

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Aleksandra Dańczak-Pazdrowska

**ZNACZENIE INTERLEUKINY-17A I WYBRANYCH
CYTOKIN W PATOMECHANIZMIE MORFEI**

Poznań 2011

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
Poznań 2011

© Copyright by Aleksandra Dańczak-Pazdrowska, 2011

Tytuł angielski

*Significance of interleukin-17A and of selected cytokines in pathomechanism
of morphea*

Recenzent

Prof. dr hab. Wojciech Silny

Korekta

Janina S. Rogalińska

Skład komputerowy

Beata Łakomiak

ISBN 978-83-7597-116-3

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
60-812 Poznań, ul. Bukowska 70

Ark. wyd. 6,9. Ark. druk. 10,0. Papier offset. kl. III 80 g/m², 70 x 100.

Format B5. Zam. nr 63/11.

Druk ukończono w kwietniu 2011 r.

*Moim Rodzicom, Synowi
i Mężowi pracę tę poświęcam*

SPIS TREŚCI

| | |
|---|----|
| WYKAZ CZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW | 7 |
| 1. Wstęp | 9 |
| 1.1. Podział | 9 |
| 1.2. Obraz kliniczny | 10 |
| 1.3. Epidemiologia | 16 |
| 1.4. Etiologia | 17 |
| 1.5. Rozpoznanie | 20 |
| 1.6. Rokowanie i przebieg | 21 |
| 1.7. Patogeneza | 21 |
| 1.7.1. Teoria naczyniowa | 22 |
| 1.7.2. Teoria immunologiczna | 24 |
| 1.7.3. Zaburzenie metabolizmu macierzy zewnątrzkomórkowej | 29 |
| 1.8. Morfea a liszaj twardzinowy | 30 |
| 1.9. Morfea a twardzina układowa | 31 |
| 1.10. Limfocyty Th17 i ich rola w chorobach autoimmunizacyjnych | 32 |
| 2. Założenia i cele pracy | 37 |
| 3. Materiał i metody | 38 |
| 3.1. Grupy badane i kontrolne | 38 |
| 3.2. Materiał | 39 |
| 3.2.1. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej i osocze | 39 |
| 3.2.2. Wycinki skóry | 39 |
| 3.3. Metody | 40 |
| 3.3.1. Ocena aktywności choroby | 40 |
| 3.3.2. Ocena rozległości i nasilenia zmian skórnych | 40 |
| 3.3.3. Badanie immunoenzymatyczne ELISA | 43 |
| 3.3.4. Badania ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym | 43 |
| 3.3.5. Badania ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF w skórze metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym | 47 |
| 3.3.6. Ocena przeciwciał przeciwjądrowych | 47 |
| 3.4. Analiza statystyczna | 47 |
| 4. Wyniki | 48 |
| 4.1. Badanie podmiotowe i przedmiotowe | 48 |
| 4.2. Ekspresja genu IL-17A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jej osoczowe stężenie oraz ekspresja jej genu w skórze chorych na morfeę ... | 49 |
| 4.3. Ekspresja genu IL-23 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jej osoczowe stężenie oraz ekspresja jej genu w skórze chorych na morfeę ... | 52 |
| 4.4. Osoczowe stężenie IL-21 u chorych na morfeę | 53 |
| 4.5. Ekspresja genu IL-1 β w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jej osoczowe stężenie oraz ekspresja jej genu w skórze chorych na morfeę ... | 53 |

| | |
|--|-----|
| 4.6. Ekspresja genu VEGF-A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze chorych na morfeę | 56 |
| 4.7. Ekspresja genu bFGF w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na morfeę | 58 |
| 4.8. Ekspresja genu HGF w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze chorych na morfeę | 59 |
| 4.9. Ekspresja TGF β 1 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze chorych na morfeę | 60 |
| 4.10. Zależności pomiędzy IL-17A a wybranymi cytokinami mającymi potencjalny wpływ na polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th17 u chorych na morfeę | 61 |
| 4.11. Zależności pomiędzy IL-17A a wybranymi cytokinami proangiogennymi i związanymi z procesem włóknienia | 62 |
| 4.12. Ocena zależności pomiędzy mianem przeciwciał przeciwjądrowych a wybranymi danymi laboratoryjnymi i klinicznymi | 62 |
| 4.13. Ocena ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , VEGF-A, bFGF, HGF i TGF β 1 oraz stężenia osoczowego IL-17A, IL-21, IL-23 i IL-1 β u chorych na morfeę w porównaniu z chorymi na na postać ograniczoną twardziny układowej | 63 |
| 5. Dyskusja | 73 |
| 5.1. Wybrane cytokiny odpowiedzi Th17 w morfei | 73 |
| 5.2. Interleukina-17A a wybrane cytokiny proangiogenne w morfei | 79 |
| 5.3. Interleukina-17A a kluczowa cytokina profibrotyczna – TGF β 1 w morfei | 83 |
| 5.4. Interleukina-17A i wybrane cytokiny z nią związane a zjawiska autoimmunizacyjne w morfei | 86 |
| 5.5. Interleukina-17A i wybrane cytokiny z nią związane w morfei i w postaci ograniczonej twardziny układowej | 87 |
| 6. Wnioski | 90 |
| 7. Streszczenie | 91 |
| 8. Summary | 97 |
| 9. Piśmiennictwo | 103 |

WYKAZ CZĘŚCIEJ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|--------|---|
| ACA | – przeciwciała antycentromerowe (<i>anticentromer antibodies</i>) |
| ACR | – Amerykańskie Kolegium Reumatologiczne (<i>American Collage of Rheumatology</i>) |
| ANA | – przeciwciała przeciwjądrowe (<i>antinuclear antibodies</i>) |
| APP | – pierwotnie zanikowa odmiana morfeji (<i>atrophyoderma Pasini-Pierini</i>) |
| bFGF | – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (<i>basic fibroblast growth factor</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 morfeji (<i>deep morphea</i>) |
| dSSc | – postać uogólniona twardziny układowej (<i>diffuse systemic sclerosis</i>) |
| EC | – komórki śródbłonna (<i>endothelial cells</i>) |
| ECM | – macierz zewnątrzkomórkowa (<i>extracellular matrix</i>) |
| EGF | – czynnik wzrostu naskórka (<i>epidermal growth factor</i>) |
| FE | – eozynofilowe zapalenie powięzi (<i>fascitis eosinophilica</i>) |
| FGF | – czynnik wzrostu fibroblastów (<i>fibroblast growth factor</i>) |
| GAPDH | – dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa |
| G-CSF | – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>) |
| GM | – morfea uogólniona (<i>morphea generalizata</i>) |
| GM-CSF | – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>) |
| GVHD | – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (<i>graft versus host disease</i>) |
| HGF | – czynnik wzrostu hepatocytów (<i>hepatocyte growth factor</i>) |
| ICAM | – cząsteczka adhezji międzykomórkowej (<i>intercellular adhesion mollecul</i>) |
| IFN | – interferon |
| Ig | – immunoglobulina |
| IL | – interleukina |
| IL-17R | – receptor IL-17 |
| IL-23R | – receptor IL-23 |
| LM | – morfea linijna (<i>linear morphea</i>) |
| LS | – liszaj twardzinowy (<i>lichen sclerosus</i>) |
| ISSc | – postać ograniczona twardziny układowej (<i>limited systemic sclerosis</i>) |
| max | – wartość maksymalna |
| MCP | – błonowy kofaktor białkowy (<i>membrane cofactor protein</i>) |
| MCDS | – morfea typu cięcia szabłą (<i>morphea en coup de sabre</i>) |
| MEP | – morfea plackowata (<i>morphea en plaques</i>) |
| min | – wartość minimalna |
| MMP | – metaloproteinaza macierzy (<i>matrix metalloproteinase</i>) |
| n | – liczba badanych |
| NGF | – czynnik wzrostu nerwów (<i>nerve growth factor</i>) |
| NO | – tlenek azotu |

| | |
|--------|---|
| PAI | – inhibitor aktywatora plazminogenu (<i>plasminogen activator inhibitor</i>) |
| PBMC | – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>) |
| PDGF | – płytkopochodny czynnik wzrostu (<i>platelet-derived growth factor</i>) |
| PHA | – postępujący zanik połowicy twarzy (<i>progressive hemiatrophia faciei</i>) |
| rt-PCR | – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (<i>real time polymerase chain reaction</i>) |
| pz | – pary zasad |
| SD | – odchylenie standardowe (<i>standard deviation</i>) |
| SLE | – toczeń rumieniowaty układowy (<i>systemic lupus erythematosus</i>) |
| SOCS | – supresor sygnałów przekazywanych przez cytokiny (<i>suppressor of cytokine signaling</i>) |
| SSc | – twardzina układowa (<i>systemic sclerosis</i>) |
| STAT | – przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji (<i>signal transducers and activators of transcription</i>) |
| TIMP | – tkankowy inhibitor metaloproteinaz (<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>) |
| TNF | – czynnik martwicy guza (<i>tumor necrosis factor</i>) |
| TGF | – transformujący czynnik wzrostu (<i>transforming growth factor</i>) |
| Th | – limfocyty T pomocnicze (<i>T helper</i>) |
| T reg | – limfocyty T regulatorowe |
| UV | – ultrafiolet |
| VCAM | – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (<i>vascular cell adhesion molecule</i>) |
| VEGF | – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (<i>vascular endothelial growth factor</i>) |

1. Wstęp

Morfea (*morphea*), zwana także twardziną ograniczoną (*localized scleroderma, scleroderma circumscripta*), jest przewlekłą chorobą skóry o nieznannej, przypuszczalnie autoimmunizacyjnej etiologii. Zaliczana jest do grupy chorób tkanki łącznej. Określenie „*scleroderma*”, wprowadzone blisko 200 lat temu, oznacza dosłownie twardą skórę i ma opisywać choroby przebiegające z włóknieniem skóry i struktur przyległych. Wynikiem włóknienia skóry jest ostatecznie jej stwardnienie, utrata możliwości formowania zmarszczek i zanik poletkowania. Morfea jest chorobą narażającą chorego w swoich najłagodniejszych, aczkolwiek najczęstszych postaciach, przede wszystkim na problemy natury estetycznej, niemniej może prowadzić również do znacznych zaburzeń funkcjonalnych, takich jak, np. spowolnienie wzrostu kończyny czy ograniczenie ruchomości w stawach i w konsekwencji do pogorszenia jakości jego życia. Kwestią dyskusji jest, czy morfea i twardzina układowa [*systemic sclerosis (SSc)*] to odmiany tej samej choroby, czy dwie różne jednostki o zbliżonych cechach klinicznych i procesach patogenetycznych [23, 33, 90, 121, 149, 235].

