

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Katedra i Klinika Dermatologii

Aleksandra Szewczyk

Rola wybranych cytokin pro i antyangiogennych  
oraz białek o aktywności naczyniowej  
w patogenezie twardziny ograniczonej (*morphea*)

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: dr hab. n. med. Aleksandra Dańczak-Pazdrowska

Poznań 2016



*Składam serdeczne podziękowania  
Pani Docent Aleksandrze Dańczak-Pazdrowskiej  
za poświęcony czas, wartościowe uwagi  
oraz wszechstronną pomoc podczas realizacji niniejszej pracy*



# SPIS TREŚCI

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW .....	7
1. WPROWADZENIE .....	9
1.1. Epidemiologia .....	9
1.2. Etiologia .....	10
1.3. Podział .....	11
1.4. Obraz kliniczny .....	12
1.5. Rozpoznanie .....	15
1.6. Rokowanie i przebieg .....	17
1.7. Patogeneza .....	18
1.7.1. Uszkodzenie komórek śródbłonka .....	19
1.7.2. Zaburzenia immunologiczne .....	20
1.7.3. Zaburzenia metabolizmu macierzy pozakomórkowej .....	23
1.8. Autoprzeciwciała a <i>morphea</i> .....	23
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....	25
3. MATERIAŁ I METODY .....	27
3.1. Grupy badane i kontrolne .....	27
3.1.1. Charakterystyka grupy badanej .....	27
3.1.2. Charakterystyka grup kontrolnych .....	28
3.2. Materiał .....	29
3.2.1. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej .....	29
3.2.2. Osocze .....	29
3.3. Metody .....	30
3.3.1. Ocena rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w <i>morphea</i> .....	30
3.3.2. Ocena aktywności choroby .....	31
3.3.3. Badanie względnego poziomu transkryptów genów (ekspresji genów) CNP, VEGF-A, IP-10 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym .....	32
3.3.3.1. Izolacja RNA .....	32
3.3.3.2. Odwrotna transkrypcja .....	32
3.3.3.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym .....	33
3.3.4. Badanie osoczowego stężenia NT-proCNP, VEGF-A, IP-10 metodą immunoenzymatyczną ELISA .....	37
3.4. Analiza statystyczna .....	37
4. WYNIKI .....	38
4.1. Wyniki oceny stanu klinicznego chorych na <i>morphea</i> .....	38
4.2. Względny poziom transkryptów genu CNP w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i osoczowe stężenie NT-proCNP u chorych na <i>morphea</i> .....	38

4.3. Względny poziom transkryptów genu VEGF-A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i osoczowe stężenie VEGF-A u chorych na <i>morphea</i> .....	41
4.4. Względny poziom transkryptów genu IP-10 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i osoczowe stężenie IP-10 u chorych na <i>morphea</i> .....	43
4.5. Ocena osoczowego stężenia NT-proCNP, VEGF-A oraz IP-10 u chorych na postać ograniczoną twardziny układowej w porównaniu z grupą chorych na <i>morphea</i> oraz grupą zdrowych ochotników .....	45
4.6. Ocena zależności pomiędzy badanymi genami oraz osoczowym stężeniem ich produktów białkowych u chorych na <i>morphea</i> .....	49
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA .....	50
5.1. Znaczenie CNP w <i>morphea</i> .....	52
5.2. Znaczenie VEGF-A w <i>morphea</i> .....	54
5.3. Znaczenie IP-10 w <i>morphea</i> .....	58
6. WNIOSKI .....	63
7. STRESZCZENIE .....	64
8. ABSTRACT .....	68
9. PIŚMIENNICTWO .....	72

## WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

ANA	– przeciwciała przeciwjądrowe ( <i>antinuclear antibodies</i> )
APP	– pierwotnie zanikowa odmiana <i>morphea</i> ( <i>atrophoderma Pasini-Pierini</i> )
CNP	– peptyd natriuretyczny typu C ( <i>C-type natriuretic peptide</i> )
CTGF	– czynnik wzrostu tkanki łącznej ( <i>connective tissue growth factor</i> )
DAF	– czynnik przyspieszający rozkład ( <i>decay accelerating factor</i> )
DM	– odmiana głęboka <i>morphea</i> ( <i>deep morphea</i> )
EC	– komórki śródbłonna ( <i>endothelial cells</i> )
ECM	– macierz pozakomórkowa ( <i>extracellular matrix</i> )
FE	– eozynofilowe zapalenie powięzi ( <i>fasciitis eosinophilica</i> )
FGF	– czynnik wzrostu fibroblastów ( <i>fibroblast growth factor</i> )
GAPDH	– dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa ( <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
GM	– postać uogólniona <i>morphea</i> ( <i>generalised morphea</i> )
GVHD	– choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi ( <i>graft versus host disease</i> )
HGF	– czynnik wzrostu hepatocytów ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
HIF	– czynnik indukowany hipoksją ( <i>hypoxia inducible factor</i> )
ICAM	– cząsteczka adhezji międzykomórkowej ( <i>intracellular adhesion molecule</i> )
IFN	– interferon ( <i>interferon</i> )
IGF	– insulinopodobny czynnik wzrostu ( <i>insulin-like growth factor</i> )
IL	– interleukina ( <i>interleukin</i> )
IP-10	– białko indukowane przez interferon gamma ( <i>interferon-gamma-inducible protein</i> )
LM	– postać linijna <i>morphea</i> ( <i>linear morphea</i> )
LoSSI	– wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w <i>morphea</i> ( <i>localized scleroderma skin severity index</i> )
ISSc	– postać ograniczona twardziny układowej ( <i>limited systemic sclerosis</i> )
MCP	– błonowy kofaktor białkowy ( <i>membrane cofactor protein</i> )
MCDS	– <i>morphea</i> typu cięcia szabłą ( <i>morphea en coup de sabre</i> )
MEP	– odmiana plackowata <i>morphea</i> ( <i>morphea en plaques</i> )
MMP	– metaloproteinazy macierzy ( <i>matrix metalloproteinases</i> )
n	– liczebność grupy
NP	– peptydy natriuretyczne ( <i>natriuretic peptides</i> )
NT-proCNP	– aminoterminalny odcinek CNP ( <i>amino-terminal fragment of pro-C-type natriuretic peptide</i> )
PBMC	– komórki jednojądrzaste krwi obwodowej ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PDGF	– płytkopochodny czynnik wzrostu ( <i>platelet-derived growth factor</i> )

- PIGF – łożyskowy czynnik wzrostu (*placental growth factor*)
- RF – czynnik reumatoidalny (*rheumatoid factor*)
- real-time* PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (*real time polymerase chain reaction*)
- TGF – transformujący czynnik wzrostu (*transforming growth factor*)
- Th – limfocyty T pomocnicze (*T helper*)
- TNF – czynnik martwicy guza (*tumor necrosis factor*)
- SD – odchylenie standardowe (*standard deviation*)
- sIL-R – rozpuszczalna forma receptora dla interleukiny (*soluble interleukin receptor*)
- SLE – toczeń rumieniowaty układowy (*systemic lupus erythematosus*)
- SSc – twardzina układowa (*systemic sclerosis*)
- VCAM – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (*vascular cell adhesion molecule*)
- VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (*vascular endothelial growth factor*)
- VEGFR – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (*vascular endothelial growth factor receptor*)
- VSCM – komórki mięśni gładkich naczyń (*vascular smooth cell muscle*)



# 1. WPROWADZENIE

Twardzina ograniczona (*localized scleroderma, morphea*) znana również jako *morphea* jest przewlekłą, autoimmunizacyjną jednostką chorobową o niewyjaśnionej dotychczas etiologii, charakteryzującą się zwłóknieniem skóry i tkanki podskórnej (Marzano AV 2003). W przeciwieństwie do twardziny układowej [*systemic sclerosis (SSc)*] w przebiegu *morphea* rzadko dochodzi do zajęcia narządów wewnętrznych, nie występuje objaw Raynauda, a przebieg choroby i rokowanie są zazwyczaj dobre. Nie rozstrzygnięto dotychczas kwestii, czy *morphea* i SSc to całkowicie odrębne jednostki chorobowe, czy stanowią jedynie dwie odmiany tej samej choroby (Toledano C 2009). Jednak z uwagi na odmienny obraz kliniczny i przebieg choroby coraz szersze grono ekspertów z dziedziny dermatologii sugeruje, aby używać terminu *morphea*, a nie twardzina ograniczona (Christen-Zaech S 2008, Nouri S 2013).

## 1.1. Epidemiologia

*Morphea* jest rzadką jednostką chorobową. Na podstawie badania populacyjnego przeprowadzonego przez Peterson i wsp. w Olmsted County (Minnesota, USA) w latach 1960-1993 określono częstość występowania choroby na 2,7 na 100 000 osób na rok. Ponadto zaobserwowano średni wzrost zachorowalności o 3,6% rocznie (Peterson LS 1997). Choroba może rozpoczynać się w każdym wieku, jednak zdecydowanie najczęściej diagnozowana jest pomiędzy 20., a 40. rokiem życia (Peterson LS 1997, Toledano C 2009). Wyjątkiem jest odmiana linijna *morphea* (LM – *linear morphea*), której początek przypada poniżej 18. roku życia oraz odmiana głęboka (DM – *deep morphea*) rozpoznawana najczęściej powyżej 46. roku życia (Peterson LS 1997, Beltramelli M 2010, Fett N 2011). Stosunek kobiet do mężczyzn określono na 2,6:1, za wyjątkiem LM, w której zachorowania stwierdza się równie często u obu płci (Peterson LS 1997). Częstość występowania choroby w populacji dziecięcej nie jest dokładnie oszacowana. Najczęściej podaje się, że średni wiek zachorowania przypada na 8. rok życia (Uziel Y 1994, Tollefson MM 2007, Zulian F 2006, Christen-Zaech S 2008, Leitenberger JJ 2009, Toledano C 2009).

Za najczęstszą postać *morphea* uznaje się odmianę plackowatą (MEP – *morphea en plaques*), która występuje u 56% pacjentów, LM stanowi 20%, odmiana uogólniona (GM – *generalised morphea*) 13%, a DM 11% (Peterson LS 1997). W przeciwieństwie do populacji osób dorosłych, w przypadku populacji dziecięcej najczęstszą podjednostką jest LM (65% do 87%), znacznie rzadziej występuje MEP (10% do 26%) i GM (3% do 7%) (Uziel Y 1994, Marzano AV 2003, Zulian F 2006, Christen-Zaech S 2008).

## 1.2. Etiologia

Etiologia choroby pozostaje nieznana. Zwraca się uwagę na podłoże genetyczne, autoimmunizacyjne oraz wpływ różnych czynników zewnętrznych takich jak: infekcje, leki, urazy, promieniowanie rentgenowskie (Fett N 2011). Opisywano przypadki rodzinnego występowania choroby oraz postaci wrodzone (Patrizi A 2000, Iranzo P 2001, Leitenberger JJ 2009). Zwrócono uwagę na związek *morphea* z antygenami zgodności tkankowej: HLA-A3, B7, DR2 (Kühnl P 1989). W literaturze można odnaleźć doniesienia na temat współwystępowania *morphea* z innymi chorobami autoimmunizacyjnymi, takimi jak: toczeń rumieniowaty układowy [*systemic lupus erythematosus* (SLE)], bielactwo, zapalenie tarczycy typu Hashimoto, pierwotna marskość żółciowa, nużliwość mięśni (Wong SS 1992, Majeed M 2000, Parra V 2003, Dervis E 2004, Gonzalez-Lopez MA 2006, Bonifati C 2006). Udowodniono zwiększoną częstość ich współwystępowania szczególnie u pacjentów z GM (Leitenberger JJ 2009), co nasuwa wniosek, że ta grupa pacjentów powinna być uważniej monitorowana w zakresie współistnienia innych chorób autoimmunizacyjnych. Na podstawie badań populacyjnych określono, iż częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych w rodzinach pacjentów z *morphea* jest większa niż w populacji ogólnej (Harrington CI 1989, Zulian F 2006, Leitenberger JJ 2009). Co ciekawe, obciążony wywiad rodzinny w kierunku chorób autoimmunizacyjnych występuje częściej u pacjentów z GM (Zulian F 2006, Leitenberger JJ 2009). U chorych na *morphea* opisywano incydentalnie epizody przejścia choroby w SSc (Birdi N 1993, Mayorquin FJ 1994). Niektórzy badacze sugerują jednak, że są to przypadki współwystępowania 2 chorób autoimmunizacyjnych (Soma Y 1993). Ponadto za potencjalnym tłem autoimmunizacyjnym choroby przemawia obecność przeciwciał przeciwjądrowych [*anti-nuclear antibodies* (ANA)] (podrozdział 1.8), jakkolwiek ich znaczenie kliniczne pozostaje niejasne. W kontekście czynników infekcyjnych zwrócono uwagę na wirus Epsteina-Barra, ospy wietrznej, zapalenia wątroby typu B i C (Spirer Z 1979, Longo F 1993, Mihos AA 2003, Soyulu S 2009). Najszerzej udokumentowano rolę infekcji *Borrelia burgdorferi*. Po raz pierwszy ten potencjalny związek opisał Aberer i wsp. (Aberer E 1985, Aberer E 1987, Aberer E 1991). Od tego czasu przedstawiono wiele sprzecznych doniesień naukowych. Pomimo, że wśród pacjentów europejskich stwierdzono zwiększony odsetek infekcji *Borrelia burgdorferi*, badania przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych nie potwierdziły tego związku (Buechner SA 1993, Dillon WI 1995, Wienecke R 1995, Eisendle K 2007). Na udział *Borrelia burgdorferi* w etiologii *morphea* wskazywać mogą specyficzne zdolności tej bakterii do bezpośredniego wiązania się z kolagenem typu I, co następnie umożliwia wzrost i formowanie mikrokoloni (Zambrano MC 2004). W związku z tym, obecnie w grupie pacjentów zamieszkujących tereny endemiczne boreliozy, jak i u tych, którzy podają w wywiadzie ukąszenie przez kleszcza, rekomenduje się oznaczanie przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi*. Wśród czynników ryzyka twardziny/chorób twardzinopodobnych wymieniono szereg leków, w tym: D-penicylaminę, witaminę K, tryptofan, bleomycynę, pentazocynę, meperydynę, balicatib (Morell A 1995, Pe-

terson LS 1995, Peroni A 2008). *Morphea* może też powstać w następstwie radioterapii raka sutka u kobiet. Częstość występowania takich zmian została oszacowana na 1 na 500 pacjentek (Davis DA 1996, Bleasel NR 1999). U większości z nich ogniska *morphea* pojawiają się w ciągu roku od zakończenia radioterapii (Bleasel NR 1999, Akay BN 2010). Zwrócono również uwagę na znaczenie urazu, co ciekawe najczęściej u dzieci, szczególnie w odmianie LM obejmującej twarz (Zulian F 2006, Sommer A 2006, Christen-Zaech S 2008). Ponadto, wystąpienie objawów eozynofilowego zapalenia powięzi [*fasciitis eosinopholica* (FE), zespół Shulmana] często poprzedzone jest intensywnym wysiłkiem fizycznym (Shulman LE 1974, Jabłońska S 1975). Opisano wystąpienie ognisk twardzinopodobnych w następstwie szczepień przeciwko gruźlicy, tężcowi–błonicy–krztuścowi, śwince–odrze–rózyczce, wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (Torrelo A 2006, Kreuter A 2009). Również w tych przypadkach zwraca się raczej uwagę na znaczenie urazu wywołanego szczepieniem, niż samych szczepionek (Fett N 2011).

### 1.3. Podział

Obecnie jednym z najczęściej stosowanych schematów klasyfikacji choroby jest podział zaproponowany przez Peterson i wsp. w 1995 roku (Peterson LS 1995), który w 2009 roku został nieco zmodyfikowany przez Kreutera i wsp. (Kreuter A 2009).

Klasyfikacja zaproponowana przez Kreutera i wsp. obejmuje następujące odmiany:

- postać ograniczona
  - odmiana plackowata – MEP (*morphea en plaques*)
  - odmiana grudkowa
  - odmiana pierwotnie zanikowa – APP (określana również jako *atrophyderma of Pasisini and Pierini*)
- postać uogólniona
  - odmiana rozsiana lub uogólniona – GM (*generalised morphea*) (zajęcie co najmniej 3 anatomicznych okolic ciała)
  - eozynofilowe zapalenie powięzi – FE (*fasciitis eosinopholica*, zespół Shulmana)
  - *disabling pansclerotic morphea*
- postać linijna – LM (*linear morphea*)
  - odmiana linijna kończyn (akralna)
  - postępujący połowiczny zanik twarzy (*progressive hemifacial atrophy*, zespół Parry-Romberga)
  - odmiana typu cięcia szabli (*morphea en coup de sabre*)
- postać głęboka – DM (*deep morphea*)

Peterson i wsp. wyodrębnili dodatkowo (Peterson LS 1995) podjednostkę pęcherzową choroby, a do postaci ograniczonej zaliczyli odmianę guzkową (bliznowcową) oraz liszaj twardzinowy – LS (*lichen sclerosus*). Ponadto wielu autorów zwraca uwagę na występowanie postaci mieszanych twardziny, czyli współwystępowania MEP z LM, MEP z DM oraz GM z LM (Peterson LS 1997, Marzano AV 2003, Zulian F 2006).

## 1.4. Obraz kliniczny

Najczęstszą postacią kliniczną choroby jest MEP. Wg Peterson i wsp. rozpoznaje się ją u 56% badanych pacjentów. Najczęstszą lokalizacją anatomiczną MEP jest tułów. Początkowo stwierdza się jedną lub więcej plam rumieniowych lub rumieniowo-obrzękowych o średnicy powyżej 1 cm. Z czasem w miejscu ustępującego rumienia pojawia się porcelanowobiała, woskowożółta blaszka, w początkowej fazie choroby otoczona sinofiołkową obwódka zapalną (ang. *lilac ring*). Blaszkki nie mają tendencji do ustępowania, przeciętnie utrzymują się 2,5-5 lat, po czym ulegają atrofii, hiperpigmentacji i/lub hipopigmentacji, a ponadto dochodzi do zaniku przydatków skóry (Jabłońska S 1975, Peterson LS 1995, Peterson LS 1997, Tuffanelli D 1998, Chung L 2006).

Odmiana grudkowa charakteryzuje się obecnością licznych, drobnych (o średnicy poniżej 1 cm) grudek zlokalizowanych głównie na tułowiu. Odmiana ta przypomina, jak również często współwystępuje z liszajem twardzinowym. W niektórych przypadkach dopiero wynik badania histopatologicznego, w którym nie stwierdza się typowych dla liszaja twardzinowego objawów takich jak: zanik naskórka czy rogowacenie mieszkowe, pozwala na rozróżnienie tych dwóch jednostek chorobowych (Jabłońska S 1975, Tuffanelli D 1998, Vierra E 1999, Toledano C 2008, Kim DH 2009).

APP została opisana jako odrębna jednostka chorobowa przez Pasiniego w 1923 roku, natomiast opis choroby został uzupełniony przez Pieriniego i Vivioli w 1936 roku. Jednakże pierwsze doniesienia pochodzą od Jeanselme i wsp. z 1903 roku i Brocqa i Ferneta z 1909 roku. Obecnie odmiana ta jest powszechnie znana jako *atrophoderma* Pasini-Pierini. Wśród wielu autorów określana jest jako poronna odmiana *morphea*. Ogniska zlokalizowane są głównie symetrycznie na tułowiu i proksymalnych odcinkach kończyn, aczkolwiek mogą również występować jednostronnie lub lokalizować się wzdłuż przebiegu nerwu. Przybierają postać owalnych lub okrągłych blaszek o sinofiołkowym lub brunatnym zabarwieniu, są zagłębione, ostro odgraniczone od otoczenia, nie ulegają stwardnieniu. Dla podkreślenia wyraźnego odgraniczenia ognisk wprowadzono określenie „objawu urwiska” (ang. *cliffdrop*). W ponad 20% przypadków stwierdza się współwystępowanie typowych ognisk *morphea* w innych częściach ciała. Niektórzy autorzy wyróżniają ponadto postać powierzchowną *morphea*, która klinicznie charakteryzuje się obecnością przebarwionych ognisk, bez stwardnienia, bądź zaniku, zlokalizowanych przede wszystkim w okolicach wyprzeniowych, takich jak pachy czy pachwiny. W odróżnieniu od APP, w obrazie histopatologicznym cechy zwłóknienia są ograniczone do

górnym warstw skóry właściwej (opis histopatologiczny przedstawiono w podrozdziale 1.5). Natomiast według innych autorów postać powierzchowna *morphea* jest synonimem APP (Jabłońska S 1962, Peterson LS 1995, Kencka D 1995, Tuffanelli D 1998, McNiff JM 1999, Jacobson L 2003, Jabłońska S 2004, Chung L 2006, Kreuter A 2012).

Odmiana GM występuje u ok. 13% pacjentów z *morphea*. Wg Laxera i Zuliana dla postawienia diagnozy GM niezbędna jest obecność czterech lub więcej stwardniałych ognisk o średnicy powyżej 3 cm, obejmujących dwie lub więcej z siedmiu okolic anatomicznych takich jak: głowa/szyja, prawa kończyna górna, lewa kończyna górna, przednia część tułowia, tylna część tułowia, prawa kończyna dolna, lewa kończyna dolna. Natomiast według Kreutera i wsp. musi dojść do zajęcia co najmniej 3 okolic anatomicznych. Wykwity najczęściej lokalizują się w obrębie tułowia i ud. Błazki mają tendencję do zlewania się ze sobą, obejmując rozległe obszary ciała. Pomimo rozległego zajęcia skóry rzadko dochodzi do zajęcia narządów wewnętrznych, ale u chorych z odmianą GM częściej występują bóle stawowe i mięśniowe oraz osłabienie. Brak objawu Raynauda, stwardnienia palców rąk oraz zajęcia narządów wewnętrznych pozwala na różnicowanie GM z SSc (Marzano AV 2003, Laxer RM 2006, Christen-Zaech S 2008, Kreuter A 2009, Fett N 2011).

FE zostało po raz pierwszy opisane przez Shulmana w 1974 roku. Choroba dotyczy przede wszystkim starszych osób płci żeńskiej i młodych osób dorosłych, a w połowie przypadków jej wystąpienie poprzedzone jest intensywnym wysiłkiem fizycznym. Proces włóknienia pierwotnie dotyczy powięzi. Symetryczne, bolesne obrzęki lokalizują się najczęściej na kończynach, oszczędzając ręce i stopy. Początkowo skóra objęta procesem chorobowym staje się ciastowata, ale szybko twardnieje i staje się ściśle związana z leżącymi poniżej tkankami, co przypomina obraz „skórki pomarańczy”. Jednym z charakterystycznych objawów spotykanych w tej odmianie *morphea* jest tzw. „objaw bruzdy” (ang. *groove sign*), który oznacza linijne zagłębienie wzdłuż przebiegu powierzchownych naczyń żylnych, wynikające ze względnego ominięcia przez proces włóknienia obszarów okołonaczyniowych. Nie stwierdza się objawu Raynauda. Zmianom skórnym towarzyszy eozynofilia obwodowa i tkankowa, hipergammaglobulinemia oraz przyspieszony odczyn opadania krwinek czerwonych. Odmiana ta może być związana ze schorzeniami hematologicznymi (Shulman LE 1975, Varga J 1997, Chung L 2006).

Unikalną i bardzo rzadką odmianą postaci uogólnionej jest *disabling pansclerotic morphea*. Ta potencjalnie okaleczająca choroba typowo rozpoczyna się u dzieci poniżej 14 roku życia. Początek choroby jest gwałtowny. Stwardnienia początkowo obejmują wyprostne powierzchnie kończyn, ale w późniejszym okresie może dojść do zajęcia rozległych części ciała, z ominięciem palców rąk i stóp. Procesem stwardnienia objęte są: skóra, tkanka podskórna, powięź, mięśnie i kości. Odmianę tę charakteryzuje brak tendencji do regresji zwłóknień, co prowadzi do powikłań w postaci: przykurczów w stawach, dolegliwości bólowych stawów, osteoporozy, ograniczenia ruchomości klatki piersiowej, niegojących się owrzodzeń skóry. Osoby dotknięte tą odmianą choroby znajdują się w grupie ryzyka zwiększonej zachorowalności na raka kolczystokomórkowego skóry. Ponadto odmianie tej towarzyszą silne dolegliwości bólowe, co można

wiązać z zajęciem przez proces chorobowy zakończeń nerwowych zlokalizowanych w skórze (Diaz-Perez JL 1980, Vierra E 1999, Maragh SH 2005, Wollina U 2007, Fett N 2011, Kreuter A 2012).

LM jest najczęstszą odmianą *morphea* u dzieci. Może obejmować kończyny, twarz, głowę owłosioną. Często współwystępuje z odmianą grudkową i MEP. LM kończyn charakteryzuje się obecnością liniowego stwardnienia, zazwyczaj z towarzyszącą hiperpigmentacją, które może obejmować skórę, tkankę podskórną, powięź, mięśnie, a nawet kości. Ogniska są najczęściej pojedyncze i jednostronne, mogą być zlokalizowane wzdłuż linii Blaschko. Powikłaniem tej odmiany *morphea* może być ograniczenie ruchomości w stawach, związane z przykurczami dermatogennymi, szczególnie gdy ognisko stwardnienia przekracza granicę stawu. Gdy choroba pojawia się w wieku dziecięcym istnieje ryzyko ograniczenia wzrostu oraz skrócenia długości kończyny. Około 13% pacjentów zgłasza dolegliwości bólowe stawów, które mogą dotyczyć stawów zlokalizowanych na obszarach nieobjętych procesem zwłóknienia (Tuffanelli D 1998, Vierra E 1999, Zulian F 2005, Chung L 2006, Christen-Zaech S 2008, Weibel L 2008, Fett N 2011, Kreuter A 2012).

Szczególną odmianą LM jest MCDS. Ta nieco historyczna nazwa wiąże się z tym, iż obraz kliniczny przypomina bliznę powstałą po uderzeniu szabłą. Ma postać liniowego stwardnienia zlokalizowanego w okolicy czołowo-ciemieniowej głowy, typowo przebiegającego jednostronnie, pionowo od poziomu brwi do owłosionej skóry głowy. Zajęcie skóry głowy owłosionej objawia się łysieniem bliznowaciejącym. Ognisko stwardnienia może rozszerzyć się obejmując: nos, policzki i górną wargę. Odmiana ta wiąże się z licznymi powikłaniami neurologicznymi, takimi jak: napady padaczkowe, bóle głowy, neuropatie obwodowe, zapalenie mózgu, malformacje naczyniowe, udary, nieprawidłowości w obrazie rezonansu magnetycznego oraz w obrazie elektroencefalograficznym. Powikłania okulistyczne obejmują: zapalenie spojówek, zapalenie nadtwardówki, suchość oczu, wytrzeszcz, porażenie mięśni ocznych. Ponadto może dojść do utraty brwi, rzęs, łysienia bliznowaciejącego, a także nieprawidłowości w uzębieniu (Peterson LS 1995, Tuffanelli D 1998, Soma Y 1998, Vierra E 1999, Stone J 2001, Zulian F 2004, Chung L 2006, Tollefson MM 2007, Kreuter A 2012).

Postępujący połowiczny zanik twarzy zwany również zespołem Parry-Romberga jest odmianą LM pierwotnie obejmującą tkankę podskórną, mięśnie oraz kości. W przeciwieństwie do MCDS w odmianie tej rzadko stwierdza się włóknienie skóry. Ponadto objawy najczęściej dotyczą dolnej połowy twarzy. Jednoczesne współwystępowanie MCDS i postępującego połowiczego zaniku twarzy jest częste i dotyczy ok. 40% pacjentów. Niewątpliwie jest to jedna z najcięższych odmian *morphea*, która może doprowadzić do poważnych deformacji twarzy, a także zaburzeń neurologicznych podobnych do opisywanych w MCDS. Ponadto wg niektórych autorów zespół Parry-Romberga i MCDS stanowią dwie odmiany tego samego procesu chorobowego (Peterson LS 1995, Tuffanelli D 1998, Vierra E 1999, Orozco-Covarrubias L 2002, Błaszczuk M 2003, Zulian F 2004, Sommer A 2006, Zulian F 2006, Tollefson MM 2007, Kreuter A 2012).

DM jest najrzadszą z odmian *morphea* (poniżej 5% chorych). Stwardnienia obejmują tkankę podskórną, powięź i/lub mięśnie. Postać ta charakteryzuje się obecnością niewyraźnie odgraniczonych, stwardniałych ognisk, ściśle związanych z poniżej leżącymi tkankami. W odróżnieniu od MEP, ogniska DM są raczej rozlane, słabiej odgraniczone i nie wykazują tendencji do układu liniowego. Postać głęboka charakteryzuje się obecnością stwardnień, najczęściej zlokalizowanych symetrycznie na kończynach (Peterson LS 1995, Vierra E 1999, Kreuter A 2009).

Niektórzy autorzy wyróżniają jeszcze inne, znacznie rzadsze odmiany *morphea*, takie jak odmiana pęcherzowa (*bullous morphea*), która może towarzyszyć każdej z powyżej opisanych postaci choroby. Typowym objawem są dobrze napięte, podnaskórkowe pęcherze. Uważa się, że powstanie pęcherzy może być uwarunkowane: urazem, zamknięciem naczyń chłonnych przez zwłóknienie otaczających tkanek, współistniejącą autoimmunizacją wobec białek strukturalnych połączenia skórno-naskórkowego lub uwalnianiem głównego białka zasadowego z eozynofili (Daoud MS 1994, Tuffanelli D 1998, Vierra E 1999, Rencic A 2002, Kawała M 2007).

Niewątpliwie do jednej z rzadszych odmian zalicza się również postać guzkową (*nodular morphea*), znaną też jako odmiana bliznowcowa (*keloid morphea*). W odmianie tej zmiany skórne przybierają postać twardych guzków przypominających keloidy. Najbardziej typową lokalizacją jest klatka piersiowa. W postawieniu rozpoznania pomocna jest obecność typowych ognisk *morphea* w innej okolicy ciała, jak również wynik badania histopatologicznego, w którym stwierdza się brak proliferacji komórkowej charakterystycznej dla keloidu. Co ciekawe odmiana guzkowa może towarzyszyć zarówno *morphea*, jak i SSc (Jabłońska S 1975, Krell JM 1995, Vierra E 1999).

