁵. W badaniu Aslanidis i wsp. zakrzepica wiązała się z przeciwciałami aCl wszystkich klas oraz a $\beta 2$ GPI w klasie IgG i IgM, ale nie w klasie IgA³¹.

W praktyce klinicznej oznacza się antykoagulant toczniowy (przeciwciała skierowane przeciw fosfolipidom uczestniczącym w procesie krzepnięcia), przeciwciała przeciwkardiolipinowe (aCl) oraz przeciwko $\beta 2$ glikoproteinie I.

Najczęściej spośród przeciwciał przeciwfosfolipidowych opisuje się przeciwciała aCl. Występują one u chorych na twardzinę układową częściej niż w zdrowej populacji, tj. do 41%^{65, 66, 67, 68}. Jeśli u chorych na twardzinę układową występują jakiegokolwiek przeciwciała przeciwfosfolipidowe, są to zwykle aCl^{65, 66}. Poza nimi stwierdza się również przeciwciała przeciw kompleksom kardiolipiny z białkiem - $\beta 2$ glikoproteiną I u 3-10% chorych^{65, 67, 68, 69}. Nie ustalono dotychczas jasnego związku między występowaniem aPI a objawami klinicznymi. Obecność ich wydaje się korelować z cięższą postacią choroby – z zajęciem narządów wewnętrznych oraz rozległymi zmianami skórnymi⁷⁰. Istnieją jednak doniesienia, w których takiej zależności nie stwierdzono^{65, 66, 68, 71}.

W literaturze opisywane są przypadki chorych na SSc, u których obecności aCl w surowicy krwi towarzyszy zakrzepica, zatorowość płucna, włóknienie śródmiąższowe i nadciśnienie płucne, jak również białkomocz, zapalenie mięśnia sercowego, czy owrzodzenia opuszek palców^{67, 72, 73}. W niektórych badaniach aCl związane były z niedokrwieniem i zawałem mięśnia sercowego, ale nie z obecnością uszkodzenia zastawek czy dysfunkcją rozkurczową komór. Opisano też chorych z katastrofalnym zespołem antyfosfolipidowym, u których

stwierdzono martwicę opuszek palców oraz liczne wielonarządowe mikrozatory ⁷⁴. Przeciwciała aCl częściej stwierdza się u chorych z ograniczonym zajęciem skóry, a rzadziej z włóknieniem uogólnionym, czy zaburzeniami połykania. Wynika to prawdopodobnie faktu, że ich obecność koreluje z występowaniem przeciwciał ACA, które są typowe dla ograniczonej postaci twardziny układowej. Katayama i wsp sugerują również, że przeciwciała aCl mogą być związane z manifestacją objawów toczniopodobnych w grupie chorych z progresywną postacią twardziny, takich jak leukopenia ⁷¹.

Przeciwciała a β 2GPI, podobnie jak aCl, znacząco zwiększają ryzyko wystąpienia izolowanego nadciśnienia płucnego, ponadto wraz ze wzrostem miana przeciwciał obserwowano zwiększanie się średniego ciśnienia w tętnicy płucnej.

Wykazano związek zmian niedokrwienych w obrębie palców z obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko aneksynie V ⁷⁵.

Antykoagulant toczniowy (LA) stanowi heterogenną grupę przeciwciał przeciwfosfolipidowych (w klasie IgG, IgM, IgA), które przedłużają czasy krzepnięcia osocza zależne od fosfolipidów. LA stanowi jedną z najczęstszych przyczyn niewyjaśnionego wydłużenia APTT (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji - *Activated Partial Thromboplastin Time*) oraz jest najbardziej istotnym czynnikiem ryzyka choroby zakrzepowo-zatorowej spośród wszystkich przeciwciał przeciwfosfolipidowych ⁷⁶. Nie ma prostego testu wykrywającego LA. Antykoagulant toczniowy powinien być rozpoznawany według zasad opracowanych przez International Society on Thrombosis and Haemostasis ⁷⁷. Wydłużenie jednego z zalecanych czasów krzepnięcia: APTT, czasu krzepnięcia osocza po dodaniu jadu węża Russella (*dilute Russell viper venom time* - dRVVT) lub czasu protrombinowego wystarczy do stwierdzenia LA. dRVVT wykazuje większą czułość niż APTT, jednak żaden z tych testów nie charakteryzuje się 100% czułością, dlatego w celu wykluczenia obecności LA konieczne jest wykonanie przynajmniej dwóch testów. Pozostałe przeciwciała przeciwfosfolipidowe nie wpływają na wyniki testów krzepnięcia krwi, zależnych od fosfolipidów, tj. APTT i czasu protrombinowego ⁷⁸.

U chorych z przeciwciałami przeciwko kompleksowi fosfatydyloseryna-protrombina (*anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies* - a-PS/PT) znacząco częściej obserwuje się objawy niedokrwienia obwodowego, owrzodzenia palców, jak również izolowane nadciśnienie płucne oraz włóknienie śródmiąższowe płuc, zmniejszoną pojemność życiową i całkowitą płuc. Natomiast nie stwierdzono podobnego związku z rozległością zmian skórnych ⁶⁹. Chorzy z teleangektazjami i nadciśnieniem płucnym mieli częściej przeciwciała a-PS/PT,

niż pozostali. Sanna i wsp. sugerują, że a-PS/PT mogą być markerem zajęcia naczyń w twardzinie układowej⁶⁷.

Istotne znaczenie dla przebiegu choroby mają również kompleksy oxy-LDL i β 2GPI. Proces zapalny w naczyniach może promować ich tworzenie. Współwystępowanie tych kompleksów i ich przeciwciał sugeruje, że mają one znaczenie aterogenne i prozakrzepowe. Za proaterogenne uważane są przeciwciała klasy IgG, natomiast przeciwciałom klasy IgM przypisuje się działanie antyaterogenne. Lopez i wsp. zauważyli, że chorzy zarówno na twardzinę układową, jak i na toczeń rumieniowaty układowy mają większą ilość kompleksów oxy-LDL/ β 2GPI i przeciwciał w klasie IgG, niż ludzie zdrowi, czy nawet chorzy na reumatoidalne zapalenie stawów, u których przeważają przeciwciała klasy IgM⁷⁹. Miano tych przeciwciał jest ponadto znacząco wyższe u chorych z wtórnym zespołem antyfosfolipidowym, w tym najwyższe u tych z wywiadem zakrzepowym. Wyniki te odzwierciedlają częste zajęcia naczyń w twardzinie układowej i toczeniu rumieniowatym układowym, a rzadkie w reumatoidalnym zapaleniu stawów⁷⁹.

Pomimo, że ostatnio przeważa pogląd, że przeciwciała przeciwfosfolipidowe mają znaczenie rokownicze oraz kliniczne w twardzinie układowej, wielu autorów nie znajduje jednak żadnego powiązania przeciwciał przeciwfosfolipidowych z cechami klinicznymi choroby^{65, 66, 68, 71}.

W prezentowanej pracy podjęto próbę ustalenia związku przeciwciał przeciwfosfolipidowych z niektórymi objawami klinicznymi, które należy uwzględnić oceniając stopień zaawansowania twardziny układowej.

2. CELE PRACY

Celem pracy było:

1. Określenie częstości występowania przeciwciał przeciwfosfolipidowych, tj. antykoagulantu toczniowego, przeciwciał przeciwkardiolipinowych, przeciwciał przeciw $\beta 2$ glikoproteinie I u chorych na twardzinę układową

oraz

2. Próba oceny związku pomiędzy obecnością poszczególnych przeciwciał przeciwfosfolipidowych a:
 - a. stopniem stwardnienia skóry
 - b. nasileniem zmian w naczyniach wałów paznokciowych
 - c. włóknieniem śródmiąższowym w płucach
 - d. zaburzeniami zdolności dyfuzyjnej tlenu węgla w płucach
 - e. zmniejszeniem natężonej pojemności życiowej
 - f. obecnością nadciśnienia płucnego
 - g. zajęciem nerek [zmniejszeniem przesączania kłębuszkowego $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$]

3. MATERIAŁ I METODY

Osoby zakwalifikowane do badania pochodziły z populacji polskiej. Przed przystąpieniem do badania każdy pacjent został poinformowany o celu i sposobie przeprowadzenia badania oraz wyraził świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu. Projekt uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 1085/07).

Badanie przeprowadzono w grupie 34 chorych na twardzinę układową: 29 kobiet i 5 mężczyzn, w wieku od 27 do 66 lat (średnia wieku 47 lat \pm 11,3), leczonych w Klinice Reumatologii i Chorób Wewnętrznych UM w Poznaniu w latach 2007 - 2010. Rozpoznanie choroby ustalone zostało na podstawie kryteriów Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego⁵. Czas trwania choroby wynosił od 1 roku do 30 lat (średnio 8,6 lat \pm 6,3).

Chorzy zostali poddani badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu oraz badaniom dodatkowym, obejmującym badania obrazowe i czynnościowe płuc, kapilaroskopię, echokardiografię, pomiar stężenia kreatyniny w surowicy krwi oraz badania serologiczne. Uzyskane od chorych surowice posłużyły do oceny występowania przeciwciał przeciwkardiolipinowych, przeciw β 2 glikoproteinie I oraz antykoagulanta toczniowego. Dodatkowo oznaczono w nich ANA, ANCA oraz czynnik reumatoidalny (RF). ANA i RF wykonywano w celu potwierdzenia rozpoznania, natomiast ANCA aby wykluczyć współwystępowanie zapalenia naczyń.

Na podstawie uzyskanych wyników badań serologicznych, chorych podzielono na trzy grupy:

1. z występującym w surowicy krwi antykoagulantem toczniowym
2. z obecnymi przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi i/lub przeciw β 2 glikoproteinie I
3. bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych w surowicy krwi – grupa kontrolna.

Grupa 1: liczyła 22 osoby: 3 mężczyzn i 19 kobiet, w wieku od 27 do 66 lat (średnio 50 lat $\pm 10,4$), z czasem trwania choroby od 1 do 30 lat (średnio 8,4 lat $\pm 6,9$).

Grupa 2: liczyła 5 osób: 1 mężczyznę i 4 kobiety, w wieku od 42 do 60 lat (średnio 52,2 lat $\pm 7,4$), czas trwania choroby od 1 do 15 lat (średnio 8,2 lat $\pm 5,3$).

Z uwagi na to, że u wszystkich chorych z przeciwciałami aCl i/lub a β 2GPI stwierdzono również antykoagulant toczniowy, grupę 2 wyodrębniono z grupy 1.

Grupa 3: obejmowała 12 osób: 2 mężczyzn i 10 kobiet, w wieku od 27 do 62 lat (średnia wieku 41 $\pm 11,2$), z czasem trwania choroby od 3 do 20 lat (średnio 8,9 lat $\pm 5,4$).

Ogólną charakterystykę wszystkich grup przedstawia tabela 2 i 3.

Tabela 2. Charakterystyka wieku chorych na twardzinę układową w grupie 1,2 i 3 oraz 1 – 2 (chorzy z LA bez aCl i/lub a β 2GPI)

Grupa	N	Wiek [lata]				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	odch.stand.
1	22	50,0	51,5	27,0	66,0	10,4
1 - 2	17	49,4	50,0	27,0	66,0	11,2
2	5	52,2	53,0	42,0	60,0	7,4
3	12	41,4	39,5	27,0	62,0	11,2

Zróznicowanie wieku w tych trzech grupach nie jest istotne statystycznie (test F; $p=0,090$).

Natomiast dla zestawienia grup 1 i 3 różnica jest istotna statystycznie (test t-Studenta; $p=0,031$).

Tabela 3. Czas trwania twardziny układowej w badanej grupie chorych

Grupa	N	Czas trwania [lata]				
		średnia	mediana	minimum	maksimum	odch.stand.
1	22	8,4	6,5	1,0	30,0	6,9
1 - 2	17	8,4	6,0	2,0	30,0	7,4
2	5	8,2	8,0	1,0	15,0	5,3
3	12	8,9	6,5	3,0	20,0	5,4

Zróznicowanie czasu trwania w trzech grupach (1-2, 2, 3) nie jest istotne statystycznie (test Kruskala-Wallisa; $p=0,737$). Także dla zestawienia grup 1 i 3 różnica nie jest istotna statystycznie (test Manna-Whitneya; $p=0,552$).

Badane zmienne porównywano między grupą 1 i 3 oraz między grupą 2 i 3.

3.1 Diagnostyka laboratoryjna

3.1.1 Obecność autoprzeciwciał

U wszystkich badanych osób określano obecność następujących autoprzeciwciał:

3.1.1.1 Antykoagulant toczniowy (LA)

LA oceniano metodami koagulologicznymi, według metod opracowanych przez International Society on Thrombosis and Haemostasis ⁷⁷, testem z użyciem rozcieńzonego osocza i jadu węża *Vipera russeli* (dRVVT).

Procedura wykrywania LA składała się z trzech etapów:

- a. testu skriningowego – wynik prawidłowy wykluczał obecność LA; przy wydłużonym dRVVT przeprowadzono drugi etap,
- b. test mieszania osocza badanego z kontrolnym, pochodzącym od zdrowego dawcy, w stosunku 1:1 – korekcja świadczyła o niedoborze czynników krzepnięcia, natomiast nadal wydłużony dRVVT – o obecności antykoagulanta,
- c. test potwierdzający – neutralizacja inhibitora krzepnięcia nadmiarem fosfolipidów; zanik aktywności inhibitora krzepnięcia i uzyskanie prawidłowego wyniku w obecności dużych stężeń fosfolipidów wskazywał na obecność antykoagulanta toczniowego.

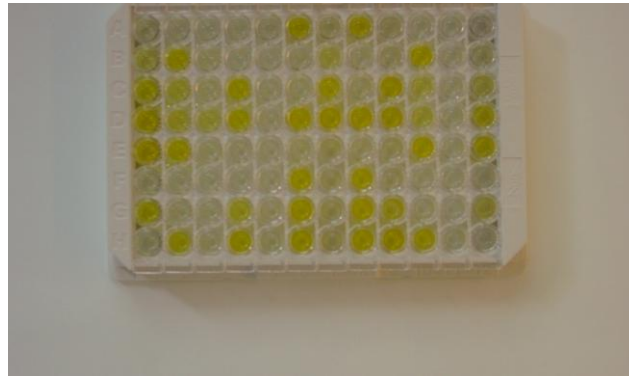
3.1.1.2 Przeciwciała przeciwkardiolipinowe (aCl)

Przeciwciała przeciwkardiolipinowe w klasie immunoglobulin G, M i A (IgG, IgM, IgA) określano metodą immunoenzymatyczną ELISA (Euroimmun, Niemcy, nr katalogowy EA 1621-9601P).

Zestaw testowy posłużył do ilościowego oznaczenia *in vitro* przeciwciał w surowicy. Do przeprowadzenia badania użyto mikropłytek ze studzienkami reakcyjnymi opłaszczonymi antygenem (ryc. 1). W pierwszym etapie studzienki reakcyjne inkubowano z rozcieńczonymi surowicami pacjentów. Bufor do rozcieńczania próbek zawierał kofaktor: β 2GPI (w wielu przypadkach aCl zależą od białka plazmy β 2GPI jako kofaktora koniecznego do rozpoznania

antygeny). W pozytywnych przypadkach przeciwciała klasy A, G, M wiązały się z obecnymi na powierzchni studzienki antygenami.

Związane przeciwciała wykrywano podczas drugiego etapu inkubacji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiej immunoglobulinie klasy A, G, M, znakowanymi enzymem, który następnie katalizował reakcję barwną.



Rycina 1. Płytką titracyjną.

Protokół badania:

- Krew pobierano na skrzep, celem uzyskania surowicy.
- Przeznaczone do badania próbki surowicy rozcieńczano w stosunku 1:201 w buforze do rozcieńczania (5µl próbki do 1 ml buforu).
- Do studzienek reakcyjnych odpipetowano po 100 µl surowic kalibracyjnych (pierwsza - zawierająca przeciwciała przeciwkardiolipinowe w ilości 120 RU/ml [RU - jednostki względne - *relative unit*], druga – zawierająca 12 RU/ml oraz trzecia – zawierającej 2 RU/ml), po 100 µl surowicy kontrolnej pozytywnej i negatywnej oraz rozcieńczone surowice pacjentów.
- Surowice inkubowano 30 min. w temperaturze pokojowej (+18°C do +25°C)
- Opróżniano studzienki reakcyjne i trzykrotnie płukano, używając po 300 µl buforu płuczącego

- Do każdej studzienki odpipetowano po 100 μ l roztworu koniugatu enzymatycznego zawierającego przeciwciała przeciw ludzkiej immunoglobulinie klasy A,G,M znakowane peroksydazą. Inkubowano 30 min. w temperaturze pokojowej, a następnie płukano.
- Do każdej studzienki odpipetowano po 100 μ l roztworu substratu / chromogenu (TMB/H₂O₂), a następnie inkubowano 15 min. w temperaturze pokojowej,
- Do każdej studzienki odpipetowano po 100 μ l roztworu przerywającego reakcję (0.5 M kwas siarkowy)
- W ciągu 30 min. od zastopowania reakcji dokonywano fotometrycznej oceny intensywności barwy, przy długości fali 450nm.