1.1. Podział

Schematy klasyfikacji morfeji przechodziły kilka rewizji. Obecnie najczęściej stosuje się te zaproponowane przez Peterson i wsp. w 1995 r. oraz Kreutera i wsp. w 2009 r. [149, 235]. Kreuter i wsp. proponują podział morfeji na:

- postać ograniczoną, do której zaliczają:
 - odmianę plackowatą [*morphea en plaques (MEP), circumscribed morphea*]
 - odmianę drobnogrudkową (*guttate morphea*)
 - odmianę pierwotnie zanikową [*atrophoderma Pasini-Pierini (APP), erythematous localized morphea*]
- postać uogólnioną, która obejmuje:
 - klasyczną postać uogólnionej morfeji [*morphea generalisata, generalized morphea (GM)*]
 - *disabling pansclerotic morphea*
 - eozynofilowe zapalenie powięzi [*fasciitis eosinophilica (FE), eosinophilic fasciitis, zespół Shulmana*]
- postać liniową [*linear scleroderma, linear morphea (LM)*], w tym:
 - postać liniową kończyn (postać akralna)
 - postać typu cięcia szablą [*morphea en coup de sabre (MCDS)*]

- postępujący zanik połowicy twarzy [zespół Parry’ego-Romberga, *progressive hemiatrophia faciei* (PHA)]
- postać głęboką [*deep morphea* (DM)] (149)

W podziale proponowanym przez Peterson i wsp. [235]:

- do podgrupy postaci ograniczonych wliczana jest również morfea guzowata/bliznowcowa (*nodular/keloid morphea*) oraz opcjonalnie liszaj twarżinowy [*lichen sclerosus* (LS)]
- *disabling pansclerotic morphea* i FE zaliczane są do postaci głębokich, razem z odmianą podskórną i pododmianą głęboką
- odrębną podjednostkę stanowi postać pęcherzowa (*bullous morphea*, *bullous morphea*)

Ponadto niektórzy autorzy proponują zaliczenie MCDS i PHA do wspólnej podgrupy, o nazwie czaszkowotwarzowa LM [66, 278]. W literaturze spotykane są również określenia morfea powierzchowna (*superficial morphea*) [124, 184, 264] oraz formy mieszane. To ostatnie stosowane jest w odniesieniu do chorych, u których stwierdza się współistnienie co najmniej dwóch postaci morfeji [48, 102]. Niektórzy autorzy sugerują również, że szczególnymi odmianami morfeji mają być linijna atrofodermia Moulina (*atrophoderma linearis Moulina*) [292] i uogólniona atrofia Goversa (*panatrophia Govers*) [188, 197]. Kwestią sporną pozostaje kwalifikacja LS, czemu poświęcony został osobny rozdział niniejszego opracowania, niemniej w pracach badawczych wyróżniana jest niekiedy podgrupa chorych ze współistniejącymi objawami morfeji i LS [135, 156, 185].

1.2. Obraz kliniczny

Odmiana plackowata morfeji jest najczęstszą postacią choroby. Zmiany pojawiają się zazwyczaj na tułowiu, niemniej mogą dotyczyć także innych lokalizacji, ale jedynie wyjątkowo twarzy. Początkowo stwierdza się rumieniowe bądź rumieniowo-obrzękowe ognisko (faza zapalna), o średnicy powyżej 1 cm, które następnie ulega stwardnieniu, nabierając białego, porcelanowego lub żółtego koloru (faza stwardnieniowa). W okresie tym obserwować można fioletową obwódkę (*lilac ring*). Kolejnym etapem, zwanym fazą regresji, jest zmiękczenie zmiany, czemu towarzyszy zanik oraz przebarwienie lub odbarwienie. Faza ta pojawia się zazwyczaj 2,5–5 lat od zachorowania i obserwuje się ją u 50% chorych, niemniej u części z nich po okresie utajenia dochodzi do reaktywacji choroby [49, 121, 149, 235, 273, 278, 287].

Postać drobnogrudkowa charakteryzuje się występowaniem na tułowiu, głównie w jego górnej części, licznych, drobnych ognisk o średnicy nieprzekraczającej 1 cm. Może imitować pozagenitalny LS lub współistnieć z LS [49, 149, 235, 287].

Odmiana pierwotnie zanikowa, jak się powszechnie uważa, opisana została przez Pasiniego w 1923 r. i Pieriniego w 1936 r., jednakże pierwsze doniesienia pochodzą od Brocqa i Civattea z 1902 r. oraz Jeanselme i wsp. z 1903 r. [121]. Choroba rozpoczyna się najczęściej w 2.–3. dekadzie życia i uważana jest za poronną postać morfeii. Początkowo jednak, z uwagi na jej nietypowy obraz kliniczny, traktowano tę jednostkę jako niezwiązaną z morfeją. Ogniska lokalizują się zazwyczaj na tułowiu i proksymalnych odcinkach kończyn i przybierają postać najczęściej niewielkich (do 1 cm średnicy) zagłębionych blaszek o niebieskobrazowym, szarym lub fioletowym odcieniu, zazwyczaj bez towarzyszącego stwardnienia i stanu zapalnego. Charakterystyczną cechą ma być „objaw urwiska” („*cliff sign*”, „*cliff drop*”), opisujący wyraźnie zaznaczony, ostry brzeg zagłębienia. Postać ta może współistnieć z klasycznymi wykwitami MEP [49, 121, 122, 138, 149, 235, 278, 287]. W 1999 r. McNiff i wsp. opisali, jak twierdzą, nową odmianę morfeii, którą nazwali powierzchowną [184]. Znakomita większość przypadków dotyczyć ma kobiet. Do zachorowania dochodzi zazwyczaj później niż w APP. Zmiany lokalizują się najczęściej symetrycznie w okolicach wyprzeniowych, na wewnętrznej powierzchni ud i skórze pach. Ogniska cechują się zmianą zabarwienia w stosunku do skóry otaczającej. W ich obrębie brak jest lub występuje jedynie minimalne stwardnienie. Od klasycznego obrazu APP postać ta ma się odróżnić przede wszystkim brakiem „objawu urwiska” i obecnością włóknienia w obrazie histopatologicznym w górnych partiach warstwy siateczkowatej skóry (dokładny opis badania histopatologicznego morfeii przedstawiono w podrozdziale poświęconym rozpoznaniu). Pozostaje niejasne, czy powierzchowna morfea jest synonimem APP [122, 124, 126, 184, 264].

Postać uogólniona w odmianie klasycznej, stanowiąca 8–13% wszystkich przypadków choroby, cechuje się występowaniem klasycznych ognisk MEP w 3 lub więcej z 7 lokalizacji anatomicznych (głowa i szyja, kończyna górna prawa, kończyna górna lewa, przednia powierzchnia tułowia, tylna powierzchnia tułowia, kończyna dolna prawa, kończyna dolna lewa). Zmiany, najczęściej symetryczne, dotyczą zazwyczaj tułowia, ud, okolicy łędźwiowo-krzyżowej, ale mogą się zlewać prowadząc do zajęcia prawie całej skóry, zazwyczaj z zaoszczędzeniem (w odróżnieniu od SSc) twarzy i rąk. Taka postać GM bywa nazywana w literaturze *pansclerotic morphea* lub morfeją rozlaną (*diffuse morphea*). Z kolei inni autorzy w odniesieniu do zmian o mniejszym nasileniu stosują określenie morfeii rozsianej (*morphea disseminata*), a dopiero objęcie procesem prawie całej powierzchni skóry (aczkolwiek określenie to jest mało precyzyjne) nazywają GM [49, 121, 123, 149, 235]. Jeszcze inną definicję choroby proponują Takehara i wsp. Podają oni dwa kryteria, których spełnienie jest konieczne do rozpoznania: występowanie czterech lub więcej ognisk o średnicy przekraczającej 3 cm, niezależnie od tego, czy są to wykwity typu MEP, czy LM oraz zajęcie 2 lub więcej z 7 wymienionych powyżej lokalizacji anatomicznych [270]. Nasilonemu procesowi

w przebiegu GM towarzyszyć może utrudnione oddychanie, wynikające z ograniczonej ruchomości klatki piersiowej. Opisuje się obecność przeciwciał przeciwdrożdżowych [*antinuclear antibodies* (ANA)], w tym przeciwciał antycentromerowych [*anticentromer antibodies* (ACA)] oraz współistnienie objawów narządowych, szczególnie dolegliwości bólowych stawów lub nawet zapalenia stawów. Sugeruje się, że postać ta wiąże się z ryzykiem progresji do SSc, chociaż przypadki takie są rzadkie i często słabo udokumentowane, a Peterson i wsp. w jedynych do tej pory opublikowanych badaniach populacyjnych nie obserwowali ani jednego takiego zdarzenia na przestrzeni 750 osobo-lat obserwacji [1, 49, 121, 219, 236, 278, 287]. W tym kontekście warto jednak zwrócić uwagę na opisany w 1982 r. przez Yamakage i wsp. podtyp SSc nazwany przez nich SSc podobną do GM (*GM – like systemic sclerosis*). Choroba ta ma dotyczyć częściej mężczyzn, zwłaszcza tych narażonych na działanie rozpuszczalników organicznych. Postęp choroby jest szybki, rzadziej natomiast niż w klasycznych odmianach SSc dochodzi do zajęcia narządów wewnętrznych. Ogniska typu MEP stwierdzane są najczęściej na skórze proksymalnych części przedramion, okolicy łędźwiowej, klatki piersiowej, brzucha, górnej części pleców. Dodatkowo obserwuje się zmiany w zakresie palców rąk, którym towarzyszy objaw Raynauda. Stwierdza się ANA, w tym charakterystyczne dla SSc przeciwciała przeciwko topoizomerazie I, zwane Scl70 [208, 299]. Należałoby zatem rozważyć, czy niektóre opisywane w literaturze przypadki współistnienia GM, ACA i/lub objawu Raynauda [1, 219] nie stanowią szczególnych postaci SSc lub są to przypadki współistnienia GM i SSc, co również było opisywane w literaturze [98, 261]. W badaniach epidemiologicznych Somy i wsp. współistnienie takie oszacowano na 6,7% wszystkich przypadków SSc [261]. Być może w przypadkach sprawiających trudności diagnostyczne, kiedy w grę wchodzi rozpoznanie GM lub SSc, pomocnym narzędziem diagnostycznym byłaby kapilaroskopia, która jak się obecnie postuluje powinna zostać uznana za kryterium mniejsze rozpoznania SSc, uzupełniając definicję SSc Amerykańskiego Kolegium Reumatologicznego [*American Collage of Rheumatology* (ACR)] z 1980 r., jako że jest ona w stanie wykazać bardzo wczesne zmiany naczyniowe w przebiegu tego schorzenia [96]. Kwestia związków pomiędzy morfeą i SSc jest przedmiotem rozdziału 1.9. niniejszego opracowania.