## 1.5. Rozpoznanie

Z uwagi na charakterystyczny obraz kliniczny diagnoza może być postawiona na podstawie badania przedmiotowego (Peterson LS 1995, Vierra E 1999, Chung L 2006, Christen-Zaech S 2008). Aczkolwiek biopsja skóry zmienionej chorobowo i badanie histologiczne pozostają nadal „złotym standardem” w diagnostyce zmian o niejasnym obrazie klinicznym (Vierra E 1999, Kreuter A 2009). W przeciwieństwie do zróżnicowanego obrazu klinicznego, obraz mikroskopowy w każdej postaci *morphea* jest podobny (Kreuter A 2009). W odmianach LM, DM, GM biopsja powinna obejmować skórę i tkankę podskórną, a nawet głębsze struktury takie jak powięź, czy mięśnie. Ma to na celu uwidocznienie rozległości procesu chorobowego. W obrazie mikroskopowym, co pozostaje zgodne z obrazem klinicznym, można wyróżnić dwie fazy choroby: wczesną fazę zapalenia oraz późną fazę zwłóknienia. Zmiany wczesne charakteryzują się obecnością nacieku zapalnego złożonego głównie z limfocytów, z domieszką: plazmacytów, granulocytów, histiocytów oraz eozynofili zlokalizowanego w obrębie powierzchownego i głębokiego splotu naczyniowego. Typowy jest gęsty nacieki zapalny na granicy skóry właściwej i tkanki podskórnej. Ponadto stwierdza się obrzęk i pogrubienie

włókien kolagenowych oraz obrzmienie komórek śródbłonka. Duże obszary tkanki tłuszczowej zostają zastąpione włóknami kolagenowymi. Naskórek pozostaje niezmienny, bądź atroficzny. Ostatecznie dochodzi do proliferacji tkanki łącznej, kosztem tkanki tłuszczowej. Między pogrubiałymi i ułożonymi równolegle do powierzchni naskórka włóknami kolagenowymi widoczne są pojedyncze fibroblasty, nie stwierdza się natomiast komórek zapalnych. Dochodzi do zaniku gruczołów łojowych, a ekrynowe gruczoły potowe są „wypychane” do powierzchownych warstw skóry właściwej przez odkładany poniżej, nowo syntetyzowany kolagen. Mieszki włosowe również ulegają zanikowi, z zachowaniem wyłącznie mięśni przywłosnych. Liczba naczyń krwionośnych ulega zmniejszeniu, a ich światło ulega szczelinowatemu zwężeniu. Sieć włókien elastycznych pozostaje niezmienną, co pozwala na różnicowanie *morphea* z liszajem twardzinowym. W odmianach LM, DM, FE procesem zapalnym i włóknieniem objęte są również przegrody łącznotkankowe tkanki tłuszczowej, powięź i mięśnie poprzecznie prążkowane (Jabłońska S 1975, Vierra E 1999, Chung L 2006, Kreuter A 2012). Pomimo tego, że obraz histopatologiczny *morphea* i SSc jest bardzo zbliżony i trudny do zróżnicowania, istnieją pewne cechy histopatologiczne, które spotyka się częściej w *morphea*, takie jak: bardziej obfite nacieki zapalne, nasiloną atrofię naskórka, okołonerwowe nacieki zapalne oraz rozlane włóknienie obejmujące warstwę brodawkową skóry właściwej (Kreuter A 2009, Succaria F 2013).

W podstawowych badaniach laboratoryjnych można obserwować pewne odchylenia, szczególnie w określonych odmianach *morphea*. Dla FE, jak wspomniano powyżej, typowa jest eozynofilia i hypergammaglobulinemia oraz przyspieszony odczyn opadania krwinek czerwonych. Hypergammaglobulinemia występuje ponadto u 50% pacjentów z LM i może korelować z nasileniem przykurczu stawów (Falanga V 1986, Tuffanelli D 1998, Zulian F 2005, Mimura Y 2005, Chung L 2006). Ponadto pacjenci z odmianą akralną LM, u których procesem chorobowym objęte są stawy, często prezentują podwyższone wartości czynnika reumatoidalnego [*rheumatoid factor* (RF)] (Vierra E 1999). Pewne odmiany *morphea* wymagają bardziej wnikliwej diagnostyki i współpracy ze specjalistami z innych dziedzin. Szczególnie dotyczy to pacjentów z MCDS i postępującym połowicznym zanikiem twarzy u których, z uwagi na potencjalne ryzyko zajęcia układu nerwowego, zaleca się wykonanie rezonansu magnetycznego oraz badania elektroencefalograficznego. Pomimo faktu, iż pacjenci często nie zgłaszają objawów neurologicznych, badania obrazowe pozwalają na zidentyfikowanie takich nieprawidłowości, jak zanik warstwy korowej mózgu czy zwapnienia podkorowe (Gambichler T 2001, Błaszczak M 2003, Sommer A 2006, Christen-Zaech S 2008). Ponadto rezonans magnetyczny, bądź tomografia komputerowa mogą być pomocne przed zaplanowanym leczeniem chirurgicznym chorych z nasilonymi deformacjami twarzoczaszki w przebiegu MCDS czy postępującego połowicznego zaniku twarzy (Kreuter A 2012). Wykonanie badań obrazowych jest również wskazane u chorych z odmianą akralną LM w celu potwierdzenia lub wykluczenia zajęcia układu mięśniowo-szkieletowego. Metoda rezonansu magnetycznego została również wykorzystana w uwidocznieniu głębokości nacieku w diagnostyce FE (al-Shaikh A 1994). Chorzy z postaciami



linijnymi zlokalizowanymi na twarzy i owłosionej skórze głowy powinni zostać skonsultowani przez neurologa i okulistę (Chung L 2006). Postuluje się również przydatność ultrasonografii wysokiej częstotliwości do oceny zmian skórnych w przebiegu *morphea*. Z pozostałych badań wykorzystywanych na razie głównie w badaniach klinicznych wymienić należy: elastometrię, termografię i dopplerowską laserową ocenę przepływów (Kreuter A 2009).

Różne grupy badaczy wykorzystują w badaniach klinicznych skale oceny klinicznej choroby. Jedną z najbardziej znanych skal, powszechnie wykorzystywaną w diagnostyce SSc, jest skala oceny grubości skóry Rodnana (RSS – Rodnan *skin score*) i jej późniejsza, zmodyfikowana wersja zwana tzw. „zmodyfikowaną skalą Rodnana” (Clements P 1995). Niestety skala ta nie uwzględnia wszystkich aspektów charakterystycznych dla *morphea*. W 2008 roku Arkachaisri i wsp. opracowali metodę oceny ciężkości przebiegu choroby w oparciu o wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w *morphea* [*localized scleroderma skin severity index* (LoSSI)], który po roku został zmodyfikowany przez tych samych autorów [*modified localized scleroderma skin severity index* (mLoSSI)]. Ten ostatni został poddany walidacji. Poprzez ocenę rozległości zmian skórnych, rumienia, grubości skóry objętej procesem chorobowym oraz obecności nowych ognisk chorobowych w 14 lokalizacjach anatomicznych ustala się nasilenie i aktywność zmian skórnych w przebiegu *morphea*. W 2010 roku ta sama grupa badaczy wprowadziła drugą ze skal, zwaną skalą oceny uszkodzenia skóry [*localized scleroderma skin damage index* (LoSDI)]. Autorzy zalecają korzystanie z obu skal celem oceny przebiegu choroby (Arkachaisri T 2008, Arkachaisri T 2009, Arkachaisri T 2010).

## 1.6. Rokowanie i przebieg

*Morphea* ma przewlekły i trudny do przewidzenia przebieg. Współczynnik przeżycia jest porównywalny z populacją osób zdrowych. Peterson i wsp. na podstawie badania populacyjnego określili, że spośród 82 pacjentów z *morphea* 11% rozwinęło pewien stopień niepełnosprawności. Większość z tej grupy stanowili pacjenci z DM (Peterson LS 1997). W odmianie MEP zmiany skórne u ok. 50% chorych wykazują tendencję do samoistnego ustępowania po okresie 3-5 lat. Zmiany wtórne w postaci hiperpigmentacji, hipopigmentacji, bądź atrofii są trwałe (Christianson HB 1956, Falanga V 1986, Peterson LS 1995). W przypadku odmiany LM, GM, DM czas trwania choroby jest dłuższy, przeciętnie wynosi on 5,5 roku (Kreuter A 2009). Opisywane są nawroty. Trwałe są także powikłania odmiany akralnej LM, takie jak: przykurcze w stawach, zaniki mięśni, powikłania neurologiczne i okulistyczne (Zulian F 2005, Tollefson MM 2007, Christen-Zaech S 2008, Kreuter A 2012).

Ryzyko przejścia *morphea* w SSc jest niskie, określone na 0,9-5,7% zachorowań (Zulian F 2004). Christianson i wsp. opisali taki proces u 2 z grupy 235 chorych na *morphea* (Christianson HB 1956). Z kolei Falanga i wsp. przebadali 53 chorych na LM. Na podstawie 10-letniej obserwacji nie stwierdzili przejścia w SSc u żadnego z pacjentów (Falanga V 1986). Dotych-

czas nie rozstrzygnięto jednoznacznie, czy pacjenci z *morphea* są w grupie podwyższonego ryzyka zachorowania na SSc. W literaturze odnaleźć można doniesienia sugerujące współistnienie *morphea* z SSc. W badaniu, przeprowadzonym przez Curtisa i Jansena, stwierdzono SSc u 6 spośród 106 chorych na *morphea* (Curtis AC 1958). Jabłońska opisała współistnienie tych dwóch jednostek chorobowych u 6 spośród 253 chorych na *morphea* (Jabłońska S 1975). Z kolei Soma i wsp. stwierdzili obecność typowych ognisk o charakterze *morphea* u 9 spośród 135 chorych na SSc (Soma Y 1993). O ile ryzyko przejścia *morphea* w SSc jest niewielkie, to u niektórych chorych mogą pojawić się różne objawy układowe. Do najczęściej spotykanych należą dolegliwości bólowe stawów (Christianson HB 1956, Uziel Y 1994). Zulian i wsp. na podstawie dużego badania retrospektywnego obejmującego grupę 750 dzieci chorych na *morphea* określili, że u 22% występowały objawy układowe, takie jak: stawowe (47% chorych), neurologiczne (17% chorych), naczyniowe (9% chorych), oczne (8% chorych), dotyczące przewodu pokarmowego (6% chorych), oddechowe (2,6% chorych), kardiologiczne i nerkowe (po 1% chorych) (Zulian F 2005). Grupa polskich badaczy wykazała szereg nieprawidłowości kardiologicznych w grupie 43 dzieci chorujących na *morphea*. Odchylenia te obejmowały zarówno nieprawidłowości w zapisie EKG, jak również w badaniu echokardiograficznym. Dzieci w grupie badanej były lżejsze i niższego wzrostu niż dzieci z grupy kontrolnej (Rokicki W 1997). Wyniki powyższych badań pozostają zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy również opisywali zaburzenia czynnościowe pracy serca w grupie dorosłych chorych na *morphea*, aczkolwiek odchylenia te nie dawały objawów czy dolegliwości klinicznych i nie wymagały leczenia (Lee P 1993). Dokładna diagnostyka pozwala na wykrycie u części chorych nieprawidłowości w zakresie przewodu pokarmowego, bądź układu oddechowego, aczkolwiek zmiany te najczęściej są bezobjawowe i nie mają znaczenia klinicznego (Diaz-Perez JL 1980, Laxer RM 1997).

## 1.7. Patogeneza

Większość badań i doniesień naukowych na temat patogenezy choroby dotyczy SSc. Uszkodzenie komórek śródbłonna [*endothelial cells* (EC)], zaburzenia immunologiczne i aktywacja fibroblastów doprowadzają do zasadniczego zjawiska patologicznego jakim jest włóknienie tkanek. Nadal niewyjaśnione pozostaje pytanie, co jest czynnikiem inicjującym kaskadę zjawisk patologicznych w *morphea* (Vierra E 1999, Chung L 2006, Varga J 2007, Gupta RA 2007).

### 1.7.1. Uszkodzenie komórek śródbłónka

Najwcześniejszym zjawiskiem w patogenezie *morphea* jest aktywacja i uszkodzenie EC (Kahaleh MB 1979, Sgonc R 1996). Konsekwencją tego zjawiska jest obliteracja małych naczyń krwionośnych oraz uwolnienie antygenów komórkowych, co może być czynnikiem spustowym dla procesów zapalnych i autoimmunologicznych (Kahaleh MB 2004). Biopsje skóry zmienionej chorobowo pobrane w fazie zapalnej wykazują obrzęk i pobudzenie EC, pogrubienie ścian naczyń krwionośnych nacieczonych komórkami zapalnymi, przede wszystkim limfocytami, ale również makrofagami, mastocytami i eozynofilami (Kobayasi T 1985, Helmbold P 2004, Kowalewski C 2005). W późniejszych stadiach choroby obserwuje się zwielokrotnienie błony podstawnej i zmniejszenie gęstości naczyń, co może wynikać z apoptozy EC. Za pomocą mikroskopii konfokalnej potwierdzono wzmoczoną angiogenezę w fazie zapalnej choroby, natomiast w obrębie starszych, „nieaktywnych” wykwitów (faza zwłóknienia) widoczne są powiększone naczynia krwionośne o nieregularnym rozkładzie (Kowalewski C 2005).

Ponadto zwrócono uwagę na zaburzenia w zakresie czynników mających wpływ ochronny na EC, do których należą między innymi: błonowy kofaktor białkowy [*membrane cofactor protein* (MCP)] oraz czynnik przyspieszający rozkład [*decay accelerating factor* (DAF)]. Czynniki te obecne są w EC, a poprzez regulację aktywności dopełniacza chronią EC przed zależnym od niego zniszczeniem. Venneker i wsp. udowodnili, że w ogniskach chorobowych *morphea* poziom tych protekcyjnych czynników jest niewykrywalny lub znacznie obniżony (Venneker GT 1994). Zwraca się również uwagę na znaczenie wolnych rodników tlenowych w uszkodzeniu EC. Do czynników neutralizujących wolne rodniki tlenowe należą dysmutazy ponadtlenkowe (Jinnin M 2004). W surowicy chorych na GM stwierdzono podwyższony poziom dysmutazy ponadtlenkowej manganowej (Mn SOD) w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. Co więcej, podwyższony poziom Mn SOD u tych chorych korelował z rozległością zmian skórnych (Jinnin M 2004). Nagai i wsp. stwierdzili obecność przeciwciał przeciwko dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej w surowicy 89% chorych na *morphea* i u 100% chorych na GM, ale tylko u 8% chorych na SSc, 15% chorych na SLE i 13% chorych na zapalenie skórno-mięśniowe. Wyższe stężenie przeciwciał korelowało z cięższym przebiegiem *morphea* (Nagai M 2004). Uszkodzone EC wytwarzają cytokiny, które zwiększają produkcję cząsteczek adhezyjnych i/lub surowiczego stężenia ich rozpuszczalnych form, takich jak: cząsteczki adhezji międzykomórkowej [*intracellular adhesion molecule* (ICAM)]- 1, cząsteczki adhezji komórkowej naczyń [*vascular cell adhesion molecule* (VCAM)]- 1, E-selektyna, P-selektyna (Yamane K 2000). Zbyt wysoki poziom cząsteczek adhezyjnych może przyczynić się do zwiększonej rekrutacji limfocytów T, nadmiernej aktywacji fibroblastów i ostatecznie pobudzenia procesu włóknienia (Sato S 1999). U chorych na *morphea* stwierdzono podwyższone surowicze stężenie wyżej wymienionych cząsteczek adhezyjnych, co więcej stężenie to korelowało z ciężkością przebiegu choroby (Ihn H 1994a, Yamane K 2000).

### 1.7.2. Zaburzenia immunologiczne

W fazie zapalnej choroby, wśród licznych komórek nacieku zapalnego, dominującą populację stanowią limfocyty T pomocnicze (*helper*, h) CD4+, będące źródłem cytokin aktywujących fibroblasty do produkcji składników macierzy pozakomórkowej [*extracellular matrix* (ECM)] (Yamamoto T 2006, Kurzinski K 2011). Również w surowicy chorych na *morphea* stwierdza się podwyższone stężenie szeregu cytokin, co potwierdza pobudzenie limfocytów T (Uziel Y 1994, Ihn H 1994b, Ihn H 1995, Ihn H 1996, Nagaoka T 2000, Hasegawa M 2003). Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na zaburzenia równowagi w populacji limfocytów Th, wyrażające się podwyższonym wskaźnikiem limfocytów Th2/Th1, co jest istotne w kontekście inicjacji zjawisk włóknienia (Sato S 1996, Artlett CM 2005). Autorzy japońscy stwierdzili podwyższone stężenie CD30 (powierzchniowy antygen limfocytów Th2) w surowicy pacjentów zarówno w SSc jak i w *morphea*, co może wskazywać, iż aktywność immunologiczna jest uwarunkowana pobudzeniem limfocytów Th2 (Ihn H 2000). Na uwagę zasługuje jednak fakt, że w fazie zapalnej *morphea* przeważają cytokiny powiązane z limfocytami Th1 i Th17, takie jak: interleukina [*interleukin* (IL)]- 2, interferon [*interferon* (IFN)]-  $\gamma$ , czynnik martwicy guza [*tumor necrosis factor* (TNF)]-  $\alpha$ , podczas gdy cytokiny produkowane przez limfocyty Th2, do których zaliczamy m.in. IL-4, IL-13, korelują raczej z procesami włóknienia i progresją choroby (Kurzinski K 2011). Pobudzenie limfocytów Th2 aktywuje uwalnianie cytokin pobudzających włóknienie, takich jak: transformujący czynnik wzrostu [*transforming growth factor* (TGF)]-  $\beta$ , płytkopochodny czynnik wzrostu [*platelet-derived growth factor* (PDGF)], czynnik wzrostu tkanki łącznej [*connective tissue growth factor* (CTGF)], IL 4, 6, 8 (Ihn H 1995, Leask A 2004). Wykazano również korelację pomiędzy stężeniem rozpuszczalnej formy receptora dla interleukiny [*soluble interleukin 2 receptor* (sIL-2R)]- 2 w surowicy chorych na *morphea*, a rozległością zmian skórnych (Ihn 1996). Także podwyższone stężenie sIL-6R u chorych na *morphea* korelować ma z ilością ognisk chorobowych oraz z zajęłą powierzchnią ciała (Nagaoka T 2000). Zwrócono również uwagę na insulinopodobny czynnik wzrostu [*insulin-like growth factor* (IGF)] w patogenezie *morphea*. Czynnik ten pobudza produkcję kolagenu i ECM. Ma również udział w procesach immunologicznych wpływając na rozwój prekursorów limfocytów B, limfocytów T oraz produkcję immunoglobulin (Fawzi MM 2008). U chorych na *morphea* stwierdzono zwiększoną ekspresję IGF w ogniskach chorobowych w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną (Fawzi MM 2008).

Zaburzenia immunologiczne w *morphea* są związane również z chemokinami, takimi jak: białko indukowane przez IFN- $\gamma$  [*interferon-gamma-inducible protein* (IP)]- 10, CXCL9, IL-8, CXCL16, które indukują, utrzymują i zwielokrotniają procesy zapalne i immunologiczne (Kurzinski K 2011, Romagnani P 2012, Magee KE 2013).

Jednym z najsilniejszych czynników pobudzających włóknienie jest TGF- $\beta$ . Jego źródłem mogą być EC, makrofagi, limfocyty, płytki krwi, fibroblasty (Moretti S 1999, Higashi-Kuwata N 2009, Antiga E 2010). TGF- $\beta$  pobudza produkcję kolagenu, fibronektyny oraz proteoglikana-

nów przez fibroblasty, poza tym hamuje syntezę metaloproteinaz macierzy [*matrix metalloproteinases* (MMP)], które odpowiadają za degradację kolagenu (Higley H 1994, Ihn H 2002, Yamamoto T 2006). Doniesienia naukowe dotyczące surowiczego stężenia TGF- $\beta$  i stopnia jego prezentacji w ogniskach chorobowych określonych przy pomocy badań immunohistochemicznych u chorych na *morphea* są niejednoznaczne (Higley H 1994, Laxer RM 1997, Querfeld C 1999, Kubo M 2001, Restrepo JF 2003, Antiga E 2010, Dańczak-Pazdrowska A 2013). TGF- $\beta$  pobudza również syntezę CTGF przez komórki EC, który wzmacnia jego działanie poprzez synergistyczną indukcję produkcji kolagenu i ECM oraz pobudzenie angiogenezy (Ihn H 2002). Podobne działania do CTGF wykazuje cytokina PDGF, wydzielana przede wszystkim przez płytki krwi, EC, fibroblasty i makrofagi. Jej działania obejmują nasilenie syntezy ECM, jak również zwiększenie proliferacji fibroblastów oraz pobudzenie ich do produkcji TGF- $\beta$  i IL-6 (Zheng XY 1998, Varga J 2007). W badaniu immunohistochemicznym skóry zmienionej chorobowo u chorych na *morphea* nie wykazano różnic w ekspresji PDGF w porównaniu ze skórą osób zdrowych (Restrepo JF 2003), aczkolwiek stwierdzono zwiększoną prezentację jego receptorów (Zheng XY 1998). W grupie chorych na SSc podjęto próby leczenia z użyciem monoklonalnych przeciwciał anti-TGF- $\beta$ , jak również z wykorzystaniem imatinibu, będącego inhibitorem kinaz tyrozynowych. Co ciekawe, wymienione badania kliniczne nie tylko nie potwierdziły skuteczności leczenia, ale również wykazały poważne działania uboczne, w tym wzrost śmiertelności u chorych po włączeniu leczenia przeciwciałami anti-TGF- $\beta$  (Denton CP 2007, Prey S 2012). Inhibitory kinaz tyrozynowych wydają się być interesującą opcją terapeutyczną dla chorych na *morphea*, szczególnie w fazie włóknienia, natomiast u chorych na SSc badania kliniczne nie potwierdziły ich skuteczności, co więcej z uwagi na częste działania niepożądane lek ten nie jest rutynowo zalecany w SSc (Moinzadeh P 2010, Prey S 2012, Coelho-Macias V 2014).

W patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem podkreśla się również znaczenie białek o potencjale proangiogennym. Jednym z najsilniejszych jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń [*vascular endothelial growth factor* (VEGF)]. Jest to w istocie grupa czynników, z których najlepiej poznany jest VEGF-A. Czynnik ten zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych pobudza wzrost i różnicowanie naczyń krwionośnych i limfatycznych, zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, stymuluje proliferację i migrację EC (Distler O 2002). Biologiczne efekty VEGF są ściśle zależne od jego stężenia (Carmeliet P 1996). U chorych na SSc pomimo wadliwej angiogenezy stwierdzono podwyższony surowiczy i tkankowy poziom tej cytokiny (Distler O 2002, Distler O 2004). Przez długi czas traktowano to jako paradoks. Dopiero rozróżnienie 2 izoform VEGF-A: proangiogennej i antyangiogennej przyczyniło się do wyjaśnienia zjawiska wadliwej angiogenezy w SSc (Manetti M 2011b). Przemiana proangiogennej izoformy VEGF w antyangiogenną odgrywa istotną rolę w zaburzeniach angiogenezy u pacjentów z SSc (Manetti M 2011b). Poza tym, niekontrolowana nadprodukcja VEGF może przyczyniać się bardziej do uszkodzenia EC i zaburzenia struktury naczyń, niż tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Mechanizmy, które prowadzą do

nadprodukcji VEGF u chorych na SSc pozostają niejasne. Najprawdopodobniej przyczyniają się do tego cytokiny prozapalne, takie jak TGF- $\beta$  i PDGF (Liakouli V 2011). Wyniki dotyczące surowiczego stężenia tego czynnika u chorych na *morphea* są jednak niejednoznaczne (Dziankowska-Bartkowiak B 2009, Dańczak-Pazdrowska A 2013). VEGF działa poprzez receptory czynnika wzrostu śródbłonna naczyń [*vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)], głównie VEGFR-1 i VEGFR-2. W skórze chorych na SSc wykazano ich zwiększoną ekspresję. Pomimo tego, w grupie badanej nie stwierdzono kompensacyjnej angiogenezy (Distler O 2002, Distler O 2004). Z kolei Dziankowska-Bartkowiak i wsp. obserwowali obniżone stężenie rozpuszczalnej postaci jego receptora (sVEGFR-2), przy jednoczesnym podwyższonym surowiczym stężeniu VEGF (Dziankowska-Bartkowiak B 2009).

Wśród cytokin prozapalnych należy wymienić również TNF- $\alpha$ , uwalniany głównie przez pobudzone makrofagi/monocyty oraz IFN- $\gamma$ , którego głównym źródłem są limfocyty T i komórki NK (Gillery P 1992). TNF- $\alpha$  reguluje proliferację, chemotaksję, ekspresję receptorów powierzchniowych oraz syntezę ECM. Jego działanie antyfibrotyczne uwarunkowane jest zniesieniem stymulacyjnego wpływu TGF- $\beta$  na fibroblasty, co hamuje ich proliferację i różnicowanie do miofibroblastów i chociaż w warunkach *in vitro* hamuje syntezę kolagenu (Hasegawa M 2003), to podany podskórnie prowadzi do ogniskowego nagromadzenia fibroblastów i syntezy kolagenu u myszy (Piguet PF 1990). Potencjalnym wytłumaczeniem tych sprzeczności może być fakt, że TNF- $\alpha$  nie pobudza bezpośrednio syntezy kolagenu, a jego działanie profibrotyczne może wynikać z pobudzenia innych mediatorów włóknienia, takich jak IL-6 (Hasegawa M 2003). Stężenie TNF- $\alpha$  jest podwyższone zarówno u chorych na SSc, gdzie koreluje z nasileniem włóknienia płuc (Hasegawa M 1997), jak również u chorych na LM, gdzie wyraźnie koreluje z liczbą ognisk chorobowych i zajęciem mięśni (Hasegawa M 2003). Pomimo opisywanej skuteczności leczenia przeciwciałami przeciwko tej cytokinie (Diab M 2010), coraz więcej danych literaturowych dostarcza opisy przypadków wzbudzenia *morphea* u chorych leczonych tymi przeciwciałami (Ramírez J 2012, Stewart FA 2013).

IFN- $\gamma$  wykazuje silne właściwości antyfibrotyczne, zmniejsza ekspresję kolagenu i znosi stymulacyjny wpływ TGF- $\beta$  na fibroblasty hamując tym samym ich proliferację i przekształcanie do miofibroblastów (Varga J 2007, Coelho LF 2008). Większość badań dotyczących patogenezy IFN- $\gamma$  w procesach włóknienia przeprowadzono u chorych na SSc, gdzie wykazano obniżenie jego surowiczego stężenia (Scala E 2004, Coelho LF 2008). Lipko-Godlewska i wsp. potwierdzili obniżone stężenie IFN- $\gamma$  w grupie chorych na *morphea*. Ponadto jego surowicze stężenie było niższe u chorych z aktywnym procesem chorobowym w porównaniu z grupą z procesem nieaktywnym (Lipko-Godlewska S 2008). Z uwagi na jego właściwości antyfibrotyczne podjęto próbę terapeutycznego zastosowania IFN- $\gamma$  w grupie chorych na *morphea*, jednakże nie odnotowano korzyści w odniesieniu do placebo (Hunzelmann N 1997).

Poza opisanymi powyżej zaburzeniami w aktywacji limfocytów T, niewątpliwie limfocyty B również odgrywają rolę w patogenezie choroby. Podwyższone surowicze stężenie różnych autoprzeciwciał, takich jak ANA czy RF stanowi jeden z dowodów na zaburzenia odpowiedzi

humoralnej (Vierra E 1999). Dotychczas nie wyjaśniono, czy przeciwciała te odgrywają rolę w patogenezie choroby, czy są jedynie epifenomenem (Gupta RA 2007) (szczegółowy opis w podrozdziale 1.8).

Z uwagi na kliniczne i histologiczne podobieństwa *morphea* i SSc do choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi [*graft versus host disease* (GVHD)] zwrócono uwagę na znaczenie mikrochimeryzmu w patogenezie chorób z kręgu twardziny. Zastosowanie techniki PCR pozwoliło wykazać obecność komórek chimerycznych zarówno u chorych na *morphea*, jak i SSc. Hipotezę tę podważa jednak obecność podobnej ilości tych komórek u zdrowych ochotników z grup kontrolnych (McNallan KT 2007, Rak JM 2009, Fett N 2011). Badania immunohistochemiczne ognisk zmienionych chorobowo wykazały naskórkowe pochodzenie komórek chimerycznych, natomiast w obrębie skóry nieobjętej procesem chorobowym, komórki chimeryczne wykazywały wspólne markery z limfocytami T i makrofagami (McNallan KT 2007). Teoria mikrochimeryzmu wymaga niewątpliwie pogłębienia badań.

### 1.7.3. Zaburzenia metabolizmu macierzy pozakomórkowej

Proces włóknienia jest kluczowym zjawiskiem w *morphea*. Opisane powyżej zaburzenia immunologiczne i dysfunkcja EC stymulują fibroblasty do nadmiernej produkcji ECM (Gupta RA 2007). Dodatkowo dochodzi do inaktywacji MMP odpowiedzialnych za degradację kolagenu (Varga J 2007). Fibroblasty wyizolowane od chorych na *morphea* wykazują zwiększoną syntezę kolagenu typu I i III, fibronektyny i glikozaminoglikanów w porównaniu do grup kontrolnych (Kähäri VM 1988, Boelsma E 1995). Nadmierna akumulacja ECM jest wynikiem zaburzeń równowagi pomiędzy ich syntezą, a degradacją (Asano Y 2006). Ten ostatni proces jest regulowany przez MMP, rodzinę cynkowo-zależnych peptydaz, których funkcja polega na rozkładaniu wszystkich składników ECM. MMP1 (śródmiażdżowa kolagenaza typu 1) jest odpowiedzialna za proces rozkładu kolagenu typu: I, II, III (Kahari VM 1997). Zarówno w surowicy chorych na SSc, jak i *morphea* stwierdzono obecność przeciwciał anti-MMP-1 (Tomimura S 2008). Co ciekawe, obecności tych przeciwciał nie potwierdzono w innych chorobach autoimmunizacyjnych, takich jak SLE czy zapalenie skórno-mięśniowe, dlatego wydaje się że anti-MMP-1 może być przeciwciałem ściśle związanym z procesami włóknienia skóry (Tomimura S 2008).