Do oceny ilościowej przeciwciał wykreślano w układzie współrzędnych wartości ekstynkcji 3 surowic kalibracyjnych i odpowiadające im względne jednostki (RU/ml), następnie łącząc naniesione punkty, wykreślano krzywą wzorcową, z której odczytywano stężenie przeciwciał w surowicy.

Za wynik dodatni przyjęto stężenie przeciwciał większe lub równe 12 RU/ml.

3.1.1.3 Przeciwciała przeciw β 2glikoproteinie I ($\alpha\beta$ 2GPI)

Przeciwciała przeciw β 2glikoproteinie I w klasach IgG, IgM, IgA określano metodą ELISA (Euroimmun, Niemcy, nr katalogowy EA1632-9601P).

Zestaw testowy posłużył do ilościowego oznaczenia *in vitro* przeciwciał w surowicy. Zasada testu była podobna do techniki zastosowanej podczas oznaczania przeciwciał przeciwkardiolipinowych. Do badania użyto mikroplacytek ze studzienkami reakcyjnymi opłaszczonymi antygenem. W pierwszym etapie studzienki reakcyjne inkubowano z rozcieńczonymi surowicami pacjentów. W pozytywnych przypadkach przeciwciała klasy A, G i M wiązały się z obecnymi na powierzchni studzienki antygenami.

Związane przeciwciała wykrywano podczas drugiego etapu inkubacji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiej immunoglobulinie klasy A, G, M znakowanymi enzymem, który następnie katalizował reakcję barwną.

Protokół badania:

- Krew pacjentów pobierano na skrzep celem uzyskania surowicy.
- Przeznaczone do badania próbki surowicy rozcieńczano w stosunku 1:201 w buforze do rozcieńczenia (5µl próbki do 1 ml buforu).
- Do studzienek reakcyjnych dodawano po 100 µl surowic kalibracyjnych (pierwsza - zawierająca przeciwciała aβ2GPI w ilości 200 RU/ml, druga – zawierająca 20 RU/ml oraz trzecia – zawierająca 2 RU/ml), po 100 µl surowicy kontrolnej pozytywnej i negatywnej oraz rozcieńczone surowice pacjentów.
- Po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej (+18°C do +25°C) opróżniano studzienki reakcyjne i trzykrotnie płukano, używając po 300 µl buforu płuczającego
 - Do każdej studzienki dodawano po 100 µl roztworu koniugatu enzymatycznego zawierającego przeciwciała przeciw ludzkiej immunoglobulinie klasy A,G,M znakowane peroksydazą. Inkubowano 30 min. w temperaturze pokojowej, a następnie płukano.
 - Do każdej studzienki dodawano po 100 µl roztworu substratu / chromogenu (TMB/H₂O₂), a następnie inkubowano 15 min. w temperaturze pokojowej,
 - Do każdej studzienki odpipetowano po 100 µl roztworu przerywającego reakcję (0.5 M kwas siarkowy)
- W ciągu 30 min. od zastopowania reakcji dokonywano fotometrycznej oceny intensywności barwy, przy długości fali 450nm

Do oceny ilościowej przeciwciał odwzorowywano w układzie współrzędnych wartości ekstynkcji 3 surowic kalibracyjnych i odpowiadające im względne jednostki (RU/ml), następnie łącząc naniesione punkty, wykreślano krzywą wzorcową, z której odczytywano stężenie przeciwciał w surowicy.

Za wynik dodatni uznawano stężenie przeciwciał większe lub równe 20 RU/ml.

3.1.1.4 Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA)

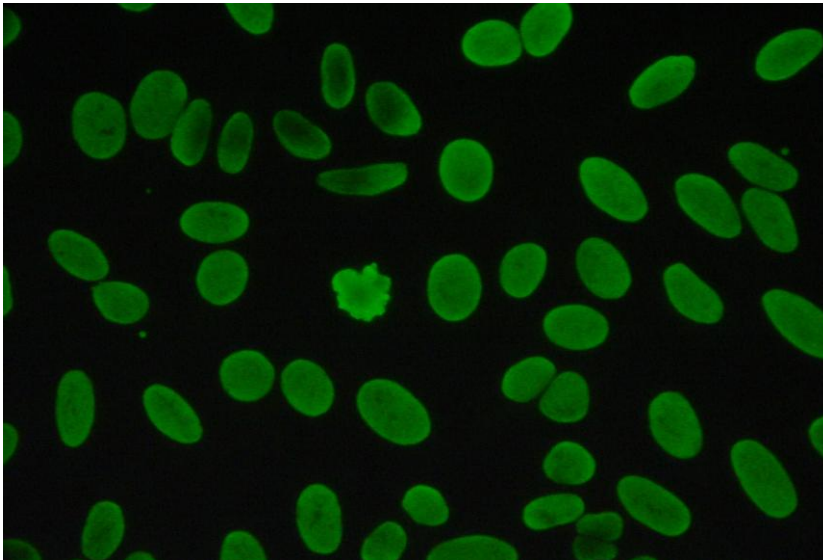
Przeciwciała przeciwjądrowe badano metodą immunofluorescencji pośredniej z wykorzystaniem linii komórkowej HEp-2 jako źródła antygenu.

Na linię komórkową HEp-2 nakładano badane surowice, rozcieńczone w stosunku geometrycznym (od 1/40 do 1/1280). Po 30 minutach preparaty trzykrotnie przepłukiwano

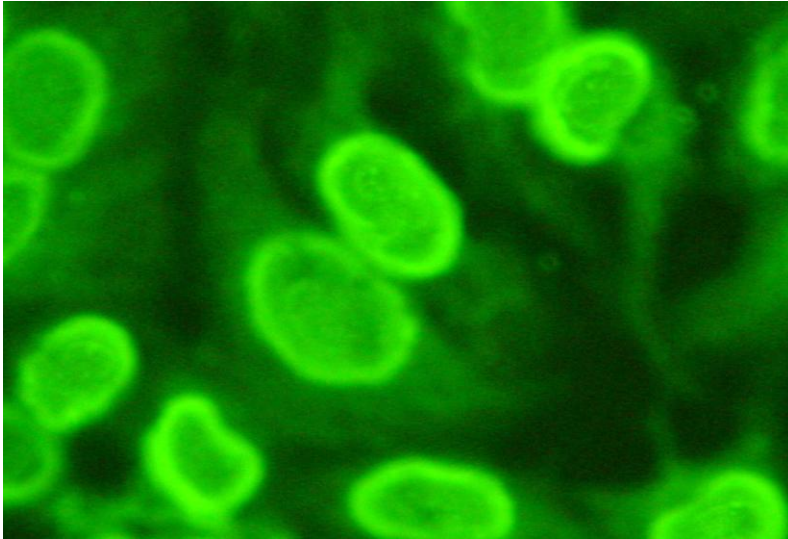
buforowanym roztworem soli fizjologicznej i inkubowano z króliczą immunoglobuliną znakowaną izotiocyanianem fluoresceiny, skierowaną przeciw ludzkiej IgG, IgM i IgA. Ponownie przepłukiwano po 30 minutach inkubacji. Tak przygotowane preparaty oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym (Axiscop-2, Zeiss, Niemcy) w obiektywie immersyjnym x 100. „Świecenie” - fluorescencja jądra komórkowego świadczyło o obecności przeciwciał w surowicy.

Za wynik dodatni przyjmowano obecność ANA w mianie $> 1/80$.

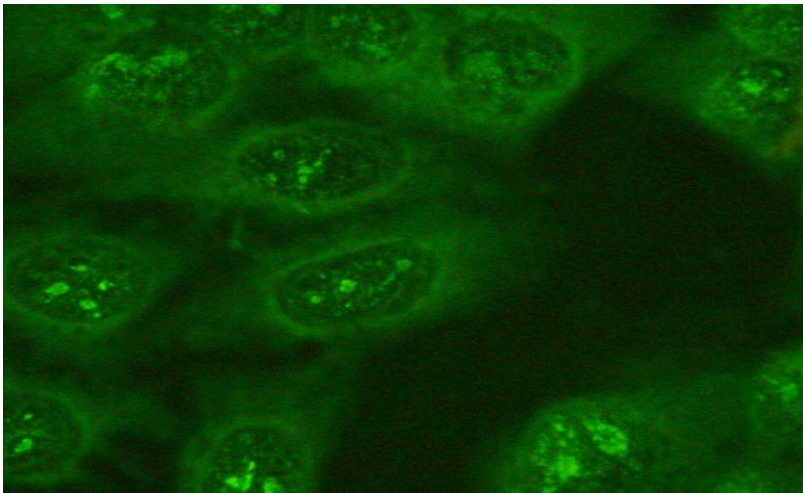
Wykorzystując linię komórkową HEp-2 można wyodrębnić pięć podstawowych typów fluorescencji jądra komórkowego: typ homogenny (ryc. 2), obwodowy (ryc. 3), jąderkowy (ryc. 4), plamisty (ryc. 5) oraz centromerowy (ryc. 6).



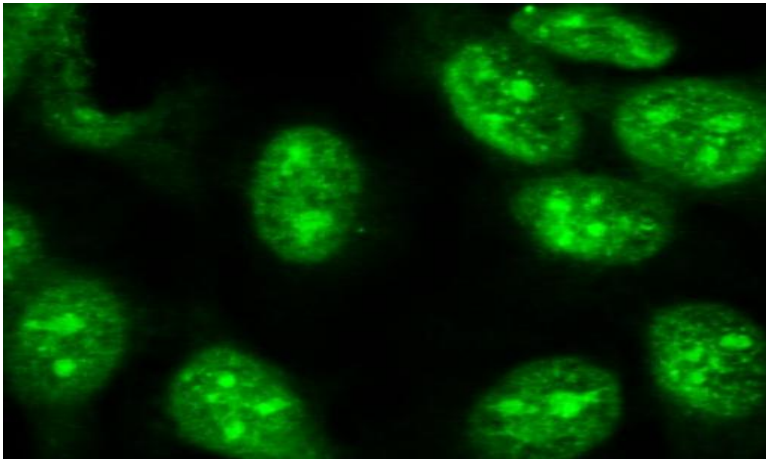
Rycina 2. Homogenny typ fluorescencji jądra komórkowego.



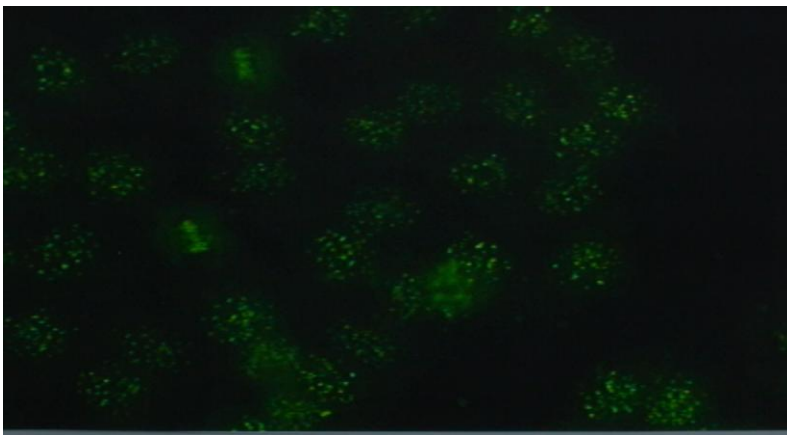
Rycina 3. Obwodowy typ fluorescencji jądra komórkowego.



Rycina 4. Jąderkowy typ fluorescencji jądra komórkowego.



Rycina 5. Plamisty typ fluorescencji jądra komórkowego.



Rycina 6. Centromerowy typ fluorescencji jądra komórkowego.

3.1.1.5 Przeciwciała przeciw rozpuszczalnym antygenom jądra komórkowego

Przeciwciała przeciw rozpuszczalnym antygenom jądra komórkowego oceniano metodą Immunoblot (Euroimmun, Niemcy, numer katalogowy DL1590-1601-3G)

Zestaw testowy (ANA Profil 3 EUROLINE) posłużył do jakościowego oznaczenia in vitro przeciwciał klasy IgG przeciwko 14 antygenom (nRNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nukleosomom, histonom, rybosomalnemu białku P oraz AMA-M2) w surowicy. Do przeprowadzenia badania użyto pasków testowych z naniesionymi w postaci linii wysoko oczyszczonymi antygenami. W pierwszym etapie paski testowe inkubowano z rozcieńczonymi surowicami pacjentów. W pozytywnych przypadkach przeciwciała klasy IgG (również IgA i IgM) wiązały się z odpowiednimi antygenami. Podczas drugiego etapu inkubacji reagowały z nimi sprzężone z enzymem (fosfatazą alkaliczną) przeciwciała skierowane przeciwko ludzkim immunoglobulinom klasy IgG. Enzym katalizował następnie reakcję barwną z roztworem substratu (NBT/BCIP – chlorek nitrobluetetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolofosforanu).

Protokół badania:

- Krew pobierano na skrzep celem uzyskania surowicy.
- Przeznaczone do badania próbki surowicy rozcieńczano w stosunku 1:101 w buforze do rozcieńczania (15µl próbki do 1,5 ml buforu).
- Paski umieszczano w rynienkach inkubacyjnych, inkubowano z buforem przez 5 min na wytrząsarce, a następnie z 1,5 ml rozcieńczonej surowicy przez 30 min. w temperaturze pokojowej.
- Opróżniano studzienki reakcyjne i płukano 3 x 5 min, używając po 1,5 ml buforu płuczącego, cały proces przeprowadzano na wytrząsarce o ruchu wahadłowym
- Do każdej studzienki dodawano po 1,5 ml roztworu koniugatu enzymatycznego, a następnie inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej, płukano trzykrotnie.
- Do każdej studzienki dodawano po 1,5 ml roztworu substratu, a następnie inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej, na wytrząsarce
- Wszystkie paski płukano 3 x 1 min wodą destylowaną , przerywającą reakcję

-Paski umieszczano na protokole, suszono, a następnie skanowano w Analizatorze EuroBlotMaster z wykorzystaniem programu EUROLinScan. Wysycenie się pasma na pasku reakcyjnym świadczyło o obecności przeciwciał. Na podstawie intensywności sygnału, wyniki można było oceniać, jako negatywne, graniczne lub pozytywne.

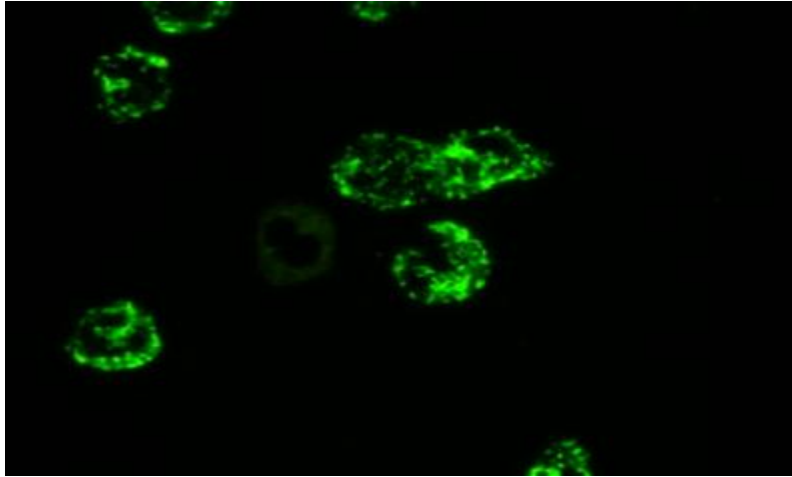
3.1.1.6 Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA)

Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych oceniano metodą immunofluorescencji pośredniej z wykorzystaniem źródła antygeny Firmy Euroimmun, Niemcy, nr katalogowy FA1201-2005-3.

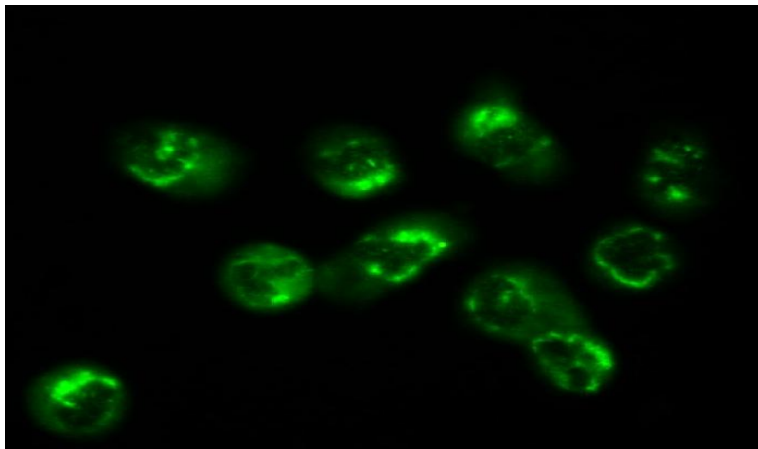
Na preparaty granulocytów obojętnochłonnych, utrwalonych alkoholem etylowym i aldehydem mrówkowym oraz komórki linii HEp-2 nakładano badane surowice, rozcieńczone w stosunku geometrycznym w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Całość inkubowano w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Po 30 minutach preparaty przepłukiwano trzykrotnie PBS-em przez 5 minut, w celu usunięcia niezwiązanego z antygenem nadmiaru przeciwciał. Następnie nakładano rozcieńczoną w PBS króliczą immunoglobulinę znakowaną izotiocyanianem fluoresceiny, skierowaną przeciw ludzkiej IgG, IgM oraz IgA. Ponownie przepłukiwano po 30 minutach inkubacji. Na preparaty nakładano krople roztworu glicerolu i zamykano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym (Axiscop-2, Zeiss, Niemcy) w obiektywie immersyjnym x 100.