Disabling pansclerotic morphea, niegdyś zwana *disabling pansclerotic morphea of children*, to choroba, która może dotyczyć również dorosłych, a jej obraz kliniczny czy histopatologiczny nie różni się od tego obserwowanego u dzieci. Większość chorych w chwili zachorowania nie przekracza jednak 14. roku życia. Termin został wprowadzony w 1980 r. przez Diaz-Pereza i wsp. Opisuje agresywnie postępującą, zniekształcającą postać morfeji, w przebiegu której procesem objęte są wszystkie warstwy skóry, tkanka podskórna, mięśnie, ścięgna, a nawet kości, i w której dochodzi do rozwoju przykurczów, zahamowania wzrostu, kacheksji, osteoporozy. Silne dolegliwości bólowe wynikają z zajęcia naczyń skór-

nych oraz stawów. Mogą się rozwinąć bolesne, trudno gojące się owrzodzenia. Zmiany dotyczą skóry głowy, tułowia, kończyn. W odróżnieniu od SSc zaoszczędzone są zazwyczaj palce rąk i stóp, nie stwierdza się objawu Raynauda i zmian w zakresie narządów wewnętrznych. Chorobę cechuje słaba odpowiedź na leczenie oraz brak/lub ograniczona skłonność do regresji. Rokowanie jest złe [49, 61, 161, 176, 149, 235, 237, 287].

Eozynofilowe zapalenie powięzi jest chorobą opisaną przez Shulmana w 1974 roku, w której proces chorobowy dotyczy pierwotnie powięzi. Początek przypada zazwyczaj na 2.–6. dekadę życia i często jest gwałtowny. Opisywano związek z poprzedzającym go znacznym wysiłkiem fizycznym. Stwierdza się symetryczne, bolesne, słabo odgraniczone stwardnienie tułowia i kończyn z zaoszczędzeniem rąk i stóp. Powierzchnia skóry wydaje się zazwyczaj prawidłowa. Obserwuje się objaw rowka/bruzdy („*groove sign*”), czyli linijne zagłębienia wzdłuż przebiegu żył powierzchownych, co wynika z relatywnego zaoszczędzenia obszarów okołozylnych. Mogą pojawiać się przykurcze stawów. Nieprawidłowości laboratoryjne obejmują hipergamaglobulinemię, eozynofilię obwodową i tkankową oraz przyspieszone opadanie erytrocytów. Żadne z nich, włączając w to zwiększoną liczbę eozynofili, nie jest wymagane do postawienia rozpoznania. Powikłania obejmują anemię aplastyczną, anemię hemolityczną, trombocytopenię, choroby nerek. Opisywano współistnienie FE z rozlicznymi rozrostami hematologicznymi, niemniej związek ten nie został, jak dotąd, ostatecznie zdefiniowany. Niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi są: wczesny początek choroby (przed 12. rokiem życia), współistnienie ognisk MEP, zajęcie procesem tułowia [49, 99, 201, 235, 287].

Twardzina linijna w swojej odmianie klasycznej rozpoczyna się zazwyczaj w dzieciństwie i jest to najczęstsza postać choroby w tej grupie wiekowej. Dotyczy zwykle kończyny dolnej, rzadziej górnej (akralna odmiana LM), ale może pojawiać się również na tułowiu. W 95% przypadków jest to zjawisko asymetryczne. Prezentuje się jako linijna smuga stwardniałej skóry z towarzyszącą atrofią, przypominając niekiedy układ w przebiegu półpaśca. Proces może obejmować również tkankę podskórną, a niekiedy także powięź, poniżej leżące mięśnie, a nawet kości. Wraz z rozwojem choroby pojawić się mogą przykurcze (gdy zmiany skórne przekraczają powierzchnie stawowe), deformacje kończyn z zaburzonym ich wzrostem włącznie, zespół cieśni nadgarstka. Niekiedy stwierdza się współistnienie ognisk MEP. Chorobie mogą towarzyszyć dolegliwości bólowe stawów, także tych w lokalizacji odległej anatomicznie od zmian skórnych. Poprawę w tym zakresie obserwuje się równoległe z poprawą w zakresie dolegliwości skórnych. Pierwotnie zanikową postacią LM ma być atrofodermia linijna Moulina [32, 49, 121, 149, 235, 278, 287, 292].

Morfea typu cięcia szabłą jest rzadką odmianą choroby. Opisuje linijne ogniska o odcieniu kości słoniowej, zlokalizowane na owłosionej skórze głowy w okolicy ciemieniowej oraz przyśrodkowo na czole, przypominające ślad po uderzeniu

mieczem. Zmiany mogą się szerzyć, obejmując łuk brwiowy czy powiekę. Chorobie towarzyszy niejednokrotnie utrata włosów z bliznowaceniem w adekwatnej lokalizacji. Nierzadko stwierdzić można więcej niż jedno ognisko MCDS. Niekiedy współistnieją wykwity o typie MEP i/lub opisany poniżej PHA. Szacuje się, że blisko 15% chorych prezentuje zaburzenia ze strony narządu wzroku w postaci wytrzeszczu, porażenia mięśni ocznych, zapalenia tęczówki, nadtwardówki, zespołu suchego oka, obrzęku tarczy nerwu wzrokowego, jaskry. Stwierdza się również odchylenia neurologiczne, najczęściej drgawki, ale obserwować można też neuropatie obwodowe, zapalenie mózgu, zapalenie nerwów czaszkowych, malformacje naczyniowe, udary mózgu, bezobjawowe odchylenia w obrazie rezonansu magnetycznego (MR) lub w zapisie elektroencefalograficznym (EEG). Opisuje się również nieprawidłowości w zakresie uzębienia [49, 121, 149, 235, 266, 274, 278, 287].

Postępujący zanik połowiczy twarzy rozpoczyna się najczęściej w 1. dekadzie życia, ale może się pojawić w każdym wieku. Niekiedy początkowo chorzy skarżą się na jednostronny ból twarzy w obszarze unerwienia nerwu trójdzielnego, po czym dochodzi do pojawienia się zmian przedmiotowych. Proces pierwotnie obejmuje tkankę podskórną, wtórnie szerząc się na poniżej leżące mięśnie, kości, a powierzchownie również skórę połowy twarzy, często z zaoszczędzeniem czoła. Prowadzi to do deformacji, prezentującej się jako połowiczy zanik twarzy, czemu towarzyszyć może siwienie, a nawet wyłysienie. Zazwyczaj nie stwierdza się stwardnienia skóry. Często współistnieją ogniska MCDS i/lub MEP (charakterystyczną lokalizacją ma być skóra barku przeciwległego). Związek pomiędzy PHA i MCDS pozostaje niejasny, niemniej większość autorów uważa, że jest on istotny i że są to odmiany tej samej jednostki chorobowej. Ma za tym przemawiać częste ich współistnienie (do 40%) oraz obraz histologiczny PHA, który nawet przy braku klinicznie stwierdzanego stwardnienia, wykazywać ma cechy charakterystyczne dla morfei, chociaż jak podaje Braun-Falco i wsp., nawet na wczesnych etapach choroby nie obserwuje się nacieku zapalnego. Chorobie, podobnie jak MCDS, towarzyszyć mogą odchylenia okulistyczne (opadanie powieki, porażenie mięśni ocznych, zespół Hornera, zmiany zabarwienia tęczówki, rozszerzenie i brak ruchomości źrenicy, zapalenie nadtwardówki), neurologiczne (nieprawidłowy zapis EEG, padaczka, bóle migrenowe głowy, neuralgia nerwu trójdzielnego, parestezje twarzy, charakteropatie, trudności w nauce), zaburzony wzrost żuchwy i wynikające z tego nieprawidłowości stomatologiczne (wady zgryzu, opóźnione wyrzynanie zębów, resorpcja korzeni). Obserwuje się również asymetrię języka. Opisano pojedyncze przypadki rodzinnego występowania PHA, z czego niektóre wykazywać miały autosomalny sposób dziedziczenia [32, 34, 38, 49, 67, 121, 149, 177, 235, 274, 278, 287].

Postać głęboka morfei stanowi mniej niż 5% przypadków choroby. Ogniska prezentują się jako rozlane, często symetryczne obszary stwardnienia związane

z poniżej leżącymi tkankami, źle odgraniczone od skóry otaczającej. Nie wykazują one tendencji do układu liniowego. Skóra je pokrywająca niejednokrotnie jest przebarwiona. Zmiany najczęściej lokalizują się na kończynach. Proces może ograniczać się do tkanki podskórnej (odmiana podskórna DM) lub sięgać głębiej, obejmując powięź, mięśnie bądź dotyczyć wyłącznie powięzi. Choroba może prowadzić do zniekształceń i dysfunkcji. Pierwotnie zanikową postacią DM ma być panatrofia Goversa [49, 121, 149, 188, 197, 235, 287, 291].

Postać morfei guzkowa/bliznowcowa prezentuje się jako pojedyncze lub liczne guzy, przypominające bliznowce, najczęściej na podłożu ognisk MEP, lub przy współistniejących ogniskach MEP w innej lokalizacji. Mogą towarzyszyć również SSc. Zazwyczaj lokalizują się na przedniej powierzchni klatki piersiowej. W wywiadzie chorzy mogą podawać występowanie bliznowców u krewnych. W odróżnieniu od bliznowców, w obrazie histologicznym nie stwierdza się rozplemu fibroblastów [49, 121, 148, 235, 278, 287].