## 1.8. Autoprzeciwciała a *morphea*

W surowicy chorych na *morphea* stwierdza się niekiedy zwiększone stężenie autoprzeciwciał, ale dotychczas nie wyjaśniono, czy odgrywają one rolę w patogenezie choroby, czy są jedynie epifenomenem (Gupta RA 2007). Część badaczy zaleca rutynowe oznaczenie ANA u wszystkich chorych na *morphea* (Kreuter A 2009), natomiast wg innych ma ono niewielkie znaczenie przy ustalaniu rozpoznania, chociaż może sugerować współistnienie innej jednostki z kręgu chorób autoimmunizacyjnych (Błaszczak M 2000, Dańczak-Pazdrowska A 2011). ANA,

w większości o homogennym typie świecenia, stwierdza się u 20% do 80% chorych na *morphea* (Falanga V 1986, Takehara K 2005, Christen-Zaech S 2008, Leitenberger JJ 2009). Autoprzeciwciała u chorych na *morphea* skierowane są nie tylko przeciwko antygenom jądra komórkowego (nukleosomy, histony, jednoniciowe DNA) czy pozajądrowym (topoizomeraza II DNA), ale także przeciwko niektórym enzymom, np. dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej (Falanga V 1986, Sato S 1993, Nagai M 2004, Hayakawa I 2004). Co ciekawe, obecność przeciwciał przeciwko dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej wykazano w surowicy 89% chorych na *morphea*, w tym u 100% chorych na GM w porównaniu do 8% chorych na SSc. Wyższe stężenie przeciwciał korelowało z cięższym przebiegiem *morphea* (Nagai M 2004). Ponadto w *morphea* stwierdzono również obecność przeciwciał antykardiolipidowych, antykoagulantu toczeniowego i RF (Sato S 1993, Sato S 2003). ANA częściej stwierdza się u chorych na GM i w postaciach mieszanych (Leitenberger JJ 2009). Przeciwciała antyhistonowe, antykardiolipidowe, anty ss-DNA są najczęściej obserwowane u chorych na GM (Sato S 1993, Sato S 2003). Natomiast przeciwciała przeciw dysmutazom ponadtlenkowym, topoizomerazie II DNA są wykrywalne z porównywalną częstością we wszystkich postaciach *morphea* (Hayakawa I 2004, Nagai M 2004). Pomimo szeroko przeprowadzonych badań, nie ustalono jednoznacznie, które z przeciwciał są typowe dla danej odmiany *morphea*. Ponadto miana przeciwciał nie korelują z przebiegiem, czy ciężkością procesu chorobowego (Takehara K 2005, Christen-Zaech S 2008, Leitenberger JJ 2009). Natomiast u chorych na SSc udowodniono, iż określone przeciwciała są charakterystyczne dla danego podtypu choroby i korelują z ciężkością przebiegu oraz aktywnością procesu chorobowego (Hu PQ 2003). Spośród typowych dla SSc ANA, takich jak przeciwciała antycentromerowe i przeciwciała przeciwko Scl-70 (topoizomerazie I), obecność przeciwciał antycentromerowych stwierdzono u 12% chorych na *morphea*, a przeciwciała przeciwko topoizomerazie I były stwierdzane w pojedynczych przypadkach (Zulian F 2004, Takehara K 2005, Ohmatsu H 2008), co może stanowić kolejny dowód na odrębność tych jednostek chorobowych. Podsumowując, potwierdzenie lub wykluczenie obecności ANA nie przesądza o rozpoznaniu choroby. Rutynowo dostępne panele określające swoistość ANA nie zawierają antygenów swoistych dla *morphea*.



## 2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

*Morphea* jest rzadko występującą jednostką chorobową o niewyjaśnionej dotychczas etiopatogenezie. Charakteryzuje się występowaniem wczesnej fazy zapalnej, po której następuje faza włóknienia prowadząca do objawów stwardnienia skóry (Peterson LS 1997, Vierra E 1999, Toledano C 2009). Etiopatogeneza *morphea* jest wieloczynnikowa, ale dotychczas niewyjaśniona.

W patomechanizmie schorzenia niewątpliwym udziałem mają zjawiska takie jak: aktywacja i uszkodzenie EC, zaburzenia immunologiczne, dysregulacja w produkcji ECM oraz aktywacja fibroblastów. Początkowy etap w łańcuchu zdarzeń patogenetycznych stanowi uszkodzenie EC oraz błony podstawnej prowadzące do obliteracji małych naczyń krwionośnych oraz uwolnienia antygenów komórkowych, co może stanowić czynnik spustowy w rozwoju reakcji zapalnej i autoimmunologicznej (Sgonc R 1996, Vierra E 1999, Kahaleh MB 2004, Gupta EA 2007).

W piśmiennictwie zwraca się uwagę na zaburzenia w zakresie czynników o aktywności naczyniowej mających działanie ochronne w stosunku do EC, do których niewątpliwie należy peptyd natriuretyczny typu C [*C-type natriuretic peptide (CNP)*]. Białko to jest czynnikiem wazodylatującym, ma również działanie przeciwplatekcyjne, przeciwlukocytarne i przeciwzapalne (Scotland RS 2005). Hamuje ponadto sekrecję endoteliny-1, która jest silnym czynnikiem obkurczającym naczynia, a której znaczenie w chorobach przebiegających z włóknieniem różnych narządów, w tym skóry, udowodniono w licznych badaniach (Abraham DJ 1997, Jing J 2015).

W patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem podkreśla się również znaczenie białek o działaniu pro i antyangiogennym. Do grupy tej należy **VEGF-A**, który zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych pobudza wzrost i różnicowanie naczyń krwionośnych i limfatycznych (Carmeliet P 2000, Ferrara N 2001, Namiecińska M 2005, Ferrara N 2005), chociaż udowodniono, że w szczególnych warunkach może mieć również znaczenie antyangiogenne (Manetti M 2011b). Dotychczasowe doniesienia dotyczące udziału tego białka w patogenezie *morphea* są niejednoznaczne (Farrell AM 2001, Dzikowska-Bartkowiak B 2009, Dańczak-Pazdrowska A 2011).

Zaburzenia immunologiczne związane są również z chemokinami, których funkcja polega na indukcji, utrzymaniu i zwielokrotnieniu procesów zapalnych (Romagnani P 2012). Jedną z chemokin jest białko **IP-10**, którego aktywność została dotychczas udowodniona w chorobach autoimmunizacyjnych, takich jak SLE, postać dziecięca zapalenia skórno-mięśniowego oraz SSc (Fall N 2005, Hasegawa M 2011, Liu X 2013, Hrycek E 2013). Wykazuje ono działanie antyangiogenne i prozapalne (Liu M 2011). INF- $\gamma$  pobudza wydzielanie IP-10 z keratynocytów, leukocytów, neutrofilów, eozynofili, makrofagów i monocytów oraz EC (Liu M 2011, Romagnani P 2012). Większość doniesień naukowych dotyczących znaczenia IP-10 w patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem dotyczy SSc (Hasegawa M 2011, Rabquer B 2011, Liu X

2013). Dane literaturowe odnoszące się do znaczenia tej chemokiny u pacjentów z *morphea* są nadzwyczaj skąpe i pojawiły się już w trakcie prowadzenia niniejszych badań (Magee KE 2013, Torok KS 2015).

Cele pracy obejmowały zatem:

1. Ocenę względnego poziomu transkryptów genu **CNP** w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i osoczowego stężenia jego produktu białkowego u chorych na *morphea* z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności.
2. Ocenę względnego poziomu transkryptów genu **VEGF-A** w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i osoczowego stężenia jego produktu białkowego u chorych na *morphea* z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności.
3. Ocenę względnego poziomu transkryptów genu **IP-10** w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i osoczowego stężenia jego produktu białkowego u chorych na *morphea* z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności.
4. Porównanie osoczowego stężenia wyżej wymienionych białek u chorych na *morphea* oraz postać ograniczoną twardziny układowej.
5. Poszukiwanie markera aktywności procesu *morphea*.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Grupy badane i kontrolne

Badaniami objęto 80 osób, z czego grupę badaną stanowiło 30 chorych na *morphea*, natomiast grupy kontrolne stanowiło 20 chorych na postać ograniczoną twardziny układowej [*limited systemic sclerosis* (ISSc)] i 30 zdrowych ochotników. Charakterystykę liczebności grup przedstawia tabela nr 1. Protokół badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu. Wszyscy pacjenci, w tym opiekunowie prawni pacjentów niepełnoletnich, uzyskali pisemną informację o celach i zasadach badania oraz dobrowolnie podpisali formularz świadomej zgody na uczestnictwo w badaniu.

**Tabela 1.** Charakterystyka i liczebność poszczególnych grup badanych

Grupy badane		Liczba chorych – n		(%)
<i>Morphea</i>		30		37,5
Grupy kontrolne	ISSc	50	20	25
	Zdrowi ochotnicy		30	37,5
Łącznie		80		100

ISSc – postać ograniczona twardziny układowej, n – liczebność grupy.

##### 3.1.1. Charakterystyka grupy badanej

Do grupy badanej zakwalifikowano 30 osób z *morphea*. W obrębie tej grupy wyróżniono trzy podgrupy:

- I – 16 chorych na MEP
- II – 2 chorych na LM
- III – 12 chorych na GM

Do badań zakwalifikowano 30 chorych. Rozpoznanie kliniczne choroby zostało potwierdzone badaniem histopatologicznym. Pacjenci pozostawali pod opieką Przyklinicznej Poradni Dermatologicznej, jak również Oddziału Klinicznego Dermatologii Szpitala Klinicznego im. Heliodora Świącickiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Kryterium wykluczającym było stosowanie leczenia ogólnego i miejscowego w okresie miesiąca poprzedzającego pobranie materiału.

W grupie badanej kobiety stanowiły 66,7% (20 osób), a mężczyźni 33,3% (10 osób). Średni wiek w grupie badanej wynosił 42,7 lat ( $\pm 21,1$ ). Średni czas trwania choroby wynosił 56,4 miesiące ( $\pm 74,4$ ). Charakterystykę grupy badanej przedstawia tabela nr 2.

**Tabela 2.** Charakterystyka grupy badanej – chorzy na *morphea*

		<i>MORPHEA</i>	PODTYPY <i>MORPHEA</i>		
			MEP	LM	GM
Liczba chorych	n	30	16	2	12
	%	100	53	7	40
Liczba kobiet/ mężczyzn	n	20/10	9/7	1/1	10/2
	%	66,7/ 33,3	56,2/43,8	50/50	83,3/16,7
Wiek chorych (lata)	Średnia/ $\pm$ SD	42,7/ $\pm$ 21,1	37,6/ $\pm$ 21,1	33,0/ $\pm$ 9,9	51,0/ $\pm$ 20,7
	Mediana	45,5	33	33	57
	Min.	11	11	26	16
	Max.	79	73	40	79

MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea* GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.

### 3.1.2. Charakterystyka grup kontrolnych

Badania przeprowadzono również wśród 50 osób z grup kontrolnych, obejmujących 20 chorych na ISSc i 30 zdrowych ochotników.

I – 20 chorych na ISSc.

W tym 90% (18 osób) stanowiły kobiety, a 10% (2 osoby) stanowili mężczyźni. Średni wiek w tej grupie kontrolnej wynosił 47,0 lat ( $\pm 10,8$ ). Najmłodsza osoba miała 32 lata, a najstarsza 63 lata. Grupa ta stanowiła kontrolę w badaniu stężenia wybranych cytokin w osoczu.

II – 30 zdrowych ochotników, niechorujących na choroby przewlekłe.

W tej populacji kobiety stanowiły 76,7% (23 osoby), a mężczyźni 23,3% (7 osób). Średni wiek wynosił 30,5 lat ( $\pm 4,0$ ). Najmłodsza osoba miała 25, a najstarsza 39 lat. Kryterium wykluczenia było poszerzone o niewystępowanie chorób autoimmunizacyjnych w rodzinie. Populacja ta stanowiła kontrolę w badaniu względnego poziomu transkryptów genów wybranych białek w PBMC, jak również ich osoczowego stężenia.

Charakterystykę obu grup kontrolnych przedstawia tabela nr 3.

**Tabela 3.** Charakterystyka grup kontrolnych

		Chorzy z ISSc	Osoby zdrowe
Liczba chorych	n	20	30
	%	100	100
Liczba kobiet/ mężczyzn	n	18/2	23/7
	%	90/10	76,7/23,3
Wiek chorych (lata)	Średnia/±SD	47,0/±10,8	30,5/±4,0
	Mediana	44,5	30,5
	Min.	32	25
	Max.	63	39

ISSc – postać ograniczona twardziny układowej, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.

## 3.2. Materiał

### 3.2.1. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

Od osób z grupy badanej oraz z grupy zdrowych ochotników pobrano jałowo 5 ml krwi do próbeko-strzykawek zawierających EDTA (*Monovette, Sarstedt*). Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej [*peripheral blood mononuclear cells* (PBMC)] uzyskano od 58 osób, z czego 29 prób pochodziło od osób zakwalifikowanych do grupy badanej, natomiast 29 prób od zdrowych ochotników (u 1 osoby z grupy badanej i u 1 osoby z grupy zdrowych ochotników nie udało się uzyskać PBMC z powodów technicznych, pomimo uzyskania krwi obwodowej). PBMC uzyskano poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Fikolu (*Ficoll-Histopaque 1.077 g/ml, Sigma Diagnostics, Inc. St. Louis, USA, 800g, 40 minut, 22°C*).

### 3.2.2. Osocze

Od 80 osób (wszystkie osoby zakwalifikowane do badania) pobrano jałowo 5 ml krwi do próbeko-strzykawek zawierających EDTA (*Monovette, Sarstedt*), z czego 30 prób pochodziło od chorych zakwalifikowanych do grupy badanej, 20 od chorych na ISSc, natomiast 30 od zdrowych ochotników. Osocze uzyskane zostało poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Fikolu (*Ficoll-Histopaque 1.077 g/ml, Sigma Diagnostics, Inc. St. Louis, USA, 800g, 40 minut, 22°C*). Osocze do czasu wykonania badań przechowywane było w temperaturze -80°C.

### 3.3. Metody

#### 3.3.1. Ocena rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w *morphea*

U wszystkich pacjentów z grupy badanej została dokonana ocena ciężkości przebiegu choroby w oparciu o LoSSI, który został zaproponowany przez Arkachaisriego i wsp. w 2008 roku. Przedstawiono go w tabeli nr 4 (Arkachaisri T 2008). W oparciu o ten wskaźnik ocenie podlegały następujące parametry: rozległość zmian skórnych, rumień, grubość skóry objętej procesem chorobowym oraz pojawienie się nowych ognisk chorobowych lub szerzenie się uprzednio istniejących zmian. Wymienione parametry oceniano w skali od 0 do 3. Obecnie, jak wspomniano we wstępie, dostępna jest uaktualniona wersja wskaźnika, tzw. mLoSSI, w którym pominięto ocenę rozległości zmian skórnych i zmodyfikowano ocenę w/w parametrów w 18 lokalizacjach anatomicznych oraz skala oceny uszkodzenia skóry (LoSDI) (Arkachaisri T 2008, Arkachaisri T 2009). Wskaźniki te nie były używane w niniejszej publikacji, ponieważ zostały opracowane już w trakcie prowadzenia niniejszych badań.

Przy ocenie rozległości zmian: 0 – oznaczało brak wykwitów w danej lokalizacji anatomicznej, 1 – zajęcie poniżej 1/3 danej powierzchni skóry, 2 – zajęcie danej lokalizacji anatomicznej w przedziale od 1/3 do 2/3, 3 – zajęcie powyżej 2/3 ocenianego obszaru przez proces chorobowy. W odniesieniu do rumienia, zaznaczyć należy, że 0 oznaczało jego brak, bądź obecność pozapalnej hiper lub hipopigmentacji, 1 – różowy odcień wykwitu, 2 – czerwony odcień, 3 – obecność żywoczerwonego rumienia. W odniesieniu do grubości skóry, badanie oparte było na zmodyfikowanym wskaźniku oceny skóry Rodnana [*modified Rodnan skin score (mRSS)*], polegającym na możliwości ujęcia skóry w fałd: 0 – oznaczało brak zgrubienia, 1 – obecność niewielkiego zgrubienia, umożliwiającego ujęcie skóry w fałd, 2 – średnio zaznaczone zgrubienie, utrudniające ujęcie skóry w fałd, 3 – wyraźnie zaznaczone zgrubienie, uniemożliwiające ujęcie skóry w fałd. Grubość skóry była oceniana w obrębie blaszki twardzinowej i porównywana z niezajętą przez proces chorobowy przeciwległą stroną ciała, a w przypadku obecności symetrycznych zmian skórnych, ze skórą po tej samej stronie ciała w pobliżu ogniska chorobowego. Rumień i stwardnienie skóry oceniano w zakresie najbardziej zaawansowanego wykwitu dla danej lokalizacji. W ramach aktywności ocenie podlegało pojawienie się nowych ognisk chorobowych lub szerzenie się uprzednio istniejących na przestrzeni 1 miesiąca poprzedzającego badanie, gdzie 3 świadczyło o pojawieniu się nowych wykwitów chorobowych, bądź szerzeniu uprzednio istniejących zmian skórnych, w przeciwnym razie punktów nie przyznawano. Ocena wyżej wymienionych parametrów została dokonana w 14 lokalizacjach anatomicznych. Liczbę przyznanych punktów sumowano, a punktacja mogła wynosić od 0 do 216 (Arkachaisri T 2008).

**Tabela 4.** Ocena rozległości, nasilenia, aktywności zmian skórnych z zastosowaniem LoSSI wg Arkachaisriego i wsp. Komentarz do tabeli zawarty jest w tekście

	Powierzchnia (SA) 0 = brak 1 = <1/3 2 = 1/3-2/3 3 = >2/3	Aktywność (N/E) 0 = brak 3 = nowe ognisko /powiększenie ogniska	Rumień (ES) 0 = brak 1 = różowy 2 = czerwony 3 = ciemnoczerwony	Pogrubienie skóry (ST) 0 = brak 1 = niewielkie 2 = średnie 3 = znaczne
Głowa				
Szyja				
Klatka piersiowa				
Brzuch				
Górna część pleców				
Dolna część pleców				
Ramię prawej kończyny górnej				
Przedramię i ręka prawej kończyny górnej				
Ramię lewej kończyny górnej				
Przedramię i ręka lewej kończyny górnej				
Pośladek i udo prawej kończyny dolnej				
Podudzie i stopa prawej kończyny dolnej				
Pośladek i udo lewej kończyny dolnej				
Podudzie i stopa lewej kończyny dolnej				

LoSSI – wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w morfeii (*localized scleroderma skin severity index*), SA – powierzchnia zmian (*surface area score*), N/E – aktywność zmian (*new lesion/lesion extension*), E – rumień (*erytoma score*), ST – pogrubienie skóry (*skin thickness*)

### 3.3.2. Ocena aktywności choroby

Chorzy, u których w trakcie ostatnich 6 miesięcy stwierdzono pojawienie się nowych ognisk, szerzenie się uprzednio istniejących zmian chorobowych lub obecność rumieniowej obwódki (ang. *lilac ring*) zostali zakwalifikowani do grupy chorych z procesem aktywnym. Chorzy u których nie stwierdzono powyższych objawów zaliczeni zostali do grupy z procesem nieaktywnym (Marzano AV 2003, Uziel Y 2007).

### 3.3.3. Badanie względnego poziomu transkryptów genów (ekspresji genów) CNP, VEGF-A, IP-10 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

#### 3.3.3.1. Izolacja RNA

Całkowite komórkowe RNA wyizolowane z PBMC uzyskano zgodnie z metodą opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi na drodze ekstrakcji fenolowo-chloroformowej oraz precypitacji alkoholem (Chomczyński P 1987). W celu rozdzielenia faz krew wirowano w gradiencie gęstości (Histopaq® 1077; 800 g, 40 minut, 22°C). PBMC pobierano z granicy faz osocze/fikol. Po usunięciu supernatantu rozpoczęto procedurę izolacji RNA.

Osad zalewano 1 ml odczynnika Tri Pure Isolation Reagent i pipetowano, aż do uzyskania całkowitej homogenizacji komórek. Następnie dodawano 200 ul chloroformu, po zworeteksowaniu inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej i wirowano (12000g, 2°C, 12 minut). Kolejne etapy procedury przeprowadzone były na lodzie.

Fazę wodną (ok. 450 µl) przenoszono do nowej probówki. W celu precypitacji RNA dodawano 500 µl izopropanolu i woreteksowano. Przez co najmniej 12 godzin mrożono w temp. -80°C, a następnie po rozmrożeniu wirowano (12000g, 2°C, 12 minut). Zlewano izopropanol. W kolejnym etapie dodawano 1 ml 75% etanolu, woreteksowano i ponownie wirowano (20000g, 2°C, 10 minut). W kolejnym etapie delikatnie zlewano etanol znad osadu, a otwarte probówki suszono pod szafą laminarną w temperaturze 37°C. Osad zalewano i rozpuszczano w 20 µl wody w temperaturze 50°C przez 15 minut w termobloku. Następnie RNA doczyszczano przy użyciu High Pure RNA Isolation Kit, zgodnie z zaleceniami producenta. Prawidłowy przebieg reakcji dnazowania, a tym samym eliminacji zanieczyszczeń genomowym DNA, został potwierdzony poprzez wykonanie reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym [*real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)*] dla genu referencyjnego dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej [*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*] z każdą próbą RNA (reakcja kontrolna typu no-RT). W kolejnym etapie dokonano jakościowej i ilościowej oceny pozyskanego RNA przy pomocy spektrofotometru Nanodrop c200.

#### 3.3.3.2. Odwrotna transkrypcja

Po wyizolowaniu RNA należy przepisać go na komplementarny DNA [*complementary DNA (cDNA)*]. Przeprowadzono odwrotną transkrypcję z użyciem komercyjnie dostępnych heksamerowych starterów o losowych wybranych sekwencjach (ang. *random hexamers*). Każdorazowo reakcję przeprowadzano z 1,5 µg wyizolowanego RNA. Po wykonaniu odwrotnej transkrypcji, próby cDNA rozcieńczane były dwukrotnie i przechowywane w temperaturze -80°C do czasu wykonania real-time PCR.



### 3.3.3.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

Uzyskane w wyniku odwrotnej transkrypcji próby cDNA poddano ilościowej ocenie ekspresji z zastosowaniem real-time PCR, której zasada opiera się na monitorowaniu wzrostu fluorescencji po każdym cyklu reakcji. Jest to możliwe poprzez wykorzystanie systemów detekcyjnych opartych na związkach fluorescencyjnych. W prezentowanych badaniach zastosowano system detekcyjny z barwnikiem SYBR Green.

Analizie poddano wybrane fragmenty genów o długości od 96 do 233 par zasad (pz). W każdym przypadku, amplikon obejmował przynajmniej jeden intron, co w połączeniu z odpowiednio krótkim czasem elongacji, minimalizowało ryzyko amplifikacji niepożądanych sekwencji pochodzenia genomowego.

Istotnym elementem badania jest wybór genu referencyjnego. Idealny gen kontrolny powinien posiadać niezmienny poziom ekspresji w różnych tkankach oraz w różnych warunkach eksperymentalnych (Ciesielska A 2008). Dlatego jako geny referencyjne wykorzystuje się geny podstawowego metabolizmu komórkowego. Pierwszym z genów użytym w prezentowanej pracy jest gen 18 S. Drugim genem referencyjnym jest gen GAPDH, który charakteryzuje się stałą ekspresją w różnych tkankach, a poza tym nie wykazuje zależności względem płci czy wieku. Dane z piśmiennictwa potwierdzają zasadność użycia tego genu (Bonet-Duquennoy M 2006).

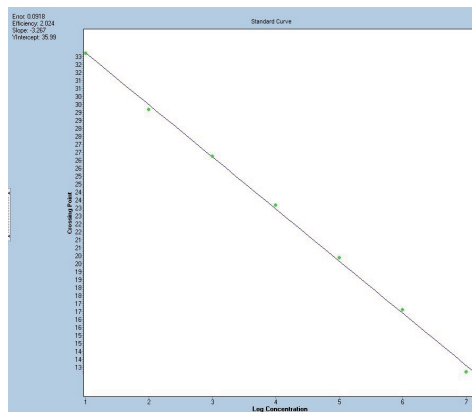
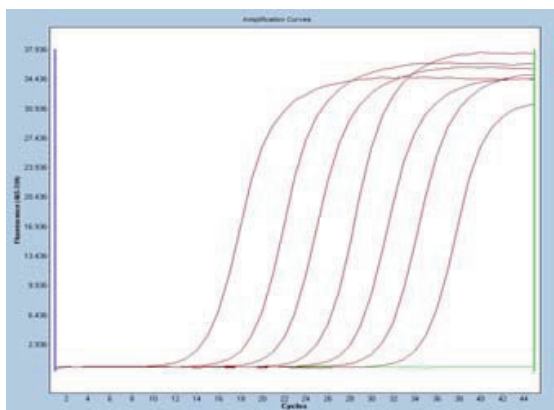
Optymalizacja real-time PCR dla każdej analizowanej sekwencji przebiegała pod kątem doboru właściwych starterów, temperatury ich przyłączenia, czasu elongacji oraz stężenia jonów magnezu.

**Tabela 5.** Charakterystyka starterów użytych w real-time PCR

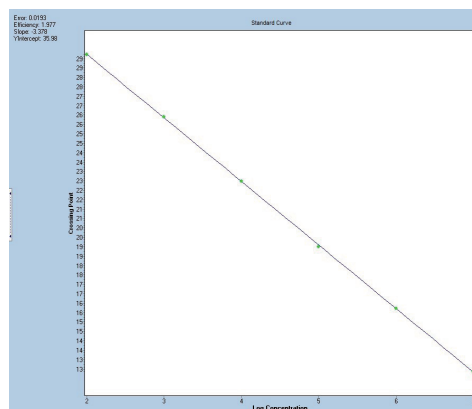
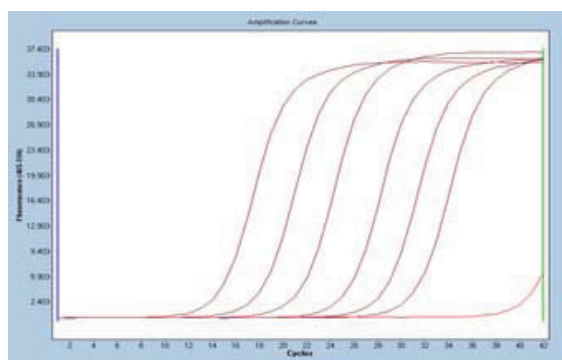
Nazwa	Sekwencja 5'-3'	Długość amplikonu/- temperatura przyłączenia starterów
GAPDH-F	CTGCACCAACTGCTTAG	119 pz/58°C
GAPDH-R	TTCTGGGTGGCAGTGATG	
IP 10-F	TGCCATTCTGATTTGCTGCC	165pz/59°C
IP 10-R	CGTGGACAAAATTGGCTTGC	
CNP-F	GCCTCAAGCTGGACCGAAT	148pz/ 60°C
CNP-R	CACATTGCGTTGGAGGTGTTT	
VEGF-F	TCACCATGCAGATTATGCGGA	233pz/60°C
VEGF-R	TAACTCAAGCTGCCTCGCCT	
18S rRNA-F	ATACAgCCAaggTCCTAgCCA	96pz/59°C
18S rRNA-R	AAgTgACgCAgCCCTCTATg	

Wielkość produktu oceniano wykorzystując proces elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (1xTBE). Reakcję uznawano za zoptymalizowaną, jeżeli uzyskano pojedynczy prążek o odpowiedniej długości oraz gdy analiza temperatury topnienia amplikonu po real-time PCR wykazywała pojedynczy i jednorodny produkt amplifikacji.

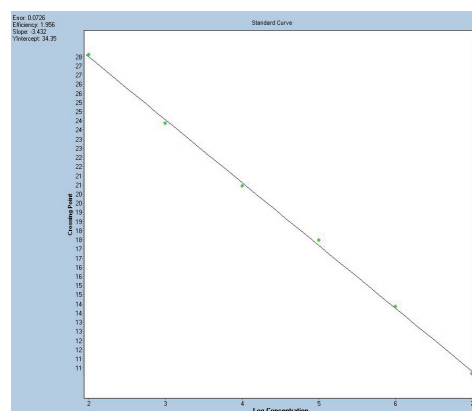
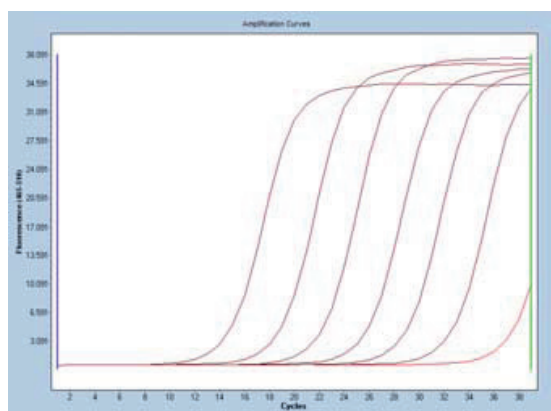
Kolejny etap polegał na sporządzeniu 10 krotnych rozcieńczeń poprzez dodatnie 10 µl roztworu o znanej liczbie kopii (standard) oraz 90 µl wody. Standardy zostały wykorzystane jako matryce w badaniu real-time PCR. W końcowym etapie wykreślono krzywe standardowe. Dla każdej analizowanej sekwencji została wykreślona oddzielna krzywa standardowa, co posłużyło jako punkt odniesienia dla wyników uzyskanych w real-time PCR.