Za wynik dodatni przyjmowano obecność ANCA w mianie $> 1/20$.

Przy użyciu metody immunofluorescencji pośredniej, wyróżnia się dwa typy ANCA: C-ANCA (*cytoplasmic* - typ cytoplazmatyczny), P-ANCA (*perinuclear* - typ okołojądrowy). Typ cytoplazmatyczny, charakteryzuje się gruboziarnistym „świeceniem” całej cytoplazmy komórki ze szczególnym nasileniem w obszarze między płåtami jądra (ryc. 7). Natomiast P-ANCA wywołują intensywne „świecenie,, wokoło jądra komórkowego (ryc. 8).



Rycina 7. Cytoplazmatyczny typ fluorescencji granulocytów obojętnochłonnych (C-ANCA).



Rycina 8. Okołojądrowy typ fluorescencji granulocytów obojętnochłonnych (P-ANCA)

3.1.1.7 Czynniki reumatoidalny (RF)

Czynnik reumatoidalny badano metodą Waalera-Rosego. Badane surowice inkubowano przez 30 minut w temperaturze 56°C, następnie do 1 ml surowicy dodawano 1 kroplę 50%

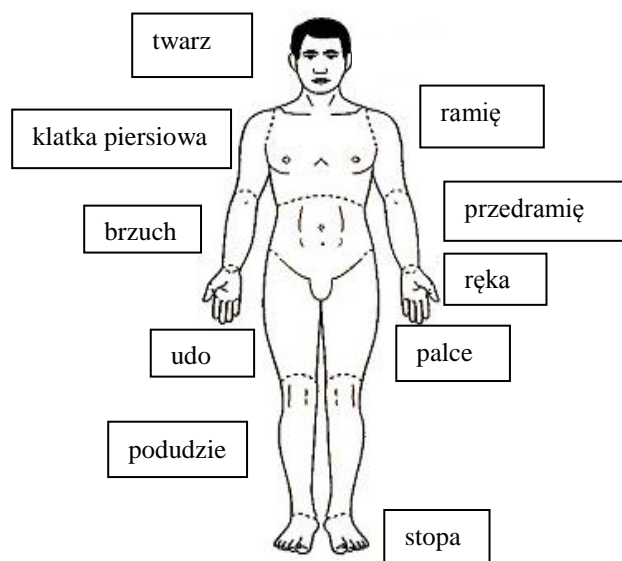
zawiesiny erytrocytów baranich w roztworze o niskiej sile jonowej (LISS). Całość inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C oraz godzinę w temperaturze 4°C. Następnie wirowano przy 200g, po czym wykonywano rozcieńczenia surowicy w 0,9% NaCl w postępie geometrycznym. Do każdej probówki dodawano 0,5 ml 1% zawiesiny erytrocytów baranich uczulonych amboceptorem i zawieszanych w soli LISS. Następnie inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C i odwirowywano przy 100g. W wyniku reakcji immunoglobuliny G króliczej opłaszczającej krwinki baranie z czynnikiem reumatoidalnym dochodziło do aglutynacji. Próbę uważano za dodatnią, gdy pojawiła się aglutynacja w mianie powyżej 1:80.

3.2 Badania określające stopień zaawansowania choroby.

W każdej z grup badanych oceniano stopień zaawansowania choroby uwzględniając stwardnienie skóry, zmiany w naczyniach wałów paznokciowych, włóknienie śródmiąższowe płuc, zdolność dyfuzyjną dla tlenu węgla w płucach, zmiany o charakterze restrykcyjnym w płucach (natężoną pojemność życiową), nadciśnienie płucne oraz wydolność nerek.

3.2.1 Ocena skóry przy użyciu zmodyfikowanej skali Rodnana (mRTSS).

Podczas palpacji oceniano grubość fałdu skórniego w 17 anatomicznych okolicach ciała (ryc.9) : na twarzy, przedniej powierzchni klatki piersiowej, brzuchu, ramionach, przedramionach, grzbietowej powierzchni rąk, palców, na przedniej powierzchni ud, podudzi oraz grzbietach stóp. Grubość skóry oceniano formując fałd skórny między kciukiem a palcem wskazującym badającego. Do oceny używano 4-stopniowej skali (od 0 do 3), gdzie 0 oznaczało normę, 1 – stwardnienie skóry łagodne, 2 – umiarkowane, 3- ciężkie. Wynik końcowy uzyskano po dodaniu punktów z 17 okolic ciała (zakres od 0 do 51). Określał on stopień zaawansowania zmian skórnych: postać łagodną (1-14 punktów), umiarkowaną (15-29), ciężką (30-39) lub stadium końcowe (≥ 40).



Rycina 9. 17 okolic ciała ocenianych wg zmodyfikowanej skali Rodnana⁸⁰.

3.2.2 Ocena naczyń obwodowych przy użyciu kapilaroskopii

Kapilaroskopia to bezpieczne, nieinwazyjne badanie, dzięki któremu można obserwować zaburzenia mikrokrążenia w obrębie skóry. Wykonuje się ją przy użyciu mikroskopu szerokokątnego, dermatoskopu lub oftalmoskopu.

Badanie mikrokrążenia w obrębie wałów paznokciowych przeprowadzono za pomocą mikroskopu świetlnego (kapilaroskopu) (Nikon SMZ 800), przy użyciu zewnętrznego źródła światła. Stosowano oświetlenie boczne, w postaci światłowodów, z jednolitą wiązką światła skierowaną na oceniany obszar (ryc. 10). Obiektyw kapilaroskopu ustawiony był prostopadle do badanej powierzchni.

Morfologię zmian oceniano w powiększeniu 94-krotnym. Pacjenci pozostawali w pokoju badań co najmniej 15 min przed przeprowadzeniem analizy, w temperaturze 22°C. Oceny dokonywano w pozycji siedzącej. Przed badaniem, na skórę wałów paznokciowych, nakładano olejek immersyjny w celu zwiększenia przejrzystości warstwy rogowej naskórka oraz poprawy rozdzielczości obrazu. Obserwowano kapilary wałów paznokciowych czterech

palców (od II do V) obu rąk. Nie oceniano palców po niedawno przeżytym urazie oraz po zabiegach kosmetycznych w obrębie płytek i wałów paznokciowych.



Rycina 10. Kapilaroskop Nikon SMZ 800.

Badaniu poddano naczynia włosowate warstwy brodawkowej skóry odchodzące od splotu podbrodawkowego, zlokalizowanego ok. 1-2 mm poniżej granicy skórno-naskórkowej. Główna oś tych naczyń ułożona jest prostopadle do linii paznokcia oraz równoległe do powierzchni skóry, co umożliwia uwidocznienie całej ich długości. Występują w postaci pętli, w kształcie litery U. W innych okolicach ciała pętle naczyniowe przebiegają prostopadle do skóry, co uniemożliwia ich uwidocznienie w kapilaroskopii, widoczne są tylko ich szczytowe części. Podczas badania uwzględniano układ pętli naczyniowych, liczbę kapilar, obecność obszarów beznaczyniowych (awaskularyzacji), obecność wybroczyn, morfologię pętli naczyniowych i ich szerokość (średnicę kapilar określa szerokość kolumny przepływających erytrocytów, nie jej ściany, które są niewidoczne w tym badaniu) ⁸¹.

Obserwowane zmiany przyporządkowano do fazy wczesnej, aktywnej lub późnej:

1. Faza wczesna – dobrze zachowana struktura i gęstość ułożenia kapilar (9-13 kapilar na milimetr liniowy), prawidłowy kształt pętli naczyniowych, obecne poszerzone pętle

naczyniowe, nieliczne megakapilary oraz wyboczyny „czapeczkowate” układające się powyżej części szczytowych kapilar (ryc. 11).

2. Faza aktywna – liczne megakapilary i wyboczyny „czapeczkowate”, z niewielką dezorganizacją układu kapilar, ponadto wypadanie pętli naczyniowych, obszary beznaczyniowe – definiowane jako utrata przynajmniej 3 kolejnych pętli naczyniowych, brak kapilar rozgałęzionych (ryc. 12)
3. Faza późna – znaczne zaburzenie dystrybucji kapilar z rozległymi obszarami awaskularyzacji i znaczną dezorganizacją układu naczyń, nieregularnie poszerzone naczynia, obecne kapilary rozgałęzione, drzewkowate - ogniska neoangiogenezy, zwykle na obrzeżach obszarów beznaczyniowych, brak megakapilar i wyboczyn, w schyłkowej fazie choroby obserwuje się ubogie unaczynienie (ryc. 13)

W prawidłowym obrazie kapilaroskopowym wszystkie pętle były podobnej długości i średnicy, rozmieszczone równomiernie i równoległe względem siebie. Jako wariant prawidłowej morfologii pętli uznawano obecność naczyń krętych oraz zróżnicowanie kształtu pętli – mogą one występować w zależności od wieku i płci.

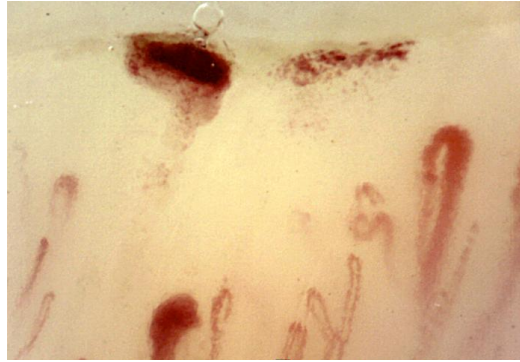


a



b

Rycina 11. Obraz naczyń w kapilaroskopii: a - poszerzone pętle naczyniowe oraz b - megakapilary ⁸².



Rycina 12. Megakapilary, ogniska awaskularyzacji, „czapeczkowate” wybroczyny ⁸².



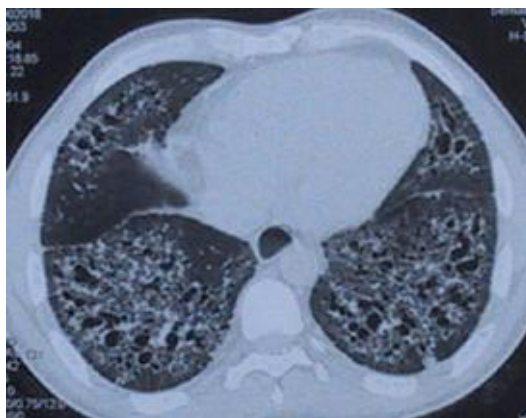
Rycina 13. Ognisko neoangiogenezy: pętle rozgałęzione ⁸².

3.2.3 Badania obrazowe i czynnościowe układu oddechowego.

Badania układu oddechowego przeprowadzono w Klinice Pulmonologii SPSK im. Przemienienia Pańskiego UM w Poznaniu.

3.2.3.1 Tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości – HRCT (*high resolution computed tomography*)

U wszystkich chorych wykonano tomografię komputerową klatki piersiowej stosując program wysokiej rozdzielczości. Obrazowanie odbywało się podczas maksymalnego wdechu u pacjenta leżącego na plecach. Oceniano obecność włóknienia śródmiąższowego w płucach. Nie różnicowano natomiast stopnia zaawansowania zmian włóknistych. Podczas dokonywania oceny radiologicznej uwzględniano zacienienia siateczkowate oraz guzkowe, obraz „plastra miodu” (obszary z licznymi drobnymi torbielami), ogniskowe zmiany o charakterze „mlecznego szkła” (nieznaczne zacienienia obszaru płuc z widocznym rysunkiem naczyń krwionośnych) oraz rozstrzenia oskrzeli, zlokalizowane pod opłucną i u podstawy płuc (ryc. 14).



Rycina 14. HRCT - włóknienie śródmiąższowe płuc ⁸².

3.2.3.2 Dyfuzja tlenu węgla w płucach - DLCO (diffusing capacity of the lung for carbon monoxide)

Zdolność dyfuzyjna płuc określa przechodzenie gazu przez barierę pęcherzykowo-włośniczkową spowodowane różnicą ciśnień parcjalnych pomiędzy powietrzem pęcherzykowym a krwią naczyń włosowatych. Różnica ciśnień dla tlenu wynosi ok. 60 mmHg. Zdolność dyfuzyjna tlenu oceniana jest za pośrednictwem badania zdolności dyfuzyjnej płuc dla tlenu węgla (DLCO).

U wszystkich chorych przeprowadzono badanie pojemności dyfuzyjnej tlenu węgla w płucach, przy użyciu urządzenia MasterScreen Body firmy Jaeger, metodą pojedynczego oddechu.

Pacjent wykonywał głęboki wydech, a następnie maksymalny wdech do poziomu całkowitej pojemności płuc, zatrzymując oddech na tym poziomie przez 10 sekund. W trakcie wdechu podawano mieszkankę powietrza z dodatkiem gazów znacznikowych: tlenu węgla 0,2% i helu 8%, według dostępnych standardów ERS/ATS ⁸³.

Norma DLCO, wyrażana jako procent wartości należnej, mieściła się w przedziale 80–120%. Wartości prawidłowe określono na podstawie rozkładu parametru w populacji zdrowej (od 5 do 95 centyla). Wartość należną podaje urządzenie w oparciu o wiek, płeć, wzrost, wagę i palenie tytoniu. Uzyskanie wiarygodnych wartości DLCO wymaga uwzględnienia również stężenia hemoglobiny, szczególnie u pacjentów z niedokrwistością.

Skorygowane wartości DLCO oblicza się, posługując się następującymi wzorami:

DLCO skorygowane dla mężczyzn = $DLCO \text{ zmierzone} \times (10,22 + Hb) / 1,7 Hb$

DLCO skorygowane dla kobiet = $DLCO \text{ zmierzone} \times (9,38 + Hb) / 1,7 Hb$

Pomiar DLCO odbywał się metodą pojedynczego oddechu, korygowany o aktualną wartość hemoglobiny i płeć.

Zastosowano 3-stopniowy podział ciężkości zaburzeń DLCO:

1. Łagodny: $>60\%$ i $<$ dolnej granicy normy
2. Umiarkowany: 40 – 60%
3. Ciężki: $< 40\%$

3.2.3.3 Natężona pojemność życiowa – FVC (*forced vital capacity*)

U wszystkich chorych przeprowadzono ocenę natężonej pojemności życiowej, wyrażonej jako odsetek wartości należnej. W tym celu wykonano spirometrię z rejestracją natężonego wydechu według obowiązujących standardów ATS/ERS⁸⁴. Po maksymalnym wdechu chory wykonywał forsowny, dynamiczny wydech, po którym określano objętość powietrza usuniętą z płuc podczas całego wydechu. Zakres wartości prawidłowych określono na podstawie rozrzutu wartości tego parametru w zdrowej populacji (od 5 do 95 centyla), zakres normy odpowiada $\pm 20\%$ wartości należnej.

Do badania wykorzystano urządzenie MasterScreen Body firmy Jaeger.

Zastosowano 3-stopniowy podział zaburzeń FVC:

1. Łagodny: 70 - 80 %
2. Umiarkowany: 50 – 69 %
3. Ciężki: < 50 %

3.2.4 Echokardiografia

Badanie przeprowadzono w Pracowni Echokardiografii SPSK im. Przemienienia Pańskiego UM w Poznaniu, przy użyciu aparatu GE Vivid 7. Stosowano rutynowe projekcje (przymostkową, czterojamową, podmostkową, z dołka jarzmowego).

W echokardiografii oceniano występowanie cech nadciśnienia płucnego. Zrezygnowano z oceny nadciśnienia płucnego w bezpośrednim pomiarze hemodynamicznym, jako metody inwazyjnej, stwarzającej większe ryzyko dla badanego. W praktyce klinicznej przyjęto nieinwazyjną metodę określania ciśnienia skurczowego w tętnicy płucnej przy użyciu echokardiografii. Każdemu pacjentowi wykonywano dopplerowską ocenę ciśnienia skurczowego w tętnicy płucnej szacując maksymalny gradient wsteczny niedomykalności zastawki trójdzielnej. Nadciśnienie płucne zdefiniowano jako ciśnienie skurczowe w prawej komorze (RVSP) większe niż 30 mmHg.

3.2.5 Przesączanie kłębuszkowe

Czynność nerek oceniano na podstawie przesączania kłębuszkowego (GFR - *glomerular filtration rate*), którego wielkość stanowi podstawę podziału przewlekłych chorób nerek na odpowiednie stadia.

Każdemu choremu oznaczono stężenie kreatyniny w surowicy krwi. Uzyskane wyniki posłużyły do obliczenia przesączania kłębuszkowego skróconym wzorem MDRD (Modification of Diet in Renal Disease Study)⁸⁵. Podczas obliczeń uwzględniono płeć, wiek i rasę. Wielkość GFR wyrażono w ml/min/1,73 m².