Postać pęcherzowa/pęcherzykowa może towarzyszyć każdej odmianie morfei. Wykwity mają charakter napiętych pęcherzy podnaskórkowych, zazwyczaj o treści surowiczej. Częściej stwierdzane są w obrębie ognisk zlokalizowanych na kończynach dolnych, rzadziej na tułowie, twarzy, szyi. Może towarzyszyć również LS, co zdarza się nawet częściej niż w morfei. Można wtedy obserwować pęcherze krwotoczne. Wystąpienie pęcherzy w morfei nie ma znaczenia rokowniczego. Może być ono wynikiem zastojów chłonnego, którego bezpośrednią przyczyną ma być włóknienie tkanek. Mechanizm ten powszechnie uważany jest za najbardziej prawdopodobny. Postuluje się również udział głównego białka zasadowego [*major basic protein* (MBP)], będącego składnikiem ziarnistości eozynofilowych. Jego obecność stwierdzono w dnach pęcherzy morfei. Pewną rolę odgrywać mogą również, szczególnie w okolicach wyprzeniowych, urazy [49, 122, 135, 202, 287].

Niejednoznaczne są opinie badaczy dotyczące występowania i znaczenia objawów pozaskórnych w morfei. Sugestie takie opierane są często na analizach serii chorych na morfeę (zazwyczaj dzieci) bez uwzględnienia grup kontrolnych, a zatem ich wyniki są niejednoznaczne. Niemniej donoszono o dolegliwościach ze strony narządu ruchu (ból, zapalenie stawów, przykurcze, zniekształcenia, głównie w LM), zaburzeniach okulistycznych i neurologicznych (dotyczących przede wszystkim chorych na LM, MCDS, PHA), zazwyczaj bezobjawowych zaburzeniach perystaltyki przełyku, hipotonii jego dolnego zwieracza oraz zmniejszeniu pojemności dyfuzyjnej płuc [48, 58, 89, 177, 273, 280]. Badania polskich autorów wykazały istotnie częstsze odchylenia kardiologiczne w odniesieniu do zdrowej grupy rówieśników [245, 294]. Co bardzo interesujące, badania Rokickiego i wsp. doczekały się kontynuacji i po 10 latach ponownie oceniono tę samą grupę badaną, przy czym badanie kardiologiczne nie wykazało progresji zmian, w odróżnieniu od badania dermatologicznego, w którym pogorszenie wykazano u blisko połowy badanych. Zmiany skórne nie korelowały zatem ze zmianami kardiologicznymi

[27]. Według dużego, wielośrodkowego badania retrospektywnego, obejmującego 750 dzieci chorych na morfeę, leczonych w centrach referencyjnych, subiektywne dolegliwości podawać miało 22% badanej populacji. Większość, bo aż 47% skarg, dotyczyła stawów i najczęściej zgłaszali je chorzy na LM. Zaburzenia neurologiczne i oczne występowały odpowiednio u 4,4 i 2,1% dzieci objętych badaniem i występowały niemal wyłącznie w przebiegu LM, zwłaszcza w odmianie PHA i/lub MCDS. U 2,4% stwierdzano zaburzenia naczyniowe, głównie w postaci objawu Raynauda (w grupie tej częściej też obserwowano ANA i inne odchylenia pozaskórne). Chorobę refluksową przełyku wykryto u 1,6% badanych dzieci, a w pojedynczych przypadkach stwierdzono także nieprawidłowości w zakresie układu oddechowego, serca i nerek (odpowiednio u 5,2 i 2 dzieci) [327]. Autorzy nie wprowadzili do badań grupy kontrolnej. W badaniach populacyjnych Peterson i wsp. najczęściej obserwowano bóle i zapalenia stawów oraz zaburzenia oczne i były one związane głównie z LM i DM, natomiast jedynie w pojedynczych przypadkach stwierdzono zaburzoną funkcję nerek bądź nieprawidłowości w zakresie układu oddechowego, przy czym w większości przypadków związane były one z wiekiem badanych lub chorobą współistniejącą [236]. Wydaje się zatem, że zanim bezwzględnie powiążemy ze sobą objawy towarzyszące i morfeę, rozważyć powinniśmy możliwość równoległe toczącego się, a niezależnego procesu chorobowego. Niewątpliwym mankamentem większości przedstawionych badań jest brak odniesienia do zdrowych, dobranych pod względem płci i wieku grup kontrolnych.

1.3. Epidemiologia

Z uwagi na rzadkość morfeii i jej zazwyczaj łagodny przebieg, ilość danych epidemiologicznych jest nad wyraz skąpa. Ich jednoznaczny analizę utrudnia stosowanie przez autorów różnych podziałów choroby oraz niejednorodne grupy badane, zwłaszcza w odniesieniu do wieku chorych. Dodatkowo, przekłamania mogą wynikać z faktu zgłaszania się do lekarza chorych o cięższym przebiegu choroby, a zatem wydaje się, że częstość, zwłaszcza MEP, może być niedoszacowana. Dlatego też przedstawione poniżej wyniki należy przyjmować z dużą ostrożnością.

Liczba nowych zachorowań na morfeę, oszacowana w badaniu populacyjnym przeprowadzonym na terenie Olmsted Country w stanie Minnesota przez Peterson i wsp., wynosi 2,7 na 100 000 na rok i ma się zwiększać z roku na rok o 3,6%. Przyczyną tego zjawiska może być coraz częstsze zgłaszanie się osób z łagodniejszymi postaciami choroby oraz lepsza jej rozpoznawalność, ale z drugiej strony sugeruje się stopniowo narastające narażenie na rozliczne czynniki środowiskowe, np. rozpuszczalniki organiczne, mogące potencjalnie wzbudzać morfeę. Liczba nowych zachorowań na LM na rok została przez tych samych au-

torów oszacowana na 0,5 na 100 000 [236]. Z kolei Herrick i wsp. [102] ocenili częstość zachorowań na wszystkie postaci u dzieci na 0,34 na 100 000 na rok, a na LM na 0,25. Jest to zatem schorzenie częstsze niż SSc [29, 32, 66, 102, 182]. W badaniach, obejmujących wszystkie grupy wiekowe, najczęstszą postacią była zazwyczaj MEP, stanowiąc 55–79%, następnie LM 20–46%, GM 5,5–46%, odmiana mieszana 11–17% i DM 0,2–11% [72, 177, 236, 273]. Z kolei z odmian LM, najczęściej stwierdzana ma być postać akralna, następnie MCSD i w końcu PHA, przy czym stosunkowo częste (ok. 30–40%) ma być współistnienie MCSD i PHA [48, 273, 274]. Częstość występowania poszczególnych typów zależy jednak od wieku grupy badanej. U dzieci, wg większości autorów, częściej stwierdza się LM. Szacuje się, że stanowi ona 51–87% wszystkich przypadków morfeji [32, 48, 102, 121, 177, 328]. Prezentowane wyniki oparte są na badaniach serii pacjentów i pochodzą z ośrodków referencyjnych. Dla odmiany Peterson i wsp. (236), we wspomnianych już badaniach populacyjnych, obserwowali LM u 39% dzieci chorych na morfeję, a MEP u 46%, co może wynikać z niezgłaszania się do ośrodków referencyjnych chorych z łagodniejszym przebiegiem choroby. W porównaniu z osobami dorosłymi u dzieci częściej stwierdzana była również postać mieszana. Opisywano też przypadki morfeji wrodzonej, zarówno w odmianie LM, jak i MEP. Jej występowanie szacowane jest na 0,8–1,5% wszystkich dzieci chorych na morfeję [48, 177, 328]. W grupie chorych powyżej 18. roku życia, podobnie jak w badaniach obejmujących całą populację, najczęściej stwierdzano MEP [32, 73, 121, 236, 273]. Większość autorów zwiększone ryzyko zachorowania obserwuje wśród kobiet, a wartości te w stosunku do częstości zachorowań wśród mężczyzn wahają się od 1,5 – 6:1 [32, 48, 73, 102, 121, 273, 280]. Prawidłowość ta nie zawsze znajdowała potwierdzenie w grupie LM [236]. Natomiast APP oraz odmiana powierzchowna morfeji (jakkolwiek odrębność obu odmian jest niejednoznaczna) występować mają prawie wyłącznie u kobiet [124, 184, 264, 273]. Niejasne jest natomiast ryzyko zachorowania szacowane dla poszczególnych ras. Sugeruje się, że choroba częściej dotyczy rasy kaukaskiej i zdecydowanie rzadziej dotyka przedstawicieli rasy czarnej [38, 48, 156]. Najczęściej do zachorowania dochodzi w wieku 20–40 lat, niemniej choroba może rozpoczynać się w każdym wieku [72, 177, 236, 273]. Należy zwrócić uwagę, że zwiększone ryzyko zachorowania w podanym powyżej przedziale wynika z dużej częstości MEP. Wśród dzieci początek choroby przypada najczęściej na 2.–14. rok życia [48]. Zauważyć jeszcze należy, że powierzchowna postać morfeji ma dotyczyć głównie osób starszych [126].

1.4. Etiologia

Etiologia morfeji pozostaje nieznaną. Postuluje się podłoże genetyczne, autoimmunizacyjne, zaburzenia układu neurowegetatywnego oraz współdziałanie różnych czynników środowiskowych: infekcyjnych, fizykalnych i chemicznych.