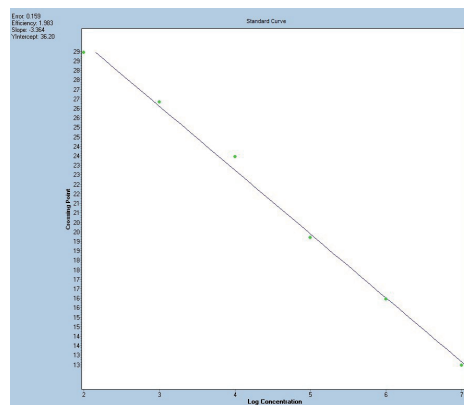
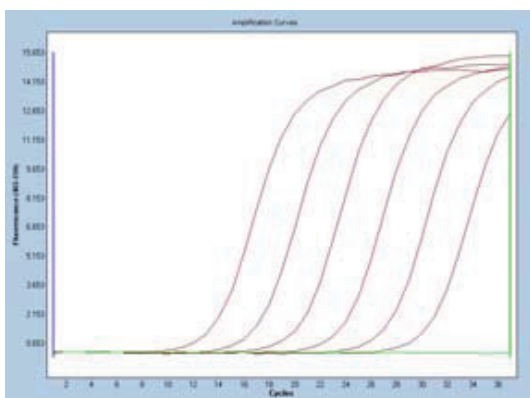
Rycina 1. Krzywa wzrostu logarytmicznego oraz krzywa standardowa genu 18S rRNA



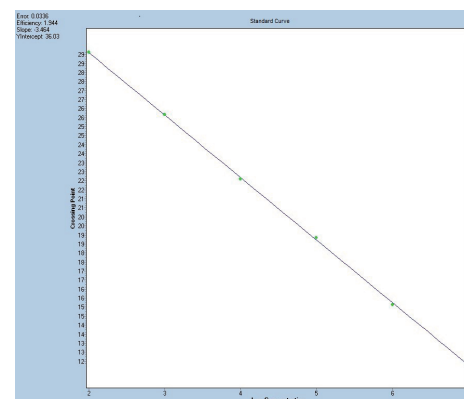
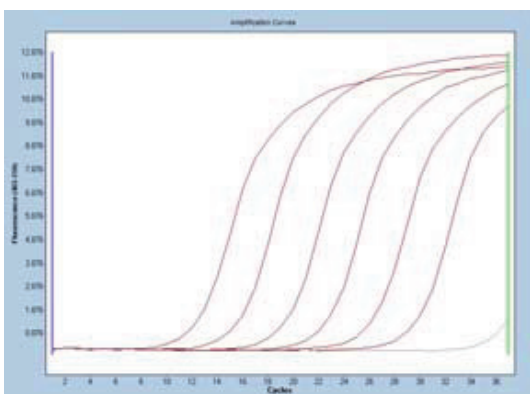
Rycina 2. Krzywa wzrostu logarytmicznego oraz krzywa standardowa genu GAPDH



Rycina 3. Krzywa wzrostu logarytmicznego oraz krzywa standardowa genu IP-10

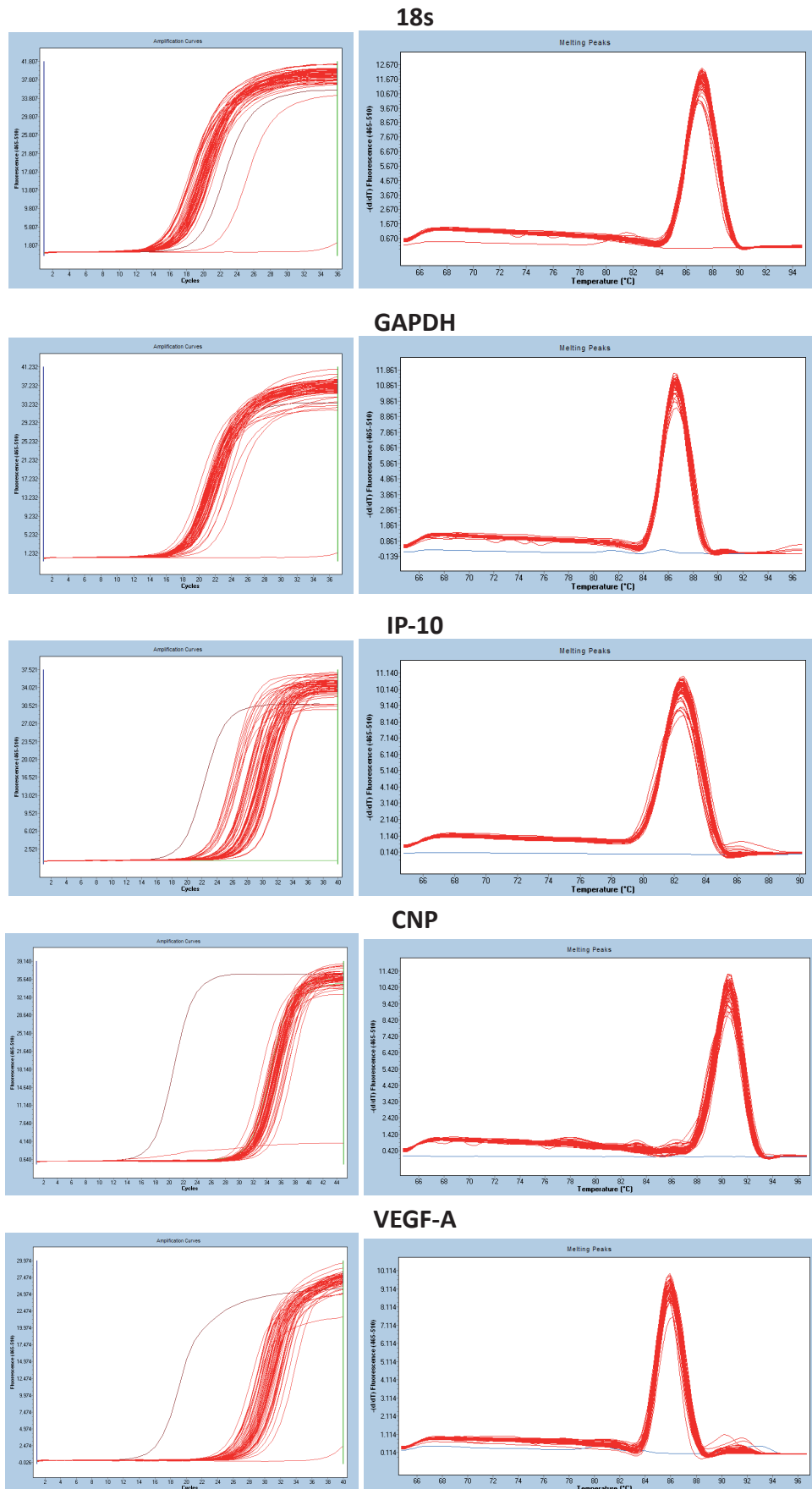


Rycina 4. Krzywa wzrostu logarytmicznego oraz krzywa standardowa genu CNP



Rycina 5. Krzywa wzrostu logarytmicznego oraz krzywa standardowa genu VEGF-A

Każda z prób cDNA amplifikowana była w dwóch powtórzeniach, dla wszystkich analizowanych transkryptów z użyciem komercyjnego zestawu odczynników LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green. Ilościowego określenia liczby kopii badanych transkryptów dokonano na podstawie krzywej standardowej wykonanej dla prób syntetycznego DNA o znanych stężeniach. Uzyskane wyniki przedstawiono jako liczby transkryptów badanych sekwencji (genów) względem średniej z liczby transkryptów dwóch genów referencyjnych.



Rycina 6. Krzywe amplifikacyjne oraz piki topnienia amplikonów wszystkich analizowanych prób

### 3.3.4. Badanie osoczowego stężenia NT-proCNP, VEGF-A, IP-10 metodą immunoenzymatyczną ELISA

Ocenę osoczowego stężenia aminoterminalnego odcinka CNP [*amino-terminal fragment of pro-C-type natriuretic peptide* (NT-proCNP)], VEGF-A, IP-10 wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA, z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów R&D System (Minneapolis, USA). Oznaczenie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta. Wszystkie oznaczenia wykonano w duplikatach.

### 3.4. Analiza statystyczna

W celu opracowania zebranego materiału doświadczalnego zastosowano szereg różnych analiz statystycznych. Do wstępnego opisu wyliczono podstawowe statystyki opisowe, stosowne dla poszczególnych zmiennych. Wszystkie zmienne ciągle przeanalizowano testem *Kolmogorowa-Smirnowa* pod kątem zgodności ich rozkładu z teoretycznym rozkładem normalnym. Do porównań dwóch zmiennych zastosowano test t-Studenta, zarówno dla modelu powiązanego, jak i niepowiązanego. W przypadku porównań więcej niż dwóch grup pomiarów zastosowano test ANOVA w klasyfikacji pojedynczej. W testach przyjęto poziom istotności  $p \leq 0.05$ .

## 4. WYNIKI

### 4.1. Wyniki oceny stanu klinicznego chorych na *morphea*

Wyniki badania podmiotowego chorych na *morphea* wyrażone za pomocą LoSSI, aktywności oraz długości trwania procesu chorobowego przedstawiono w tabeli nr 6.

Obecność współistniejących z *morphea* chorób autoimmunizacyjnych stwierdzono u 4 pacjentów. Dwie pacjentki z GM podawały współwystępowanie zapalenia tarczycy typu Hashimoto, u jednej pacjentki z GM współwystępowało łysienie plackowate, a u kolejnej z MEP bielactwo. Choroby autoimmunizacyjne w rodzinie podawał jeden chory z grupy badanej, a mianowicie u krewnego pierwszego stopnia występowało reumatoidalne zapalenie stawów.

**Tabela 6.** Charakterystyka grupy badanej, LoSSI, aktywność choroby, długość trwania choroby w grupie badanej

		<i>Morphea</i>	Podtypy		
			MEP	LM	GM
Liczba chorych	n	30	16	2	12
	%	100	53	7	40
Długość trwania choroby	Średnia (miesiące)	56,4	59,8	162,0	34,3
	SD	74,4	67,7	195,2	47,9
LoSSI	Średnia	5,6	2,9	4	9,4
	Min.-Max.	1–17	1–10	2–6	5–17
Choroba aktywna/nieaktywna		19/11	8/8	1/1	10/2

MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea*, GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna, LoSSI – wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w *morphea* wg Arkachaisriego i wsp.

### 4.2. Względny poziom transkryptów genu *CNP* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i osoczowe stężenie NT-proCNP u chorych na *morphea*

Uzyskane wartości względnego poziomu transkryptów genu *CNP* w PBMC w całej grupie badanej chorych na *morphea* oraz w poszczególnych odmianach choroby przedstawiono w tabeli nr 7. Natomiast wartości osoczowego stężenia NT-proCNP (pg/ml) w całej grupie badanej chorych na *morphea* oraz w poszczególnych odmianach choroby przedstawiono w tabeli nr 8.

Nie wykazano istotnych różnic zarówno we względnym poziomie transkryptów genu CNP w PBMC w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych ( $p=0,2752$ ) (Rycina 7), jak i w osoczym stężeniu NT-proCNP w grupie badanej względem grupy kontrolnej osób zdrowych ( $p=0,6789$ ) (Rycina 8). Nie wykazano różnic statystycznych we względnym poziomie transkryptów genu CNP w PBMC ( $p=0,7190$ ), jak również w osoczym stężeniu NT-proCNP ( $p=0,2716$ ) w obrębie poszczególnych odmian choroby. Względny poziom transkryptów genu CNP w PBMC, jak i osocze stężenie jego produktu białkowego nie wykazały korelacji ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania.

**Tabela 7.** Względny poziom transkryptów genu CNP w PBMC w grupie badanej i zdrowej grupie kontrolnej

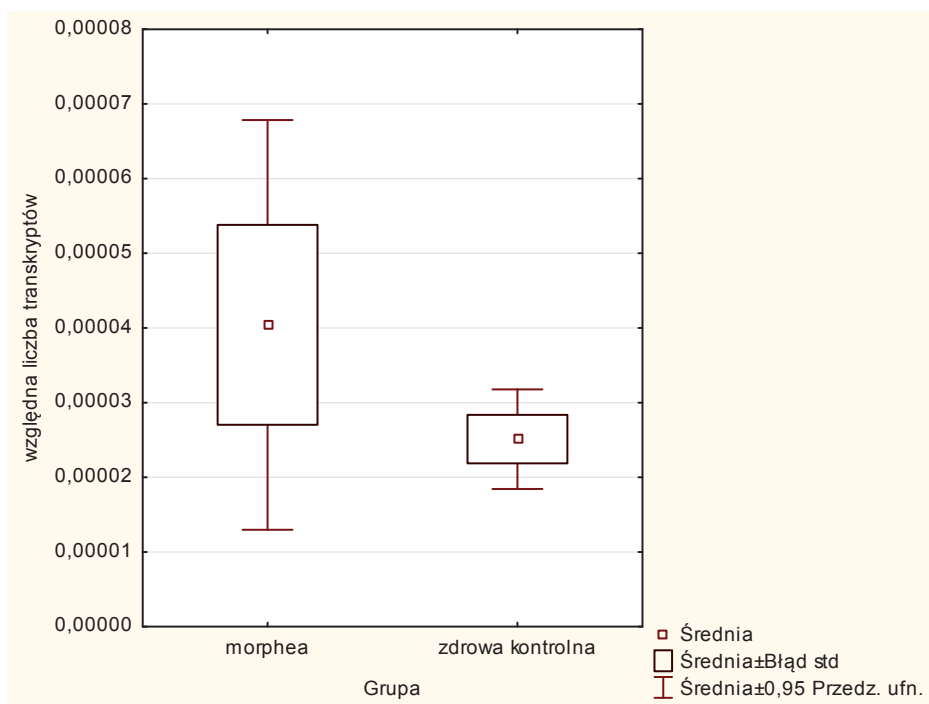
		<i>Morphea</i>	MEP	LM	GM	Kontrola
Względny poziom transkryptów genu CNP	Średnia/ $\pm$ SD	0,00004/ $\pm$ 0,0001	0,00005/ $\pm$ 0,0001	0,00001/ $\pm$ 0,00	0,00003/ $\pm$ 0,00	0,00002/ $\pm$ 0,00
	Min.	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
	Max.	0,00035	0,0004	0,00002	0,0001	0,0001
	n	29	16	2	11	29

PBMC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea*, GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.

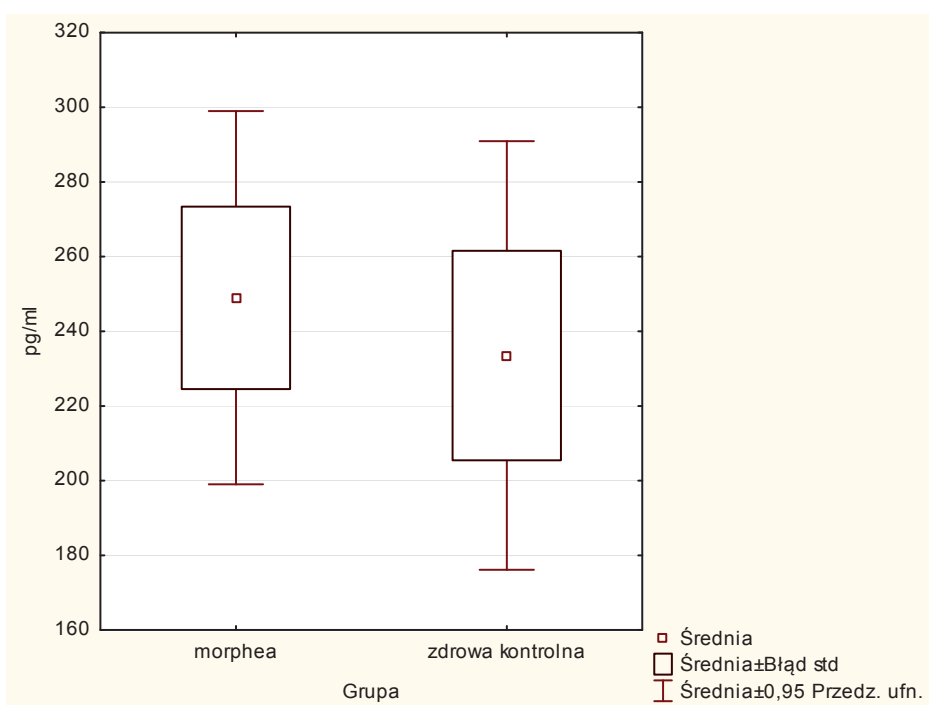
**Tabela 8.** Osocze stężenie NT-proCNP w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej

		<i>Morphea</i>	MEP	LM	GM	Kontrola
Osocze stężenie (pg/ml)	Średnia/ $\pm$ SD	249,0/ $\pm$ 133,8	261,1/ $\pm$ 122,6	370,4/ $\pm$ 28,2	212,5/ $\pm$ 149,5	233,5/ $\pm$ 153,7
	Min.	0,0	0,0	350,5	0,0	0,0
	Max.	442,1	442,1	390,4	392,6	523,0
	n	30	16	2	12	30

MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea*, GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.



**Rycina 7.** Porównanie oznaczenia względnej liczby transkryptów genu CNP pomiędzy grupą badaną i zdrową grupą kontrolną



**Rycina 8.** Porównanie osoczowego stężenia NT-proCNP pomiędzy grupą badaną i zdrową grupą kontrolną



### 4.3. Względny poziom transkryptów genu VEGF-A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i osoczowe stężenie VEGF-A u chorych na *morphea*

Uzyskane wartości względnego poziomu transkryptów genu VEGF-A w PBMC w całej grupie badanej chorych na *morphea* oraz w poszczególnych odmianach choroby przedstawiono w tabeli nr 9. Natomiast wartości osoczowego stężenia VEGF-A (pg/ml) w całej grupie badanej chorych na *morphea* oraz w poszczególnych odmianach choroby przedstawiono w tabeli nr 10.

Ocena względnego poziomu transkryptów genu VEGF-A w PBMC w grupie chorych na *morphea* nie wykazała istotnej różnicy w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych ( $p=0,1836$ ) (Rycina 9). Nie wykazano również istotnej różnicy pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną osób zdrowych w osoczowym stężeniu VEGF-A ( $p=0,9723$ ) (Rycina 10). Nie odnotowano istotnej różnicy we względnym poziomie transkryptów genu VEGF-A w PBMC ( $p=0,4150$ ), jak również w osoczowym stężeniu VEGF-A ( $p=0,8431$ ) w obrębie poszczególnych odmian choroby. Zarówno względny poziom transkryptów genu VEGF-A w PBMC, jak i osoczowe stężenie jego produktu białkowego nie wykazały korelacji ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania.

**Tabela 9.** Względny poziom transkryptów genu VEGF-A w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej

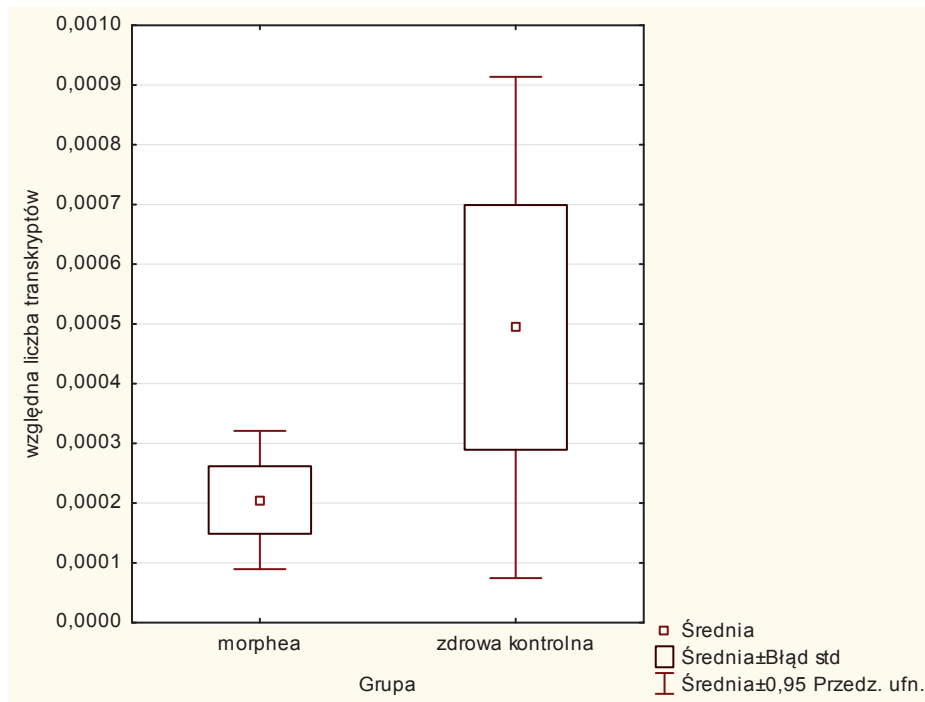
		<i>Morphea</i>	MEP	LM	GM	Kontrola
Względny poziom transkryptów genu VEGF-A	Średnia/±SD	0,0002/ ±0,0003	0,0003/ ±0,0004	0,0001/ ±0,00	0,0001/ ±0,0001	0,0005/ ±0,0011
	Min.	0,00002	0,00004	0,00	0,00006	0,00006
	Max.	0,0015	0,0015	0,0001	0,0002	0,0051
	n	29	16	2	11	29

PBMC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea*, GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.

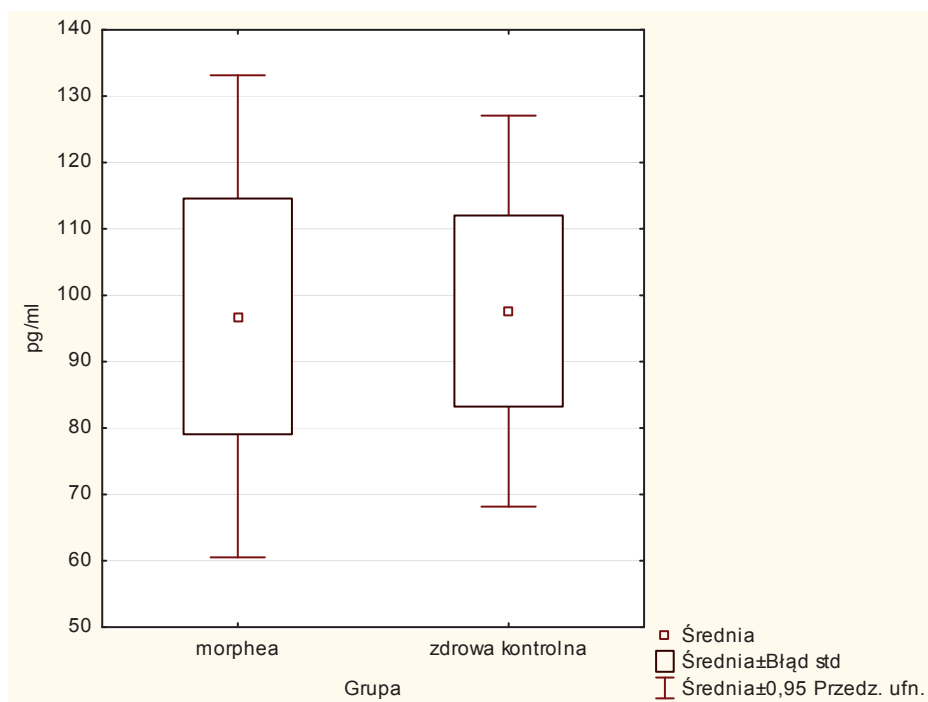
**Tabela 10.** Osoczowe stężenie VEGF-A w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej

		<i>Morphea</i>	MEP	LM	GM	Kontrola
Osoczowe stężenie (pg/ml)	Średnia /±SD	96,8/±97,3	92,1/±99,5	68,4/±5,0	107,9/±105,5	97,6/±78,9
	Min.	1,4	1,4	64,9	25,6	0,0
	Max.	417,7	340,5	72,0	417,7	303,6
	n	30	16	2	12	30

MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea*, GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.



**Rycina 9.** Porównanie oznaczenia względnej liczby transkryptów genu VEGF-A pomiędzy grupą badaną i zdrową grupą kontrolną



**Rycina 10.** Porównanie osoczowego stężenia VEGF-A pomiędzy grupą badaną i zdrową grupą kontrolną

#### 4.4. Względny poziom transkryptów genu IP-10 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i osoczowe stężenie IP-10 u chorych na *morphea*

Uzyskane wartości względnego poziomu transkryptów genu IP-10 w PBMC w całej grupie badanej chorych na *morphea* oraz w poszczególnych odmianach choroby przedstawiono w tabeli nr 11. Natomiast wartości osoczowego stężenia IP-10 (pg/ml) w całej grupie badanej chorych na *morphea* oraz w poszczególnych odmianach choroby przedstawiono w tabeli nr 12. Ocena względnego poziomu transkryptów genu IP-10 w PBMC wykazała statystycznie niższe wartości w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych ( $p=0,0023$ ) (Rycina 11). Ponadto odnotowano istotnie wyższe osoczowe stężenie IP-10 w grupie chorych na *morphea* w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych ( $p=0,0225$ ) (Rycina 12). Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic we względnym poziomie transkryptów genu IP-10 w PBMC ( $p=0,1688$ ), ani w osoczym stężeniu badanej cytokiny ( $p=0,0973$ ) w obrębie poszczególnych odmian choroby. W grupie badanej udowodniono korelację pomiędzy osoczym stężeniem IP-10, a LoSSI ( $p<0,0001$ ) (wartość  $r=0,66$ ) (Rycina 13). Z kolei względny poziom transkryptów genu IP-10 w PBMC, jak i osoczowe stężenie jego produktu białkowego nie wykazały korelacji ze zmiennymi, takimi jak aktywność choroby czy długość jej trwania.

**Tabela 11.** Względny poziom transkryptów genu IP-10 w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej

		<i>Morphea</i>	MEP	LM	GM	Kontrola
Względny poziom transkryptów genu IP10	Średnia / $\pm$ SD	0,0036*/ $\pm 0,0027$	0,0028/ $\pm 0,0018$	0,0037/ $\pm 0,0049$	0,0048/ $\pm 0,0033$	0,0078*/ $\pm 0,0064$
	Min.	0,0003	0,0008	0,0003	0,0012	0,001
	Max.	0,0113	0,0074	0,0072	0,0113	0,0241
	n	29	16	2	11	29

PBMC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea*, GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.

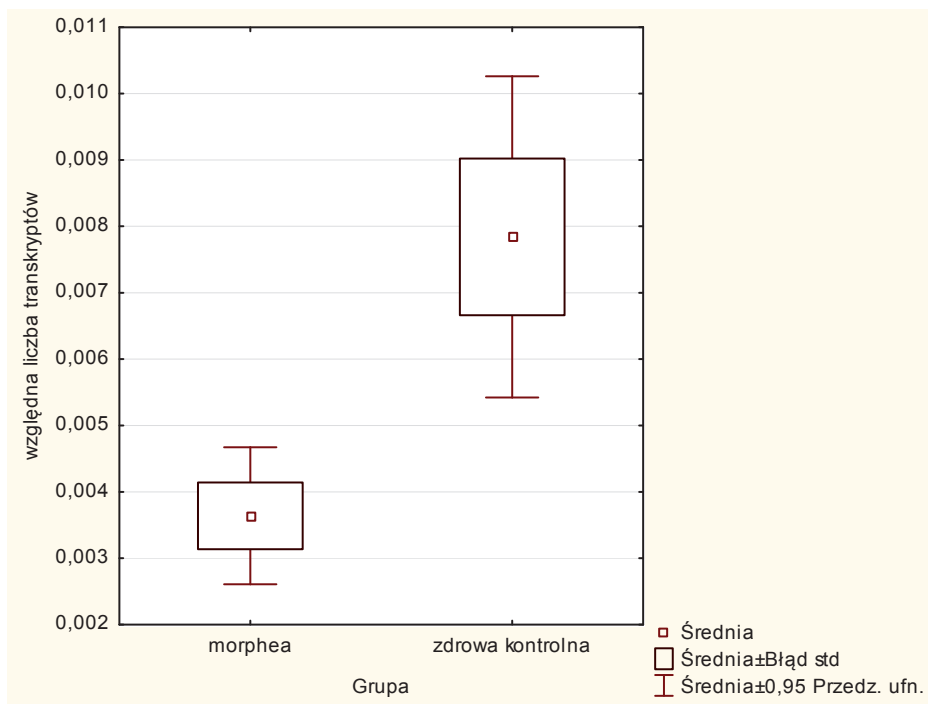
**\*p = 0,0023**

**Tabela 12.** Osoczowe stężenie IP-10 w grupie badanej i w grupie kontrolnej zdrowej

		<i>Morphea</i>	MEP	LM	GM	Kontrola
Osoczowe stężenie (pg/ml)	Średnia / $\pm$ SD	218,6*/ $\pm 155,0$	169,5/ $\pm 115,8$	165,4/ $\pm 11,4$	292,9/ $\pm 187,2$	139,2*/ $\pm 102,0$
	Min.	63,7	63,7	157,4	97,5	37,6
	Max.	525,0	525,0	173,5	525,0	525,0
	n	30	16	2	12	30

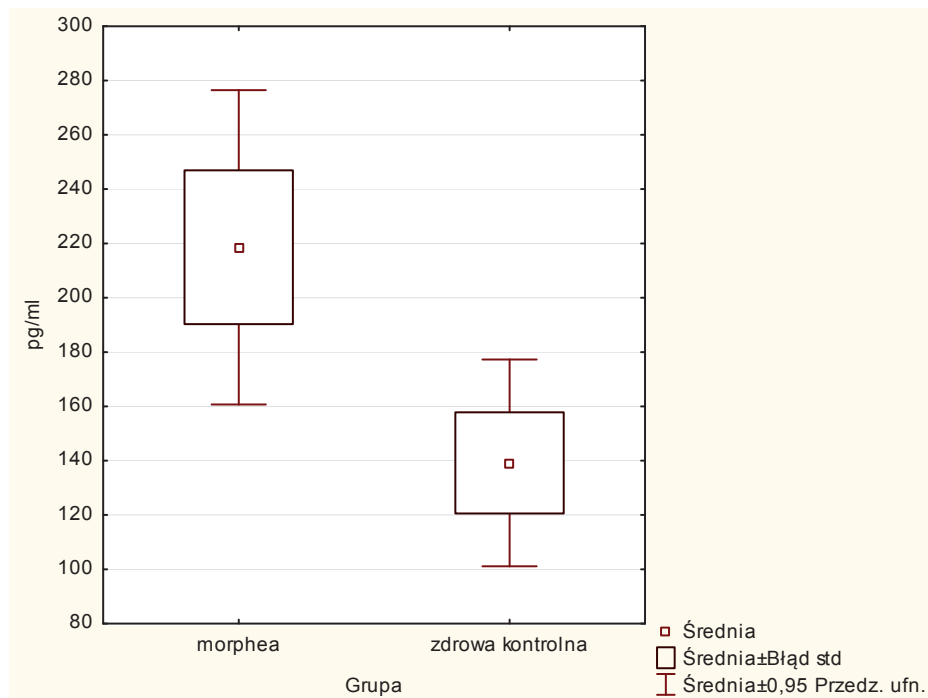
MEP – odmiana plackowata *morphea*, LM – odmiana linijna *morphea*, GM – odmiana uogólniona *morphea*, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.