GFR dla badanej grupy chorych wyliczono wg wzoru:

$$\text{GFR} = 186 \times (\text{stężenie kreatyniny w mg/dl})^{-1,154} \times (\text{wiek})^{-0,203} \text{ [x 0,742 dla kobiet]}$$

Chorych podzielono na dwie grupy:

1. z filtracją kłębuszkową ≥ 60 ml/min/1,73 m² (norma lub stadium I i II przewlekłej choroby nerek)
2. z filtracją kłębuszkową < 60 ml/min/1,73 m² (stadium III, IV, V)

Podział przewlekłych chorób nerek na odpowiednie stadia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi K/DOQI (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*), opracowanych przez grupę roboczą działającą pod patronatem *National Kidney Foundation*⁸⁶. Według tych wytycznych stwierdzenie filtracji kłębuszkowej poniżej 60 ml/min/1,73 m² jednoznacznie upoważnia do rozpoznania przewlekłej choroby nerek, niezależnie od tego, czy równocześnie występują cechy uszkodzenia nerek.

Oceniano częstość występowania przewlekłej choroby nerek (GFR < 60 ml/min/1,73m²) w zależności od obecności przeciwciał przeciwfosfolipidowych.

3.3 Metody opracowania statystycznego

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Różnice między grupami chorych pod względem cech ilościowych w przypadku spełnienia warunku normalności rozkładu weryfikowane były testem F oraz t-Studenta. Gdy warunek normalności rozkładu nie był spełniony, stosowane były testy nieparametryczne: Manna-Witneya, a w przypadku większej od dwóch liczby grup testem Kruskala –Wallisa.

Różnice częstości występowania kategorii cech jakościowych weryfikowane były testem dla dwóch wskaźników struktury.

Wyniki testów dla poziomu istotności równego lub mniejszego od 0,05 uznawane były za istotne statystycznie.

Analizy statystycznej dokonano korzystając z programu Statistica 5.2.

Zgodnie z zasadami dla tak małych grup nie powinno się stosować wartości procentowych, są jednak zwolennicy podawania ich mimo tego.

4. WYNIKI

4.1 Częstość występowania autoprzeciwciał

W badanej grupie 34 chorych stwierdzono występowanie antykoagulantu toczniowego u 22 osób (65%).

Przeciwciała przeciwkardiolipinowe były obecne zaledwie u 3 osób (9%), natomiast przeciwciała przeciw β 2GPI – u 4 (12%). Dwie osoby miały zarówno przeciwciała aCl, jak i $a\beta$ 2GPI. Z uwagi na niską częstość występowania tych przeciwciał, chorych przydzielono do wspólnej grupy: z przeciwciałami aCl i/lub $a\beta$ 2GPI. Grupa ta liczyła 5 osób (15%).

Ponadto zaobserwowano, że przeciwciała występowały w surowicy krwi w niewielkiej stężeniu: aCl od 12 do 17 RU/ml, natomiast $a\beta$ 2GPI od 28 do 44 RU/ml. U wszystkich osób z tej grupy stwierdzono również antykoagulant toczniowy.

Częstość występowania aPL w badanej grupie chorych przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Częstość występowania przeciwciał przeciwfosfolipidowych w badanej grupie chorych.

	Częstość występowania przeciwciał przeciwfosfolipidowych				
Grupa badana	LA	aCl i/lub aβ2GPI	aCl	a β 2GPI	Brak aPL
34 osoby	22	5	3	4	12
100%	65 %	15 %	9 %	12 %	35 %

LA – antykoagulant toczniowy, aCl – przeciwciała przeciwkardiolipinowe, $a\beta$ 2GPI – przeciwciała przeciw β 2 glikoproteinie I, aPL – przeciwciała przeciwfosfolipidowe

U wszystkich chorych oceniono częstość występowania ANCA oraz RF. Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych, w niskim mianie, wykazano u 2 chorych (6%), były to przeciwciała o okołojądrowym typie fluorescencji. U żadnej z badanych osób nie stwierdzono cytoplazmatycznego typu fluorescencji ANCA. Natomiast czynnik reumatoidalny wykryto u 3 osób (9%) (tab. 5).

Tabela 5. Częstość występowania ANCA i RF w badanej grupie chorych z twardziną układową

	Grupa badana	ANCA	RF
Liczba i odsetek chorych	34 (100%)	2 (6%)	3 (9%)

4.2 Badania określające stopień zaawansowania choroby.

4.2.1 Stwardnienie skóry

Nie stwierdzono związku między występowaniem aPl a cięższym i bardziej rozległym stwardnieniem skóry ocenianym według zmodyfikowanej skali Rodnana. Ciężką postać twardnienia skóry stwierdzono u 2 osób - nie miały one aPl w surowicy krwi. Zmiany skórne w fazie łagodnej i umiarkowanej występowały u podobnego odsetka chorych we wszystkich grupach (tab. 6).

Tabela 6. Stopień stwardnienia skóry według zmodyfikowanej skali Rodnana w grupie chorych ze stwierdzonym: antykoagulantem toczeniowym (LA) – grupa 1, z przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi (aCl) i/lub przeciwciałami przeciw $\beta 2$ glikoproteinie I ($a\beta 2$ GPI) – grupa 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) – grupa 3

Faza stwardnienia skóry wg zmodyfikowanej skali Rodnana	LA	aCl i/lub $a\beta 2$ GPI	Brak aPL	Poziom p istotności różnicy częstości między grupami:	
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	1 i 3	2 i 3
	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)		
Łagodna (0–14 pkt)	20 (91 %)	4 (80 %)	9 (75 %)	0,211	0,825
Umiarkowana (15-29 pkt)	2 (9 %)	1 (20 %)	1 (8 %)	0,941	0,496
Ciężka (30-39 pkt)	0	0	2 (17 %)	0,048	0,331
Stadium końcowe (≥ 40 pkt)	-	-	-		

4.2.2 Zmiany w naczyniach wałów paznokciowych

U wszystkich chorych z przeciwciałami aCl i/lub $a\beta 2$ GPI stwierdzono zaawansowane zmiany w kapilarach wałów paznokciowych - fazę późną. Natomiast w pozostałych grupach faza późna występowała w mniejszym odsetku: grupa z LA – 36%, bez aPL – 25% chorych. Prawidłowy obraz naczyń wałów paznokciowych stwierdzono wyłącznie w grupie chorych z LA (27%). Faza wczesna zmian naczyniowych występowała w podobnej liczbie chorych w grupie z LA (23%) oraz w grupie bez aPL (33%). Natomiast fazę aktywną obserwowano

częściej w grupie bez aPL (42%) niż w grupie z LA (14%), nie uzyskując jednak istotności statystycznej (tab. 7).

Wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy obecnością przeciwciał aCl i/lub a β 2GPI a występowaniem zaawansowanych zmian naczyniowych w wałach paznokciowych.

Tabela 7. Stopień zaawansowania zmian w naczyniach wałów paznokciowych (faza późna – III, aktywna – II, wczesna – I, brak zmian – 0) badanych w kapilaroskopii, w zależności od występowania antykoagulanta toczeniowego (LA) – grupa 1, przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β 2 glikoproteinie I (a β 2GPI) – grupa 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) – grupa 3

Stopień zaawansowania zmian w naczyniach wałów paznokciowych	LA Grupa 1	aCl i/lub a β 2GPI Grupa 2	Brak aPL Grupa 3	Poziom p istotności różnicy częstości między grupami:	
	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	1 i 3	2 i 3
III (faza późna)	8 (36 %)	5 (100 %)	3 (25 %)	0,499	0,005
II (faza aktywna)	3 (14 %)	0	5 (42 %)	0,066	0,086
I (faza wczesna)	5 (23 %)	0	4 (33 %)	0,503	0,140
0 (brak zmian)	6 (27 %)	0	0	0,046	

4.2.3 Badania obrazowe i czynnościowe układu oddechowego.

4.2.3.1 Włóknienie śródmiąższowe płuc

Włóknienie śródmiąższowe płuc stwierdzono u 31 osób, co stanowi większość chorych (ryc. 15).



Rycina 15. HRCT klatki piersiowej – widoczne włóknienie śródmiąższowe.

W grupie z przeciwciałami aCI i/lub a β 2GPI włóknienie śródmiąższowe obserwowano u wszystkich chorych. W grupie z LA odsetek chorych z zajęciem płuc sięgał 86%, podczas gdy w grupie bez przeciwciał stanowił 58% (tab. 8).

Analiza uzyskanych wyników nie wykazała jednak istotnego statystycznie wpływu przeciwciał aPI na włóknienie śródmiąższowe płuc.

Tabela 8. Liczba chorych z włóknieniem śródmiąższowym w płucach obserwowanym w HRCT, w zależności od obecności antykoagulantu toczniowego (LA), przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β 2 glikoproteinie I ($a\beta$ 2GPI) oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL)

Włóknienie śródmiąższowe w płucach	LA	aCl i/lub a β 2GPI	Brak aPL	Poziom p istotności różnicy częstości między grupami:	
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3		
	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	1 i 3	2 i 3
	19 (86 %)	5 (100 %)	7 (58 %)	0,066	0,086

4.2.3.2 Pojemność dyfuzyjna płuc dla tlenu węgla (DLCO)

U wszystkich badanych chorych stwierdzono zmniejszenie pojemności dyfuzyjnej dla tlenu węgla w płucach.

Zaburzenia DLCO łagodnego stopnia obserwowano w podobnym odsetku w grupie osób z LA (31%) i bez aPL (40%). Łagodnych zaburzeń dyfuzji nie obserwowano u żadnego chorego z obecnymi przeciwciałami aCl i/lub a β 2GPI.

Zaburzenia dyfuzji umiarkowanego stopnia występowały we wszystkich grupach: z LA – 38%, aCl i/lub a β 2GPI – 60%, bez aPL – 60%.

Ciężkie zaburzenia dyfuzji tlenu węgla w płucach stwierdzono u 31% chorych w grupie z LA oraz u 40% osób z aCl i/lub aβ2GPI. Nie wykazano natomiast ciężkiego stopnia zaburzeń DLCO u chorych bez aPL (tab. 9).

Tabela 9. Zaburzenie zdolności dyfuzyjnej tlenu węgla w płucach stopnia łagodnego, umiarkowanego i ciężkiego w grupie chorych z antykoagulantem toczeniowym (LA) – grupa 1, z przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi (aCl) i/lub przeciwciałami przeciw β2 glikoproteinie I (aβ2GPI) – grupa 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) – grupa 3

Zaburzenie zdolności dyfuzyjnej tlenu węgla w płucach stopnia:	LA (100%=14) Grupa 1	aCl i/lub aβ2GPI (100%=5) Grupa 2	Brak aPL (100%=10) Grupa 3	Poziom p istotności różnicy częstości między grupami:	
	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	1 i 3	2 i 3
Łagodnego	4 (29 %)	0	4 (40 %)	0,558	0,099
Umiarkowanego	5 (36 %)	3 (60 %)	6 (60 %)	0,239	1,000
Ciężkiego	5 (36 %)	2 (40 %)	0	0,034	0,032

4.2.3.3 Natężona pojemność życiowa (FEV)

W większości przypadków (21 osób) natężona pojemność życiowa występowała w granicach normy, w podobnym odsetku w każdej z grup: z LA – 55%, z aCl i/lub aβ2GPI – 60%, bez aPl – 73%.

Zmiany łagodne wykazano częściej w grupie chorych z aCl i/lub aβ2GPI oraz w grupie bez aPl: odpowiednio 20% i 18%, podczas gdy u osób z LA – w 5%.

Zmiany restrykcyjne umiarkowanego stopnia stwierdzano nieco częściej w obu grupach z aPl: LA – 35%, aCl i/lub aβ2GPI – 20% niż w grupie chorych bez aPl – 9%.

Zmiany FVC ciężkiego stopnia zaobserwowano tylko u jednego chorego z obecnym w surowicy krwi antykoagulantem toczniowym.

Zaburzenia FVC (stopnia umiarkowanego i ciężkiego) występowały nieznacznie częściej u osób z aPl w surowicy krwi, a szczególnie w grupie chorych z LA: grupa z LA – 40%, grupa z aCl i/lub aβ2GPI – 20%, grupa bez aPl – 9%.

Różnice częstości występowania zaburzeń FVC w zależności od obecności przeciwciał przeciwfosfolipidowych nie były jednak istotne statystycznie. (tab. 10)

Tabela 10. Zaburzenie natężonej pojemności życiowej stopnia łagodnego, umiarkowanego i ciężkiego w grupie chorych z antykoagulantem toczeniowym (LA) - 1, przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi (aCl) i/lub przeciwciałami przeciw β 2 glikoproteinie I ($\alpha\beta$ 2GPI) - 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) - 3

Zaburzenie FVC, stopień:	LA (100%=20) Grupa 1	aCl i/lub $\alpha\beta$2GPI (100%=5) Grupa 2	Brak aPL (100%=11) Grupa 3	Poziom p istotności różnicy częstości między grupami:	
	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	1 i 3	2 i 3
Norma > 80%	11 (55 %)	3 (60 %)	8 (73 %)	0,332	0,611
Łagodny 70-80%	1 (5 %)	1 (20 %)	2 (18 %)	0,235	0,931
Umiarkowany 50-69%	7 (35%)	1 (20%)	1 (9 %)	0,115	0,541
Ciężki <50%	1 (5%)	0	0	0,451	

4.2.4 Nadciśnienie płucne

Nie stwierdzono związku między obecnością aPL w surowicy krwi, a występowaniem nadciśnienia płucnego. Nieprawidłowe ciśnienie w prawej komorze serca obserwowano u 36% osób z LA, 20% z aCl i/lub $\alpha\beta$ 2GPI oraz u 33% chorych bez aPL. (tab. 11)

Tabela 11. Nadciśnienie płucne w echokardiografii w grupie chorych z obecnością: antykoagulantu toczniowego (LA) - 1, przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β 2 glikoproteinie I ($\alpha\beta$ 2GPI) - 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych – 3

Nadciśnienie płucne	LA	aCl i/lub a β 2GPI	Brak aPL	Poziom p istotności różnicy częstości między grupami:	
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3		
	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	1 i 3	2 i 3
	8 (36 %)	1 (20 %)	4 (33 %)	0,860	0,583

4.2.5 Przesączanie kłębuszkowe (GFR)

Częstość występowania przewlekłej choroby nerek, określonej na podstawie GFR, była większa u chorych z LA w surowicy krwi (32%), niż w grupie bez aPL (17%), jednak bez istotnej statystycznie różnicy (tab. 12). U żadnego chorego w grupie z aCl i/lub a β 2GPI nie stwierdzono przewlekłej choroby nerek, jednak również tutaj nie odnotowano istotności statystycznej.

U 25 osób, co stanowi większą część badanych, GFR był prawidłowy lub nieznacznie zmniejszony (w stopniu I lub II).

Tabela 12. Liczba chorych z przewlekłą chorobą nerek (filtracja kłębuszkowa - GFR < 60 ml/min/1,73m² - oceniana wg skróconego wzoru MDRD) w grupie chorych z obecnością: antykoagulantu toczeniowego (LA) - 1, przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β 2 glikoproteinie I (a β 2GPI) - 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych – 3

Przewlekła choroba nerek (GFR < 60 ml/min/1,73m ²) wg skróconego wzoru MDRD	LA Grupa 1	aCl i/lub aβ2GPI Grupa 2	Brak aPL Grupa 3	Poziom p istotności różnicy częstości między grupami:	
	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	Liczba chorych (Odsetek chorych)	1 i 3	2 i 3
	7 (32 %)	-	2 (17 %)	0,339	0,331

5. Dyskusja

Przeciwciała przeciwfosfolipidowe wykrywane są przede wszystkim w surowicy krwi chorych z zespołem przeciwfosfolipidowym. Obecne są także w różnych chorobach zapalnych, infekcyjnych, nowotworowych oraz autoimmunologicznych. W twardzinie układowej częstość występowania aPI, w większości obserwacji, mieści się w zakresie między 20% a 25%. W literaturze opisywane są jednak badania, w których stwierdzano przeciwciała aPI u zaledwie kilku procent chorych z SSc, jak również są takie gdzie ustalono częstość występowania aPI na poziomie 63%^{87, 88, 89, 90, 91}. Znaczna część badań ocenia wyłącznie występowanie przeciwciał przeciwkardiolipinowych, natomiast istnieje niewielka ilość danych dotycząca innych przeciwciał przeciwfosfolipidowych, stwierdzanych zwykle w znacznie mniejszym odsetku.

W badanej grupie 34 chorych na twardzinę układową stwierdzono występowanie przeciwciał przeciwfosfolipidowych u 22 osób, co stanowi dużą grupę 65% badanych. W przedstawionym badaniu grupę 22 osób z aPL stanowią pacjenci, u których obserwowano obecność antykoagulantu toczniowego. Wśród nich przeciwciała przeciwkardiolipinowe były obecne u 3 osób, co stanowi 9%, podczas gdy aβ2GPI stwierdzono u 4 osób z tej grupy, tj. 12% badanych.

aCI stwierdzono w niskim odsetku chorych (9%), podobnie jak w badaniach m.in. Pope i wsp.⁸⁹, Schoenroth i wsp.⁶⁸ oraz Merkel i wsp.⁹⁰ Nieznacznie większy odsetek chorych z aCI stwierdza Parodi i wsp., który opisuje ich obecność w 15%, natomiast inne przeciwciała przeciwfosfolipidowe występowały w tym badaniu sporadycznie i zawsze w obecności aCI⁶⁵.