Opisywano rzadkie przypadki rodzinnego występowania schorzenia, a także jego postaci wrodzonych [48, 119, 232, 328]. Sugeruje się związek z antygenami HLA A3, B7, B8, B40, Bw60, DR2, DR3, DRw8 [62, 153]. Za zjawiskami autoagresyjnymi przemawiać ma częstsze, niż w populacji ogólnej, współwystępowanie morfeji z innymi chorobami o potwierdzonym lub domniemanym podłożu autoimmunizacyjnym, w tym z bielactwem, łuszczycą, pęcherzycą, pierwotną marskością wątroby, reumatoidalnym zapaleniem stawów, nużliwością mięśni, niedoczynnością tarczycy Hashimoto, zespołem Sjögrena, idiopatyczną plamicą małopłytkową, toczniem rumieniowatym układowym, cukrzycą typu I, zapaleniem skórno-mięśniowym, zapaleniem wielomięśniowym, mieszaną chorobą tkanki łącznej [201, 249, 262, 329]. Współistnienie takie częściej stwierdza się w GM, w porównaniu z pozostałymi odmianami choroby [156]. Autoimmunizacyjne podłoże morfeji potwierdzać ma także częste występowanie autoprzeciwciał w surowicy tych chorych (ich charakterystykę przedstawiono w rozdziale poświęconym patogenecie choroby) [270]. Niejednokrotnie obserwowany segmentalny układ wykwitów stanowi z kolei podstawę koncepcji zaburzeń neurovegetatywnych w patogenecie morfeji [123, 188]. Obserwowano zaburzenia struktury nerwów obwodowych [142]. Sugeruje się również możliwą mutację klonu komórek na etapie embriogenezy z następowym jego szerzeniem wzdłuż linii Blaschko. Po pobudzeniu przez niezidentyfikowany czynnik środowiskowy, w miejscu ulokowania się komórek mogą pojawiać się wykwity skórne [35, 188]. Zdecydowanie najszerszej w literaturze dyskutowane są rozmaite czynniki środowiskowe. W 1985 r. Aberer i wsp. [2] zasugerowali związek morfeji z infekcją *Borrelia burgdorferi*. Swoje przypuszczenie oparli oni na klinicznym i histologicznym podobieństwie morfeji i przewlekłego zanikowego zapalenia skóry kończyn, obserwowanym przez nich współistnieniu tych dwóch jednostek, odpowiedzi morfeji na antybiotykoterapię oraz obecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w surowicy części chorych na morfeję. Obecnie panuje przekonanie, że związek taki jest prawdopodobny na terenie Europy Centralnej i Azji, natomiast brak przesłanek potwierdzających jego istnienie na obszarze Stanów Zjednoczonych i w wielu krajach Europy Zachodniej. Wsuwa się przypuszczenia, że powodem tych rozbieżności mogą być odmienne podtypy *Borrelia burgdorferi* w różnych rejonach geograficznych. Sugeruje się zatem, że jedynie chorzy na morfeję, którzy zamieszkują tereny endemiczne, a dodatkowo podają ukąszenie kleszcza w wywiadzie, powinni być poddawani testom na istnienie zakażenia tym patogenem. Wydaje się, że *Borrelia burgdorferi* jest jedynie jednym z wielu czynników środowiskowych, które mogą wzbudzić proces u osób predysponowanych genetycznie [3, 72, 97, 240, 257, 277, 291, 326]. Z innych czynników infekcyjnych, mających mieć związek z morfeją, w kazuistycznych doniesieniach, opisywane są: wirus zapalenia wątroby typu B, wirus zapalenia wątroby typu C, wirus Epsteina-Barra, wirus ospy wietrznej, wirus odry [166, 187, 262, 263]. Ob-

serwowano wykwity morfeji w miejscu podania szczepienia przeciwko gruźlicy, tężcowi, wirusowemu zapaleniu ślinianki przyusznej-odrze-różyczce. Być może jednak główne znaczenie miała tu iniekcja, jako forma urazu [149]. Stosunkowo często podnoszona jest również rola radioterapii, zazwyczaj w przebiegu raka piersi. Opisano około 50 takich przypadków. Co ciekawe, równolegle znajdujemy jedynie kazuistyczne doniesienia o domniemanym wzbudzeniu morfeji przez tę metodę leczenia okolic innych niż piersi. Zmiany mają pojawiać się zwykle około roku od zakończenia radioterapii i początkowo są często rozpoznawane jako zmiany poradiacyjne lub wznowa w przebiegu choroby nowotworowej. Pojawiły się nawet propozycje, aby współistniejąca autoimmunizacyjna choroba tkanki łącznej stanowiła względne przeciwwskazanie do radioterapii [51, 103, 200, 276]. Mając na uwadze ryzyko jakie niesie ze sobą choroba nowotworowa i ryzyko związane z morfeją trudno się jednak zgodzić z tą propozycją. Inne czynniki fizyczne, które wiązano z pojawieniem się zmian o typie morfeji obejmują urazy, w tym także wibracyjny, chirurgiczny, termiczny czy przewlekły ucisk [26, 48, 86, 200, 287, 303, 305]. Obserwowano pojedyncze przypadki morfeji po immunoterapii swoistej. Próby tłumaczenia tego zjawiska poruszają kwestie przesunięcia odpowiedzi immunologicznej pod wpływem immunoterapii swoistej w kierunku limfocytów Th2 oraz roli soli aluminium, stosowanych jako absorbent w szczepionkach i w immunoterapii. Sole te mają stymulować i wzmacniać odpowiedź immunologiczną na antygeny, a ponadto mogą być fagocytowane przez makrofagi i w konsekwencji powodować uwalnianie cytokin aktywujących fibroblasty. Jedną z opisywanych chorych podawała SSc u krewnego 2. stopnia. Sugerowano zatem, że dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób z kręgu twardziny powinien stanowić względne przeciwwskazanie do immunoterapii swoistej [199, 254]. Należy jednak zauważyć, że opisywane ogniska pojawiały się w miejscu iniekcji związanej z podawaniem immunoterapii swoistej, a jak wspomniano wcześniej, sama iniekcja jako uraz może potencjalnie wzbudzić morfeję. Podnoszono również znaczenie przewlekłej niewydolności żylną dla rozwoju ognisk morfeji na kończynach dolnych [168]. Wśród czynników ryzyka morfeji i/lub chorób twardziny-podobnych wymienia się również szereg leków, w tym: bleomycynę, pentazo-cynę, metysergid, bromokryptynę, morfinę, L-tryptofan, karbidopę, etosuksimid, kwas walproinowy, substancje hamujące apetyt, fitomenadion, penicylaminę, beta blokery, triamcynolon, interferon (IFN) α , interleukinę (IL) -2, przeciwciała przeciwko czynnikowi martwicy guza [*Tumor Necrosis Factor* (TNF)] α , kokainę oraz rozliczne substancje chemiczne, np. chlorek winylu, żywicę epoksydową, pestycydy, krzem, silikon [24, 62, 79, 96, 181, 213, 287]. Murell i wsp. [205] sugerują, że wiele z powyżej opisanych czynników, w tym krzem, promieniowanie słoneczne i rentgenowskie, ale także alkohol czy nikotyna, może działać poprzez wzbudzanie wolnych rodników tlenowych.

1.5. Rozpoznanie

W większości przypadków badanie przedmiotowe jest wystarczające do postawienia rozpoznania [48, 49, 66, 213, 235, 287]. Niemniej w przypadkach spornych badaniem rozstrzygającym i „złotym standardem” pozostaje biopsja skóry [48, 49, 149, 213, 235, 287]. Obraz histologiczny wykazuje różnice w zależności od fazy choroby, najczęściej jednak stwierdza się cechy zarówno fazy wczesnej – zapalnej, jak i późnej – sklerotycznej. W fazie wczesnej, klinicznie prezentującej się jako liliowy rumień otaczający wykwit, obserwuje się umiarkowanie obfite nacieki zapalne wokół naczyń i przydatków warstwy siateczkowej skóry, z dominacją limfocytów oraz domieszką komórek plazmatycznych, makrofagów, komórek tłuszczowych i rzadziej eozynofików (w odróżnieniu od SSc, w której nie spotyka się nacieku z tych ostatnich). W odmianach głębokich i LM komórki nacieku stwierdzić można również w warstwie podskórnej, w obrębie powięzi i mięśni. W warstwie siateczkowej skóry widoczny jest obrzęk i pogrubiałe pęczki kolagenu ułożone równolegle do powierzchni. Tkanka podskórna zastępowana jest nowo tworzonym kolagenem, prezentującym się jako delikatne, pofałdowane włókna. Naczynia wykazują poszerzone światło, a ich śródbłonek łagodny obrzęk. Naskórek jest prawidłowy lub ścięczały z zanikiem soplí naskórkowych. W fazie późnej (fibrotycznej), w obrazie dominują ściśle upakowane, w różnym stopniu pogrubiałe, wysoce eozynofilne pęczki kolagenu. Dochodzi do zaniku gruczołów łojowych i mieszków włosowych z zachowaniem mięśni przywłosnych, a gruczoły potowe ekrynowe są zazwyczaj uciśnięte i przemieszczone ku górnym warstwom skóry, na skutek ich wypychania przez pęczki kolagenu. Liczba naczyń ulega zmniejszeniu, a te widoczne prezentują zwłókniałe i pogrubiałe ściany oraz szczelinowate światło. Komórki nacieku zapalnego obecne są w znikomej liczbie, podobnie jak nieliczne są fibroblasty. Skóra w całości jest pogrubiała, co dzieje się zazwyczaj kosztem tkanki podskórnej. W DM i LM można obserwować zmiany w obrębie powięzi, zazwyczaj w postaci jej zwłóknienia. Niekiedy widoczna jest również wakuolizacja komórek mięśniowych i ich rozdzielenie przez obrzęk międzykomórkowy i naciek zapalny. W fazie regresji/atrofii dochodzi do ścięczenia skóry właściwej, czemu towarzyszy ścięczenie naskórka. Przydatki są nieobecne (jako ostatnie zanikają gruczoły potowe). Na przestrzeni wszystkich opisanych okresów morfeí zasadniczo niezmiennione pozostają włókna elastyczne (wyjątek ma stanowić odmiana powierzchowna, dodatkowo pewien stopień pofragmentowania obserwować można w fazie regresji), co stanowi podstawę do różnicowania z innymi chorobami przebiegającymi z atrofią i jest jedną z cech wyróżniających od LS. Obraz histologiczny morfeí i SSc jest zbliżony, ale należy zauważyć, że w fazie wczesnej naciek zapalny jest dużo silniej wyrażony w morfeí, a ponadto w SSc nie spotyka się domieszki eozynofików [3, 38, 121, 124, 149, 158, 188, 287].