**\*p = 0,0225**



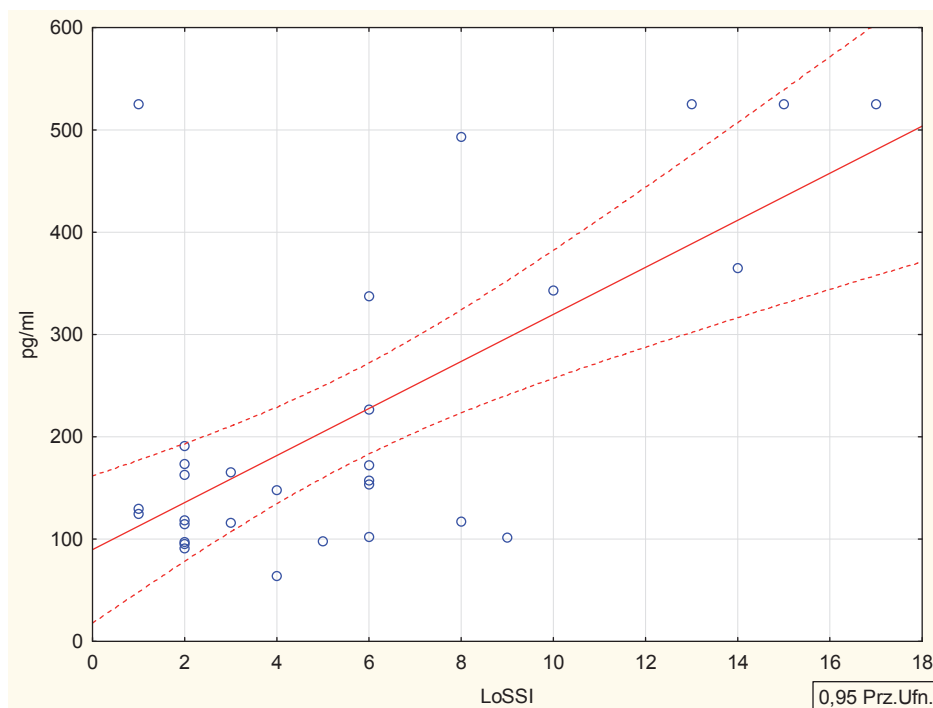
**p = 0,0023**

**Rycina 11.** Porównanie oznaczenia względnego poziomu transkryptów genu IP-10 pomiędzy grupą badaną i zdrową grupą kontrolną



**p = 0,0225**

**Rycina 12.** Porównanie osoczowego stężenia IP-10 pomiędzy grupą badaną i zdrową grupą kontrolną



LoSSI – wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w *morphea* wg Arkachaisriego i wsp.;  $p < 0,0001$

**Rycina 13.** Korelacja pomiędzy osoczowym stężeniem IP-10 w grupie badanej, a LoSSI

#### 4.5. Ocena osoczowego stężenia NT-proCNP, VEGF-A, oraz IP-10 u chorych na postać ograniczoną twardziny układowej w porównaniu z grupą chorych na *morphea* oraz grupą zdrowych ochotników

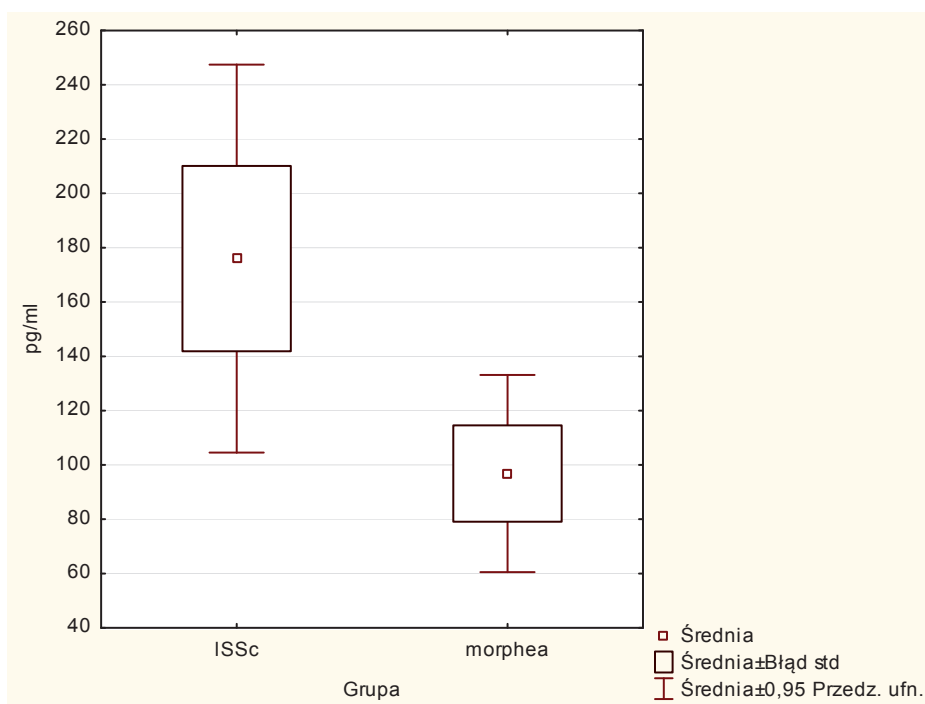
Uzyskane wartości osoczowego stężenia NT-proCNP, VEGF-A oraz IP-10 (pg/ml) w całej grupie badanej chorych na *morphea* oraz w grupie chorych na ISSc przedstawiono w tabeli 12. Odnotowano istotnie wyższe osoczowe stężenie VEGF-A w grupie chorych na ISSc zarówno w odniesieniu do grupy badanej ( $p=0,0295$ ) (Rycina 14), jak i do grupy kontrolnej zdrowych ochotników ( $p=0,0212$ ) (Rycina 15). Ponadto wykazano istotnie wyższe osoczowe stężenie IP-10 w grupie chorych na ISSc w porównaniu z grupą badaną ( $p=0,0070$ ) (Rycina 16), jak i grupą kontrolną zdrowych ochotników ( $p<0,0001$ ) (Rycina 17). Nie wykazano istotnych różnic w osoczowym stężeniu NT-proCNP w grupie ISSc w porównaniu do grupy badanej ( $p=0,7740$ ) (Rycina 18) i grupy kontrolnej zdrowych ochotników ( $p=0,9391$ ) (Rycina 19).

**Tabela 13.** Osoczowe stężenie (pg/ml): NT-proCNP, VEGF-A, IP-10 w grupie chorych na ISSc, grupie badanej i zdrowej grupie kontrolnej

		ISSc	<i>Morphea</i>	Kontrola
NT-proCNP [pg/ml]	Średnia/ $\pm$ SD	236,9/ $\pm$ 158,9	249,0/ $\pm$ 133,8	233,5/ $\pm$ 153,7
	Min.	0,0	0,0	0,0
	Max.	457,8	442,1	523,0
	n	20	30	30
VEGF-A [pg/ml]	Średnia/ $\pm$ SD	176,0*/ $\pm$ 152,6	96,8*/ $\pm$ 97,3	97,6*/ $\pm$ 78,9
	Min.	5,3	1,4	0,0
	Max.	529,1	417,7	303,6
	n	20	30	30
IP-10 [pg/ml]	Średnia/ $\pm$ SD	344,7*/ $\pm$ 155,5	218,6*/ $\pm$ 155,0	139,2*/ $\pm$ 102,0
	Min.	112,8	63,7	37,6
	Max.	525,0	525,0	525,0
	n	20	30	30

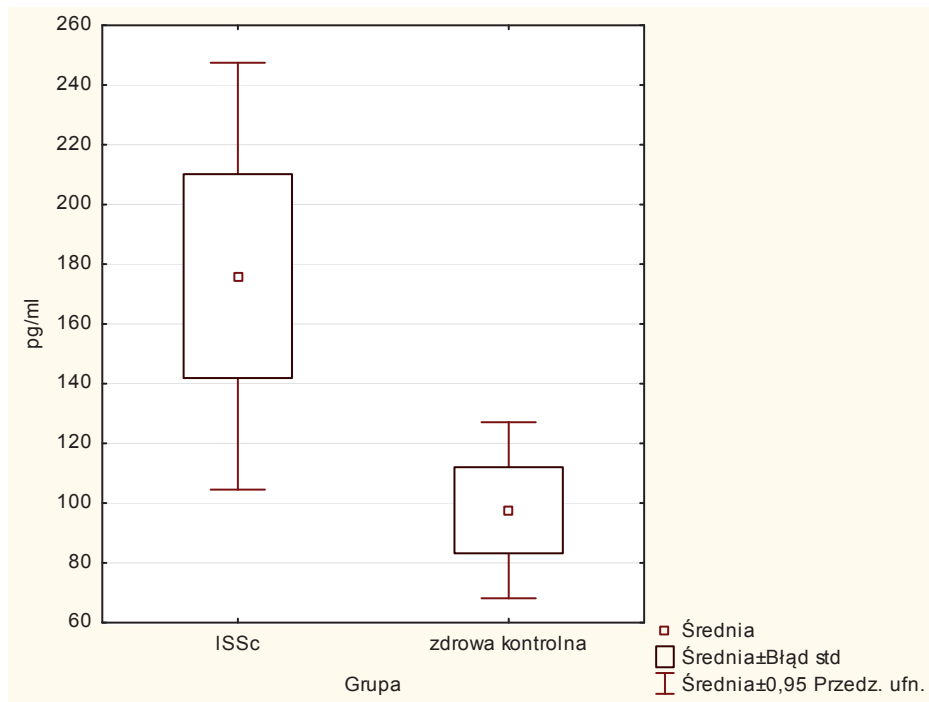
ISSc – postać ograniczona twardziny układowej, n – liczebność grupy, SD – odchylenie standardowe, Min. – wartość minimalna, Max. – wartość maksymalna.

\* istotność statystyczna ( $p \leq 0,05$ )



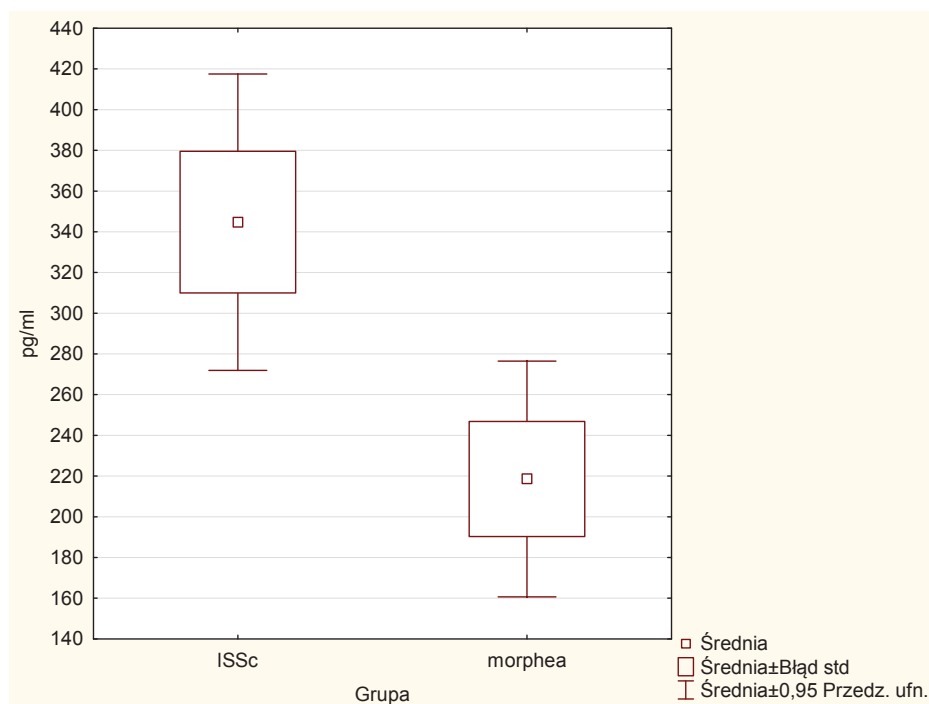
ISSc – postać ograniczona twardziny układowej;  $p=0,0295$

**Rycina 14.** Porównanie osoczowego stężenia VEGF-A pomiędzy grupą chorych na ISSc i grupą badaną



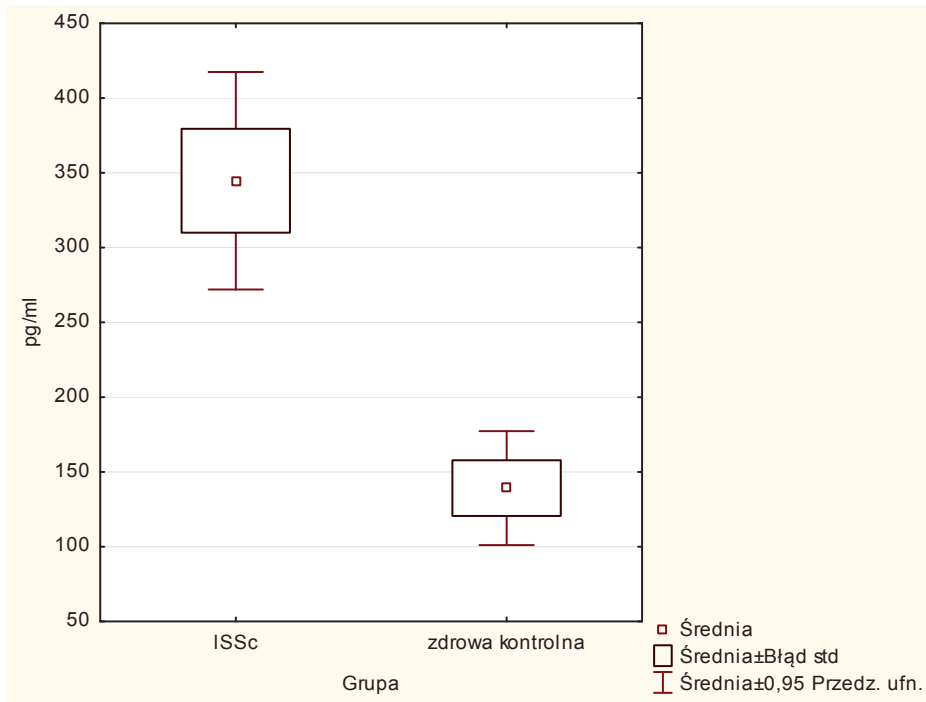
ISSc – postać ograniczona twardziny układowej;  $p=0,0212$

**Rycina 15.** Porównanie osoczowego stężenia VEGF-A pomiędzy grupą chorych na ISSc i zdrową grupą kontrolną



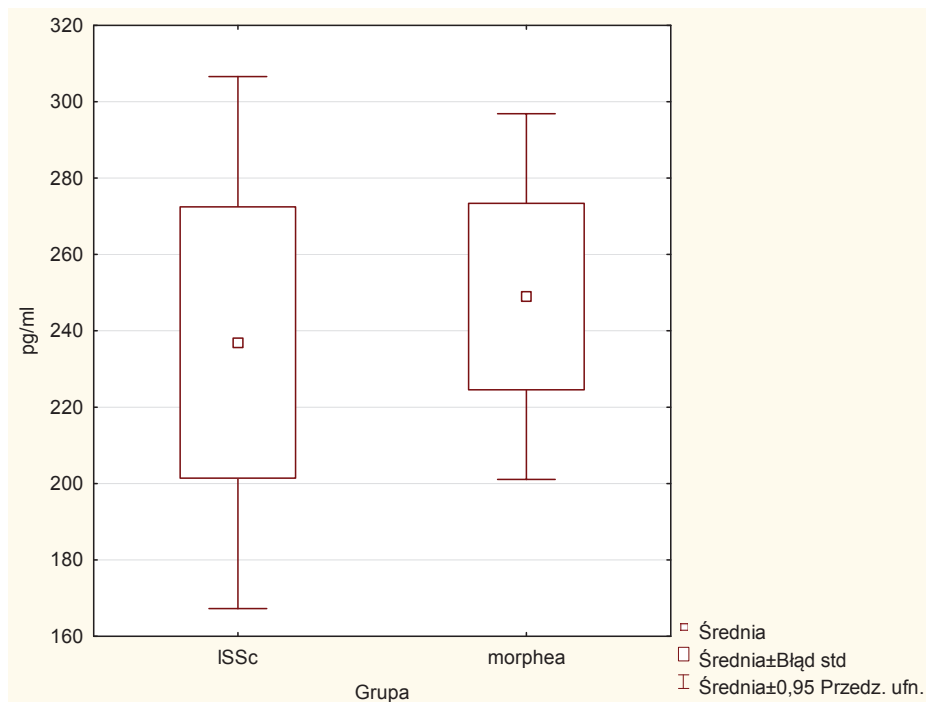
ISSc – postać ograniczona twardziny układowej;  $p=0,0070$

**Rycina 16.** Porównanie osoczowego stężenia IP-10 pomiędzy grupą chorych na ISSc i grupą badaną



ISSc – postać ograniczona twardziny układowej;  $p < 0,0001$

**Rycina 17.** Porównanie osoczowego stężenia IP-10 pomiędzy grupą chorych na ISSc i zdrową grupą kontrolną



ISSc – postać ograniczona twardziny układowej

**Rycina 18.** Porównanie osoczowego stężenia NT-proCNP pomiędzy grupą chorych na ISSc i grupą badaną





ISSc – postać ograniczona twardziny układowej

**Rycina 19.** Porównanie osoczowego stężenia NT-proCNP pomiędzy grupą chorych na ISSc i zdrową grupą kontrolną

#### 4.6. Ocena zależności pomiędzy badanymi genami oraz osoczowym stężeniem ich produktów białkowych u chorych na *morphea*

Uzyskane wartości względnego poziomu transkryptów genów: CNP VEGF-A, IP-10 w PBMC w całej grupie badanej chorych na *morphea* przedstawiono w tabelach nr: 7, 9, 11.

Wykazano korelację pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu VEGF-A, a genu CNP w PBMC w grupie badanej chorych na *morphea* ( $p=0,0001$ ). Nie wykazano istotnej zależności zarówno pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu VEGF-A, a genu IP-10 ( $p=0,5219$ ), jak również pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu CNP, a genu IP-10 ( $p=0,5470$ ) w PBMC u chorych z grupy badanej. Uzyskane wartości osoczowego stężenia NT-proCNP, VEGF-A, oraz IP-10 (pg/ml) w całej grupie badanej chorych na *morphea* przedstawiono w tabeli nr 13. Nie wykazano korelacji zarówno pomiędzy osoczowym stężeniem NT-proCNP, a VEGF-A ( $p=0,3926$ ), jak również pomiędzy VEGF-A, a IP-10 ( $p=0,8790$ ) oraz IP-10, a NT-proCNP ( $p=0,9883$ ). Nie stwierdzono korelacji zarówno pomiędzy osoczowym stężeniem NT-proCNP, a względnym poziomem transkryptów genu zarówno dla VEGF-A ( $p=0,6615$ ), jak i dla IP-10 ( $p=0,2512$ ). Nie wykazano korelacji pomiędzy osoczowym stężeniem VEGF-A, a względnym poziomem transkryptów genu zarówno dla CNP ( $p=0,0990$ ), jak i dla IP-10 ( $p=0,9545$ ). Nie odnotowano korelacji zarówno pomiędzy osoczowym stężeniem IP-10, a względnym poziomem transkryptów genu zarówno dla CNP ( $p=0,5358$ ), jak i dla VEGF-A ( $p=0,6757$ ).

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

*Morphea* należy do grupy chorób tkanki łącznej, w której proces włóknienia dotyczy skóry w odróżnieniu do SSc, gdzie zjawisko włóknienia może dotyczyć również narządów wewnętrznych. Mechanizm powstawania stwardnień skóry pozostaje nadal niedokładnie poznany. Wiadomo jednak, że jest on wynikiem złożonych zaburzeń naczyniowych, immunologicznych, jak również wzmożonej syntezy kolagenu i ECM (Vierra E 1999, Chung L 2006, Gupta RA 2007, Kreuter A 2009, Fett N 2011, Kurzinski K 2011, Kreuter A 2012). Patogenezę obu wymienionych wyżej chorób charakteryzuje wczesna faza zapalenia (zwana fazą aktywną) oraz późna faza włóknienia. W badaniu histopatologicznym faza zapalenia charakteryzuje się obfitymi naciekami zapalnymi, zlokalizowanymi głównie wokół naczyń krwionośnych warstwy siateczkowatej skóry właściwej. Naczynia krwionośne wykazują poszerzone światło, a śródbłonek łagodny obrzęk. Natomiast w fazie włóknienia obserwuje się zanik naczyń krwionośnych, jak również zwłóknienie ich ścian. Zmiany w naczyniach krwionośnych i komórkach EC są najwcześniejszymi cechami obserwowanymi w badaniu histopatologicznym. Dominującymi komórkami nacieku zapalnego w fazie wczesnej są limfocyty, z towarzyszącą domieszką komórek plazmatycznych i eozynofili, natomiast w fazie późnej zmniejsza się liczba komórek zapalnych, a dominującym staje się proces włóknienia (Dziankowska-Bartkowiak B 2009, Succaria F 2013). W odpowiedzi na uszkodzenie EC dochodzi do aktywacji MMP, co prowadzi do destrukcji ECM, uwolnienia czynników proangiogennych, jak również molekuł adhezyjnych, które przyciągają krążące PBMC. Efektem końcowym opisanych procesów jak zjawisko włóknienia tkanek (Sgonc R 1996, Kreuter A 2009, Dziankowska-Bartkowiak B 2009, Hummers LK 2009).

W kontekście zaburzeń naczyniowych zwraca się uwagę na uszkodzenie EC, jak również nieprawidłowości w zakresie angio- i waskulogenezy (Distler O 2004, Dziankowska-Bartkowiak B 2009). Czynniki inicjujące uszkodzenie EC nadal pozostają niewyjaśnione, a procesy te mają miejsce na wczesnym etapie choroby (Hummers LK 2009). Dane literaturowe coraz częściej wskazują na zaburzenia równowagi w zakresie czynników pro i antyangiogennych. Wiązać może się to z progresją choroby (Distler O 2002, Dziankowska-Bartkowiak B 2006, Hummers LK 2009). Angiogeneza jest złożonym, wielostopniowym procesem tworzenia nowych naczyń krwionośnych z wcześniej istniejących, pozostającym pod ścisłym nadzorem czynników pro i antyangiogennych. Zjawisko to ma miejsce zarówno w warunkach fizjologicznych, takich jak embriogeneza, naprawa tkanek po urazie czy cykl menstruacyjny u kobiet, jak i patologicznych obejmujących przewlekłe procesy zapalne, choroby nowotworowe czy choroby przebiegające z włóknieniem (Doi K 1996, Strieter RM 2005, Riccieri V 2011). W warunkach fizjologicznych zachowana jest ścisła równowaga pomiędzy czynnikami pobudzającymi i hamującymi angiogenezę, natomiast pod wpływem określonych czynników stymulujących, takich jak niedotle-

nienie lub niedokrwienie tkanek następuje pobudzenie czynników proangiogennych i indukcja angiogenezy (Carmeliet P 2000, Distler O 2002, Rabquer BJ 2011, Riccieri V 2011).

Do znanych czynników pobudzających angiogenezę należą: VEGF i jego receptory, PDGF, TGF- $\beta$ , czynnik wzrostu fibroblastów [*fibroblast growth factor* (FGF-2)]- 2, angiopoetyna-1, endotelina-1, czynnik pochodzący z komórek zrębowych [*stromal cell-derived factor* (SDF-1/CXCL12)]-1, czynnik wzrostu hepatocytów [*hepatocyte growth factor* (HGF)], IGF, TNF- $\alpha$  i  $\beta$ , kalikreiny, IL-6, IL-8 i inne. Z kolei do czynników hamujących angiogenezę (antyangiogennych/angiostatycznych) zaliczamy m.in. IP-10, endostatynę, angiostatynę, angiopoetynę-2, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-12 (Strieter RM 2005, Manetti M 2010, Liakouli V 2011). Najlepiej poznane czynniki pro i antyangiogenne przedstawiono w tabeli nr 14.

**Tabela 14.** Czynniki pro i antyangiogenne

Czynniki proangiogenne	Czynniki antyangiogenne
VEGF	Angiostatyna
TGF- $\beta$	Endostatyna
PDGF	Angiopoetyna-2
FGF-2	IL-12
Angiopoetyna-1	IFN- $\alpha$
Endotelina-1	IFN- $\gamma$
SDF1/CXCL12	IP-10/CXCL10
tkankowe kalikreiny	
HGF	
IL-6	
IL-8	
TNF- $\alpha$ i $\beta$	

W chorobach z kręgu twardziny, pomimo ewidentnych objawów niedokrwienia i niedotlenienia tkanek, brak jest cech efektywnej angiogenezy (Riccieri V 2011). Pomimo to, u chorych na SSc stwierdza się zwiększoną ekspresję, bądź stężenie wielu czynników proangiogennych, takich jak: VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1, FGF-2, łożyskowy czynnik wzrostu [*placental growth factor* (PlGF)], VCAM-1, ICAM-1, endotelina-1, E-selektyny i P-selektyny, IL-8, TNF- $\alpha$  (Distler O 2002, Distler O 2004, Hummers L.K. 2009, Riccieri V 2011). Doniesienia na temat roli tych czynników w *morphea* są nieliczne (Ihn H 1994b, Ihn H 1995, Nagaoka T 2000, Hasegawa M 2003, Uziel Y 2007, Dziańkowska-Bartkowiak B 2009, Kurzinski K 2011). Zaniki naczyń krwionośnych są widoczne zarówno w badaniu histopatologicznym w ogniskach stwardniałej skóry u chorych na *morphea* i SSc, natomiast w przypadku SSc nieprawidłowości w zakresie mikrokrażenia, można uwidocznić dodatkowo w badaniu kapilaroskopowym wałów okołopaznokciowych (Riccieri V 2011). Poza uszkodzeniem EC, zaburzeniami w zakresie angio i waskulogenezy obserwuje się również upośledzenie przepływu krwi, adhezję leukocytów do EC,

przenikanie leukocytów do otaczających tkanek, a w rezultacie wzbudzenie stanu zapalnego oraz pobudzenie fibroblastów do nadmiernej produkcji kolagenu i składników ECM (Dziankowska-Bartkowiak B 2009, Riccieri V 2011).

Co więcej, aktualnie nie dysponujemy znajomością markerów świadczących o aktywności, czy stopniu zaawansowania *morphea*, a co się z tym wiąże posiadamy ograniczoną możliwość działań terapeutycznych na wczesnym, potencjalnie odwracalnym etapie choroby, poprzedzającym proces włóknienia tkanek (Uziel Y 2007, Hummers LK 2009, Manetti M 2011b).

## 5.1. Znaczenie CNP w *morphea*

Jednym z najwcześniejszych etapów patogenezy *morphea* jest uszkodzenie EC, które są głównym źródłem CNP (Stingo AJ 1992). CNP, będący białkiem o aktywności naczyniowej należy do rodziny peptydów natriuretycznych [*natriuretic peptides* (NP)], których przedstawicielami są również przedsionkowy peptyd natriuretyczny [*atrial natriuretic peptide* (ANP)], mózgowy peptyd natriuretyczny [*brain natriuretic peptide* (BNP)], urodylatyna oraz DNP (*dendroaspis natriuretic peptide*), który nie występuje w ludzkim organizmie. Wszystkie NP syntetyzowane są z prohormonów, posiadają 17-aminokwasową strukturę pierścieniową, zawierającą dwie reszty cysteinowe, połączone wewnętrznym mostkiem dwusiarczkowym. Działają one przede wszystkim moczopędnie, natriuretycznie oraz wazodylatacyjnie, ponadto wywierają wpływ na układ nerwowy oraz hormonalny (Stryjewski PJ 2013).

CNP został odkryty w 1990 roku jako trzeci członek rodziny NP, a wyizolowano go w ekstraktach mózgu świń (Sudoh T 1990). Gen dla CNP znajduje się na chromosomie 2 w lokalizacji 2q24 (Potter LR 2009), a jego produkcja ma miejsce głównie w EC, a także w chondrocytach oraz ośrodkowym układzie nerwowym (Stingo AJ 1992, Potter LR 2009). Ekspresję CNP wykazywano także w PBMC, z jej następowym zwiększeniem po stymulacji lipopolisacharydami (Bruckmeier M 2012). Po odcięciu N-końcowego 23-aminokwasowego peptydu sygnałowego od 126-aminokwasowego białka (preproCNP), wytwarzany jest składający się ze 103-aminokwasów propeptyd CNP (proCNP), który następnie przekształcany jest przez wewnątrzkomórkową proteazę w CNP złożony z 53 aminokwasów oraz 50-aminokwasowy N-końcowy fragment CNP (NT-proCNP), który jest formą bardziej stabilną i z tego powodu służy do określania osoczowego, bądź surowiczego stężenia CNP (Prickett TC 2001, Stryjewski PJ 2013). Natomiast w tkankach dominuje forma 53-aminokwasowa, a obok niej występuje krótsza forma 22-aminokwasowa (Sudoh T 1990, Stingo AJ 1992, Prickett TC 2001, Malinowski M 2006, Stryjewski PJ 2013).