Z doniesień literaturowych wynika, że aβ2GPI wykrywano z częstością od 3 do 10%^{65, 68, 92} a nawet 40% w badaniu przeprowadzonym w grupie 22 chorych w populacji polskiej⁶⁶. W obserwacji tej u wszystkich osób z aβ2GPI w surowicy krwi stwierdzano również aCI. W innej analizie dokonanej w grupie 30 chorych z SSc nie stwierdzono jednak aβ2GPI u żadnego chorego, podczas gdy aCI obserwowano w 13% przypadków⁹³.

W prezentowanym badaniu przeciwciała przeciw β2GPI obecne były w 12%. Ponadto nie obserwowano ścisłej zależności między występowaniem aβ2GPI i aCI, co było postulowane w niektórych publikacjach⁶⁵. Dwie osoby miały zarówno przeciwciała aCI, jak i aβ2GPI, natomiast u 2 osób stwierdzono wyłącznie aβ2GPI.

Grupa chorych, u których wykryto przeciwciała aCl i/lub a β 2GPI liczyła 5 osób (15%), porównywalnie do obserwacji Hasegawa i wsp. (7%)⁶⁹.

Z niewielu dostępnych publikacji wynika, że antykoagulant toczniowy występował w znacznie mniejszym odsetku chorych niż w prezentowanym badaniu: 26% w grupie 81 chorych z SSc według Hasegawa i wsp.⁶⁹, w innym doniesieniu 1 przypadek na 72 osoby (1,4%) łącznie z przeciwciałami aCl⁹⁴. W badaniu Marie i wsp. grupa chorych z LA i/lub aCl i a β 2GPI stanowiła zaledwie 19%⁹⁵.

Przyczyną dużej rozbieżności wyników dotyczących częstości aPl opisywanych w literaturze, może być stosowanie odmiennych metod badawczych oraz duża różnorodność stosowanych testów ELISA wykrywających przeciwciała aPl. Stanowi to pewną trudność przy porównywaniu wyników oraz interpretacji związku aPl z różnymi objawami choroby.

W prezentowanym badaniu zastanawia duży odsetek chorych z wykrytym LA. Można to tłumaczyć powtarzającym się błędem laboratoryjnym prowadzącym do uzyskiwania fałszywie dodatnich wyników i nadwykrywalności LA w grupie badanej. Nie należy jednak wykluczyć, że w populacji polskiej, którą poddano badaniu, odsetek chorych z LA jest rzeczywiście większy niż w populacjach dotychczas ocenianych. W literaturze takie dane nie występują. Wymaga to z pewnością szczególnej uwagi i przeprowadzenia dalszych badań.

Rozbieżności dotyczące częstości występowania przeciwciał w różnych pracach mogą wynikać również ze stosowania odmiennych kryteriów włączenia do badania. W prezentowanej pracy chorzy kwalifikowani byli do badania po spełnieniu kryteriów ACR. Duża część badaczy włącza do oceny również chorych z wczesną postacią twardziny, spełniających kryteria zaproponowane przez Le Roy i wsp., nie spełniających jeszcze kryteriów ACR. Do badań kwalifikuje się niekiedy również chorych z mieszaną chorobą tkanki łącznej i zespołami nakładania.

Z badań Katayamy i wsp. wynika, że przeciwciała aCl znacznie częściej związane były z ograniczoną postacią skórną, a rzadziej z proksymalną sklerodermią⁷¹. W moim badaniu analizowano chorych z postacią uogólnioną twardziny układowej, nie było w niej natomiast chorych z postacią ograniczoną. W związku z tym u większości chorych nie wykrywano przeciwciał przeciwcentromerowych, których obecność wiąże się z większą częstością występowania aCl. Natomiast w większości badań łącznej analizie poddaje się chorych z obiema postaciami choroby. Fakt ten mógłby tłumaczyć niewielki odsetek chorych z aCl w badanej grupie.

W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano, że przeciwciała aPI występowały w surowicy krwi w niewielkim stężeniu: aCl od 12 do 17 RU/ml, natomiast aβ2GPI od 28 do 44 RU/ml. Inne prace potwierdzają niewielkie stężenie wykrywanych aPI u chorych z SSc, poniżej poziomu odcięcia dla zespołu antyfosfolipidowego, tj. poniżej 40 GPL lub MPL. Stężenie aPI w SSc jest mniejsze niż u chorych na toczeń rumieniowaty układowy ⁹⁶. U większości chorych na twardzinę układową z aPI w surowicy krwi nie stwierdzano cech zakrzepicy, czy niepowodzeń położniczych. W opisywanym badaniu również żaden chory nie spełniał kryteriów rozpoznania zespołu antyfosfolipidowego.

Z uwagi na małą liczbę chorych, u których wykryto przeciwciała aCl lub aβ2GPI w surowicy krwi oraz opisywane podobne znaczenie kliniczne wymienionych przeciwciał, pacjentów tych połączono w jedną grupę i wspólnie poddano analizie statystycznej oceniającej ich znaczenie kliniczne.

Inne znaczenie przypisuje się antykoagulantowi toczeniowemu. LA wiążąc się z fosfolipidami biorącymi udział w kaskadzie krzepnięcia, odgrywają znaczącą rolę w tym procesie. Dlatego chorych u których wykryto te przeciwciała poddano oddzielnej analizie. Dodatkowym czynnikiem przemawiającym za wyodrębnieniem dwóch grup chorych w prezentowanym badaniu był znacząco większy odsetek pacjentów z LA niż przedstawiano w innych publikacjach.

Przeciwciała ANCA wykrywa się w wielu chorobach autoimmunologicznych, niezbyt jednak często w twardzinie układowej. Ich obecność rzadko koreluje z objawami klinicznymi. Częstość występowania ANCA w tej grupie chorych szacuje się na 7 - 13% ⁹⁷. Wykrywano zarówno przeciwciała przeciwko peroksydazie 3 (PR3), jak i mieloperoksydazie (MPO) ^{98, 99}. W prezentowanym opracowaniu ANCA wykryto u 2 chorych (6%). Zmiany angiopatyczne w SSc mają zwykle charakter niezapalny, polegający na koncentrycznym przeroście naczyń, natomiast zapalenie naczyń występuje rzadko. Ostatnio w różnych doniesieniach pojawiają się przypadki chorych na SSc z obecnością ANCA w surowicy krwi. U tych pacjentów opisuje się martwicę palców ¹⁰⁰, ciężką sklerodermię, krwawienia do pęcherzyków płucnych ¹⁰¹, gwałtownie postępujące kłębuszkowe zapalenie nerek ¹⁰². Obecność dodatkowo wykładników zapalenia wskazuje na zapalenie naczyń, jako przyczynę zmian, a nie angiopatię typową dla SSc ¹⁰³. Wysokie miano ANCA koreluje z szybkim upośledzeniem funkcji narządów wewnętrznych ¹⁰⁴. Częstość występowania ANCA jest niewielka, fakt ten nie powinien być jednak ignorowany. Obecność ANCA sugeruje występowanie zapalnej komponenty choroby. Pomimo, że u chorych z wczesną uogólnioną twardziną układową stosowanie steroidów, z obawy przed wystąpieniem przełomu

nerkowego, powinno być bardzo ostrożne, w grupie z ANCA mogą być one jednak wskazane. Sugeruje się, że ANCA mogą wpływać na nasilenie zmian narządowych w SSc, szczególnie zajęcia nerek. Ich obecność może przyczyniać się do szybszego wystąpienia niewydolności nerek, przełomu nerkowego, podobnie jak w przypadku wykrycia aPI u chorych na SSc. Podczas interpretowania uzyskanych wyników i wyciągania wniosków należałoby więc również uwzględnić ich występowanie.

U dwójki chorych, u których wykryto ANCA, nie stwierdzono jednak istotnego upośledzenia funkcji nerek, skóra zajęta była w stopniu umiarkowanym, nie obserwowano też cech *vasculitis*. Wydaje się, że w opisywanej grupie chorych obecność ANCA nie miała wpływu na wyniki badań, ani ich interpretację.

Czynnik reumatoidalny wykryto zaledwie u 3 chorych, co stanowi 9% badanych. RF może być obecny w twardzinie układowej, podobnie jak w pozostałych chorobach autoimmunologicznych. Jego znaczenie w twardzinie układowej jest niejasne, należy przypuszczać, że nie wpływa istotnie na objawy kliniczne.

Kluczowe znaczenie w patogenezie twardziny układowej mają zmiany strukturalne i czynnościowe w naczyniach. Dochodzi do uszkodzenia śródbłonka, aktywacji mięśni gładkich naczyń oraz hiperplazji błony wewnętrznej. Postępującemu zwężaniu się naczyń towarzyszy nieprawidłowa angiogeneza, co skutkuje wytworzeniem niewydolnego krążenia obocznego oraz nasileniem objawów choroby. Uszkodzenie śródbłonka naczyń wywołane czynnikami takimi jak endotelina, czy trombomodulina prowadzi do uogólnionej mikroangiopatii oraz włóknienia. Z kolei przeciwciała przeciwfosfolipidowe są przyczyną tętnicznych lub żylnych zakrzepów oraz uszkodzenia śródbłonka. Korelację aCI z uszkodzeniem endotelium w twardzinie układowej opisali w swoim badaniu Assous i wsp.⁹⁶. Wydaje się, że aPI mogą nasilać oraz przyspieszać zmiany zachodzące w naczyniach u chorych na twardzinę układową, co ma odzwierciedlenie w przeprowadzonych do tej pory badaniach. Wiadomo, że obecność aPI koreluje z cięższą postacią choroby^{87, 70}.

W badaniu kapilaroskopowym możliwe jest obserwowanie wybroczyn oraz liniowych, równoległych do wałów paznokciowych depozytów hemosyderyny, przy prawidłowej morfologii kapilar. Zmiany te mają związek z obecnością aPI i są cechą typową dla zespołu antyfosfolipidowego.

Marie i wsp. przy użyciu wideokapilaroskopu oceniali przepływ krwi oraz zburzenia naczyniowe wałów paznokciowych⁹⁵. W swoim opracowaniu zwrócili uwagę na częstsze

występowanie zmian w kapilarach wałów paznokciowych u chorych z aCl/ β 2GPI i/lub LA. W badaniu Sanna i wsp. chorzy ze skórnymi teleangektazjami i nadciśnieniem płucnym mieli częściej przeciwciała a-PS/PT, niż pozostali ⁶⁷. Autorzy sugerują, że a-PS/PT mogą być markerem zajęcia naczyń w twardzinie układowej ⁶⁷, które jednak w tym badaniu nie podlegały ocenie. Wiadomo natomiast, że aPI nawet w niskim stężeniu, poniżej poziomu odcięcia dla zespołu antyfosfolipidowego, nasilają peroksydację lipidów błonowych, w wyniku czego obserwuje się wysokie stężenie 8-epi-prostaglandyny-F2 α (8-epi-PGF2 α), która stymuluje komórki śródbłonna naczyń do wytwarzania endoteliny-1, silnej substancji naczyniokurczącej. Nawet niskie stężenie aPI może nasilać zmiany naczyniowe ¹⁰⁵.

Niektóre doniesienia nie potwierdzają jednak tej hipotezy ⁸⁹. W obserwacji Vayssairat pomimo, że u chorych z aCl w surowicy, częściej występowały zmiany zaawansowane typowe dla fazy aktywnej lub późnej (kapilary rozgałęzione, wybroczyny, zaburzenia dystrybucji naczyń), to jednak nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy między badaną grupą, a grupą kontrolną, tj. bez przeciwciał ¹⁰⁶.

Trudno uzyskać wiarygodne wnioski ponieważ badania przeprowadza się na małych grupach pacjentów, co wynika z niskiej chorobowości twardziny układowej. Jak również liczba wykonanych dotychczas badań jest niewielka. Nie ulega wątpliwości, że takie obserwacje powinny być prowadzone na szerszą niż dotychczas skalę, co pozwoliłoby na szybsze wykrywanie powikłań oraz na wdrożenie skuteczniejszego leczenia.

Pośrednim dowodem na występowanie zaburzeń naczyniowych jest obecność owrzodzeń i martwicy palców, które znacznie częściej występują u chorych z aPI, co zostało potwierdzone w badaniu Parodi i wsp. ⁶⁵ Również Picillo i wsp. zauważyli korelację aPI ze zmianami naczyniowymi pod postacią naporstkowych blizn na opuszkach palców oraz teleangiektazji ⁸⁶. Objawy te nie były jednak przedmiotem oceny w moim badaniu.

W prezentowanej pracy oceniano stopień nasilenia zmian angiopatycznych w zależności od obecności aPI. Wszyscy chorzy biorący udział w badaniu poddani zostali badaniu kapilaroskopowemu. Zmiany o typie późnym wykryto u 11 z 34 badanych chorych: 5 z przeciwciałami aCl i/lub a β 2GPI oraz LA, 3 wyłącznie z LA i 3 bez przeciwciał w surowicy krwi. W grupie z aCl i/lub a β 2GPI wszyscy chorzy prezentowali zmiany zaawansowane, podczas gdy w grupie z LA odsetek ten był znacznie niższy i wynosił 36%. Jeszcze większą różnicę, istotną statystycznie, zaobserwowano porównując grupę aCl i/lub a β 2GPI z grupą bez przeciwciał: 100% vs 25% (p=0,005). Wyniki te potwierdzają znaczenie przeciwciał aCl i a β 2GPI w powstawaniu ciężkich zaburzeń w łożysku naczyniowym. Takiego znaczenia nie wykazuje jednak LA.

Częstość występowania mikroangiopatii twardzinowej o typie aktywnym lub wczesnym nie różnił się w sposób istotny statystycznie między badanymi grupami. Co ciekawe zaobserwowano również, że wszyscy pacjenci, u których nie stwierdzano żadnych zmian w badaniu kapilaroskopowym, pochodzili z grupy z LA i stanowili 27% tej populacji, więcej w sposób istotny statystycznie niż w grupie chorych bez przeciwciał. Nie potwierdza to udziału LA w nasilaniu zmian angiopatycznych, a nawet wskazuje, że może mieć on pewne znaczenie w hamowaniu nowotworzenia naczyń. Teza ta nie ma jednak potwierdzenia w dostępnej literaturze. Na uwagę zasługuje fakt, że w prezentowanym badaniu u pacjentów z LA w dużej części nie wykryto przeciwciał aScl-70, które stanowią samodzielny czynnik ryzyka wystąpienia mikroangiopatii oraz ognisk nowotworzenia naczyń. Fakt ten tłumaczy występowanie niewielkich zmian naczyniowych u chorych z LA, jak również podkreśla niewielkie znaczenie LA w nasilaniu zaburzeń naczyniowych.

Obecność aPl wydaje się korelować nie tylko z poważniejszym zajęciem narządów wewnętrznych, ale również bardziej rozległym zajęciem skóry^{87, 70}. Choć opublikowano badania, które nie potwierdzają tej zależności. Hasegawa i wsp. oceniając grupę 112 pacjentów zauważyli, że pomimo iż u chorych z przeciwciałami a-PS/PT znacząco częściej występowały objawy niedokrwienia obwodowego, owrzodzenia palców, a nawet zmiany w płucach i izolowane nadciśnienie płucne, nie miały one związku z rozległością zmian skórnych⁶⁹. Leite i wsp. opisali przypadek chorej z aCl i LA oraz zakrzepicą żylną oraz objawem Raynaud, u której w surowicy wykryto przeciwciała przeciwcentromerowe, nie stwierdzając jednak zmian skórnych¹⁰⁷. Rozpoznano w tej sytuacji twardzinę układową bez twardnienia skóry oraz zespół antyfosfolipidowy, nie potwierdzając związku aPl z twardnieniem skóry. Również Vayssairat i wsp. nie znaleźli związku między występowaniem aCl a nasileniem zmian skórnych¹⁰⁶.

W analizowanej przeze mnie grupie również nie wykazano korelacji między występowaniem aPl a nasileniem zmian skórnych, zarówno dla LA, jak i aCl oraz aβ2GPI. Obserwacje te nie potwierdzają doniesień Malia oraz Picillo^{70, 87}. Analiza statystyczna wykazała ponadto, że twardnienie skóry było nawet cięższe u chorych bez aPl, niż w ich obecności, a różnica między grupami była istotna statystycznie. Nie należy jednak przypuszczać, że aPl pełnią protekcyjną rolę, zmniejszającą ryzyko zaawansowanego zajęcia skóry. Również w tym przypadku dysproporcja częstości występowania aScl-70 w surowicy krwi między grupą z aPl i grupą bez aPl mógłby stanowić wyjaśnienie tego zjawiska. Obecność przeciwciał aScl-70, jak wiadomo, ma ścisły związek z szybkim postępem i rozległością zmian skórnych. W

grupie z LA tylko u 32% chorych wykryto przeciwciała aScl-70, natomiast duży odsetek 83% chorych z aScl70 odnotowano w grupie bez aPl. Z uwagi na korelację aScl-70 z rozległym zajęciem skóry fakt ten ma kluczowe znaczenie i prawdopodobnie tłumaczy cięższe zajęcie skóry w grupie bez aPl.