1.6. Rokowanie i przebieg

Choroba nie wpływa na długość życia osób nią dotkniętych [177, 236, 273]. W wielu przypadkach przebieg choroby jest samoograniczający się, co utrudnia prowadzenie badań kontrolowanych placebo. Z tego punktu widzenia wyróżnić można 3 fazy choroby: zapalną/aktywną, stabilną, regresji. Szacuje się, że czas potrzebny do wyciszenia procesu chorobowego i przejścia w fazę regresji wynosi średnio 2–6 lat [49, 66, 110, 177, 213, 236, 287]. Zjawisko to obserwowane jest u 50% wszystkich chorych na morfeę, przy czym częściej dotyczy MEP i w tej grupie dochodzi do niego szybciej, bo średnio po 2,7 latach choroby, w porównaniu do DM, gdzie proces ten ujawnia się średnio po 5,5 latach. Długość fazy aktywnej MCDS szacuje się na 2–5 lat, a PHA na 3 lata. Niemniej, w części przypadków aktywny proces może utrzymywać się nawet ponad 20 lat. Z drugiej strony opisywano chorych, u których obserwowano uaktywnienie choroby po różnie długim czasie utajenia [48, 110, 177, 213, 236, 287]. Pomimo zazwyczaj łagodnego przebiegu choroby, w szczególnych przypadkach może ona prowadzić do deformacji i zaburzeń funkcjonowania, a dotyczy to głównie chorych na postać LM, DM i GM [32, 48, 177, 213, 236]. Christen-Zaech i wsp. [48] obserwowali przykurcze w 25% GM i w 26% LM, oraz zaburzony wzrost kończyny w 33% LM u dzieci. Gorsze rokowanie ma być związane z dużą powierzchnią zajętej skóry oraz obecnością ANA, natomiast nie jest z nim związany osobniczy lub rodzinny wywiad w kierunku chorób autoimmunizacyjnych [11, 48, 177]. Zmiany wtórne, takie jak odbarwienie, przebarwienie, przykurcze, atrofia, wykazują jedynie małą tendencję do cofania się [149]. Może to być przyczyną nieakceptowalnych przez chorego zaburzeń natury estetycznej. Wszystkie powyższe nieprawidłowości mogą stać się przyczyną pogorszenia jakości życia chorych, chociaż należy zauważyć, że doniesienia poświęcone temu tematowi podkreślają brak istotnego wpływu choroby na jakość życia borykających się z nią dzieci, co może jednak wynikać z braku kwestionariuszy dostosowanych do szczególnego charakteru morfeii [15, 225, 281, 287].

1.7. Patogeneza

Patogeneza morfeii pozostaje enigmatyczna. Jej centralnym, klinicznie jawnym zjawiskiem, jest nadmierne włóknienie tkanki łącznej, prowadzące do stwardnienia skóry. Prowadzić mają do tego uszkodzenie komórek śródbłonka [*endothelial cell* (EC)] i aktywacja układu immunologicznego, w tym procesów autoagresywnych. Czynniki inicjujące kaskadę zjawisk patologicznych pozostaje jednak niejasny, podobnie jak kolejność poszczególnych jej elementów, zwłaszcza, że wiele z nich przeplata się i wpływa nie na jedno, a na kilka równoległe toczących się procesów, tworzących często wzajemnie stymulujące się pętle [49, 90, 110, 287].

1.7.1. Teoria naczyniowa

Już w latach 30. ubiegłego wieku sugerowano, że liliowa obwódka wykwitów twardzinowych jest dowodem na ich pierwotnie naczyniowy charakter [121]. Jednym ze wstępnych etapów morfeji ma być zatem uszkodzenie **komórek śródbłonka** [*endothelial cell* (EC)]. Biopsje skóry zmienionej chorobowo, pobrane w fazie zapalnej, wykazują obrzęk i pobudzenie EC, hiperplazję pericytów, pogrubienie ścian naczyń nacieczonych komórkami zapalnymi, w tym limfocytami, monocytami/makrofagami, komórkami tuczonymi, a niekiedy także eozynofilami [8, 100, 143, 147, 253]. Obserwuje się również zwiększoną liczbę drobnych, poskręcanych naczyń włosowatych, zorientowanych niezależnie od splotu brodawkowego bądź naczyń łączących oba naczyniowe sploty skórne [147]. W późniejszych etapach dochodzi do zmniejszenia gęstości naczyń i wielokrotnienia błony podstawnej, co ma wynikać z apoptozy EC [8, 100, 143, 147, 253]. Na podstawie badań nad kurczakami UCD (*University of California at Davis*) linii 200/206, wykazującymi cechy SSc, zasugerowano, że EC są pierwszymi komórkami, które podlegają apoptozie w przebiegu choroby [100]. Jedną z hipotez sugeruje autoagresję przeciwko EC. Co ciekawe, wykazano, że obserwowane u części chorych na morfeję przeciwciała antykardiolipinowe mogą uszkadzać omawiane komórki [253]. Wykazano jednocześnie szereg zaburzeń w zakresie układów mających ochronny wpływ na EC. W komórkach tych obserwowano niewykrywalną bądź bardzo małą ekspresję błonowego kofaktora białkowego [*Membrane Cofactor Protein* (MCP), CD46] i czynnika przyspieszającego rozkład [*Decay Accelerating Factor* (DAF), CD55], będących błonowymi czynnikami regulującymi aktywność komplementu. Oba zapobiegają formowaniu na powierzchni błony konwertazy składowej C5, a DAF dodatkowo hamuje powstawanie i przyspiesza rozpad konwertaz składowych C3 i C5 komplementu. W ten sposób chronią one komórki przed zależnym od niego zniszczeniem [88, 286]. Wykazano również zmniejszoną ekspresję mRNA śródbłonkowej syntetazy tlenku azotu (NO) w hodowlach EC chorych na morfeję. Komórki te produkowały jednocześnie mniejsze ilości NO [247]. NO jest jednym z najsilniejszych czynników zmniejszających napięcie ściany komórkowej, hamuje on agregację płytek, interakcję leukocytów ze ścianą naczyń i proliferację mięśni gładkich naczyń, aktywuje metaloproteinazy macierzy [*Matrix Metalloproteinase* (MMP)], zmniejsza produkcję kolagenu oraz wolnych rodników tlenowych, a także blokuje apoptozę EC. Na modelach zwierzęcych wykazano, że farmakologiczna blokada NO prowadziła do remodelingu naczyń, wzbudzenia syntezy kolagenu I i III [41, 88]. Ochronną rolę w stosunku do EC ma pełnić również peptyd natriuretyczny typu C [*C-type Natriuretic Peptide* (CNP)]. CNP jest czynnikiem rozszerzającym naczynia, pochodzącym z EC, który wywiera również efekt przeciwzapalny (przynajmniej w części mediowany zmniejszeniem ekspresji selektyny P), przeciwlukocytarny, przeciwpłytkowy. Może też hamować sekrecję endoteliny-1. Z drugiej strony na ekspresję jego genu wpływać mają

transformujący czynnik wzrostu [*Transforming Growth Factor (TGF)*] β , płytkopochodny czynnik wzrostu [*Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)*], czynnik wzrostu fibroblastów [*Fibroblast Growth Factor (FGF)*]. Stwierdzono zmniejszone lub niewykrywalne stężenie w surowicy chorych na morfeę aminoterminalnego odcinka CNP, w przeciwieństwie do SSc, gdzie nie obserwowano statystycznie znaczących różnic surowiczego poziomu tego czynnika w odniesieniu do kontrolnej grupy osób zdrowych [221, 222]. W przeciwieństwie do NO i CNP, wspomniana już endotelina-1 jest silnym czynnikiem obkurczającym naczynia, syntetyzowanym głównie w EC, ale także w wielu innych komórkach, w tym w fibroblastach i makrofagach. Peptyd ten nasila również syntezę składników macierzy zewnątrzkomórkowej [*Extracellular Matrix (ECM)*] i tkankowego inhibitora metaloproteinaz [*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)*] -1, a zmniejsza produkcję MMP. Zwiększoną produkcję TIMP-1 i wzrost surowiczego stężenia endoteliny-1 wykazano w SSc [75, 260]. Podkreśla się również potencjalne znaczenie wolnych rodników tlenowych w uszkodzeniu EC. Ich wysokie surowicze stężenie korelowało z aktywnością i ciężkością przebiegu morfeji [255]. Jinnin i wsp. stwierdzili podwyższone stężenie dysmutazy ponadtlenkowej manganowej w surowicy chorych na GM, ale nie w innych odmianach morfeji. Co więcej, stężenie to miało ulec obniżeniu wraz z prowadzonym leczeniem [127]. Nagai i wsp. [207] wykazali przeciwciała przeciwko dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej w surowicy 89% chorych na morfeę i 100% chorych na GM (w odróżnieniu od 8% chorych na SSc). Wyższe stężenie przeciwciał korelowało z cięższym przebiegiem choroby [207]. Obie opisane powyżej dysmutazy ponadtlenkowe wchodziły w skład rodziny enzymów neutralizujących wolne rodniki tlenowe. Wykazują zatem właściwości ochronne w stosunku do komórek [127]. Udział wolnych rodników sugerowany jest również u myszy, u których chorobę twardzinopodobną wywołują iniekcje bleomycyny. Wykazano negatywny wpływ bleomycyny na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, a jej podawanie hamowało proces włóknienia w różnych modelach zwierzęcych [207, 300]. Wykazano, że ponadtlenkowa dysmutaza miedziowo-cynkowa zmniejsza ekspresję TIMP i TGF β . Sugeruje się, że wolne rodniki tlenowe mogą również bezpośrednio wzbudzać syntezę kolagenu poprzez peroksydację lipidów [207]. W rezultacie aktywacja EC, a następnie ich uszkodzenie prowadzić ma do obliteracji małych naczyń i wzbudzenia kaskady zjawisk immunologicznych. Dochodzi zatem do zwiększonej produkcji cząsteczek adhezyjnych i/lub surowiczego stężenia ich form rozpuszczalnych, w tym: selektyny E, P, cząsteczki adhezji komórkowej naczyń [*Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)*] -1, cząsteczki adhezji międzykomórkowej [*Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)*] -1, co zostało potwierdzone dla morfeji [113, 222, 306]. Przynajmniej w SSc proces ten jest promowany przez twardzinowe fibroblasty [59]. Rozpuszczalne formy wyżej wymienionych cząsteczek adhezyjnych są wskaźnikiem stanu zapalnego [270]. Pobudzone EC mogą być źródłem licznych

cytokin i czynników wzrostu, m.in. TGF β , PDGF, czynnika wzrostu śródbłonna naczyń [*Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)], FGF, TNF α , czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów [*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF)] [88, 108]. Uważa się, że w szczególnych warunkach EC mogą ulegać przekształceniu w miofibroblasty. Wydaje się, że dochodzi do tego w obecności TNF α , IL-1 β [134, 285].