NP działają poprzez natriuretyczne receptory peptydowe. Dotychczas zidentyfikowano trzy receptory: receptor peptydów natriuretycznych typu A (NPR-A/NPR1), receptor peptydów natriuretycznych typu B (NPR-B/NPR2) oraz receptor peptydów natriuretycznych typu C (NPR-C/NPR3), z których dwa pierwsze będąc biologicznie aktywnymi białkami błonowymi posiadają aktywność cyklazy guanylowej, przekształcają GTP w cykliczny GMP (cGMP). Zewnątrz-

komórkowy odcinek łańcucha peptydowego zawiera domenę wiążącą hormon natriuretyczny, natomiast część wewnątrzkomórkowa białka receptorowego zawiera proksymalnie domenę wykazującą aktywność kinazy, a dystalnie centrum aktywne cykazy guanylowej. Kinaza służy za czynnik sprzęgający zewnątrzkomórkową domenę receptorową z wykazującą aktywność cykazy guanylowej domeną wewnątrzkomórkową. NPR-B wykazuje największe powinowactwo dla CNP i zlokalizowany jest głównie w mięśniach gładkich obwodowych naczyń krwionośnych, jak również w centralnym układzie nerwowym. Natomiast NPR-A wykazuje większe powinowactwo do ANP, BNP i DNP, a umiejscowiony jest w: nerkach, nadnerczach, płucach, mózgu, sercu, tkance tłuszczowej oraz mięśniach gładkich naczyń krwionośnych (Suga S 1992, Stryjewski PJ 2013). NPR-C jest receptorem degradującym dla NP, a jego nazwa wywodzi się od angielskiego słowa oczyszczanie (ang. *clearance*). Z uwagi na różnice w powinowactwie do receptora, okres półtrwania poszczególnych NP jest odmienny, z czego CNP posiada najkrótszy okres półtrwania- 2,6 minuty. Degradowanie NP odbywa się nie tylko przez receptor NPR-C. W procesie usuwania NP z krwiobiegu bierze udział również neutralna endopeptydaza (NEP 24.11), będąca ektoenzymem syntetyzowanym głównie w EC. NEP wykazuje największe powinowactwo do CNP, który hydrolizowany jest 2-krotnie szybciej od ANP i 30-krotnie szybciej od BNP (Suga S 1992, Hunt PJ 1994, Malinowski M 2006, Stryjewski PJ 2013). NT-proCNP, posiadający dłuższy okres półtrwania od CNP i służący głównie do oznaczania osoczowego stężenia tego białka, nie ulega tak łatwo degradacji zarówno w mechanizmie wiązania się z receptorem NPR-C, jak i rozkładu przez NEP. Ze względu na to, że jego produkcja ma miejsce głównie w EC, uważa się, że pomiar jego stężenia może pośrednio świadczyć o ich aktywności zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w stanach chorobowych (Prickett TC 2001). Produkcja i uwalnianie CNP z EC regulowane jest za pomocą różnych cytokin i czynników wzrostu. Do najsilniejszych stymulatorów należą między innymi czynniki zaangażowane w patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem, takie jak TNF- $\alpha$  czy TGF- $\beta$  (Suga S 1992, Suga S 1998, Malinowski M 2006). Z drugiej strony, działanie hamujące uwalnianie CNP z EC wykazuje jeden z najsilniejszych czynników proangiogennych, czyli VEGF (Doi K 1996).

CNP charakteryzuje się szerokim zakresem działania, aczkolwiek jego właściwości natriuretyczne i diuretyczne są znacznie słabsze niż ANP i BNP (Hunt PJ 1994). Poza działaniem wazodylatacyjnym CNP wykazuje również działania cytoprotekcyjne, przeciwzapalne, przeciwpłytkowe i przeciwlukocytarne (Scotland RS 2005). Udowodniono hamujący wpływ CNP na proliferację komórek mięśni gładkich naczyń [*vascular smooth cell muscle (VSCM)*], jak również na sekrecję endoteliny-1, która jest silnym czynnikiem obkurczającym naczynia (Kohno M 1992, Suga S 1998). Działanie przeciwzapalne CNP związane jest z hamowaniem rekrutacji leukocytów do ognisk zapalnych, co częściowo wynika z hamowania wydzielania rozpuszczalnej postaci selektyny P [*soluble P-selectin*] (Scotland RS 2005).

Dane literaturowe wskazują na podwyższone osoczowe stężenie CNP u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, czy w przebiegu wstrząsu toksycznego (Totsune K 1994, Hama N

1994, Prickett TC 2001). Ze względu na właściwości wazodylatacyjne, cytoprotekcyjne i przeciwzapalne zwrócono uwagę na znaczenie CNP w prewencji miażdżycy naczyń krwionośnych (Suga S 1998). CNP ma również hamować włóknienie płuc indukowane bleomycyną (Murakami S 2004). Właściwości cytoprotekcyjne CNP skłoniły badaczy do pochylenia się nad rolą tego białka w chorobach autoimmunizacyjnych związanych z zaburzeniami angiogenezy. Doniesienia literaturowe dotyczące znaczenia CNP w patogenezie tych chorób są jednak nadal nieliczne. Olewicz-Gawlik i wsp. wykazali istotnie wyższe surowicze stężenie NT-proCNP u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną, a jego stężenie korelowało ze stężeniem rozpuszczalnej E-selektyny, markera aktywacji EC (Olewicz-Gawlik A 2010). Ta sama grupa badaczy podjęła nowatorską próbę określenia surowiczego poziomu NT-proCNP w grupie chorych na SSc. Nie stwierdzono istotnych różnic w surowiczym stężeniu NT-proCNP w grupie badanej w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, ale co ciekawe w grupie badanej stężenie NT-proCNP korelowało z czasem trwania choroby i stężeniem białka C reaktywnego, co pośrednio świadczyć może o tym, iż obecność NT-proCNP jest wynikiem procesów zapalnych w przebiegu choroby (Olewicz Gawlik A 2010).

W prezentowanych badaniach podjęto się oceny osoczowego stężenia NT-proCNP oraz względnego poziomu transkryptów genu CNP w PMBC u chorych na *morphea*. Analizując wyniki osoczowego stężenia NT-proCNP nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic u chorych na *morphea* (249,0 pg/ml  $\pm$ 133,8) w porównaniu do grupy kontrolnej chorych na ISSc (236,9 pg/ml  $\pm$ 158,9) oraz grupy zdrowych ochotników (233,5 pg/ml  $\pm$ 153,7). Również względny poziom transkryptów genu CNP w PBMC nie różnił się pomiędzy grupą badaną, a grupą zdrowych ochotników. Badając CNP, zarówno w zakresie osoczowego stężenia, jak i względnego poziomu transkryptów genu w PBMC, nie wykazano korelacji ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania. Podobnie w grupie chorych na ISSc nie wykazano istotnych różnic w osoczowym stężeniu NT-proCNP zarówno w odniesieniu do grupy badanej, jak i grupy kontrolnej zdrowych ochotników.

Do chwili obecnej nie opublikowano badań podejmujących się oceny CNP u chorych na *morphea*, dlatego niemożliwe jest porównanie uzyskanych wyników z doniesieniami innych badaczy. Przeprowadzone badania nie potwierdzają jednak roli tego białka w patogenezie *morphea*, nie można jednak wykluczyć znaczenia zaburzeń w zakresie jego receptorów i nieprawidłowości dotyczących układu CNP- receptor CNP na poziomie tkanki zmienionej chorobowo.

## 5.2. Znaczenie VEGF-A w *morphea*

VEGF jest najsilniejszym promotorem angiogenezy i limfogenezy. Został opisany przez Sengera i wsp. w 1983 roku jako czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń [*vascular permeability factor* (VPF)] charakteryzujący się wybitnym działaniem proangiogennym (Senger DR 1990). VEGF to rodzina siedmiu czynników: VEGF-A, -B, -C, -D, -E (czyli wirusowy homolog VEGF), -F (pochodzący z jadu węży) oraz PlGF. Ich wspólną cechą jest występowanie

w cząsteczce fragmentu zawierającego sekwencję cystein, co umożliwia tworzenie dimerów i mostków siarczkowych (Namięcińska M 2005, Yamazaki Y 2006). Poszczególne czynniki są produktami ekspresji różnych genów, różnią się między sobą strukturą cząsteczki oraz stopniem podobieństwem do VEGF-A, a także odmiennym działaniem biologicznym. Najbardziej znanym spośród całej rodziny jest czynnik VEGF-A, będący produktem genu zlokalizowanego na chromosomie 6 (6p21.3) (Yamazaki Y 2006). W wyniku alternatywnego składowania mRNA, będącego produktem ekspresji tego genu, powstają izoformy VEGF-A różniące się liczbą aminokwasów w cząsteczce: 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189, 206. W warunkach fizjologicznych najliczniejszą z izoform, jak również posiadającą najsilniejsze właściwości biologiczne jest izoforma VEGF-A165 (Yamazaki Y 2006). Właściwości biologiczne tego czynnika są uzależnione od powinowactwa, jakie poszczególne izoformy VEGF-A wykazują w stosunku do heparyny oraz neuropiliny (Ferrara N 2001, Namięcińska M 2005, Yamazaki Y 2006).

VEGF-A jest wydzielany przez różnego rodzaju komórki, takie jak: EC, makrofagi, płytki krwi, fibroblasty czy VSMC pod wpływem czynników stymulujących syntezę, do których należą przede wszystkim hipoksja, ale również hipoglikemia, czynniki wzrostowe, takie jak: TGF- $\beta$ , PDGF, bFGF, oraz cytokiny: IL-1, TNF- $\alpha$ , tlenek azotu, hormony, onkogeny (Carmeliet P 2000, Ferrara N 2001, Distler O 2002, Namięcińska M 2005, Yamazaki Y 2006). Niedotlenienie warunkuje zwiększenie syntezy VEGF w różnych komórkach, w wyniku syntezy w tych komórkach czynnika indukowanego hipoksją [*hypoxia inducible factor (HIF-1)*]-1 (Distler O 2002). Działanie biologiczne VEGF-A uwarunkowane jest wiązaniem do VEGFR. Istnieją 3 podtypy tego receptora, takie jak: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) i VEGFR-3 (Flt-4). Receptory te należą do nadrodziny receptorowych kinaz tyrozynowych i mają zdolność do autofosforylacji. Składają się z 3 zasadniczych elementów: zewnątrzkomórkowego (zbudowanego z siedmiu domen immunoglobulinopodobnych), pojedynczego obszaru transbłonowego oraz elementu wewnątrzkomórkowego, zawierającego domenę kinazy tyrozynowej (Namięcińska M 2005). Do czynników modulujących aktywność VEGF należą neuropilina 1 i 2 (NRP-1, NRP-2), pełniące funkcję koreceptorów (Namięcińska M 2005). Ekspresja VEGFR-1 ma miejsce głównie w EC naczyń krwionośnych, monocytach, makrofagach, komórkach mezangialnych nerki i komórkach łożyska. Ekspresja VEGFR-2 występuje w największej ilości również w EC naczyń krwionośnych, natomiast ekspresja VEGFR-3 ma miejsce przede wszystkim w komórkach śródbłona limfatycznego (Ferrara N 2001, Namięcińska M 2005). Proangiogenne efekty VEGF-A są mediuwane niemal wyłącznie poprzez aktywację receptora VEGFR-2 (Yamazaki Y 2006, Manetti M 2011b). VEGF zaangażowany jest na wielu różnych etapach angiogenezy, takich jak: początkowe rozszerzenie naczyń krwionośnych, wzrost przepuszczalności naczyń, przebudowa macierzy okołonaczyniowej, indukcja proliferacji, migracji i przeżycia EC (Carmeliet P 2000, Distler O 2002, Namięcińska M 2005). Poza funkcją proangiogenną, udowodniono również jego aktywność neroprotekcyjną w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym (Namięcińska M 2005). Biologiczne efekty działania VEGF są ściśle zależne od dawki, o czym świadczą wyniki doświadczeń nad zarodkami mysimi. Utrata choćby jednego allelu VEGF skutkowała letalnymi

defektami naczyniowymi, a śmierć zarodków następowała ok. 10. dnia ciąży (Namiecińska M 2005).

VEGF odgrywa kluczową rolę w procesie angiogenezy zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, w tym w chorobach autoimmunizacyjnych (Carmeliet P 2000, Ferrara N 2001, Namiecińska M 2005). Udział VEGF-A został opisany m. in. w reumatoidalnym zapaleniu stawów, zapaleniu skórno-mięśniowym/wielomięśniowym (Kikuchi K 1998), jak również w SSc (Kikuchi K 1998, Distler O 2002, Choi JJ 2003, Distler O 2004, Dzikowska-Bartkowiak B 2006, Dzikowska-Bartkowiak B 2009, Manetti M 2010). W wielu badaniach wykazano podwyższone zarówno surowicze (Kikuchi K 1998, Distler O 2002, Choi JJ 2003, Manetti M 2010), osoczowe (Hammers LK 2009, Riccieri V 2011), jak i tkankowe (Mackiewicz Z 2002, Distler O 2004, Manetti M 2011) stężenie VEGF u chorych na SSc w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Z drugiej strony Ozcelik i wsp. wykazali obniżoną ekspresję VEGF-A w błonie śluzowej dziąseł u chorych na SSc w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną (Ozcelik O 2007). Z kolei zwiększoną ekspresję VEGFR-1 i VEGFR-2 na skórnych EC udowodniono u chorych na SSc (Mackiewicz Z 2002, Distler O 2004). W badaniu Distlera i wsp. wykazano korelację pomiędzy istotnie wyższym surowiczym stężeniem VEGF, a czasem trwania choroby. Co ciekawe, u chorych z krótkim okresem trwania choroby oraz zaliczonych do grupy pre-SSc (obecność objawu Raynauda, zmian w kapilaroskopii oraz krążących autooprzeciwciał charakterystycznych dla SSc) stężenie to było istotnie wyższe niż u zdrowych ochotników, co może dowodzić, iż podwyższone wartości VEGF są wykładnikiem wczesnego etapu choroby. Ci sami autorzy wykazali istotną korelację pomiędzy surowiczym stężeniem VEGF, a brakiem tendencji do rozwoju owrzodzeń na opuszkach palców rąk u chorych na SSc, co z kolei może świadczyć o tym, iż VEGF działa w tym zakresie prewencyjnie (Distler O 2002). Mechanizmy które prowadzą do nadprodukcji VEGF w SSc pozostają nieznane. Pomimo, że hipoksja jest jednym z najsilniejszych induktorów syntezy VEGF-A, czynnik HIF-1 $\alpha$  nie odgrywa istotnej roli w indukcji wytwarzania VEGF-A w SSc (Distler O 2004). Ponadto istnieją doniesienia, że brak efektywnej angiogenezy u chorych na SSc, pomimo podwyższonego stężenia cytokin proangiogennych, w tym VEGF-A, hamowany jest przez jednoczesne wysokie stężenie cytokin antyangiogennych, takich jak endostatyna, będąca potencjalnym inhibitorem zależnej od VEGF angiogenezy (Hebbar M 2000, Dzikowska-Bartkowiak B 2006, Hammers LK 2009). Z drugiej strony Distler i wsp. nie wykazali podwyższonego stężenia endostatyny w grupie chorych na SSc (Distler O 2002). Autorzy ci wnioskują, że w SSc dochodzi do zaburzenia funkcji samej cytokiny lub jej receptora w procesie wadliwej angiogenezy, jak również o tym, iż przewlekła i niekontrolowana nadekspresja VEGF może mieć szkodliwy wpływ na tworzenie nowych naczyń krwionośnych (Distler O 2004). W badaniu Dzikowskiej-Bartkowiak i wsp. wykazano z kolei obniżony stosunek VEGF do endostatyny u chorych na SSc, co potwierdza hipotezę braku równowagi pomiędzy czynnikami pro i antyangiogennymi w przebiegu SSc (Dzikowska-Bartkowiak B 2006).



Należy też zaznaczyć, że istnieją 2 izoformy VEGF-A, powstające w wyniku odmiennego składowania mRNA w obrębie terminalnego eksonu, tzw. proangiogenne VEGF-A 165 oraz antyangiogenne VEGF-A 165b (Bates DO 2002, Qiu Y 2009, Manetti M 2011b). W stosunkowo niedawno przeprowadzonym badaniu Manetti i wsp. wykazali podwyższone osoczowe i tkankowe stężenie VEGF-A u chorych z SSc, co było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami Distlera i wsp. z 2002 i 2004 roku oraz badaniami własnymi Manetti i wsp. z 2010 roku, aczkolwiek nowatorskim odkryciem był fakt, iż wysokie stężenie VEGF-A wynikało z istotnej przewagi antyangiogennej izoformy tego białka, czyli VEGF-A 165b nad proangiogenną izoformą VEGF-A 165 (Distler O 2002, Distler O 2004, Manetti M 2010, Manetti M 2011a, Manetti M 2011b). W warunkach *in vitro* obserwowano pobudzenie angiogenezy na EC uzyskanych od pacjentów z SSc, po dodaniu rekombinowanych izoform VEGF-A 165 oraz przeciwciał blokujących VEGF-A 165b (Manetti M 2011a), co w przyszłości może stanowić jedną z opcji terapeutycznych w chorobach z kręgu twardziny i być może tłumaczy niejednoznaczne wyniki badań nad rolą VEGF-A w SSc. Inni badacze sugerują z kolei, że brak efektu VEGF-A wynika z krótkotrwałego wzrostu jego stężenia. Udowodniono, że zbyt krótko trwające podwyższenie stężenia VEGF-A wpływa na nietrwałość nowo tworzonych naczyń krwionośnych, a z drugiej strony przedłużona ekspresja VEGF-A, obserwowana szczególnie u chorych na SSc na różnych etapach choroby, powoduje łączenie się nowo tworzonych naczyń w sposób niekontrolowany, co paradoksalnie prowadzi do powstawania nietrwalej sieci naczyń krwionośnych (Distler O 2004).

Doniesienia na temat ekspresji VEGF-A u chorych na *morphea* są znacznie bardziej skąpe. Dańczak-Pazdrowska wykazała znamienne wyższą ekspresję genu VEGF w PBMC u chorych na *morphea*, natomiast istotnie obniżoną ekspresję w tkankach zmienionych chorobowo w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną (Dańczak-Pazdrowska A 2011). Stanowi to potwierdzenie wyników wcześniejszych badań, w których również wykazano znamienne wyższe surowicze stężenia VEGF w grupie badanej chorych z *morphea* (Dziankowska-Bartkowiak B 2009). Jednocześnie w tym ostatnim badaniu zwrócono uwagę, że wyższe stężenie VEGF w *morphea* wiązało się z nieznamienne statystycznie niższym osoczkowym stężeniem sVEGFR-2, co może świadczyć o tym, iż proces wadliwej angiogenezy w *morphea* wynika ze zmniejszonej ekspresji receptora na EC (Dziankowska-Bartkowiak B 2009). Z kolei Farrel i wsp. w badaniu immunohistochemicznym 2 biopsji skórnych pobranych od chorych na *morphea* nie wykazali różnic w stosunku do grupy kontrolnej, co jak sugerują autorzy pośrednio świadczy o zaburzeniu angiogenezy na poziomie tkankowym w obrębie ognisk chorobowych (Farrel AM 2001).

W prezentowanych badaniach nie wykazano istotnej różnicy w osoczkowym stężeniu VEGF-A w grupie badanej (96,8 pg/ml  $\pm$ 97,3) względem grupy kontrolnej zdrowych ochotników (97,6 pg/ml  $\pm$ 78,9). Stwierdzono natomiast istotnie wyższe osoczowe stężenie VEGF-A w grupie chorych na lSSc (176,0 pg/ml  $\pm$ 152,6) w porównaniu z grupą badaną, jak i grupą kontrolną osób zdrowych. Osoczowe stężenie VEGF-A w grupie chorych na *morphea* nie wykazało

korelacji ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania. Ponadto nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic we względnym poziomie transkryptów genu VEGF-A w PBMC w grupie badanej w porównaniu do grupy zdrowych ochotników. Względny poziom transkryptów genu VEGF-A w PBMC w grupie chorych na *morphea* również nie korelował ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania.

Różnice w prezentowanych wynikach w porównaniu do tych uzyskanych przez wyżej wymienionych autorów (Dziankowska-Bartkowiak B 2009, Dańczak-Pazdrowska A 2011) wynikać mogą z różnic klinicznych dotyczących grup badanych. O ile wiek chorych w grupach badanych był na podobnym poziomie: 42,7 vs 45,1 (Dańczak-Pazdrowska A 2011) vs 43,8 (Dziankowska-Bartkowiak B 2009), to średni czas trwania choroby wynosił 56 miesięcy vs 67 miesięcy (Dańczak-Pazdrowska A 2011) vs 18 miesięcy (Dziankowska-Bartkowiak B 2009). Dane literaturowe dotyczące patogenezy VEGF-A w SSc wskazują, iż białko to zaangażowane jest na wczesnych etapach choroby (Distler O 2002), dlatego dobór grupy badanej w początkowym stadium choroby mógłby mieć potencjalny wpływ na uzyskane wyniki. Co więcej, rozbieżności pomiędzy uzyskiwanymi wynikami mogą być związane z włączeniem do badania różnych podtypów choroby, chociaż należy też zaznaczyć, że nie wykazano różnic w osoczym stężeniu VEGF-A, ani we względnym poziomie transkryptów genu VEGF-A w PBMC pomiędzy badanymi odmianami choroby. Ponadto analizując wyniki powyżej cytowanych autorów (Farrel AM 2001, Dziankowska-Bartkowiak B 2009, Dańczak-Pazdrowska A 2011), w których dowodzono zaburzeń angiogenezy na poziomie tkankowym, istotne byłoby poszerzenie badań nad ekspresją genu VEGF w skórze. Kolejnym interesującym aspektem byłaby ocena ekspresji receptora badanej cytokiny. Dane literaturowe wskazują na zwiększoną ekspresję VEGFR w obrębie skórnych EC u chorych na SSc (Mackiewicz Z 2002, Distler O 2004), natomiast u chorych na *morphea* stwierdzono nieznamiennie statystycznie niższe surowicze stężenie sVEGFR-2 (Dziankowska-Bartkowiak B 2009). Być może zatem na proces wadliwej angiogenezy wpływa raczej zaburzona funkcja receptora dla VEGF, niż samo VEGF.

### 5.3. Znaczenie IP-10 w *morphea*

Wśród czynników pro i antyangiogennych zaangażowanych w patogenezę *morphea* istotną rolę odgrywają również chemokiny. Należą one do rodziny białek oddziałujących chemotaktycznie na różne populacje leukocytów, wzmacniając reakcje zapalne i immunologiczne (Yamamoto Y 2006, Zhou L 2008, Gołąb J 2009, Rabquer BJ 2011, Romagnani P 2012). Z tego powodu chemokiny odgrywają kluczową rolę w wielu chorobach autoimmunizacyjnych (Yamamoto Y 2006, Rabquer BJ 2011, Magee KE 2013). Poza działaniem chemotaktycznym, chemokiny biorą udział w aktywacji, proliferacji i różnicowaniu odmiennych populacji leukocytów, jak również tworzeniu przerzutów nowotworowych czy też regulacji angiogenezy (Gołąb J 2009, Rabquer BJ 2011, Romagnani P 2012). Do chemokin będących inhibitorami angiogenezy należą monokina indukowana przez IFN- $\gamma$  (MIG/CXCL9) oraz IP-10, znana również jako CXCL10, które

swoje działanie antyangiogenne wykazują poprzez wiązanie się z receptorem CXCR3 na powierzchni EC (Strieter RM 2005, Rabquer BJ 2011). Natomiast chemokiny posiadające w swej budowie motyw ELR, takie jak IL-8 (CXCL8) czy CXCL16, oddziałując poprzez wiązanie się z receptorem CXCR6 na powierzchni EC, pobudzają angiogenezę (Rabquer BJ 2011).

Chemokina IP-10 jest glikoproteiną, o masie cząsteczkowej 10 kDa, należąca do podrodziny chemokin CXC, natomiast funkcjonalnie zaliczana jest do chemokin prozapalnych (Ahmadi Z 2013). Z uwagi na brak motywu ELR, IP-10 hamuje tworzenie nowych naczyń krwionośnych, dlatego określana jest też jako czynnik angiostatyczny (Strieter RM 1995). IFN- $\gamma$  indukuje uwalnianie IP-10 z szeregu różnych komórek, takich jak: keratynocyty, leukocyty, neutrofile, makrofagi, monocyty, eozynofile, fibroblasty oraz EC, co indukuje odpowiedź zapalną (Liu M 2011, Romagnani P 2012, Ahmadi Z 2013). Jej działanie biologiczne uwarunkowane jest poprzez wiązanie z receptorem CXCR3 (Strieter RM 2005), w związku z czym komórki prezentujące go na swojej powierzchni, takie jak: limfocyty Th1, limfocyty B, komórki NK czy makrofagi są rekrutowane do miejsc objętych procesem zapalnym właśnie przez IP-10 (Arimilli S 2000, Romagnani P 2012). Może to dowodzić, że chemokina IP-10 jest zaangażowana w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych charakteryzujących się dominacją limfocytów Th1 (Arimilli S 2000). Obecnie postuluje się, że chociaż choroby przebiegające z włóknieniem należą do grupy chorób Th2-zależnych, to jednak na wczesnych ich etapach w naciekach zapalnych stwierdza się przewagę limfocytów Th1 i cytokin z nimi związanych (Uziel Y 1994, Ihn H 1995, Ihn H 1996, Hasegawa M 2003, Kurzinski K 2011, Liu X 2013, Torok KS 2015). Ekspresja receptora CXCR3 ma miejsce nie tylko na komórkach układu immunologicznego, ale również na EC, perycytach czy komórkach mezangialnych (Arimilli S 2000, Ahmadi Z 2013). Receptor CXCR3 istnieje w postaci trzech izoform, odpowiednio CXCR3-A, CXCR3-B oraz CXCR3-alt (Lasagni L 2003). IP-10 przyłączając się do poszczególnych izoform odmiennie oddziałuje na funkcjonowanie komórek, a mianowicie pobudzając receptor CXCR3-A wpływa na chemotaksję i proliferację różnych typów komórek, natomiast aktywując CXCR3-B hamuje proliferację i migrację komórek, a pobudza apoptozę (Lasagni L 2003, Rabquer BJ 2011, Ahmadi Z 2013). Efekty antyangiogenne IP-10 są mediowane wyłącznie poprzez aktywację receptora CXCR3-B (Rabquer BJ 2011). Działania IP-10 obejmują m.in.: chemotaksję makrofagów, monocytów, komórek NK, limfocytów T, wpływ na rozwój i funkcję limfocytów, stymulację adhezji limfocytów T do EC, indukcję procesów zapalnych, zahamowanie wzrostu guza *in vivo*, jak również zahamowanie angiogenezy (Romagnani P 2012, Ahmadi Z 2013).

Rolę IP-10 udowodniono w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych, takich jak: SLE (Hrycek E 2013), postać dziecięca zapalenia skórno-mięśniowego (Fall N 2005), cukrzyca typu I (Ahmadi Z 2013) czy SSc (Rabquer BJ 2011, Hasegawa M 2011, Assassi S 2013). Rabquer i wsp. wykazali podwyższone surowicze i tkankowe stężenie IP-10 u chorych na SSc, natomiast ekspresja receptora CXCR3 na EC była obniżona w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną (Rabquer BJ 2011). Ci sami autorzy wykazali podwyższone surowicze i tkankowe stężenie potencjalnie proangiogennej chemokiny CXCL16, jak również zwiększoną ekspre-

sję jej receptora CXCR6 na EC w skórze chorych na SSc, co jak wnioskuje świadczyć ma o tym, iż ekspresja receptorów dla chemokin proangiogennych służy promowaniu angiogenezy w skórze chorych na SSc (Rabquer BJ 2011). Również w skórze myszy Scl GvHD stwierdzono zwiększoną ekspresję mRNA dla cytokin indukowanych przez IFN- $\gamma$ , takich jak: MIG/CXCL9, IP-10, oraz CXCL11/I-TAC (Zhou L 2007). Inne grupy badaczy potwierdziły podwyższone surowicze (Antonelli A 2008, Hasegawa M 2011) i osoczowe (Liu X 2013) stężenia tej cytokiny u chorych na SSc w porównaniu z grupami kontrolnymi zdrowych ochotników. Stężenia te korelowały zarówno z aktywnością procesu chorobowego (Hasegawa M 2011, Liu X 2013), jak i ze stopniem zajęcia nerek i płuc (Antonelli A 2008). Surowicze stężenie IP-10 wykazywało również istotny związek ze stopniem włóknienia wątroby w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C (Reitberger T 2008).

We wzbudzaniu chemokin CXC istotną rolę odgrywa IFN- $\gamma$  będący produktem syntezy limfocytów T i komórek NK (Gillery P 1992). Udowodniono jego silne właściwości antyfibrotyczne, które wyrażają się poprzez zmniejszenie poziomu mRNA dla kolagenów typu I, II, III, zahamowanie proliferacji i migracji skórnych fibroblastów, jak również zniesienie stymulującego wpływu TGF- $\beta$  (Hunzelmann N 1997, Sime PJ 2001, Coelho L 2008). Dane literaturowe wskazują na niskie stężenie IFN- $\gamma$  w chorobach skóry przebiegających z nadmiernym włóknieniem, takich jak *morphea* i SSC (Scala E 2004, Hasegawa M 2005, Lipko-Godlewska S 2008). Lipko-Godlewska i wsp. wykazali obniżenie surowiczego stężenia IFN- $\gamma$  w grupie chorych na *morphea*. Co więcej, niskie stężenie tego białka korelowało z aktywnością procesu chorobowego (Lipko-Godlewska S 2008). Odmienne wyniki odnaleźć można w niedawno opublikowanym badaniu, w którym Torok i wsp. wykazali podwyższone surowicze stężenie IFN- $\gamma$  w pediatrycznej grupie chorych na *morphea* (Torok KS 2015). Pośrednio wskazywać to może na udział limfocytów Th1 będących głównym źródłem IFN- $\gamma$  w patogenezie choroby (Torok KS 2015). Z uwagi na właściwości antyfibrotyczne podjęto próby terapeutycznego wykorzystania IFN- $\gamma$  zarówno u chorych na SSc, jak i na *morphea*. Co prawda wstępne wyniki badań z zastosowaniem IFN- $\gamma$  były obiecujące (Grassegger A 1998), to jednak badania kliniczne nie przyniosły spodziewanych rezultatów zarówno u chorych na *morphea*, jak i na SSc i substancja ta nie jest obecnie rekomendowana w schematach leczenia obu chorób (Hunzelmann N 1997, Black CM 1999).