W prezentowanej analizie uwzględniono ocenę zmian w płucach na podstawie HRCT, FVC oraz DLCO – badań wykorzystywanych w różnych skalach do oceny ciężkości SSc, między innymi w skali ciężkości choroby wg Medsger⁴⁰. Istotne klinicznie zajęcie płuc występuje u około 30% chorych na SSc. Natomiast cechy włóknienia śródmiąższowego płuc w tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości widoczne są nawet w 55% przypadków, chociaż wiele z nich nie jest związane z poważnym upośledzeniem funkcji płuc¹⁰⁸. W przebiegu choroby w HRCT stwierdza się zagęszczenia siateczkowate, zmiany typu plastra miodu oraz mleczej szyby. HRCT jest badaniem z wyboru przy ocenie zmian śródmiąższowych w płucach, wykrywającym już niewielkie zmiany, znacznie wcześniej niż zdjęcia rentgenowskie. Badania obrazowe powinny być uzupełnione o badania czynnościowe płuc, oceniające występowanie zmian restrykcyjnych w płucach, co stwierdza się przy obniżonej natężonej pojemności życiowej (FVC) i braku cech obturacji. Na FVC może mieć wpływ nie tylko włóknienie śródmiąższowe, ale również zaburzenia mechaniki oddychania przy stwardnieniu skóry oraz struktur ściany klatki piersiowej. Najbardziej czułym wskaźnikiem włóknienia w płucach jest pomiar dyfuzji tlenu węgla przez barierę pęcherzykowo-włosniczkową (DLCO).

Istnieje bardzo niewielka liczba badań oceniająca częstość występowania zmian w płucach w zależności od obecności aPl. Poza tym dane te nie są jednoznaczne. Hasegawa i wsp. w badaniu na dużej grupie pacjentów zauważyli, że u chorych z przeciwciałami a-PS/PT znacząco częściej występowały objawy włóknienia płuc, zmniejszona pojemność życiowa i całkowita płuc⁶⁹. Picillo i wsp. częściej obserwowali włóknienie płuc oraz zaburzenia oddychania typu restrykcyjnego w obecności aCl niż w grupie bez aPl, jednak różnice te nie były istotne statystycznie⁸⁷. W badaniu Sulik i wsp. gdzie poddano ocenie polską populację nie potwierdzono związku aCl ani β 2GPI z włóknieniem śródmiąższowym w płucach⁶⁶. Natomiast w ocenie Parodi i wsp. zajęcie płuc występuje nawet rzadziej w obecności aPl⁶⁵.

W badanej grupie włóknienie śródmiąższowe wykrywano częściej u chorych posiadających przeciwciała aPl. W grupie z aCl i/lub β 2GPI u wszystkich pacjentów wykryto zmiany w tkance płucnej, natomiast nieco mniej (86%) u osób posiadających LA w surowicy

krwi i tylko 58% w grupie bez przeciwciał. Różnice między grupami nie były jednak istotne statystycznie, co wynika prawdopodobnie z małej liczebności grup.

Podobnie nie zaobserwowano istotnej korelacji między aPI a zaburzeniami oddychania typu restrykcyjnego. Na uwagę zasługuje fakt, że zmniejszenie natężonej pojemności życiowej (FVC) w stopniu ciężkim obserwowano wyłącznie u chorych z LA. W grupie bez aPI u ponad 90% chorych stwierdzono prawidłowe lub zmniejszone w stopniu lekkim FVC, natomiast u osób z aPI odsetek ten wynosił 60%. Na podstawie tego badania można podejrzewać, że obecność aPI może przyspieszać występowanie zmian w płucach, co wymaga jednak potwierdzenia na większej liczbie chorych. Dopiero analiza statystyczna zaburzeń zdolności dyfuzyjnej tlenu węgla w płucach wykazała istotne różnice częstości występowania zmian w zależności od obecności aPI. Upośledzenie DLCO w stopniu ciężkim wykazano u 36% chorych z LA oraz 40% z aCI i/lub β 2GPI, podczas gdy w grupie chorych bez przeciwciał aPI obserwowano tylko zmiany w stopniu lekkim i umiarkowanym. U żadnego chorego z aCI i/lub β 2GPI nie obserwowano zaburzeń łagodnego stopnia. Badanie to potwierdziło istotny statystycznie związek aPI z upośledzeniem dyfuzji gazów w płucach ($p=0,034$), natomiast takiej korelacji nie obserwowano w stosunku do FVC oraz zmian w HRCT. Związek aPI z nasileniem zmian w płucach pozostaje niejasny, co ma swój wyraz w przytoczonych wyżej publikacjach.

W niektórych badaniach aCI związane były z niedokrwieniem i zawałem serca, ale nie z obecnością uszkodzenia zastawek czy dysfunkcją rozkurczową komór⁴⁴. W analizie przeprowadzonej przez Picillo na grupie 100 chorych z twardziną układową stwierdzono przeciwciała przeciwkardiolipinowe w 25% oraz zauważono znaczący związek aCI z niedokrwieniem i martwicą mięśnia sercowego⁸⁷. Dropiński i wsp. stwierdzili, również że częstość i zakres patologii serca jest skorelowany z obecnością przeciwciał przeciwfosfolipidowych¹⁰⁹. W innym badaniu Ichikawa i wsp. sugerują, że aPI mogą przyczyniać się do zapalenia osierdzia z wysiękiem do worka osierdziowego¹¹⁷. Natomiast inne stanowisko zajmują Gabrielli i wsp., którzy zauważyli, że częste zajęcie serca u chorych z układową chorobą tkanki łącznej nie ma związku ze zwiększoną ilością przeciwciał przeciwfosfolipidowych¹¹⁰. Jeszcze bardziej zastanawiające wnioski wysunięto w badaniu Parodi i wsp., którzy stwierdzili, że u chorych z obecnością aPI serce było zajęte nawet rzadziej, niż u pozostałych⁶⁵.

Większość autorów wypowiada się jednoznacznie tylko w kwestii dotyczącej korelacji aPI z występowaniem nadciśnienia płucnego u chorych na SSc. Pomimo, że aCI wykrywa się

zwykle w niskim stężeniu, stwierdzono ścisły związek nadciśnienia płucnego z ich obecnością^{69, 96, 95, 92}. Inne badania wykazują ewidentny związek przeciwciał aβ2GPI z występowaniem cech PAH w echokardiografii¹¹¹.

U chorych z aPI, poza nadciśnieniem płucnym wtórnym do choroby zakrzepowozatorowej, wykrywane było również pierwotne nadciśnienie płucne, nie związane z chorobą śródmiąższową. Częstość występowania nadciśnienia płucnego u chorych z pierwotnym zespołem antyfosfolipidowym szacuje się na ok. 3%^{112, 63}. W badaniach chorych z pierwotnym PAH stwierdzono również częste występowanie aPI¹¹³. Launay i wsp. stwierdzili, że u chorych z pierwotnym nadciśnieniem płucnym częściej wykrywa się aCI niż u chorych bez PAH (72.7% vs 35.7%, $P < 0.05$)¹¹⁴. Sugeruje się, że aPI mogą aktywować komórki śródbłonna oraz stymulować wytwarzanie przeciwciał skierowanych przeciwko endotelium, co prowadzi do zmian naczyniowych obserwowanych w nadciśnieniu płucnym. aPI indukują komórki śródbłonna do produkcji endoteliny 1 (ET-1), której wysokie stężenie w surowicy krwi obserwuje się u chorych z nadciśnieniem płucnym i która ściśle wiąże się z patogenezą PAH w twardzinie układowej. Również wysokie stężenie 8-epi-PGF2α, silnej substancji wazoaktywnej stymulującej produkcję endoteliny-1 przez komórki naczyń płucnych, koreluje ze stężeniem aCI w klasie G¹⁰⁵.

Można stąd przypuszczać że aPI będą działały synergistycznie do patomechanizmów zwiększających opór w tętnicach płucnych, zachodzących w SSc, a ich obecność będzie zwiększała ryzyko wystąpienia PAH.

W opisywanym badaniu do oceny ciśnienia w krążeniu płucnym wybrano echokardiografię, jako metodę nieinwazyjną i bezpieczną dla pacjenta. Większość autorów również wykorzystuje echokardiografię w swoich analizach. Należy jednak pamiętać, że jest to badanie pozwalające jedynie oszacować prawdopodobieństwo wystąpienia nadciśnienia płucnego (PH). Zwiększony gradient wsteczny przez zastawkę trójdzielną pośrednio wskazuje na patologiczne ciśnienie w prawej komorze (RVSP). Uzyskany wynik oznacza stopień prawdopodobieństwa wystąpienia nadciśnienia płucnego: PH bardzo prawdopodobne przy RVSP ≥ 46 mmHg, prawdopodobne w przedziale 32 – 45mmHg oraz mało prawdopodobne < 31 mmHg. Analizując uzyskane wyniki należy brać pod uwagę fakt, że jest to metoda niedokładna, używana jako skryningowa, wymagająca potwierdzenia podczas cewnikowania serca i tętnicy płucnej. Podkreśla się, że przezklatkowa echokardiografia może być użyteczna w wykrywaniu lub wykluczaniu istotnego nadciśnienia płucnego, ale jest zawodna przy wczesnym PH. Pomocne w interpretacji badania mogą być inne cechy PH: poszerzenie prawej komory i zaburzenia kurczliwości, przy prawidłowej wielkości i funkcji

skurczowej lewej komory. Cechy te nie były jednak brane pod uwagę w opisywanym badaniu.

Częstość występowania PAH w oparciu o echokardiografię wynosi ok. 27%, co jest odsetkiem znacznie zawyżonym w porównaniu z wartością uzyskaną stosując metodę inwazyjną (7 – 12%)³⁷. Dlatego przed rozpoczęciem specyficznej terapii nadciśnienia płucnego zawsze należy potwierdzić jego występowanie podczas cewnikowania serca.

W prezentowanym badaniu nadciśnienie płucne (PH) wykazano u 8 chorych z 32 badanych, co stanowi 37%. W większości przypadków było to nadciśnienie płucne wtórne do choroby śródmiąższowej płuc. Tylko w 1 przypadku (3%) było to tętnicze nadciśnienie płucne, bez zmian w tkance płucnej (ocenianych metodą HRCT). W surowicy krwi u tego chorego stwierdzono LA, natomiast nie wykryto aScI-70. W pozostałych przypadkach zmiany w krążeniu płucnym wynikały z włóknienia śródmiąższowego w płucach (u 5 chorych z 8 stwierdzono zmiany zaawansowane – DLCO III stopnia). Dane w literaturze wskazują na rzadkie występowanie pierwotnego PAH w twardzinie układowej, szczególnie w postaci uogólnionej, jednak nieco częstsze niż w ocenianej grupie. Ten niski odsetek chorych z PAH wiąże się z doborem grupy badanej. PAH uważane jest za późny objaw twardziny układowej ograniczonej, natomiast badaną grupę stanowili wyłącznie pacjenci z postacią uogólnioną. Ryzyko wystąpienia PAH zwiększa się w obecności przeciwciał przeciwcentromerowych, których nie stwierdzono w tym badaniu.

W przedstawionej grupie nadciśnienie płucne obserwowano w porównywalnym odsetku u chorych z LA oraz w grupie bez przeciwciał (36 v 33%). PH stwierdzono tylko u jednego z pięciu chorych z aCl i/lub aβ2GPI. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy między grupami, nie potwierdzono zatem udziału aPl w nasilaniu PH. W badaniu Sulik i wsp. przeprowadzonym w polskiej populacji⁶⁶ takiej zależności również nie stwierdzono.

Uzyskiwane w moim badaniu wartości ciśnienia w prawej komorze serca były niskie i mieściły się w zakresie od 31 do 50 mmHg – nadciśnienie małego stopnia prezentowała większość pacjentów w tej grupie, tylko w 2 przypadkach było to PH stopnia umiarkowanego (najwyższe u chorego z PAH). W surowicy krwi chorego z tętnicznym nadciśnieniem płucnym wykryto LA, co może sugerować jego udział w powstawaniu zmian w krążeniu płucnym. Na tej podstawie nie można jednak wysunąć wiarygodnych wniosków. W dostępnej literaturze nie istnieją dane potwierdzające związek LA z nadciśnieniem płucnym.

Różnice dotyczące częstości występowania PAH i jego związku z aPl między przedstawionymi tutaj wynikami a wnioskami prezentowanymi przez większość autorów może wynikać ze zbyt małej liczebności grup, a szczególnie grupy z aCl i/lub aβ2GPI.

Znaczenie tych przeciwciał oceniano łącznie, co może mieć również istotne znaczenie, szczególnie w świetle niektórych doniesień poddających pod wątpliwość znaczenie a β 2GPI w nadciśnieniu płucnym. Assous i wsp. nie odnotowali takiej zależności między PAH a a β 2GPI. Wpływ na wyniki może mieć również metoda oznaczenia aPI. Zestawy, których użyto do oznaczania aCI oraz a β 2GPI wykrywały łącznie przeciwciała w klasach G, M oraz A. Według dostępnych źródeł, u większości chorych, stwierdzano przeciwciała aPI w klasie IgM, które jednak nie wiązały się z objawami klinicznymi⁹².

Ihn i wsp. zauważyli, że aCI i a β 2GPI w klasie IgG, które stwierdzono tylko u 10% chorych na SSc, ściśle korelowały z częstością występowania nadciśnienia płucnego. Ponadto spośród chorych z rozpoznaniem nadciśnieniem płucnym w przebiegu choroby, u osób z aCI i a β 2GPI w klasie IgG oznaczano wyższe średnie ciśnienie w tętnicy płucnej, niż u osób bez przeciwciał⁹². Ponadto stężenie przeciwciał w klasie IgG, zarówno aCI, jak i a β 2GPI, korelowało ze stopniem nadciśnienia płucnego^{87, 92}. Planując podobne badanie należałoby zatem wybrać zestaw laboratoryjny pozwalający na określenie klasy wykrytych aPI.

Przeciwciała aPI zwiększając skłonność do mikrozakrzepów oraz mikroangiopatii predysponują najprawdopodobniej do wystąpienia patologicznych zmian w obrębie nerek. Wiąże się je z uszkodzeniami śródbłonna oraz proliferacją błony wewnętrznej naczyń łukowatych i międzyplacikowych. To prowadzi do pogrubienia i zwężenia naczyń nerkowych oraz zmian niedokrwiennych. Jedną z przyczyn takich zmian w twardzinie układowej może być obecność aPI. Przeciwciała te wiążąc się z fosfolipidami błon komórkowych zmniejszają uwalnianie prostacykliny, mającej działanie wazodylatacyjne, jak również antyagregacyjne. Nefropatia wywołana przez zwężenie drobnych naczyń w nerkach oraz agregacją płytek krwi i zakrzepami w kłębuszkach nerkowych i tętniczkach jest jedną z nerkowych manifestacji zespołu antyfosfolipidowego¹¹⁵. Wyniki dotychczasowych obserwacji sugerują, że antykoagulant toczniowy oraz aCI są odpowiedzialne za tworzenie się zakrzepów w naczyniach nerkowych i wynikające z tego objawy u chorych nie spełniających kryteriów zespołu antyfosfolipidowego.

Uszkodzenie nerek może się manifestować wystąpieniem białkomoczu, erytrocyturii, czy zwiększeniem stężenia kreatyniny w surowicy krwi, z jednoczesnym zmniejszaniem się klirensu kreatyniny. Zajęcie nerek w prezentowanym badaniu oceniane było na podstawie przesączania kłębuszkowego (GFR) wyliczonego wg skróconego wzoru MDRD. Metodę tą uważa się za najbardziej adekwatną u osób między 18 a 70 rokiem życia, u chorych z nieprawidłowym przesączaniem kłębuszkowym <60ml/min/1,73m². Wzór ten nie uwzględnia

masy ciała dlatego należy pamiętać, że u osób otyłych GFR jest niedoszacowane, natomiast zbyt wysokie u osób wychudzonych. Metodę CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) uważa się za bardziej precyzyjną przy $GFR > 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, natomiast formułę Cockcroft-Gault wyeliminowano jako najmniej dokładną, (np. obserwuje się zbyt dużą zmienność GFR w zależności od wieku). Natomiast wyliczanie klirensu kreatyniny powinno być zarezerwowane dla osób z nieprawidłową produkcją kreatyniny, np. z ekstremalną masą mięśniową lub stosujących dietę wegetariańską.