1.7.2. Teoria immunologiczna

Do ogniska rekrutowane są komórki zapalne. Są one liczniejsze we wczesnych fazach choroby, po czym obserwuje się stopniowe zmniejszenie ich liczby [121, 158, 297]. Najliczniejszymi komórkami nacieku okołonaczyniowego są limfocyty. Mają to być zarówno aktywowane limfocyty T, jak i B. W zakresie **limfocytów T** sugerowano polaryzację w kierunku limfocytów T pomocniczych (*helper*, h) 2, co ma promować proces włóknienia tkanki [87, 117, 251]. Antiga i wsp. [13] wykazali dodatkowo zmniejszoną liczbę zarówno krążących, jak i osiadłych limfocytów T regulatorowych (T reg). Z kolei Xie i wsp. [297] nie wykazali różnic w obrazie immunohistochemicznym skrawków skóry morfeji i zdrowych na obecność komórek CD3+, ale jednocześnie obserwowali zwiększone barwienie przeciwciałami przeciwko CD3+, CD4+, CD8+ i CD25+. Badania na mysich modelach SSc sugerują przewagę Th1 w najwcześniejszych etapach choroby, z ich następowym przełączeniem w kierunku odpowiedzi Th2 [322]. Co więcej, wykazano patogenność autoreaktywnych limfocytów T CD4+ pobranych od myszy z chorobą twardzino-podobną wzbudzoną bleomycyną po ich przeszczepieniu do zdrowych osobników [120]. Pobudzenie **limfocytów B** może mieć z kolei znaczenie nie tylko w związku z nadprodukcją autoprzeciwciał, ale także w kontekście produkowania przez nie dużych ilości nasilającej włóknienie IL-6. Wykazano, że myszy Tsk1/+ (*tight skin*), będące jednym z mysich modeli SSc, pozbawione limfocytów B wykazywały mniej nasilone włóknienie skóry [94]. Podobne obserwacje poczyniono w mysim bleomycynowym modelu SSc [317]. Obserwowane w dużej ilości **monocyty/makrofagi** mają być jednymi z pierwszych komórek nacieku zapalnego morfeji. Po ich aktywacji na drodze alternatywnej (przez IL-4, TGF β , pochłonięcie materiału apoptotycznego), są one znaczącym źródłem cytokin, uważanych powszechnie za kluczowe w patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem, takich jak TGF β , PDGF. Alternatywnie aktywowane makrofagi przełączać mają polaryzację w kierunku Th2 i mają mieć większy potencjał angiogeny niż makrofagi wzbudzone klasycznie. Stanowią one też potencjalne źródło wolnych rodników tlenowych [88, 104, 207, 297, 301]. Podkreśla się również istotną rolę **komórek CD34+**, które mają być komórkami macierzystymi m.in. dla EC, komórek dendrytycznych CD34-. W morfeji obserwuje się stopniowy ich zanik, co sugeruje ich różnicowanie w kierunku np. EC lub skierowaną przeciwko nim reakcję autoagre-

sywną. Utrata komórek CD34+ przebiegać ma równocześnie z utratą kontroli nad procesem włóknienia. W literaturze pojawiają się również sugestie, że nieprawidłowości stwierdzone w zakresie tych komórek miałyby leżeć u podłoża zaburzeń angiogenezy. Jeden z mechanizmów działania promieniowania ultrafioletowego (UV) A1 obejmować ma zwiększenie liczby komórek CD34+. Jednocześnie zaobserwowano, że wraz z utratą tych ostatnich zwiększeniu ulega liczba komórek dendrytycznych wykazujących ekspresję czynnika krzepnięcia XIIIa. Czynniki te, należący do rodziny transglutaminaz, w stanie fizjologicznym odpowiada za naprawę uszkodzonych tkanek, a jego zwiększoną ekspresję obserwowano w chorobach przebiegających z włóknieniem [87, 151, 259, 285, 290, 293]. Komórki dendrytyczne stanowią źródło licznych cytokin m.in.: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27, CCL1, CCL2, CCL3, TNF α , IFN γ , GM-CSF, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów [*Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF)] [88]. W nacieku zapalnym w morfeji stwierdzone są również **komórki tuczne** [49, 143, 297]. Komórki te odgrywają zazwyczaj ważną rolę, zwłaszcza w początkowych fazach reakcji immunologicznej leżących u podłoża różnych jednostek chorobowych [88]. Są one źródłem wielu mediatorów zapalenia oraz chemokin, w tym TNF, TGF β , FGF, PDGF, IL-4, powodują m.in. wzrost przepuszczalności naczyń włosowatych. Wydzielają również heparynę, która współdziała z wiążącymi ją czynnikami wzrostu – VEGF i FGF [88, 287, 301]. Blokowanie degranulacji komórek tucznych powodowało złagodzenie stopnia włóknienia u myszy *Tsk*. Z drugiej jednak strony iniekcje bleomycyny wzbudzały proces włóknienia także u myszy pozbawionych tych komórek, w zakresie podobnym do obserwowanego w grupie kontrolnej [301]. Niejasna pozostaje rola **eozynofili**. Jako że nie stanowią one stałej w składzie nacieku zapalnego w morfeji, można domniemywać, że pojawiają się tam one wtórnie, w reakcji na czynniki chemotaktyczne wydzielane przez rozliczne komórki immunologiczne, w tym limfocyty Th2. Z drugiej strony sugeruje się, że są one istotnym źródłem TGF β . Badania *in vitro* wykazały, że wiążą się one do fibroblastów, prowadząc do uwolnienia przez te ostatnie czynników nasilających włóknienie [49, 149, 301]. Wydaje się, że mają one znaczenie w patogenezie rzadkiej pęcherzowej odmiany morfeji, co opisano w rozdziale poświęconym podrozdziałowi morfeji [202]. Badania Xie i wsp. [296, 297] wskazują również na potencjalny udział w patogenezie morfeji komórek NK i Langerhansa.

Kluczową rolę w chorobach przebiegających z włóknieniem tkanki odgrywać ma **TGF β** [18, 37, 60, 162, 285, 291]. Jego źródłem mogą być liczne komórki, w tym makrofagi, limfocyty (zwłaszcza T reg), EC, neutrofile, płytki krwi, ale także same fibroblasty [13, 88, 101, 104, 198]. Uważany jest za jeden z głównych czynników immunosupresyjnych, z drugiej strony, jak sugerują badania ostatnich lat, TGF β jest kluczowym czynnikiem różnicowania limfocytów w kierunku Th17 i T reg. Nasila również angiogenezę. Wykazano, że inkubacja zdrowych fibroblastów

z TGF β wyzwała w nich cechy obserwowane w chorobach przebiegających z włóknieniem tkanek [18, 37, 88, 101, 230, 281, 285]. Stworzono zwierzęcy model SSc podając mysim noworodkom TGF β , a następnie wzmagając uzyskany efekt podawaniem czynnika wzrostu tkanki łącznej [*Connective Tissue Growth Factor* (CTGF)] i FGF. Co ważne, CTGF i FGF wstrzykiwane myszom bez uprzedniego podania TGF β nie powodowały żadnych nieprawidłowości. Jednocześnie blokowanie TGF β hamowało produkcję ECM *in vitro* i *in vivo* [37, 118, 301]. Doniesienia dotyczące surowiczego stężenia i/lub stopnia prezentacji białka w badaniach immunohistochemicznych i/lub poziomu ekspresji genu TGF β w morfeji są jednak skrajnie niejednoznaczne [13, 87, 100, 105, 159, 234, 241, 244, 282]. Uważa się, że przynajmniej część efektów działania TGF β , mediowana jest przez **CTGF**, bogate w cysteinę białko, należące do macierzokomórkowych czynników wzrostu, które modulują połączenia pomiędzy komórkami, a składnikami ECM. Jego źródłem są EC i fibroblasty. Cytokina ta ma działanie synergistyczne z TGF β , podtrzymuje proliferację fibroblastów i nasila produkcję ECM. Ekspresję CTGF wzmagają mają TGF β , endotelina-1, niedotlenienie. Zwiększoną ilość mRNA dla CTGF wykazano w skórze chorych na morfeję. Ekspresja białka i jego surowicze stężenie wzrastać mają również w SSc oraz w mysich modelach tej choroby [112, 285, 301, 322]. Cytokiną o podobnych właściwościach do CTGF jest **PDGF**. Jej głównym źródłem są płytki krwi, fibroblasty i makrofagi, EC, komórki nabłonkowe i nerwowe. PDGF stymuluje chemotaksję oraz proliferację fibroblastów i ostatecznie nasila syntezę ECM. Pobudza również fibroblasty do produkcji TGF β , IL-6 i chemokiny CCL2 [białka chemotaktycznego dla monocytów -1, *Monocyte Chemoattractant Protein -1* (MCP-1)] [88, 129, 285, 298]. Znaczenie PDGF wykazano w SSc, gdzie obserwowano m.in. autoprzeciwiactwa przeciwko receptorom omawianego białka, mogące wzbudzać fibroblasty, oraz w zwierzęcych modelach SSc, w których zwiększenie ekspresji jego genu było jednym z najwcześniejszych zjawisk po wzbudzeniu choroby [84, 322]. Jednak Restrepo i wsp. [244] nie wykazali różnic w badaniu immunohistochemicznym skóry zdrowej i w morfeji na obecność PDGF. W skórze zmienionej w przebiegu morfeji stwierdzono natomiast zwiększoną prezentację jego receptorów [298]. Kolejnym czynnikiem wzrostu, którego zaangażowanie w patogenezę morfeji wydaje się prawdopodobne jest **FGF**. Jest to rodzina co najmniej ośmiu białek, które mają nasilać angiogenezę, ale także migrację i proliferację fibroblastów. Szczególną rolę w tym zakresie przypisuje się zwłaszcza zasadowemu FGF [*basic FGF* (bFGF), FGF2]. Jego źródłem mają być makrofagi, komórki tuczne, fibroblasty i EC [75, 301]. Zwiększoną ekspresję genu FGF stwierdzono w różnych modelach zwierzęcych SSc [301, 322]. Ciekawym białkiem, w kontekście patogenezy chorób przebiegających z włóknieniem, jest czynnik wzrostu hepatocytów [*Hepatocyte Growth Factor* (**HGF**)]. Promotorowy region jego genu zawiera element blokujący gen TGF β . HGF wzmagają produkcję MMP i hamuje syntezę TIMP. Podawany