W prezentowanej pracy średnie osoczowe stężenie IP-10 u chorych na *morphea* (218,6 pg/ml  $\pm$ 155,0) było istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej zdrowych ochotników (139,2 pg/ml  $\pm$ 102,0). Osoczowe stężenie cytokiny IP-10 w grupie chorych na *morphea* korelowało z LoSSI ( $r=0,66$ ); ( $p<0,0001$ ), natomiast nie wykazano korelacji ze zmiennymi, takimi jak aktywność choroby czy długość jej trwania. Porównując względny poziom transkryptów genu IP-10 w PBMC w grupie badanej wykazano istotnie niższe wartości względem grupy zdrowych ochotników. Względny poziom transkryptów genu IP-10 w PBMC w grupie chorych na *morphea* nie korelował ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwa-

nia. W grupie chorych na lSSc odnotowano istotnie wyższe osoczowe stężenie IP-10 (344,7 pg/ml  $\pm$ 155,5) zarówno względem grupy badanej, jak i grupy zdrowych ochotników.

Uzyskane wyniki w dużej mierze są zgodne z nielicznymi danymi literaturowymi. Do chwili obecnej opublikowano dwa badania podejmujące ocenę chemokiny IP-10 w patogenezie *morphea*. Należy podkreślić, że obie prace opublikowane zostały już w trakcie prowadzenia prezentowanych badań. Magee i wsp. przebadali grupę 69 pacjentów pediatrycznych, w której osoczowe stężenie IP-10 było istotnie wyższe względem stężenia obserwowanego w grupie zdrowych ochotników. Co więcej, stężenie to korelowało z aktywnością kliniczną choroby określoną za pomocą mLoSSI i PGA-A (*Physician Global Assessment of Disease Activity*). Badaniem immunohistochemicznym potwierdzono również obecność IP-10 w ogniskach chorobowych u 5 pacjentów, u których pobrano biopsje skórne, a jego poziom był porównywalny do poziomu stwierdzanego u pacjentów z łuszczycą, stanowiących w tym badaniu grupę kontrolną (Magee KE 2013). Podobnie Torok i wsp. wykazali podwyższenie osoczowego stężenia IP-10 w grupie dzieci chorych na *morphea*. W badaniu tym wykazano również korelację pomiędzy podwyższonym stężeniem badanej cytokiny, a aktywnością choroby (Torok KS 2015).

Nie jest jasne dlaczego uzyskaliśmy zmniejszony względny poziom transkryptów genu IP-10 w PBMC. Zjawisko to tłumaczyć można przypuszczalnym zaistnieniem mechanizmu pętli zwrotnej w układzie IP-10, gdzie wysokie osoczowe stężenie cytokiny może hamować jego ekspresję, aczkolwiek nie obserwowano negatywnych korelacji pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu IP-10 w PBMC, a osoczowym stężeniem jego produktu białkowego. Ponadto badanie na poziomie mRNA jest uważane obecnie za mniej informatywne, niż badanie na poziomie białka. Wiadomo bowiem, że sama ekspresja mRNA nie będzie świadczyła o realnej produkcji białka, a wpływać na nią może szereg systemów regulujących. Co więcej, należałoby zwrócić uwagę na ocenę lokalnej ekspresji badanej cytokiny na poziomie tkankowym, gdyż proces toczący się w skórze nie zawsze przekłada się na układową ekspresję badanej cytokiny.

Podsumowując, wydaje się, że IP-10 może być zaangażowana w patomechanizm *morphea*. Co więcej, cytokina ta może stanowić marker aktywności choroby, ponieważ jej osoczowe stężenie korelowało z LoSSI. Ponadto IP-10 potencjalnie stanowić może docelowy punkt uchwytu dla terapii antyfibrotycznych. W ostatnim czasie ukazała się publikacja, wg której fluorofenidon mający osłabiać włóknienie nerek swój efekt wywiera m.in. poprzez obniżenie ekspresji IP-10 (Tang J 2015).

W powyższej pracy podjęto próbę scharakteryzowania potencjalnego znaczenia wybranych czynników pro i antyangiogennych i białka o aktywności wazoprotekcyjnej w patogenezie *morphea*. Badane czynniki wpływają na wiele różnych mechanizmów inicjacji i utrzymania zaburzeń naczyniowych w przebiegu chorób przebiegających z włóknieniem. Dokładny patomechanizm zarówno SSc, jak i *morphea* pozostaje nieznan. Wyniki prezentowanych badań, w kontekście danych literaturowych, nie pozwalają jednoznacznie określić roli VEGF-A i CNP

w zaburzeniach naczyniowych stanowiących niewątpliwie istotną rolę w patomechanizmie choroby, aczkolwiek uzyskane wyniki roli tych białek w *morphea* nie potwierdzają. Wydaje się jednak, że istotne byłoby poszerzenie badań dotyczących ekspresji badanych białek na poziomie tkanek zmienionych chorobowo oraz rozszerzenie badań o ocenę ich receptorów.

Obiecujące wyniki uzyskano natomiast w kontekście znaczenia IP-10, które to białko wydaje się odgrywać rolę w patogenezie *morphea*, a co więcej może stanowić marker aktywności choroby. Idealny biomarker powinien być wykrywalny na wczesnych etapach choroby, charakteryzować się bezpośrednim wpływem na patogenezę procesu chorobowego i dobrze korelować z aktywnością choroby (Hummers LK 2009). Wydaje się zatem, że należy kontynuować podjęte prace na większych i w miarę możliwości ujednoliconych grupach badanych.

Oczywiście przedstawione badania nie są pozbawione ograniczeń. Przede wszystkim, z uwagi na fakt, iż *morphea* jest rzadką chorobą, grupa badana składała się jedynie z 30 chorych, w tym podział na poszczególne podtypy był nierówny. Ponadto brak jest danych jednoznacznie potwierdzających dobór genów referencyjnych GAPDH oraz 18 S w chorobach przebiegających z włóknieniem i być może należałoby powtórzyć badania z udziałem innych genów referencyjnych. Ponadto, jak już wspomniano, celem pełnej oceny roli wybranych białek w patogenezie *morphea* należałoby również wykonać badania na poziomie zmienionych chorobowo tkanek z uwzględnieniem receptorów.

## 6. WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania nie potwierdzają roli białka CNP w patogenezie *morphea*, aczkolwiek nie można wykluczyć znaczenia jego receptorów ani zaburzeń w układzie CNP-CNPR na poziomie tkanki zmienionej chorobowo.
2. Przeprowadzone badania nie potwierdzają roli białka VEGF-A w patogenezie *morphea*, aczkolwiek nie można wykluczyć znaczenia jego receptorów ani zaburzeń w układzie VEGF-VEGFR na poziomie tkanki zmienionej chorobowo.
3. W grupie chorych na *morphea* uzyskano istotnie wyższe osoczowe stężenie białka IP-10, co może sugerować, że białko to odgrywa rolę w patogenezie choroby.
4. Osoczowe stężenie białka IP-10 korelowało ze skalą LoSSI, co sugeruje, że białko to może być przydatne w monitorowaniu aktywności choroby.

## 7. STRESZCZENIE

Twardzina ograniczona (*localized scleroderma, morphea*) znana również jako *morphea* jest rzadko występującą, przewlekłą, autoimmunologiczną jednostką chorobową o niewyjaśnionej dotychczas etiologii. Charakteryzuje się występowaniem wczesnej fazy zapalnej, po której następuje nieodwracalna faza zwłóknieniem skóry i tkanki podskórnej. Większość doniesień naukowych dotyczących etiopatogenezy twardziny odnosi się do postaci układowej choroby [*systemic sclerosis (SSc)*], natomiast dane literaturowe dotyczące *morphea* są skąpe.

W patomechanizmie choroby zwracają uwagę trzy zasadnicze zjawiska, takie jak: aktywacja i uszkodzenie komórek śródbłonna [endothelial cells (EC)], zaburzenia immunologiczne oraz nieprawidłowości dotyczące metabolizmu białek macierzy pozakomórkowej. Inicjującym zjawiskiem w patomechanizmie choroby jest uszkodzenie EC, co prowadzi do obliteracji małych naczyń krwionośnych, uwolnienia antygenów komórkowych oraz wzbudzenia procesów zapalnych i autoimmunizacyjnych. Zwrócono uwagę na zaburzenia w zakresie białek o aktywności naczyniowej mających ochronny wpływ na EC, do których niewątpliwie zaliczyć można peptyd natriuretyczny typu C [C-type natriuretic peptide (CNP)]. Poza silnym działaniem wazodylatacyjnym, białko to wykazuje również działanie przeciwzapalne, przeciwpłytkowe i przeciwlukocytarne. Doniesienia literaturowe dotyczące znaczenia CNP w chorobach autoimmunizacyjnych są nieliczne. W patogenezie chorób przebiegających z zwłóknieniem podkreśla się także rolę czynników proangiogennych. Do grupy tej zaliczyć można czynnik wzrostu śródbłonna naczyń [vascular endothelial growth factor (VEGF)]-A, będący zarówno w warunkach fizjologicznych i patologicznych jednym z najsilniejszych promotorów angiogenezy. Dotychczasowe badania dotyczące udziału tego białka w patogenezie *morphea* są niejednoznaczne. W zaburzeniach immunologicznych istotną rolę odgrywają także cytokiny, których zadanie polega na indukcji, utrzymaniu i zwielokrotnieniu procesów zapalnych. Do grupy tej należy białko indukowane przez interferon gamma [interferon-gamma-inducible protein (IP)]-10. Dane literaturowe potwierdzają znaczenie chemokiny IP-10 w chorobach autoimmunizacyjnych, m.in. takich jak SSc. Natomiast doniesienia dotyczące jej znaczenia w patomechanizmie *morphea* są nieliczne.

Cele pracy obejmowały: (1) ocenę względnego poziomu transkryptów genu dla CNP, VEGF-A oraz IP-10 w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej [*peripheral blood mononuclear cells (PBMC)*] u chorych na *morphea* z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności; (2) ocenę osoczonego stężenia aminoterminalnego odcinka CNP [*amino-terminal fragment of pro-C-type natriuretic peptide (NT-proCNP)*], VEGF-A oraz IP-10 u chorych na *morphea* z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności; (3) porównanie osoczonego stężenia NT-proCNP, VEGF-A



oraz IP-10 w grupie chorych na *morphea* oraz postać ograniczoną twardziny układowej [*limited systemic sclerosis* (ISSc)]; (4) poszukiwanie markera aktywności procesu *morphea*.

Badaniami objęto 80 osób, z czego grupę badaną stanowiło 30 chorych na *morphea* leczonych w warunkach ambulatoryjnych i szpitalnych w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Kryterium wykluczającym było stosowanie leczenia ogólnego i miejscowego w okresie miesiąca poprzedzającego pobranie materiału. U wszystkich chorych z grupy badanej rozpoznanie kliniczne zostało potwierdzone badaniem histopatologicznym. Ponadto chorych zakwalifikowano do 3 podgrup: (1) odmiana plackowata *morphea* [*morphea en plaques* (MEP)] (16 chorych), (2) odmiana linijna *morphea* [*linear morphea* (LM)] (2 chorych) oraz (3) odmiana uogólniona *morphea* [*generalised morphea* (GM)] (12 chorych). Natomiast grupy kontrolne obejmowały: (1) 20 chorych na ISSc, grupa ta stanowiła kontrolę w badaniu osoczonego stężenia wybranych cytokin oraz (2) 30 zdrowych ochotników, grupa ta stanowiła kontrolę zarówno w badaniu względnego poziomu transkryptów genów wybranych białek w PBMC, jak również ich osoczonego stężenia. U wszystkich chorych z grupy badanej dokonano oceny aktywności choroby, czas trwania procesu chorobowego, a także ocena rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w *morphea* w oparciu o wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w *morphea* [*localized scleroderma skin severity index* (LoSSI)], zaproponowany przez Arkachaisriego i wsp. w 2008 roku.

Ocenę względnego poziomu transkryptów (ekspresji) genu dla CNP, VEGF-A i IP-10 w PBMC u chorych na *morphea* i zdrowych ochotników dokonano w oparciu o metodę reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym [*real time polymerase chain reaction* (rt-PCR)].

Natomiast osoczowe stężenia NT-proCNP, VEGF-A i IP-10 wykonano z zastosowaniem metody immunoenzymatycznej ELISA. Ocena ta dokonana została u chorych z grupy badanej oraz w obu grupach kontrolnych.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Za istotne statystycznie uznano te, które osiągnęły wartość  $p \leq 0,05$ .

Wykazano istotnie wyższe osoczowe stężenie chemokiny IP-10 w grupie chorych na *morphea* w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych ochotników ( $p=0,0225$ ). Stwierdzono istotnie niższy względny poziom transkryptów genu IP-10 w PBMC w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych ochotników ( $p=0,0023$ ). Ponadto wykazano korelację pomiędzy osoczymym stężeniem IP-10, a LoSSI ( $p<0,0001$ ) ( $r=0,66$ ), natomiast nie wykazano korelacji ze zmiennymi, takimi jak aktywność choroby czy długość jej trwania. Nie odnotowano korelacji pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu IP-10 w PBMC, a LoSSI, aktywnością choroby czy długością jej trwania. Nie wykazano istotnych różnic we względnym poziomie transkryptów genu IP-10 w PBMC, ani w osoczymym stężeniu badanej cytokiny w obrębie poszczególnych odmian choroby.

Nie wykazano istotnych różnic we względnym poziomie transkryptów genu CNP w PBMC, jak również w osoczymym stężeniu NT-proCNP w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. Względny poziom transkryptów genu CNP w PBMC, jak również oso-

czowe stężenie NT-proCNP nie wykazały korelacji ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania. Nie wykazano istotnych różnic we względnym poziomie transkryptów genu CNP w PBMC, ani w osoczym stężeniu badanego białka w obrębie poszczególnych odmian choroby.

Nie stwierdzono istotnych różnic we względnym poziomie transkryptów genu VEGF-A w PBMC, ani w osoczym stężeniu VEGF-A w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych ochotników. W grupie badanej, zarówno względny poziom transkryptów genu VEGF-A w PBMC, jak również osocze stężenie VEGF-A nie wykazały korelacji ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania. Nie odnotowano różnic we względnym poziomie transkryptów genu VEGF-A w PBMC, ani w osoczym stężeniu badanej cytokiny w obrębie poszczególnych odmian choroby.

Wykazano istotnie wyższe osocze stężenie IP-10 w grupie chorych na lSSc w porównaniu z grupą badaną ( $p=0,0070$ ), jak i grupą zdrowych ochotników ( $p<0,0001$ ). Stwierdzono istotnie wyższe osocze stężenie VEGF-A w grupie chorych na lSSc w porównaniu z grupą badaną ( $p=0,0295$ ) oraz grupą zdrowych ochotników ( $p=0,0212$ ). Natomiast w odniesieniu do NT-proCNP nie stwierdzono różnic w osoczym stężeniu tego białka w grupie chorych na lSSc w porównaniu do grupy badanej, jak i grupy zdrowych ochotników. Być może wyższe osocze stężenie IP-10 i VEGF-A u chorych na lSSc w porównaniu do grupy badanej oraz do grupy osobników zdrowych wynika z tego, iż proces chorobowy w lSSc jest ogólnoustrojowy i wielonarządowy w odróżnieniu do *morphea*, gdzie dotyczy on zasadniczo skóry. Zasadnym zatem, w przypadku *morphea*, byłoby skoncentrowanie badań na biopsjach zmienionej tkanki.

W grupie badanej dokonano również oceny korelacji pomiędzy względnymi poziomami transkryptów genu dla CNP, VEGF-A, IP-10 w PBMC. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zależność pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu VEGF-A, a genu CNP w PBMC ( $p=0,0001$ ). Nie wykazano istotnej zależności pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu VEGF-A, a genu IP-10, jak również pomiędzy względnym poziomem transkryptów genu CNP, a genu IP-10 w PBMC. Nie wykazano również istotnej korelacji pomiędzy osoczym stężeniem badanych białek w grupie badanej. Ocena zależności pomiędzy osoczym stężeniem NT-proCNP, a względnym poziomem transkryptów genu dla VEGF-A i genu dla IP-10 w PBMC nie wykazała istotności statystycznej. Podobnych zależności nie stwierdzono dokonując porównania pomiędzy osoczym stężeniem VEGF-A, a względnym poziomem transkryptów genu dla CNP i genu dla IP-10 w PBMC, jak i pomiędzy osoczym stężeniem IP-10, a względnym poziomem transkryptów genu dla CNP i genu dla VEGF-A w PBMC u chorych z grupy badanej.

Niniejsza praca stanowiła próbę poszerzenia wiedzy na temat etiopatogenezy *morphea*, a w szczególności zaburzeń naczyniowych. W prezentowanych badaniach podjęto próbę scharakteryzowania roli CNP, VEGF-A, IP-10 w patogenezie choroby. Dokładny patomechanizm zarówno SSc, jak i *morphea* pozostaje nieznan. Wyniki prezentowanych badań nie pozwalają jednoznacznie określić roli VEGF-A i CNP w zaburzeniach naczyniowych stanowiących nie-

wątpliwie istotną rolę w patomechanizmie schorzenia, aczkolwiek uzyskane wyniki roli tych białek w *morphea* nie potwierdzają. Wydaje się jednak, że istotne byłoby pogłębienie badań dotyczących oceny względnego poziomu transkryptów genów badanych białek na poziomie zmienionych chorobowo tkanek oraz rozszerzenie badań o ocenę ich receptorów.

Obiecujące wyniki uzyskano natomiast w kontekście znaczenia IP-10, które to białko wydaje się odgrywać rolę w patogenezie *morphea*, a co więcej może stanowić marker aktywności choroby. W prezentowanych badaniach uzyskano dowody potwierdzające udział tej chemokiny w patogenezie *morphea*. Niewątpliwie należy kontynuować podjęte prace. Istotnym wydaje się poszerzenie oceny względnego poziomu transkryptów badanego genu na poziomie zmienionych chorobowo tkanek, jak również przeprowadzanie ich na większych i w miarę możliwości ujednoliconych grupach badanych.

Na podstawie prezentowanych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Przeprowadzone badania nie potwierdzają roli białka CNP w patogenezie *morphea*, aczkolwiek nie można wykluczyć znaczenia jego receptorów ani zaburzeń w układzie CNP-CNPR na poziomie tkanki zmienionej chorobowo.
2. Przeprowadzone badania nie potwierdzają roli białka VEGF-A w patogenezie *morphea*, aczkolwiek nie można wykluczyć znaczenia jego receptorów ani zaburzeń w układzie VEGF-VEGFR na poziomie tkanki zmienionej chorobowo.
3. W grupie chorych na *morphea* uzyskano istotnie wyższe osoczowe stężenie białka IP-10, co może sugerować, że białko to odgrywa rolę w patogenezie choroby.
4. Osoczowe stężenie białka IP-10 korelowało ze skalą LoSSI, co sugeruje, że białko to może być przydatne w monitorowaniu aktywności choroby.

## 8. ABSTRACT

Localized scleroderma, also known as morphea is a rare, chronic, autoimmune disease with yet unclear aetiology. It is characterized by an early inflammatory phase, which is followed by irreversible skin and subcutaneous tissue fibrosis. Most of scientific reports concerning the etiopathogenesis of *scleroderma* refers to systemic sclerosis (SSc) and the literature data concerning morphea is scarce.

The disease's pathomechanism features three primary phenomena, such as: activation and damage of endothelial cells (EC), immune dysfunction and abnormalities concerning the extracellular matrix protein metabolism. The initiative phenomenon in the disease's pathomechanism is the damage of EC, which results in the obliteration of small blood vessels, release of cellular antigens and excitation of inflammatory and autoimmune processes. The attention was also put to disorders in the scope of vasoactive proteins which have a protective impact on EC, which may undoubtedly include the C-type natriuretic peptide (CNP). Besides from severe vasodilation, the protein demonstrates anti-inflammatory, anti-platelet and anti-leukocyte effects. Literature reports concerning the impact of CNP on autoimmune diseases are scarce. The role of pro- and anti-angiogenic factors is also emphasized in the pathogenesis of fibrotic diseases. This group includes the vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, which is one of the strongest promoters of angiogenesis in both physiological and pathological conditions. The current studies concerning the role of this protein in the pathogenesis of morphea are unclear. Cytokines, the task of which is to induce, maintain and multiply the inflammatory processes, also play a huge role in immune disorders. This group includes interferon-gamma-inducible protein (IP)-10. Literature data confirms the importance of chemokine IP-10 in autoimmune diseases, such as, for example, SSc. Reports concerning their importance in the pathomechanism of morphea are however unclear.

Therefore, the study aimed: (1) evaluation of relative transcript abundance of CNP, VEGF-A and IP-10 genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with morphea, taking into account individual sub-types of the disease, its severity and activity (2) evaluation of the plasma concentrations of the amino-terminal fragment of pro-C-type natriuretic peptide (NT-proCNP), VEGF-A and IP-10 in patients with morphea, taking into account individual sub-types of the disease, its severity and activity; (3) comparison of the plasma concentration of NT-proCNP, VEGF-A and IP-10 in patients with morphea or the limited systemic sclerosis (lSSc); (4) searching for the activity marker of morphea.

The studies embraced 80 people, while the study group included 30 morphea patients treated in the Department of Dermatology, University of Medical Sciences in Poznań. The exclusion criterion was the application of general and local treatment one month before the material sampling. The diagnosis was confirmed by skin biopsy. Furthermore, the patients were clas-

sified in 3 sub-groups: (1) morphea *en plaques* (MEP) (16 patients), (2) linear morphea (LM) (2 patients) and (3) generalised morphea (GM) (12 patients). The control groups included: (1) 20 ISSc patients; this group was the control for the plasma concentration of selected cytokines and (2) 30 healthy volunteers; this group was the control for the evaluation of relative transcript abundance of selected genes in PBMC and their plasma concentration. In all patients from the studied group the disease activity, its duration as well as evaluation of the extent, severity and activity of skin changes in morphea based on the localized scleroderma skin severity index (LoSSI) (proposed by Arkachaisri, et al. in 2008) was assessed.

The evaluation of relative transcript abundance (expression) of CNP, VEGF-A and IP-10 genes in PBMC of morphea patients and healthy volunteers was conducted on the basis of the real time polymerase chain reaction (real-time PCR).

The plasma concentration of the NT-proCNP, VEGF-A and IP-10 were evaluated with the use of the ELISA immunoenzymatic method. The evaluation was conducted on the studied group and both control groups.

The obtained results have undergone statistical analysis. The results which achieved the value of  $p \leq 0.05$  were deemed as statistically important.

The significantly higher plasma concentration of chemokine IP-10 in the group of morphea patients in comparison to the control group of healthy volunteers ( $p=0,0225$ ) was revealed. The statistically lower relative transcript abundance of IP-10 gene in PBMC in the studied group in comparison to the control group of healthy volunteers was demonstrated ( $p=0,0023$ ). Furthermore, the evaluation revealed a correlation between the plasma concentration for IP-10 and the LoSSI ( $p<0,0001$ ) ( $r=0.66$ ). However there was no correlation with the variables, such as the disease activity or its duration. No correlation between relative transcript abundance of IP-10 gene in PBMC and the LoSSI, disease activity or its duration was reported. No differences in the relative transcript abundance of IP-10 gene in PBMC or in the plasma concentration of the tested cytokine in particular disease sub-types were demonstrated.

No significant differences in the relative transcript abundance of CNP gene in PBMC or in the plasma concentration of the NT-proCNP were demonstrated for the studied group in comparison to the control group of healthy volunteers. The relative transcript abundance of CNP gene in PBMC or plasma concentration of NT-proCNP have not demonstrated any correlations with the variables, such as the LoSSI, disease activity or its duration. No differences in the relative transcript abundance of CNP gene in PBMC or in the plasma concentration of the tested protein in particular disease sub-types were demonstrated.

No significant differences in the relative transcript abundance of VEGF-A gene in PBMC or in its plasma concentration were observed for the studied group in comparison to the control group of healthy volunteers. In the studied group, both the relative transcript abundance of VEGF-A gene in PBMC and the plasma concentration of the tested cytokine have not demonstrated any correlations with the variables, such as the LoSSI, disease activity or its duration.

No differences in the relative transcript abundance of VEGF-A gene in PBMC or in the plasma concentration of the tested cytokine in particular disease sub-types were revealed.

Significant higher plasma concentration of IP-10 in the group of ISSc patients in comparison to the studied group ( $p=0,0070$ ) and the group of healthy volunteers ( $p<0,0001$ ) was observed. Significantly higher plasma concentration of VEGF-A in the group of ISSc patients in comparison to the studied group ( $p=0,0295$ ) and the group of healthy volunteers ( $p=0,0212$ ) was demonstrated. In relation to the NT-proCNP however, no differences in the plasma concentration of this protein was presented in the group of ISSc patients in comparison to the studied group or the group of healthy volunteers. It may be that the higher plasma concentration of IP-10 and VEGF-A in the ISSc patients in comparison to the studied group and the group of healthy volunteers results from the systemic and multi-organ process of the ISSc disease in comparison to morphea, in which the skin is affected primarily. It was therefore justified, in the case of morphea, to focus the studies on altered tissue biopsies.

In the studied group the correlation between the relative transcript abundance of CNP, VEGF-A and IP-10 genes in PBMC was also evaluated. Based on the obtained results, a correlation between the relative transcript abundance of VEGF-A gene and CNP gene in PBMC ( $p<0,0001$ ) was ascertained. No statistical correlation between the relative transcript abundance of VEGF-A gene and IP-10 gene in PBMC was demonstrated, unlike between the CNP gene and IP-10 gene. No significant correlation was also demonstrated between the plasma concentrations of the proteins tested in the studied group. The evaluation of the relations between the plasma concentration of the NT-proCNP and the relative transcript abundance of VEGF-A gene and IP-10 gene in PBMC has not demonstrated any statistical significance. Similar correlations were not demonstrated when comparing the plasma concentration of VEGF-A with the relative transcript abundance of CNP gene and IP-10 gene in PBMC or the plasma concentration of IP-10 with the relative transcript abundance of CNP gene and VEGF-A gene in PBMC of the studied group.

This paper constituted an attempt to broaden the knowledge concerning the etiopathogenesis of morphea, especially its vascular disturbances. The presented studies featured an attempt to characterise the role of CNP, VEGF-A and IP-10 in the disease's pathogenesis. The specific pathomechanism of both SSc and morphea remains unknown. The results of the presented study do not allow to clearly define the role of VEGF-A and CNP in vascular disturbances, which undoubtedly play an important role in the disease's pathomechanism. However the obtained results do not confirm it. It seems however that it would be important to broaden the studies concerning the relative transcript abundance of tested genes to the tissue level of changed skin and the evaluation of their receptors.

On the other hand, promising results were obtained in relation to IP-10, which seems to be an important protein in the pathogenesis of morphea. Most importantly, this protein may constitute the disease's activity marker. The presented studies brought forth evidence confirming the share of this chemokine in the pathogenesis of morphea. The conducted work must undoubtedly

be continued. It seems important to broaden the evaluation of the relative transcript abundance of tested genes on the level of changed skin and to conduct the expression on wider and possibly unified test groups.

Based on the presented studies, the following conclusions were made:

1. The conducted studies do not confirm the role of the CNP protein in the pathogenesis of morphea, however the importance of its receptors or disturbances in the CNP-CNPR on the tissue level of the changed skin cannot be excluded.
2. The conducted studies do not confirm the role of the VEGF-A protein in the pathogenesis of morphea, however the importance of its receptors or disturbances in the VEGF-VEGFR system on the tissue level of the changed skin cannot be excluded.
3. The plasma concentration of the IP-10 protein was significantly higher in the group of morphea patients, that may suggest, that this protein plays an important role in the pathogenesis of morphea.
4. The plasma concentration of IP-10 protein correlates with the LoSSI, that may suggest, that this protein can be useful in the evaluation of the disease's activity.

## 9. PIŚMIENICTWO

1. Aberer E, Neumann R, Stanek G. Is localised scleroderma a *Borrelia* infection? *Lancet* 1985;2:278.
2. Aberer E, Stanek G, Ertl M, Neumann R. Evidence for spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). *Acta Derm Venereol* 1987;67:225-31.
3. Aberer E, Klade H, Stanek G, Gebhart W. *Borrelia burgdorferi* and different types of morphea. *Dermatologica* 1991;182:145-54.
4. Aberer E, Klade H, Hobisch G. A clinical, histological, and immunohistochemical comparison of acrodermatitis chronica atrophicans and morphea. *Am J Dermatopathol* 1991;13:334-41.
5. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR i wsp. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol* 1997;151:831-41.
6. Ahmadi Z, Arababadi MK, Hassanshahi G. CXCL10 activities, biological structure, and source along with its significant role played in pathophysiology of type I diabetes mellitus. *Inflammation* 2013;36:364-71.
7. Akay BN, Sanli H, Heper AO. Postirradiation linear morphoea. *Clin Exp Dermatol* 2010;35:106-8.
8. Antiga E, Quaglini P, Bellandi S i wsp. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. *Br J Dermatol* 2010;162:1056-63.
9. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P i wsp. CXCL10 (alpha) and CCL2 (beta) chemokines in systemic sclerosis-a longitudinal study. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:45-9.
10. Arkachaisri T, Pino S. Localized scleroderma severity index and global assessments: a pilot study of outcome instruments. *J Rheumatol* 2008;35:650-7.
11. Arkachaisri T, Vilaiyuk S, Li S i wsp. The localized scleroderma skin severity index and physician global assessment of disease activity: a work in progress toward development of localized scleroderma outcome measures. *J Rheumatol* 2009;36:2819-29.
12. Arkachaisri T, Vilaiyuk S, Torok KS i wsp. Development and initial validation of the localized scleroderma skin damage index and physician global assessment of disease damage: a proof-of-concept study. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:373-81.
13. Arimilli S, Ferlin W, Solvason N i wsp. Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2000;177:43-51.
14. Artlett CM. Immunology of systemic sclerosis. *Front Biosci* 2005;10:1707-19.
15. Asano Y, Ihn H, Jinnin M i wsp. Involvement of alpha5beta1 integrin in the establishment of autocrine TGF-beta signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma. *J Invest Dermatol* 2006;126:1761-9.
16. Bates DO, Cui TG, Doughty JM i wsp. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.
17. Beltramelli M, Vercellesi P, Frasin A i wsp. Localized severe scleroderma: a retrospective study of 26 pediatric patients. *Pediatr Dermatol* 2010;27:476-80.
18. Birdi N, Laxer RM, Thorner P i wsp. Localized scleroderma progressing to systemic disease. Case report and review of the literature. *Arthritis Rheum* 1993;36:1182.