W opisywanej grupie chorych przewlekłą chorobę nerek w stadium III ($GFR < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) stwierdzono u 9 (26%) chorych: 7 w grupie z LA, tj. u 32% chorych z LA oraz 2 bez aPI w surowicy krwi, co stanowi 17% chorych w grupie. Obserwowana różnica nie była istotna statystycznie. A zatem nie udowodniono korelacji między aPI a występowaniem poważnego uszkodzenia nerek. U żadnego chorego w grupie z aCL i/lub $\beta 2\text{GPI}$ nie stwierdzono przewlekłej choroby nerek w stopniu III, co nie potwierdza związku aPI z upośledzeniem funkcji nerek. Na uwagę zasługuje również fakt, że odsetek chorych z przewlekłą chorobą nerek był mniejszy niż podaje literatura. Należy zaznaczyć, że nie brano pod uwagę chorych z innymi cechami uszkodzenia nerek, np. białkomoczem, przy $GFR > 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$.

W innym badaniu przeprowadzonym w polskiej populacji zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie się GFR wyliczanego metodą MDRD w grupie chorych z aPI w porównaniu z grupą bez aPI¹¹⁶. Nie stwierdzono podobnego związku w przypadku GFR wyliczanego metodą Cockcroft-Gault. Zaobserwowano również, że ta negatywna korelacja między aPI a przesączaniem kłębuszkowym zachodziła wyłącznie w obecności przeciwciał aCL i $\beta 2\text{GPI}$ w klasie IgG, takiej zależności nie obserwowano z przeciwciałami w klasie IgM. Ponadto białkomocz, przełom nerkowy i nadciśnienie tętnicze obserwowano częściej u chorych z aPI.

W moim badaniu do wykrywania przeciwciał aCL i $\beta 2\text{GPI}$ użyto zestawów oceniających łącznie obecność przeciwciał w klasie IgG, IgM oraz IgA, bez rozróżnienia ich na klasy. W tym przypadku nie miało to jednak wpływu na ostateczne wnioski ponieważ u nikogo w ocenianej grupie nie obserwowano znacznego obniżenia GFR. W badaniu Wielosz i wsp. inne cechy uszkodzenia nerek takie jak białkomocz, nadciśnienie tętnicze, przełom nerkowy występowały nieco częściej u chorych z aPI, ale bez istotności statystycznej, natomiast istotne różnice występowały pomiędzy postacią uogólnioną i ograniczoną twardziny układowej zarówno u osób z aPI, jak i bez nich.

Na podstawie swoich obserwacji Ichikawa i wsp. sugeruje natomiast, że obecność aPI może przyczyniać się do występowania przełomu nerkowego ¹¹⁷.

Podsumowując dostępne badania można przypuszczać, że aPI w surowicy krwi, nawet w niskim mianie, może wywoływać u chorych na twardzinę układową nefropatię typową dla zespołu antyfosfolipidowego, pomimo braku pełnych objawów zespołu. W przedstawianym badaniu teza ta jednak nie została potwierdzona.

Wielu autorów nie znajduje żadnego powiązania pomiędzy obecnością przeciwciał przeciwfosfolipidowych a objawami klinicznymi. W grupie chorych ocenianych przez Sulik i wsp. rozpowszechnienie aCI i aβ2GP I było stosunkowo duże (odpowiednio 45% i 41%). Nie udało się natomiast określić ich znaczącego związku z zajęciem organów wewnętrznych, ani też obecnością przeciwciał anti-Sc1-70. Udało się natomiast ustalić, że przeciwciała aβ2GPI występowały tylko u tych chorych posiadających przeciwciała przeciwkardiolipinowe ⁶⁶. Ostatni wniosek nie znalazł potwierdzenia w moim badaniu, gdzie u 2 chorych wykryto aβ2GP występujące samodzielnie, bez aCI.

Pope i wsp. wykazali aCI u niskiego odsetka chorych (4,8%) w badaniu przeprowadzonym na grupie 63 chorych, stwierdzając, że aCI w SSc rzadko ma znaczenie kliniczne, tylko u jednej pacjentki odnotowano niedokrwienie i martwicę stopy towarzyszące zakrzepicy w naczyniach średniej wielkości kończyny dolnej ⁸⁹. Również Parodi i wsp. stwierdzili, że zajęcie narządów wewnętrznych u chorych z aPI nie było ciężkie, chociaż częściej występowały owrzodzenia skóry (63% vs 39% u chorych bez aPI) ⁶⁵. W badaniach Passaleva i wsp. oraz Katayama i wsp. również nie wykazano związku aPI z nasileniem zmian skórnych i zajęciem narządów wewnętrznych ^{88, 71}.

Dane dotyczące związku zmian narządowych w twardzinie układowej z występowaniem przeciwciał przeciwfosfolipidowych są bardzo ograniczone i niejednoznaczne. aPI nawet w niskim mianie mogą mieć związek z pogorszeniem funkcjonowania nerek, układu krążenia oraz układu oddechowego. Wymaga to z pewnością prowadzenia dalszych badań na dużych grupach chorych, z uwzględnieniem jeszcze innych przeciwciał, nie wykrywanych obecnie w rutynowych testach laboratoryjnych. W przedstawionym badaniu wykazano związek aPI z nasileniem zmian naczyniowych obserwowanych w kapilaroskopii oraz z upośledzeniem dyfuzji gazów w płucach. Takiej zależności nie odnotowano dla innych cech opisujących nasilenie i aktywność twardziny układowej.

6. WNIOSKI

1. Przeciwciała aPI stwierdza się u 65% chorych na twardzinę układową , w tym LA u 65% , a przeciwciała aCI i/lub aβ2GPI u 15% chorych. Przeciwciała aPI występują w niskim stężeniu nieistotnym dla rozpoznania zespołu antyfosfolipidowego.
2. Istnieje związek pomiędzy obecnością aCI i/lub aβ2GPI a stopniem zaawansowania zmian naczyniowych obserwowanych w kapilaroskopii wałów paznokciowych.
3. U chorych na twardzinę układową z obecnymi aPL (głównie przeciwciałami aCI i/lub aβ2GPI) obserwuje się zwiększoną częstości występowania zaawansowanych zaburzeń DLCO.
4. Nie stwierdza się istotnej korelacji pomiędzy obecnością przeciwciał aPI a stopniem stwardnienia skóry, nasileniem włóknienia śródmiąższowego płuc, ani zmniejszeniem pojemności życiowej płuc, występowaniem nadciśnienia płucnego oraz istotnym zmniejszeniem przesączania kłębuszkowego w nerkach.

7. STRESZCZENIE

Twardzina układowa należy do układowych chorób tkanki łącznej, które cechuje przewlekły proces zapalny o podłożu autoimmunologicznym. Charakteryzuje się ona uogólnionym zwłóknieniem skóry i narządów wewnętrznych, prowadząc do ich niewydolności. U podłoża choroby leży również uszkodzenie naczyń krwionośnych oraz nieprawidłowa aktywacja układu immunologicznego. Obok typowych dla twardziny układowej przeciwciał stwierdza się również inne, nieswoiste dla choroby. Należą do nich między innymi przeciwciała przeciwfosfolipidowe (aPI).

Celem pracy było określenie częstości występowania przeciwciał przeciwfosfolipidowych, tj. antykoagulanta toczniowego (LA), przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) oraz przeciwciał przeciw $\beta 2$ glikoproteinie I ($\alpha\beta 2$ GPI) u chorych na twardzinę układową. Ponadto oceniano związek między obecnością przeciwciał przeciwfosfolipidowych a niektórymi objawami klinicznymi: stopniem stwardnienia skóry, nasileniem zmian w naczyniach wałów paznokciowych, obecnością nadciśnienia płucnego, zajęciem układu oddechowego i nerek.

Badanie przeprowadzono w grupie 34 chorych na twardzinę układową. Rozpoznanie choroby ustalano na podstawie kryteriów Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego. Wszyscy chorzy poddani zostali badaniu przedmiotowemu, z uwzględnieniem stopnia zajęcia skóry wg zmodyfikowanej skali Rodnana. Wykonano badania dodatkowe obejmujące kapilaroskopię wałów paznokciowych, echokardiografię, tomografię komputerową płuc wysokiej rozdzielczości oraz badania czynnościowe płuc: pojemność dyfuzyjną tlenu węgla w płucach (DLCO) i spiometrię, w której oceniano natężoną pojemność życiową (FVC). Ponadto, na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy krwi, obliczano przesączanie kłębuszkowe w nerkach (GFR).

Na podstawie uzyskanych wyników badań serologicznych, chorych podzielono na trzy grupy: 1 - z występującym w surowicy krwi antykoagulantem toczniowym, 2 - z obecnymi przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi i/lub przeciw $\beta 2$ glikoproteinie I oraz grupę 3 - bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych w surowicy krwi, która stanowiła grupę kontrolną.

U 22 chorych (65%) stwierdzono obecność LA, natomiast u pozostałych 12 chorych (35%) nie wykryto żadnych przeciwciał przeciwfosfolipidowych. Wśród chorych z LA u 5 osób wykryto dodatkowo przeciwciała aCl i/lub a β 2GPI (15% badanych).

W przeprowadzonym badaniu wykazano związek aCl i/lub a β 2GPI z zaawansowanymi zaburzeniami naczyniowymi obserwowanymi w kapilaroskopii wałów paznokciowych, nie stwierdzając takiej zależności w przypadku tylko LA. Ponadto wykazano zwiększenie częstości występowania zaawansowanych zaburzeń DLCO w płucach u chorych z aPI, szczególnie w grupie z aCl i/lub a β 2GPI, w porównaniu z grupą bez aPI. Nie wykazano natomiast istotnej korelacji między przeciwciałami aPI a stopniem stwardnienia skóry, nasileniem włóknienia śródmiąższowego w płucach, ani zmniejszeniem pojemności życiowej w płucach, jak również istotnym zmniejszeniem GFR. Pomimo, że nadciśnienie płucne obserwowano częściej u chorych z aCl i/lub a β 2GPI niż w grupie bez aPI, różnica ta nie była jednak istotna statystycznie.

Uzyskane wyniki mogą sugerować wpływ aPI na występowanie niektórych zmian narządowych u chorych na twardzinę układową. Wymaga to z pewnością prowadzenia dalszych badań na dużych grupach chorych, z uwzględnieniem innych przeciwciał przeciwfosfolipidowych, nie wykrywanych obecnie w rutynowych testach.

8. SUMMARY

Systemic sclerosis (SSc) is one of connective tissue diseases characterized by chronic autoimmunologic inflammatory reaction. Most typical symptoms are skin and vital organs fibrosis leading to severe insufficiency, pathologic immunologic system activation and improper vessel's function. In laboratory tests typical for SSc as well as different unspecific antibodies are found, as for example antiphospholipid antibodies (aPI).

The aim of the study was to assess the prevalence of aPI: lupus anticoagulant (LA), anticardiolipin antibodies (aCl) and anti- β 2 glycoprotein I (anti- β 2GPI) in patients with SSc. The correlation between the presence of aPI and certain clinical manifestations was also examined – thickening of the skin, severity of nailfold capillaries impairment, pulmonary arterial hypertension, abnormalities in respiratory system and renal function were under observation .

34 patients were admitted to the study according to the American College of Rheumatology preliminary criteria for systemic sclerosis. Clinical examination was performed and skin thickening measured according to modified Rodnan skin score. In addition nailfold capillaroscopy, echocardiography, high resolution computed tomography of lungs, forced vital capacity (FVC) by spirometry, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) were evaluated. Glomerular filtration rate (GFR) was counted, using serum creatinine.

All patients were assigned to three groups according to serological tests : 1 – LA present in the serum, 2 – aCl and/or anti- β 2GPI and 3 – no aPI in serum. Group 3 was the control group.

LA was present in 22 (65%) cases, aCl and/or anti- β 2GPI were also detected in 5 (15%) individuals within group 1 and were separated to group 2. There was no aPI found in 12 (35%) cases.

The study revealed significant relationship between presence of aCl and/or anti- β 2GPI and severe abnormalities of nailfold capillaries, while no such association was found in first group. In addition, serious decrease of DLCO in lungs was associated with aPI, especially with aCl and/or anti- β 2GPI. There was no positive correlation between aPI presence and skin thickening, lungs interstitial fibrosis, FVC decrease and glomerular filtration. Pulmonary

hypertension was more frequently found when aCl and/or anti- β 2GPI were present than those without aPI but no significant correlation was found.

Findings suggest that aPI presence may predict severity of certain clinical manifestations in systemic sclerosis. Further research, in larger groups of patients and other antiphospholipid antibodies examination, is necessary to confirm this hypothesis.

9. SPIS RYCIN

Rycina 1. Płytki titracyjna	37
Rycina 2. Homogeny typ fluorescencji jądra komórkowego.	40
Rycina 3. Obwodowy typ fluorescencji jądra komórkowego.	41
Rycina 4. Jąderkowy typ fluorescencji jądra komórkowego.	41
Rycina 5. Plamisty typ fluorescencji jądra komórkowego.....	42
Rycina 6. Centromerowy typ fluorescencji jądra komórkowego.....	42
Rycina 7. Cytoplazmatyczny typ fluorescencji granulocytów obojętnochłonnych	45
Rycina 8. Okołojądrowy typ fluorescencji granulocytów obojętnochłonnych (P-ANCA)	45
Rycina 9. 17 okolic ciała ocenianych wg zmodyfikowanej skali Rodnana	47
Rycina 10. Kapilaroskop Nikon SMZ 800.....	48
Rycina 11. Obraz naczyń w kapilaroskopii: a - poszerzone pętle naczyniowe oraz b - megakapilary	49
Rycina 12. Megakapilary, ogniska awaskularyzacji, „czapeczkowate” wybroczyny	50
Rycina 13. Ognisko neoangiogenezy: pętle rozgałęzione	50
Rycina 14. HRCT - włóknienie śródmiąższowe płuc	51
Rycina 15. HRCT klatki piersiowej – widoczne włóknienie śródmiąższowe.	60

10. SPIS TABEL

Tabela 1. Zmodyfikowane kryteria klasyfikacyjne zespołu antyfosfolipidowego z 2004 r.	28
Tabela 2. Charakterystyka wieku chorych na twardzinę układową w grupie 1,2 i 3 oraz 1 – 2 (chorzy z LA bez aCl i/lub aβ2GPI)	34
Tabela 3. Czas trwania twardziny układowej w badanej grupie chorych	35
Tabela 4. Częstość występowania przeciwciał przeciwfosfolipidowych w badanej grupie	56
Tabela 5. Częstość występowania ANCA i RF w badanej grupie chorych z twardziną układową	57
Tabela 6. Stopień stwardnienia skóry według zmodyfikowanej skali Rodnana w grupie chorych ze stwierdzonym: antykoagulantem toczniowym (LA) – grupa 1, z przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi (aCl) i/lub przeciwciałami przeciw β2 glikoproteinie I (aβ2GPI) – grupa 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) – grupa 3	58
Tabela 7. Stopień zaawansowania zmian w naczyniach wałów paznokciowych (faza późna – III, aktywna – II, wczesna – I, brak zmian – 0) badanych w kapilaroskopii, w zależności od występowania antykoagulantu toczniowego (LA) – grupa 1, przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β2 glikoproteinie I (aβ2GPI) – grupa 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) – grupa 3	59
Tabela 8. Liczba chorych z włóknieniem śródmiąższowym w płucach obserwowanym w HRCT, w zależności od obecności antykoagulantu toczniowego (LA), przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β2 glikoproteinie I (aβ2GPI) oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL)	61
Tabela 9. Zaburzenie zdolności dyfuzyjnej tlenu węgla w płucach stopnia łagodnego, umiarkowanego i ciężkiego w grupie chorych z antykoagulantem toczniowym (LA) – grupa 1, z przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi (aCl) i/lub przeciwciałami przeciw β2 glikoproteinie I (aβ2GPI) – grupa 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) – grupa 3	62
Tabela 10. Zaburzenie natężonej pojemności życiowej stopnia łagodnego, umiarkowanego i ciężkiego w grupie chorych z antykoagulantem toczniowym (LA) - 1, przeciwciałami przeciwkardiolipinowymi (aCl) i/lub przeciwciałami przeciw β2	

glikoproteinie I (a β 2GPI) - 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych (aPL) - 3 64

Tabela 11. Nadciśnienie płucne w echokardiografii w grupie chorych z obecnością:

antykoagulanta toczniowego (LA) - 1, przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β 2 glikoproteinie I (a β 2GPI) - 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych – 3 65

Tabela 12. Liczba chorych z przewlekłą chorobą nerek (filtracja kłębuszkowa - GFR < 60

ml/min/1,73m² - oceniana wg skróconego wzoru MDRD) w grupie chorych z obecnością: antykoagulanta toczniowego (LA) - 1, przeciwciał przeciwkardiolipinowych (aCl) i/lub przeciwciał przeciw β 2 glikoproteinie I (a β 2GPI) - 2 oraz w grupie chorych bez przeciwciał przeciwfosfolipidowych – 3... 66

11. PIŚMIENNICTWO

¹ Decker JL. American Rheumatism Association nomenclature and classification of arthritis and rheumatism (1983). *Arthritis Rheum.* 1983;26:1029-32.

² Kowal-Bielecka O, Bielecki M. Twardzina układowa. W Puszciewicz M. (red) *Reumatologia, Medical Tribune Polska, Warszawa* 2010; 127.

³ LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15: 202-205.

⁴ Toya SP, Tzelepis GE. The many faces of scleroderma sine scleroderma: a literature review focusing on cardiopulmonary complications . *Rheumatology International* 2009; 29: 861-868.