19. Black CM, Silman AJ, Herrick AI i wsp. Interferon-alpha does not improve outcome at one year in patients with diffuse cutaneous scleroderma: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 1999;42:299-305.
20. Bleasel NR, Stapleton KM, Commens C i wsp. Radiation-induced localized scleroderma in breast cancer patients. *Australas J Dermatol* 1999;40:99-102.
21. Błaszczyk M, Jarząbek-Chorzelska M, Jabłońska S. Związek między twardziną ograniczoną a układową. Czy badania immunopatologiczne są pomocne w ustaleniu przjścia twardziny skórnej w postać układową? *Przegląd Dermatologiczny* 2000; 87:119-25.
22. Błaszczyk M, Królicki L, Krasu M i wsp. Progressive facial hemiatrophy: central nervous system involvement and relationship with scleroderma en coup de sabre. *J Rheumatol* 2003;30:1997-2004.
23. Boelsma E, Pavel S, Ponc M. Effects of calcitriol on fibroblasts derived from skin of scleroderma patients. *Dermatology* 1995;191:226-33.
24. Bonifati C, Impara G, Morrone A i wsp. Simultaneous occurrence of linear scleroderma and homolateral segmental vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20:63-5.
25. Bonnet-Duquennoy M, Abaibou H, Tailhardat M i wsp. Study of housekeeping gene expression in human keratinocytes using OLISA, a long-oligonucleotide microarray and q RT-PCR. *Eur J Dermatol* 2006;16:136-40.
26. Bruckmeier M, Kuehnl A, Culmes M i wsp. Impact of oxLDL and LPS on C-type natriuretic peptide system is different between THP-1 cells and human peripheral blood monocytic cells. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:199-209.
27. Buechner SA, Winkelmann RK, Lautenschlager S i wsp. Localized scleroderma associated with *Borrelia burgdorferi* infection. Clinical, histologic, and immunohistochemical observations. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:190-6.
28. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G i wsp. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-9.
29. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
30. Choi JJ, Min DJ, Cho ML i wsp. Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003;30:1529-33.
31. Chomeczyński P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
32. Christen-Zaech S, Hakim MD, Afsar FS i wsp. Pediatric morphea (localized scleroderma): review of 136 patients. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:385-96.
33. Christianson HB, Dorsey CS, Kierland RR i wsp. Localized scleroderma; a clinical study of two hundred thirty-five cases. *AMA Arch Derm* 1956;74:629-39.
34. Chung L, Lin J, Furst DE, Fiorentino D. Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol* 2006;24:374-92.
35. Ciesielska A, Sikorski MM. Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego. *Biotechnologia* 2008;4:88-100.
36. Clements P, Lachenbruch P, Siebold J i wsp. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1995;22:1281-5.
37. Coelho LF, de Oliveira JG, Kroon EG. Interferons and scleroderma-a new clue to understanding the pathogenesis of scleroderma? *Immunol Lett* 2008;118:110-5.
38. Coelho-Macias V, Mendes-Bastos P, Assis-Pacheco F i wsp. Imatinib: a novel treatment approach for generalized morphea. *Int J Dermatol* 2014;53:1299-302.

39. Curtis AC, Jansen TG. The prognosis of localized scleroderma. *AMA Arch Derm* 1958;78:749-55.
40. Dańczak-Pazdrowska A. Znaczenie interleukiny 17-A i wybranych cytokin w patomechanizmie morfeji. Wydawnictwo Nauk. UM im. K. Marcinkowskiego. Poznań, 2011.
41. Dańczak-Pazdrowska A, Kowalczyk M, Szramka-Pawlak B i wsp. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in plaque morphea. *Postepy Dermatol Alergol* 2013;30:337-42.
42. Dańczak-Pazdrowska A, Kowalczyk M, Szramka-Pawlak B i wsp. Higher expression of VEGF-A in PBMCs and lower in the skin of Morphea patients. *EADV Istanbul 2013. 22nd Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology "Dermatovenereology in a changing world". Istanbul, Turkey, 2-6 October 2013. P266.CD-ROM.*
43. Daoud MS, Su WP, Leiferman KM i wsp. Bullous morphea: clinical, pathologic, and immunopathologic evaluation of thirteen cases. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:937-43.
44. Davis DA, Cohen PR, McNeese MD i wsp. Localized scleroderma in breast cancer patients treated with supervoltage external beam radiation: radiation port scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:923-7.
45. Denton CP, Merkel PA, Furst DE i wsp. Recombinant human anti-transforming growth factor beta 1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis Rheum* 2007;56:323-33.
46. Dervis E, Acbay O, Barut G i wsp. Association of vitiligo, morphea, and Hashimoto's thyroiditis. *Int J Dermatol* 2004;43:236-7.
47. Diab M, Coloe JR, Magro C, Bechtel MA. Treatment of recalcitrant generalized morphea with infliximab. *Arch Dermatol* 2010;146:601-4.
48. Diaz-Perez JL, Connolly SM, Winkelmann RK. Disabling pansclerotic morphea of children. *Arch Dermatol* 1980;116:169-73.
49. Dillon WI, Saed GM, Fivenson DP. *Borrelia burgdorferi* DNA is undetectable by polymerase chain reaction in skin lesions of morphea, scleroderma, or lichen sclerosus et atrophicus of patients from North America. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:617-20.
50. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R i wsp. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 2002;4:R11.
51. Distler O, Distler JH, Scheid A i wsp. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2004;95:109-16.
52. Doi K, Itoh H, Komatsu Y i wsp. Vascular endothelial growth factor suppresses C-type natriuretic peptide secretion. *Hypertension* 1996;27:811-5
53. Dziańkowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Dziańkowska-Zaboroszczyk E i wsp. Decreased ratio of circulatory vascular endothelial growth factor to endostatin in patients with systemic sclerosis-association with pulmonary involvement. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:508-13.
54. Dziańkowska-Bartkowiak B, Żebrowska A, Wagrowska-Danielewicz M i wsp. Systemic sclerosis and scleroderma circumscripta-disturbances of selected serum parameters which are responsible for vascular changes and CD34 expression in involved skin. *Przegl Lek* 2009;66:1040-5.
55. Eisendle K, Grabner T, Zelger B. Morphea: a manifestation of infection with *Borrelia* species? *Br J Dermatol* 2007;157:1189-98.
56. Falanga V, Medsger TA Jr, Reichlin M i wsp. Linear scleroderma. Clinical spectrum, prognosis, and laboratory abnormalities. *Ann Intern Med* 1986;104:849-57.

57. Falanga V, Medsger TA Jr, Reichlin M. Antinuclear and anti-single-stranded DNA antibodies in morphea and generalized morphea. *Arch Dermatol* 1987;123:350-3.
58. Fall N, Bove KE, Stringer K i wsp. Association between lack of angiogenic response in muscle tissue and high expression of angiostatic ELR-negative CXC chemokines in patients with juvenile dermatomyositis: possible link to vasculopathy. *Arthritis Rheum* 2005;52:3175-80.
59. Farrell AM, Dean D, Charnock M i wsp. Distribution of transforming growth factor-beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2 and TGF-beta 3 and vascular endothelial growth factor in vulvar lichen sclerosis. *J Reprod Med* 2001;46:117-24.
60. Fawzi MM, Tawfik SO, Eissa AM i wsp. Expression of insulin-like growth factor-I in lesional and non-lesional skin of patients with morphoea. *Br J Dermatol* 2008;159:86-90.
61. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106:148-56.
62. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 2005;94:209-31.
63. Fett N, Werth VP. Update on morphea: part I. Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 2011;64:217-28.
64. Gambichler T, Kreuter A, Hoffmann K i wsp. Bilateral linear scleroderma "en coup de sabre" associated with facial atrophy and neurological complications. *BMC Dermatol* 2001;1:9.
65. Gillery P, Serpier H, Polette M i wsp. Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1992;57:244-53.
66. Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W i wsp. *Immunologia*. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2009.
67. González-López MA, Drake M, González-Vela MC i wsp. Generalized morphea and primary biliary cirrhosis coexisting in a male patient. *J Dermatol* 2006;33:709-13.
68. Grassegger A, Schuler G, Hessenberger G i wsp. Interferon-gamma in the treatment of systemic sclerosis: a randomized controlled multicentre trial. *Br J Dermatol* 1998;139:639-48.
69. Gupta RA, Fiorentino D. Localized scleroderma and systemic sclerosis: is there a connection? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007;21:1025-36.
70. Hama N, Itoh H, Shirakami G i wsp. Detection of C-type natriuretic peptide in human circulation and marked increase of plasma CNP level in septic shock patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:1177-82.
71. Harrington CI, Dunsmore IR. An investigation into the incidence of auto-immune disorders in patients with localized morphoea. *Br J Dermatol* 1989;120:645-8.
72. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K i wsp. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 1997;24:663-5.
73. Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T i wsp. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. *Dermatology* 2003;207:141-7.
74. Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K i wsp. Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J Dermatol Sci* 2005;39:1-7.
75. Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T i wsp. Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2011;30:231-7.
76. Hayakawa I, Hasegawa M, Takehara K i wsp. Anti-DNA topoisomerase IIalpha autoantibodies in localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004;50:227-32.

77. Hebbbar M, Peyrat JP, Hornez L i wsp. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:889-93.
78. Helmbold P, Fiedler E, Fischer M i wsp. Hyperplasia of dermal microvascular pericytes in scleroderma. *J Cutan Pathol* 2004;31:431-40.
79. Higashi-Kuwata N, Makino T, Inoue Y i wsp. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. *Exp Dermatol* 2009;18:727-9.
80. Higley H, Persichitte K, Chu S i wsp. Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor beta 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea, and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 1994;37:278-88.
81. Hrycek E, Franek A, Błaszczak E i wsp. Serum levels of selected chemokines in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol Int* 2013;33:2423-7.
82. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr i wsp. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1363-73.
83. Hummers LK, Hall A, Wigley FM, Simons M. Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma. *J Rheumatol* 2009;36:576-82.
84. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA i wsp. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1428-35.
85. Hunzelmann N, Anders S, Fierlbeck G i wsp. Double-blind, placebo-controlled study of intralesional interferon gamma for the treatment of localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1997;36:433-5.
86. Ihn H, Fujimoto M, Sato S i wsp. Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1994a;31:591-5.
87. Ihn H, Sato S, Fujimoto M i wsp. Demonstration of interleukin 8 in serum samples of patients with localized scleroderma. *Arch Dermatol* 1994b;130:1327-8.
88. Ihn H, Sato S, Fujimoto M i wsp. Demonstration of interleukin-2, interleukin-4 and interleukin-6 in sera from patients with localized scleroderma. *Arch Dermatol Res* 1995;287:193-7.
89. Ihn H, Sato S, Fujimoto M i wsp. Clinical significance of serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with localized scleroderma. *Br J Dermatol* 1996;134:843-7.
90. Ihn H, Yazawa N, Kubo M i wsp. Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with localized scleroderma and correlated with serological and clinical features of the disease. *J Rheumatol* 2000;27:698-702.
91. Ihn H Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:681-5.
92. Iranzo P, Lopez I, Palou J i wsp. Morphoea in three siblings. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:46-7.
93. Jabłońska S, Szczepański A. Atrophoderma pasini-Pierini: is it an entity? *Dermatologica* 1962;125:226-42.
94. Jabłońska S. Scleroderma and pseudoscleroderma. Warszawa PZWL 1975.
95. Jabłońska S, Blaszczyk M. Is superficial morphea synonymous with atrophoderma Pasini-Pierini? *J Am Acad Dermatol* 2004;50:979-80.
96. Jacobson L, Palazij R, Jaworsky C. Superficial morphea. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:323-5.
97. Jing J, Dou TT, Yang JQ i wsp. Role of endothelin-1 in the skin fibrosis of systemic sclerosis. *Eur Cytokine Netw* 2015;26:10-4.
98. Jinnin M, Ihn H, Yazawa N i wsp. Serum levels of manganese superoxide dismutase in patients with localized scleroderma. *Exp Dermatol* 2004;13:357-60.

99. Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 1979;149:1326-35.
100. Kahaleh MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:718-22.
101. Kähäri VM, Sandberg M, Kalimo H i wsp. Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* 1988;90:664-70.
102. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997;6:199-213.
103. Kavala M, Zindanci I, Demirkesen C i wsp. Intertriginous bullous morphea: A clue for the pathogenesis? *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007;73:262-4.
104. Kencka D, Blaszczyk M, Jabłońska S. Atrophoderma Pasini-Pierini is a primary atrophic abortive morphea. *Dermatology* 1995;190:203-6.
105. Kikuchi K, Kubo M, Kadono T i wsp. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in collagen diseases. *Br J Dermatol* 1998;139:1049-51.
106. Kim DH, Lee KR, Kim TY i wsp. Coexistence of lichen sclerosus with morphea showing bilateral symmetry. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:416-8.
107. Kobayasi T, Serup J. Vascular changes in morphea. *Acta Derm Venereol* 1985;65:116-20.
108. Kohno M, Horio T, Yokokawa K i wsp. C-type natriuretic peptide inhibits thrombin- and angiotensin II-stimulated endothelin release via cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Hypertension* 1992;19:320-5.
109. Kowalewski C, Kozłowska A, Górska M i wsp. Alterations of basement membrane zone and cutaneous microvasculature in morphea and extragenital lichen sclerosus. *Am J Dermatopathol* 2005;27:489-96.
110. Krell JM, Solomon AR, Glavey CM i wsp. Nodular scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:343-5.
111. Kreuter A, Krieg T, Worm M i wsp. AWMF Guideline no. 013/066. Diagnosis and therapy of circumscribed scleroderma. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7:1-14.
112. Kreuter A. Localized scleroderma. *Dermatol Ther* 2012;25:135-47.
113. Kubo M, Ihn H, Yamane K i wsp. Up-regulated expression of transforming growth factor beta receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001;44:731-4.
114. Kurzinski K, Torok KS. Cytokine profiles in localized scleroderma and relationship to clinical features. *Cytokine* 2011;55:157-64.
115. Kühnl P, Sibrowski W, Boehm BO i wsp. Association of HLA antigens with progressive systemic sclerosis and morphea. *Tissue Antigens* 1989;34:207-9.
116. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F i wsp. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 2003;197:1537-49.
117. Laxer RM, Feldman BM. General and local scleroderma in children and dermatomyositis and associated syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:458-64.
118. Laxer RM, Zulian F. Localized scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:606-13.
119. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004;18:816-27.
120. Lee P. Clinical aspects of systemic and localized sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 1993;5:785-91.
121. Leitenberger JJ, Cayce RL, Haley RW i wsp. Distinct autoimmune syndromes in morphea: a review of 245 adult and pediatric cases. *Arch Dermatol* 2009;145:545-50.

122. Liakouli V, Cipriani P, Marrelli A i wsp. Angiogenic cytokines and growth factors in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2011;10:590-4.
123. Lipko-Godlewska S, Wojas-Pelc A. Stężenie INF- $\gamma$  w surowicy chorych na twardzinę skórną plackowatą i atrophoderma Pasini-Pierini z uwzględnieniem klinicznej aktywności choroby. *Post Dermatol Alergol* 2008;25:214–219.
124. Liu M, Guo S, Hibbert JM, i wsp. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:121-30.
125. Liu X, Mayes MD, Tan FK i wsp. Correlation of interferon-inducible chemokine plasma levels with disease severity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2013;65:226-35.
126. Longo F, Saletta S, Lepore L i wsp. Localized scleroderma after infection with Epstein-Barr virus. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:681-3.
127. González-López MA, Drake M, González-Vela MC i wsp. Generalized morphea and primary biliary cirrhosis coexisting in a male patient. *J Dermatol* 2006;33:709-13.
128. Mackiewicz Z, Sukura A, Povilenaitė D i wsp. Increased but imbalanced expression of VEGF and its receptors has no positive effect on angiogenesis in systemic sclerosis skin. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:641-6.
129. Magee KE, Kelsey CE, Kurzinski KL i wsp. Interferon-gamma inducible protein-10 as a potential biomarker in localized scleroderma. *Arthritis Res Ther* 2013;15:188.
130. Majeed M, Al-Mayouf SM, Al-Sabban E i wsp. Coexistent linear scleroderma and juvenile systemic lupus erythematosus. *Pediatr Dermatol* 2000;17:456-9.
131. Malinowski M, Biernat J, Roleder T i wsp. Natriuretic peptides: anything new in cardiology? *Kardiol Pol* 2006;64:578-85.
132. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L i wsp. Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* 2010;14:1241-54.
133. Manetti M, Guiducci S, Romano E i wsp. Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2011a;109:14-26.
134. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L i wsp. Impaired angiogenesis in systemic sclerosis: the emerging role of the antiangiogenic VEGF(165)b splice variant. *Trends Cardiovasc Med* 2011b;21:204-10.
135. Maragh SH, Davis MD, Bruce AJ i wsp. Disabling pansclerotic morphea: clinical presentation in two adults. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:115-9.
136. Marzano AV, Menni S, Parodi A i wsp. Localized scleroderma in adults and children. Clinical and laboratory investigations on 239 cases. *Eur J Dermatol* 2003;13:171-6.
137. Mayorquin FJ, McCurley TL, Levernier JE i wsp. Progression of childhood linear scleroderma to fatal systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994;21:1955-7.
138. McNallan KT, Aponte C, el-Azhary R i wsp. Immunophenotyping of chimeric cells in localized scleroderma. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:398-402.
139. McNiff JM, Glusac EJ, Lazova RZ i wsp. Morphea limited to the superficial reticular dermis: an underrecognized histologic phenomenon. *Am J Dermatopathol* 1999;21:315-9.
140. Mihas AA, Abou-Assi SG, Heuman DM. Cutae morphea associated with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003;39:458-9.
141. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M i wsp. Rheumatoid factor isotypes in localized scleroderma. *Clin Exp Dermatol* 2005;30:405-8.

142. Moinzadeh P, Krieg T, Hunzelmann N. Imatinib treatment of generalized localized scleroderma (morphea). *J Am Acad Dermatol* 2010;63:102-4.
143. Morell A, Betlloch I, Sevilla A i wsp. Morphea-like reaction from vitamin K1. *Int J Dermatol* 1995;34:201-2.
144. Moretti S, Spallanzani A, Pinzi C. Skin angiogenesis: biologic bases for pathological processes. *Clin Dermatol* 1999;17:629-31.
145. Murakami S, Nagaya N, Itoh T i wsp. C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:1172-7.
146. Nagai M, Hasegawa M, Takehara K i wsp. Novel autoantibody to Cu/Zn superoxide dismutase in patients with localized scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004;122:594-601.
147. Nagaoka T, Sato S, Hasegawa M i wsp. Serum levels of soluble interleukin 6 receptor and soluble gp130 are elevated in patients with localized scleroderma. *J Rheumatol* 2000;27:1917-21.
148. Namiecińska M, Marciniak K, Nowak JZ. VEGF jako czynnik angiogeny, neurotroficzny i neuroprotekcyny. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005;59:573-83.
149. Nouri S, Jacobe H. Recent developments in diagnosis and assessment of morphea. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:308.
150. Ohmatsu H, Tada Y, Yazawa N i wsp. Generalized morphea positive for anticentromere antibody. *Eur J Dermatol* 2008;18:718-9.
151. Olewicz-Gawlik A, Trzybulska D, Grala P i wsp. Blood serum levels of amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide in patients with rheumatoid arthritis. *Adv Med Sci* 2010;55:261-5.
152. Olewicz-Gawlik A, Dańczak-Pazdrowska A, Klama K i wsp. Blood serum levels of amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide in patients with systemic sclerosis. *Connect Tissue Res* 2010;51:83-7.
153. Orozco-Covarrubias L, Guzmán-Meza A, Ridaura-Sanz C i wsp. Scleroderma ‘en coup de sabre’ and progressive facial hemiatrophy. Is it possible to differentiate them? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002;16:361-6.
154. Ozcelik O, Haytac MC, Ergin M i wsp. The immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factors A and C and microvessel density in gingival tissues of systemic sclerosis patients: their possible effects on gingival inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:481-5.
155. Parra V, Driban N, Bassotti A. Localized morphea and myasthenia gravis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:e5.
156. Patrizi A, Marzaduri S, Marini R. A familial case of scleroderma en coup de sabre. *Acta Derm Venereol* 2000;80:237.
157. Peroni A, Zini A, Braga V i wsp. Drug-induced morphea: report of a case induced by balicitib and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:125-9.
158. Peterson LS, Nelson AM, Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc* 1995;70:1068-76.
159. Peterson LS, Nelson AM, Su WP i wsp. The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. *J Rheumatol* 1997;24:73-80.
160. Piguet PF, Grau GE, Vassalli P. Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries, and epidermal cells, or massive tissue necrosis. *Am J Pathol* 1990;136:103-10.
161. Potter LR, Yoder AR, Flora DR i wsp. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol* 2009;191:341-66.

162. Prey S, Ezzedine K, Doussau A i wsp. Imatinib mesylate in scleroderma-associated diffuse skin fibrosis: a phase II multicentre randomized double-blinded controlled trial. *Br J Dermatol* 2012;167:1138-44.
163. Prickett TC, Yandle TG, Nicholls MG i wsp. Identification of amino-terminal pro-C-type natriuretic peptide in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:513-7.
164. Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S i wsp. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 2009;37:1207-13.
165. Querfeld C, Eckes B, Huerkamp C i wsp. Expression of TGF-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in localized and systemic scleroderma. *J Dermatol Sci* 1999;21:13-22.
166. Rabquer BJ, Tsou PS, Hou Y i wsp. Dysregulated expression of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and CXCL16 and their receptors in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:18.
167. Rak JM, Pagni PP, Tiev K i wsp. Male microchimerism and HLA compatibility in French women with scleroderma: a different profile in limited and diffuse subset. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:363-6.
168. Ramírez J, Hernández MV, Galve J i wsp. Morphea associated with the use of adalimumab: a case report and review of the literature. *Mod Rheumatol* 2012;22:602-4.
169. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M i wsp. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther* 2008;13:969-76.
170. Rencic A, Goyal S, Mofid M i wsp. Bullous lesions in scleroderma. *Int J Dermatol* 2002;41:335-9.
171. Restrepo JF, Guzmán R, Rodríguez G i wsp. Expression of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor in linear scleroderma. *Biomedica* 2003;23:408-15.
172. Riccieri V, Stefanantoni K, Vasile M i wsp. Abnormal plasma levels of different angiogenic molecules are associated with different clinical manifestations in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:46-52.
173. Rokicki W, Dukalska M, Rubisz-Brzezińska J i wsp. Circulatory system in children with localized scleroderma. *Pediatr Cardiol* 1997;18:213-7.
174. Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta* 2012;413:1364-73.
175. Sato S, Ihn H, Soma Y i wsp. Antihistone antibodies in patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 1993;36:1137-41.
176. Sato S, Fujimoto M, Kikuchi K i wsp. Soluble CD4 and CD8 in serum from patients with localized scleroderma. *Arch Dermatol Res* 1996;288:358-62.
177. Sato S. Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:503-7.
178. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M i wsp. Antiphospholipid antibody in localised scleroderma. *Ann Rheum Dis* 2003;62:771-4.
179. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A i wsp. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 2004;138:540-6.
180. Scotland RS, Cohen M, Foster P i wsp. C-type natriuretic peptide inhibits leukocyte recruitment and platelet-leukocyte interactions via suppression of P-selectin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14452-7.
181. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H i wsp. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996;98:785-92.



182. al-Shaikh A, Freeman C, Avruch L i wsp. Use of magnetic resonance imaging in diagnosing eosinophilic fasciitis. Report of two cases. *Arthritis Rheum* 1994;37:1602-8.
183. Shulman LE Diffuse fasciitis with hypergammaglobulinemia and eosinophilia: a new syndrome? *Trans Assoc Am Physicians* 1975;88:70-86.
184. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 2001;99:308-19.
185. Soma Y, Tamaki T, Kikuchi K i wsp. Coexistence of morphea and systemic sclerosis. *Dermatology* 1993;186:103-5.
186. Soma Y, Fujimoto M. Frontoparietal scleroderma (en coup de sabre) following Blaschko's lines. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:366-8.
187. Sommer A, Gambichler T, Bacharach-Buhles M i wsp. Clinical and serological characteristics of progressive facial hemiatrophy: a case series of 12 patients. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:227-33.
188. Soylu S, Gül U, Gönül M i wsp. An uncommon presentation of the co-existence of morphea and vitiligo in a patient with chronic hepatitis B virus infection: is there a possible association with autoimmunity? *Am J Clin Dermatol* 2009;10:336-8.
189. Spierer Z, Ilie B, Pick IA i wsp. Localized scleroderma following varicella in a three-year-old girl with IgA deficiency. *Acta Paediatr Scand* 1979;68:783-5.
190. Stewart FA, Gavino AC, Elewski BE. New side effect of TNF-alpha inhibitors: morphea. *Skinmed* 2013;11:59-60.
191. Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM i wsp. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol* 1992;263:1318-21.
192. Stone J, Franks AJ, Guthrie JA i wsp. Scleroderma "en coup de sabre": pathological evidence of intracerebral inflammation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:382-5.
193. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL i wsp. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348-57.
194. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN i wsp. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:593-609.
195. Stryjewski PJ, Nessler B, Cubera K i wsp. Natriuretic peptides. History of discovery, chemical structure, mechanism of action and the removal routes. Basis of diagnostic and therapeutic use. *Przegl Lek* 2013;70:463-7.
196. Succaria F, Kurban M, Kibbi AG i wsp. Clinicopathological study of 81 cases of localized and systemic scleroderma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27:191-6.
197. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K i wsp. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:863-70.
198. Suga S, Nakao K, Hosoda K i wsp. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 1992;130:229-39.
199. Suga S, Itoh H, Komatsu Y i wsp. Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages. *Endocrinology* 1998;139:1920-6.
200. Takehara K, Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:274-9.
201. Tang Y, Zhang F, Huang L i wsp. The Protective Mechanism of Fluorofenidone in Renal Interstitial Inflammation and Fibrosis. *Am J Med Sci.* 2015;350:195-203.
202. Toledano C, Rabhi S, Kettaneh A i wsp. Localized scleroderma: a series of 52 patients. *Eur J Intern Med* 2009;20:331-6.

203. Tollefson MM, Witman PM. En coup de sabre morphea and Parry-Romberg syndrome: a retrospective review of 54 patients. *J Am Acad Dermatol* 2007;56:257-63.
204. Tomimura S, Ogawa F, Iwata Y i wsp. Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with localized scleroderma. *J Dermatol Sci* 2008;52:47-54.
205. Torok KS, Kurzinski K, Kelsey C i wsp. Peripheral blood cytokine and chemokine profiles in juvenile localized scleroderma: T-helper cell-associated cytokine profiles. *Semin Arthritis Rheum* 2015;45:284-93.
206. Torrelo A, Suárez J, Colmenero I i wsp. Deep morphea after vaccination in two young children. *Pediatr Dermatol* 2006;23:484-7.
207. Totsune K, Takahashi K, Murakami O i wsp. Elevated plasma C-type natriuretic peptide concentrations in patients with chronic renal failure. *Clin Sci (Lond)* 1994;87:319-22.
208. Tuffanelli D. Localized scleroderma. *Semin Cutan Med Surg* 1998;17:27-33.
209. Uziel Y, Krafchik BR, Silverman ED i wsp. Localized scleroderma in childhood: a report of 30 cases. *Semin Arthritis Rheum* 1994;23:328-40.
210. Uziel Y, Feldman BM, Krafchik BR i wsp. Increased serum levels of TGFbeta1 in children with localized scleroderma. *Pediatr Rheumatol Online J* 2007;5:22.
211. Varga J, Kähäri VM. Eosinophilia-myalgia syndrome, eosinophilic fasciitis, and related fibrosing disorders. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:562-70.
212. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557-67.
213. Venneker GT, Das PK, Naafs B i wsp. Morphoea lesions are associated with aberrant expression of membrane cofactor protein and decay accelerating factor in vascular endothelium. *Br J Dermatol* 1994;131:237-42.
214. Vierra E, Cunningham BB. Morphea and localized scleroderma in children. *Semin Cutan Med Surg* 1999;18:210-25.
215. Weibel L, Harper JI. Linear morphoea follows Blaschko's lines. *Br J Dermatol* 2008;159:175-81.
216. Wienecke R, Schlüpen EM, Zöchling N i wsp. No evidence for *Borrelia burgdorferi*-specific DNA in lesions of localized scleroderma. *J Invest Dermatol* 1995;104:23-6.
217. Wollina U, Buslau M, Heinig B i wsp. Disabling pansclerotic morphea of childhood poses a high risk of chronic ulceration of the skin and squamous cell carcinoma. *Int J Low Extrem Wounds* 2007;6:291-8.
218. Wong SS, Holt PJ. Generalized morphoea and primary biliary cirrhosis: a rare association and improvement with oxyphenfylline. *Clin Exp Dermatol* 1992;17:371-3.
219. Yamamoto T. Chemokines and chemokine receptors in scleroderma. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140:345-56.
220. Yamane K, Ihn H, Kubo M i wsp. Increased serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 and E-selectin in patients with localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:64-9.
221. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* 2006;10:515-27.
222. Zambrano MC, Beklemisheva AA, Bryksin AV i wsp. *Borrelia burgdorferi* binds to, invades, and colonizes native type I collagen lattices. *Infect Immun* 2004;72:3138-46.
223. Zheng XY, Zhang JZ, Tu P i wsp. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and platelet-derived growth factor beta-receptor in fibroblasts of scleroderma. *J Dermatol Sci* 1998;18:90-7.

224. Zhou L, Askew D, Wu C i wsp. Cutaneous gene expression by DNA microarray in murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma. *J Invest Dermatol* 2007;127:281-92.
225. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
226. Zulian F. Systemic manifestations in localized scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2004;6:417-24.
227. Zulian F, Vallongo C, Woo P i wsp. Localized scleroderma in childhood is not just a skin disease. *Arthritis Rheum* 2005;52:2873-81.
228. Zulian F, Athreya BH, Laxer R i wsp. Juvenile localized scleroderma: clinical and epidemiological features in 750 children. An international study. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:614-20.