⁵ Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23:581-590.

⁶ LeRoy EC, Medsger TA., Jr Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001;28:1573–1576.

⁷ Hudson M, Taillefer S, Steele R. et al. Improving the sensitivity of the American College of Rheumatology classification criteria for systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2007; 25: 754-757.

⁸ Coyle W. A Brief History of Scleroderma. *Scleroderma News*, 1988; 8, 2.

⁹ Goetz RH. The pathology of progressive systemic sclerosis (generalized scleroderma): with special reference to changes in the viscera. *Clin Proc* 1945; 4: 337- 392.

¹⁰ Winterbauer RH. Multiple telangiectasia, Raynaud's phenomenon, sclerodactyly, and subcutaneous calcinosis: A syndrome mimicking hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964; 114:361-383.

¹¹ Velayos EE, Masi AT, Stevens MB, et al. The 'CREST' syndrome. Comparison with systemic sclerosis (scleroderma). *Arch Intern Med.* 1979;139:1240-1244.

¹² Gabrieli A, Avvedimento E, Kreig T. Scleroderma. Mechanisms of disease. *N Engl J Med* 2009; 360:1989-2003.

¹³ Chiffлот H, Fautrel B, Sordet C, et al. Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis: A Systematic Literature Review *Semin Arthritis Rheum* 2008; 37:223-235.

¹⁴ Sierakowski S, Sierakowska M. Twardzina układowa. w: Zimmermann-Górska I. (red.) *Reumatologia kliniczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, 608.

¹⁵ Krzyszczak ME, Li Y, Ross SJ, et al. Gender and ethnicity differences in the prevalence of scleroderma-related autoantibodies. *Clin Rheumatol.* 2011; 30:1333-1339.

¹⁶ Klippel JH. *Primer On the Rheumatic Diseases 12ED*, Arthritis Foundation, Atlanta 2001; 353-356.

¹⁷ Gilliland BC. Twardzina układowa i zespoły twardzinopodobne. W: Fauci AS, Langford CA. (red.) *Harrison. Reumatologia*, Czelej ;135-136.

¹⁸ Arnett FC, Howard RF, Tan F. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* 1996;39:1362-70.

¹⁹ Nikpour, M, et al. Epidemiology of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24:857-869.

²⁰ Dieudé P, Boileau C, Allanore Y. Immunogenetics of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2011;10:282-290.

²¹ Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1956-1963.

²² Silman A J. Epidemiology of scleroderma. *Ann Rheum Dis* 1991;50 :846-853.

²³ Yamane K, Miyauchi T, Suzuki N et al. Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1992;19:1566-71.

²⁴ Gu YS, Kong J, Cheema GS et al. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2008;38:132-160.

²⁵ Galluccio F, Matucci-Cerinic M. Two faces of the same coin: Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2011;10:241-243.

²⁶ Houtman PM, Kallenberg CGM, Fidler V, et al. Diagnostic significance of nailfold capillary patterns in patients with Raynaud's phenomenon: an analysis of patterns discriminating patients with and without connective tissue disease. *J Rheumatol* 1986; 13: 556–563.

²⁷ Maricq HR. Widefield capillary microscopy: technique and rating scale for abnormalities seen in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1159–65.

²⁸ Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C. et al. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2000 Jan;27(1):155-60.

²⁹ Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ. et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008 Dec;58(12):3902-12.

-
- ³⁰ Cutolo M, Grassi W, Matucci Cerinic M. Raynaud's phenomenon and the role of capillaroscopy. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3023-3030.
- ³¹ Aslanidis S, Pyrpasopoulou A, Doumas M et al. Association of capillaroscopic microhaemorrhages with clinical and immunological antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29:307-309.
- ³² Amjadi S, Maranian P, Furst D. et al. Course of Modified Rodnan Skin Score in Systemic Sclerosis Clinical Trials: Analysis of 3 Large Multicenter, Randomized Clinical Trials. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 2490–2498.
- ³³ Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, White B, Weiner S, Martin R, Weinstein A, Weisman M, Mayes M, Collier D, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1995;22:1281-1285.
- ³⁴ Nishimagi, Emi; Kawaguchi, et al. Classification of systemic sclerosis in the Japanese population based on rapid progression of skin thickening. *Modern Rheumatology* 2004;14, 3: 216 – 221.
- ³⁵ Clements PJ, Lachenbruch PA, Swee Chen NG, et al. A semiquantitative measure of cutaneous involvement that improves prediction of prognosis in system sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1256–63.
- ³⁶ Peters-Golden M, Wise RA, Chochberg MC, et al. Carbon monoxide diffusing capacity as predictor of outcome in systemic sclerosis. *Am J Med* 1984; 77: 1027-34.
- ³⁷ Chatterjee S. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2011;41:19-37.

³⁸ Chronic kidney disease as a public health problem. Clinical Practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Part 3. *Am. J. Kidney Dis.* 2002; 39:37–46.

³⁹ Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S. et al. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:901-903.

⁴⁰ Medsger TA Jr, Silman AJ, Steen VD, et al. A disease severity scale for systemic sclerosis: development and testing. *J Rheumatol.* 1999;26:2159-2167.

⁴¹ Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002;47:434-444.

⁴² Puszczewicz M. Przeciwciała przeciwjądrowe w twardzinie układowej – charakterystyka antygenowa i znaczenie kliniczne. *Reumatologia* 2006;44,3:169–175.

⁴³ W Earnshaw, B Bordwell, C Marino, et al. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J Clin Invest.* 1986; 77: 426–430.

⁴⁴ Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther.* 2003;5:80-93.

⁴⁵ Higuchi M, Horiuchi T, Ishibashi N et al. Anticentromere antibody as a risk factor for cancer in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2000;19:123-127.

⁴⁶ Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL et al. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum* 1988;31:378-385.

-
- ⁴⁷ Akimoto S, Ishikawa O, Takagi H, et al. Immunological features of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) overlapping systemic sclerosis: a comparison with patients with PBC alone. *J. Gastroenterol Hepatol.* 1998;13:897-901.
- ⁴⁸ Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr. Clinical correlation and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:196-203.
- ⁴⁹ Murata I, Takenaka K, Shinohara S, et al. Diversity of myocardial involvement in systemic sclerosis: an 8-year study of 95 Japanese patients. *Am Hart J.* 1998;135:960-969.
- ⁵⁰ Nishijima C, Sato S, Hasegawa M, et al. Renal vascular damage in Japanese patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40:406-409.
- ⁵¹ Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med.* 1997;103:242-248.
- ⁵² Bernstein RM, Steigerwald JC, Tan EM. Association of antinuclear and antinucleolar antibodies in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1982;48:43-51.
- ⁵³ Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, et al. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993, 91,1399-1403.
- ⁵⁴ Phan TG, Cass A, Gillin A, et al. Anti-RNA polymerase III antibodies in the diagnosis of scleroderma renal crisis sine scleroderma. *J.Rheum* 1999,26,2489-2492.
- ⁵⁵ Dragon F, Gallagher JE, Compagnone-Post PA, et al. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 2002;417:967-970.
- ⁵⁶ Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, et al. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2001; 40:1157-1162.
- ⁵⁷ Yimane K, Ihn H, Kubo M, et al. Anti-U3 snRNP antibodies in localised scleroderma. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:1157-1158.

-
- ⁵⁸ Lee B, Craft JE. Molecular structure and function of autoantigens in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol.* 1995;12:129-144.
- ⁵⁹ Yamane K, Ihn H, Kubo M. et al. Antibodies to Th/To ribonucleoproteine in patients with localized scleroderma. *Rheumatology* 2001;40:683-686.
- ⁶⁰ Reimer G, Steen VD, Penning CA, et al. Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1988;31:525-528.
- ⁶¹ Graves M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lancet*1999;353:1348–1353.
- ⁶² Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4:295-306.
- ⁶³ Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1019-1027.
- ⁶⁴ Zawilska K. Przeciwciała antyfosfolipidowe – czynnik zagrożenia żylną chorobą zakrzepowo-zatorową i zakrzepicą tętniczą. *Pol Arch Med Wewn.* 2007;117:41-45.
- ⁶⁵ Parodi A, Drosera M, Barbieri L, et al. Antiphospholipid antibody system in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40:111-112.
- ⁶⁶ Sulik A, Kowal-Bielecka O, Domyslawska I, et al. The prevalence and clinical significance of antiphospholipid antibodies in the patients with systemic sclerosis--preliminary report. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2005;50, Suppl 1:228-231.
- ⁶⁷ Sanna G, Bertolaccini ML, Mameli A, et al. Antiphospholipid antibodies in patients with scleroderma: prevalence and clinical significance. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1795-1796.

-
- ⁶⁸ Schoenroth L, Fritzler M, Lonzeiti L, et al. Antibodies to beta2 glycoprotein I and cardiolipin in SSc. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:183-184.
- ⁶⁹ Hasegawa M, Satol S, Yanabal K. Autoantibodies against phosphatidyloserine-prothrombin complex in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63:1514-1517.
- ⁷⁰ Malia RG, Greaves M, Rowlands LM, et al. Anticardiolipin antibodies in systemic sclerosis: immunological and clinical associations. *Clin Exp Immunol.* 1988;73:456-460.
- ⁷¹ Katayama I, Otoyama K, Kondo S, et al. Clinical manifestations in anticardiolipin antibody-positive patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23:198-201.
- ⁷² Tazawa R, Saijo Y, Abe T, et al. Pulmonary thromboembolism associated with antiphospholipid syndrome in scleroderma. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1997;35:1413-1417.
- ⁷³ Chun WH, Bang D, Lee SK, et al. Antiphospholipid syndrome associated with progressive systemic sclerosis. *J Dermatol.* 1996;23:347-351.
- ⁷⁴ Kane D, McSweeney F, Swan N, et al. Catastrophic antiphospholipid antibody syndrome in primary systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1998;25:810-812.
- ⁷⁵ Sigiura K., Muro Y. Anti-annexin V antibodies and digital ischemia in patients with scleroderma. *J.Rheum* 1999;26: 2168-2172.
- ⁷⁶ Triplett, Douglas A. Use of the Dilute Russell Viper Venom Time (dRVVT): Its Importance and Pitfalls. *Journal of Autoimmunity* Volume 2000;15:173-178.
- ⁷⁷ Brandt JT, Triplett DA, Alving B, et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid

Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995;74:1185-1190.

⁷⁸ Lewandowski K, Turowiecka Z, Puszczewicz J, et al. Antiphospholipid antibodies and disturbances of phospholipid dependent coagulation tests in patients with systemic sclerosis and severe peripheral ischaemia. *Thromb Res.* 1996;81:693-695.

⁷⁹ Lopez LR, Simpson DF, Hurley BL, et al. OxLDL/ β 2GPI Complexes and Autoantibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, Systemic Sclerosis, and Antiphospholipid Syndrome: Pathogenic Implications for Vascular Involvement. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:313-322.

⁸⁰ The University of Michigan Health System web site:
med.umich.edu/scleroderma/patients/classification.htm

⁸¹ Michalska-Jakubus M, Chodorowska M, Krasowska D. Kapilaroskopia wału paznokciowego. Mikroskopowa ocena zmian morfologicznych mikrokrążenia w twardzinie układowej. *Post Dermatol Alergol* 2010; 27:106–118.

⁸² www.eustar.org/modules.php

⁸³ American Thoracic Society/European Respiratory Society Standardization of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 6:720–735.

⁸⁴ Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. ATS/ERS Task Force: standardisation of lung function testing; standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26:319–338.

⁸⁵ Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.* 1999; 130:461–470.

⁸⁶ Chronic kidney disease as a public health problem. Clinical Practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Part 3. *Am. J. Kidney Dis.* 2002; 39:37–46.

⁸⁷ Picillo U, Migliaresi S, Marcialis MR, et al. Clinical significance of anticardiolipin antibodies in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity.* 1995;20:1-7.

⁸⁸ Passaleva A, Massai G, Matucci-Cerinic M, et al. Immunological abnormalities in a group of patients with limited cutaneous systemic sclerosis and prominent vascular disease. *Autoimmunity.* 1990;6:283-291.

⁸⁹ Pope JE, Thompson A. The frequency and significance of anticardiolipin antibodies in scleroderma. *J Rheumatol.* 2000 Jun;27:1450-1452.

⁹⁰ Merkel PA, Chang Y, Pierangeli SS, et al. The prevalence and clinical associations of anticardiolipin antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue diseases. *Am J Med.* 1996;101:576-583.

⁹¹ Herrick AL, Oogarah PK, Freemont AJ, et al. Vasculitis in patients with systemic sclerosis and severe digital ischaemia requiring amputation. *Ann Rheum Dis.* 1994;53:323-326.

⁹² Ihn H, Sato S, Fujimoto M, et al. Measurement of anticardiolipin antibodies by ELISA using beta 2-glycoprotein I (beta 2-GPI) in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1996;105:475-479.

⁹³ Marai I, Gilburd B, Blank M, et al. Anti-cardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I (beta2GP-I) antibody assays as screening for anti-phospholipid syndrome. *Hum Antibodies.* 2003;12:57-62.

⁹⁴ Gupta R, Thabab MM, Gupta S, et al. Clinical significance of antiphospholipid antibodies in Indian scleroderma patients. *Rheumatol Int.* 2009;30:277-279.

⁹⁵ Marie I, Jouen F, Hellot MF, et al. Anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibodies and lupus-like anticoagulant: prevalence and significance in systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 2008;158:141-144.

⁹⁶ Assous N, Allanore Y, Batteux F, et al. Prevalence of antiphospholipid antibodies in systemic sclerosis and association with primitive pulmonary arterial hypertension and endothelial injury. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:199-204.

⁹⁷ Herrera-Esparza R, Aguilar JL, Saucedo A, et al. Scleroderma with type III glomerulonephritis and MPO-ANCA antibodies in the serum. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19:617-620.

⁹⁸ Akimoto S, Ishikawa O, Tamura T, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 1996;134:407-410.

⁹⁹ Locke IC, Worrall JG, Leaker B, et al. Autoantibodies to myeloperoxidase in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997;24:86-89.

¹⁰⁰ Herrick A, Oogarah P, Freemont A, et al. Vasculitis in patients with systemic sclerosis and severe digital ischaemia requiring amputation. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:323-326.

¹⁰¹ Yamada T, Nakajima H, Tanaka E, et al. Case of systemic sclerosis presenting with alveolar hemorrhage and positive anti-neutrophil cytoplasmic myeloperoxidase antibody(MPO-ANCA) without pathological renal involvement. *Ryumachi*. 2003;43:690-695.

¹⁰² Omote A, Muramatsu M, Sugimoto Y, et al. Myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies - related scleroderma renal crisis treated with double-filtration plasmapheresis. *Intern Med* 1997;36:508-513.

¹⁰³ Casari S, Haeney M, Farrand S, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies a "Red Flag" in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2002;29:2666-2667.

¹⁰⁴ Endo H, Hosono T, Kondo H. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in 6 patients with renal failure and systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 1994;21:864-870.

¹⁰⁵ Ames PR. Antiphospholipid antibodies in systemic sclerosis: a double oxidative hit? *Clin Rheumatol.* 2009;28:881-882.

¹⁰⁶ Vayssairat M, Abuaf N, Deschamps A et al. Nailfold capillary microscopy in patients with anticardiolipin antibodies: a case-control study. *Dermatology.* 1997;194:36-40.

¹⁰⁷ Leite PD, de Carvalho JF. Systemic sclerosis sine scleroderma associated with antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int. Online first* 2010; DOI 10.1007/s00296-010-1482-6.

¹⁰⁸ Steen VD, Medsger TA Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2437-2444.

¹⁰⁹ Dropinski J, Szczeklik W, Rubis P. Cardiac involvement in systemic autoimmune disease. *Pol Arch Med Wewn.* 2003;109:375-381.

¹¹⁰ Gabrielli F, Alcini E, Prima MA, et al. Cardiac involvement in connective tissue diseases and primary antiphospholipid syndrome: echocardiographic assessment and correlation with antiphospholipid antibodies. *Acta Cardiol.* 1996;51:425-439.

¹¹¹ Boin F, Franchini S, Colantuoni E, et al. Independent association of anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies with macrovascular disease and mortality in scleroderma patients. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2480-2489.

¹¹² Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European Multicenter Study of 114 patients. *Am J Med.* 1994;96:3-9.

¹¹³ Karmochkine M, Cacoub P, Dorent R, et al. High prevalence of antiphospholipid antibodies in precapillary pulmonary hypertension. *J Rheumatol.* 1996;23:286-290.

¹¹⁴ Launay D, Hachulla E, Hatron PY, et al. Pulmonary hypertension screening in systemic scleroderma: a cohort study of 67 patients. *Rev Med Interne*. 2001;22:819-829.

¹¹⁵ Fakhouri F, Noël LH, Zuber J. et al. The expanding spectrum of renal diseases associated with antiphospholipid syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2003;41:1205-1211.

¹¹⁶ Wielosz E, Dryglewska M, Majdan M. Antiphospholipid antibodies and kidney involvement in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 955-959.

¹¹⁷ Ichikawa H, Amano T, Fukuda S, et al. A case of scleroderma renal crisis with massive pericardial effusion and positivity on antiphospholipid antibody test. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1998;40:295-300.