w bleomycynowym modelu SSc hamuje włóknienie i powoduje cofanie się wcześniej powstałych zmian [295, 301]. HGF jest też silnym czynnikiem nasilającym angiogenezę [268]. Jednym z najsilniej działających w tym zakresie i najlepiej poznanych czynników jest **VEGF**. Znaczenie tego białka wykazano m.in. w SSc i zwierzęcych modelach choroby, niemniej wyniki dotyczące jego surowiczego stężenia u chorych na morfeę są niejednoznaczne. Wykazano podwyższone jego stężenie surowicze, przy jednoczesnym obniżeniu stężenia rozpuszczalnej postaci jego receptora (VEGFR), ale w badaniu immunohistochemicznym dwóch wycinków od chorych na morfeę nie obserwowano zwiększonej jego ilości w odniesieniu do grupy kontrolnej [71, 76, 322]. W patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem sugeruje się również rolę czynnika wzrostu naskórka [*Epidermal Growth Factor (EGF)*] i czynnika wzrostu nerwów [*Nerve Growth Factor (NGF)*] β [191, 322]. W surowicy chorych na morfeę obserwowano także podwyższone stężenia IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-18 oraz rozpuszczalnego receptora dla IL-6 [*soluble IL-6 receptor (sIL-6R)*]. Wielu autorów obserwowało jednocześnie korelację z aktywnością procesu chorobowego [9, 93, 114–116, 127, 159, 279, 291]. Sugerowano polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th2 [49, 90, 285]. Należy jednak zauważyć, że IL-1 i 6 odgrywać mają istotną rolę w różnicowaniu limfocytów Th17 [230]. Z kolei IL-4 i 13 wykazują silne właściwości profibrotyczne i są zaangażowane w patogenezę także innych chorób przebiegających z włóknieniem, podobnie jak IL-8, której duży potencjał naczyniotwórczy wydaje się być szczególnie istotny w tej grupie schorzeń [88, 285, 301]. Rozbieżne są natomiast doniesienia dotyczące IL-2 i jej rozpuszczalnego receptora [*soluble IL-2 receptor (sIL-2R)*] [9, 46, 115, 159]. Sugeruje się również osłabioną produkcję, mającej właściwości antyfibrotyczne, IL-10 zarówno w morfeji, jak i w zwierzęcych modelach SSc [13, 322]. Na podstawie tych ostatnich wysunięto również przypuszczenie o zaangażowaniu w proces włóknienia **TNF α** , a nawet dowodząco skuteczności leczenia przeciwciałami przeciwko tej cytokinie [301]. Niemniej niedawno opisano przypadek chorego, u którego leczenie takie wzbudziło proces o charakterze morfeji [181]. U myszy Scl GVHD we wczesnych fazach procesu prowadzącego do zwłóknienia wykazano również zwiększoną zawartość mRNA dla **chemokin** CC: CCL2, CCL3 [białka zapalnego makrofagów, *Macrophage Inflammatory Protein-1 α* (MIP-1 α)], CCL5 [regulowany przez aktywację, prezentowany i wydzielany przez prawidłowe limfocyty T, *Regulated on Activation Normal T cel Expressed and Secreted* (RANTES)], CCL7 (MCP-3), CCL-17 [322]. Wydzielane są one przez liczne komórki zaangażowane w patogenezę morfeji, w tym przez makrofagi, EC, fibroblasty. Komórkami docelowymi ich działania są m.in. monocyty/makrofagi, granulocyty i limfocyty [88]. Uważa się, że chemokiny te mogą działać jako kofaktory TGF β we wzbudzaniu syntezy ECM [60, 301]. Wykazano zwiększoną ekspresję genu CCL2 i jego produktu u chorych na SSc [301]. Przeciwciała przeciwko CCL2 podawane myszom równocześnie z bleomycyną zmniejszały

stopień zwłóknienia skóry i powodowały mniejszą ekspresję kolagenu I [301]. Poza chemokinami CC dochodzi także do wzbudzenia chemokin CXC, w tym CXCL9, CXCL10, CXCL11, dla których zwiększoną zawartość mRNA stwierdzono u myszy Scl GVHD [322]. We wzbudzaniu chemokin CXC istotną rolę odgrywa ma IFN γ [322]. W omawianym mysim modelu stwierdzono także zwiększoną ekspresję mRNA dla receptorów chemokin (CCR): CCR1, CCR5, CCR6 [322]. U chorych na SSc obserwowano również podwyższone stężenie CXC3CL1 [301]. Wspomniany powyżej **IFN γ** , poza wzbudzaniem chemokin CXC, wykazuje również silne właściwości antyfibrotyczne *in vitro* i *in vivo*: zmniejsza ekspresję kolagenu i znosi stymulacyjny wpływ TGF β , a tym samym hamuje proliferację fibroblastów i ich różnicowanie do miofibroblastów [50, 285]. Lipko-Godlewska i wsp. [160] wykazali istotne statystycznie obniżenie stężenia IFN γ w surowicy chorych na morfeę w fazie aktywnej, ale nie w całej grupie badanej i nie w APP, w którym obserwowano nawet zwiększone jego stężenie, chociaż różnica ta nie była istotna statystycznie. We wczesnych etapach choroby u myszy Scl GVHD dochodzi do zwiększonego wytwarzania IFN γ [322]. Antyfibrotyczne właściwości IFN γ skłoniły do próby jego terapeutycznego zastosowania. Niestety nie wykazano korzyści tej metody w odniesieniu do placebo [109]. Co więcej opisywano chorych leczonych IFN γ , do czego wskazaniem było stwardnienie rozsiane, u których doszło do rozwoju SSc [50].

Autoprzeciwciała stwierdzane są nawet w 90% ogólnej populacji chorych na morfeę, chociaż rozbieżności pomiędzy badaczami w tym zakresie są olbrzymie. Niezależnie jednak od częstości ich występowania godnym uwagi jest fakt, że mają one odmienną specyfikę od tych obserwowanych w SSc i poza nielicznymi wyjątkami nie są to Scl-70 czy ACA. W morfeji wykrawane są ANA przeciwko jednoniciowemu DNA (ssDNA), histonom, topoizomerazie II DNA, nukleosomom, ale stwierdza się również czynnik reumatoidalny, autoprzeciwciała przeciwfosfolipidowe i skierowane przeciwko białku szoku termicznego o masie cząsteczkowej 73kDa, mitochondriom, fibrylinie 1, receptorom Fc- γ , MMP-1, dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej i agalaktozylowanym IgG. Żadno z wymienionych nie wykazuje swoistości dla morfeji, ale niektóre z nich, w szczególności autoprzeciwciała przeciwko nukleosomom, topoizomerazie II i dysmutazie ponadtlenkowej miedziowo-cynkowej są dla niej wysoce charakterystyczne. Według wielu autorów miana autoprzeciwciał korelować mają z cięższym przebiegiem choroby, powierzchnią zajętej skóry, a nawet aktywnością procesu, chociaż nie jest to pogląd podzielany przez wszystkich badaczy. Nie jest też jasne, czy mają one znaczenie patogenetyczne, czy są jedynie epifenomenem w przebiegu choroby [16, 33, 48, 57, 82, 156, 177, 189, 190, 207, 270, 275, 291].

1.7.3. Zaburzenia metabolizmu macierzy zewnątrzkomórkowej

Cytokiny i czynniki wzrostu, uwalniane przez rozmaite komórki zaangażowane w patologiczne zjawiska stwierdzone w morfeji, stymulują ostatecznie fibroblasty i tym samym nasilają odkładanie składników ECM. Równocześnie dochodzi do zmniejszenia liczby komórek zapalnych. Włóknienie to pojawia się początkowo wokół naczyń, co ma dodatkowo potwierdzać hipotezę, że pierwszym uszkodzonym elementem w patogenezie morfeji są EC [121, 158]. Fibroblasty, które okazują się być bardzo aktywnymi immunologicznie komórkami w patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem, wykazują przetrwałą aktywację w hodowlach ze względną opornością na apoptozę i różnicują się w kierunku miofibroblastów. Te ostatnie cechują się właściwościami typowymi dla komórek mięśni gładkich, w tym zdolność do kurczenia się, a ich charakterystyczną cechą jest ekspresja α SMA, przy czym zachowują one zdolność do produkcji cytokin profibrotycznych. Źródłem miofibroblastów mogą być także EC i komórki CD34+ [87, 134, 285]. Obserwuje się nasiloną produkcję ECM, głównie kolagenu I i III, fibronektyny i glikozaminoglikanów, w tym tenascyny, która jak się sugeruje, może odgrywać istotną rolę w aktywacji fibroblastów, a jej ekspresja jest wzmożona w fazie zapalnej i ulega zmniejszeniu w późniejszych okresach choroby [87, 95, 131, 289]. Tamura i wsp. [271] wykazali ponadto w skórze chorych na morfeję zwiększoną ilość histydynohydroksylizynonorleucyny, będącej trójwartościowym wiązaniem krzyżowym kolagenu typu I, szczególnie w skórze nieekspozowanej na działanie promieni UV. Jednocześnie jednak, nie stwierdzono korelacji pomiędzy ilością histydynohydroksylizynonorleucyny a długością trwania choroby [271]. Obserwowano również zwiększone stężenie oksydazy lizynowej, która jest niezbędnym enzymem katalizującym wiązania krzyżowe kolagenu [40]. Należy zauważyć, że nadmierne odkładanie ECM jest procesem złożonym, zależnym nie tylko od nadprodukcji jej składowych, ale także upośledzonego ich rozkładu. Ten ostatni zależy w głównej mierze od rodziny metalozależnych endoproteaz, zwanych MMP, które kolektywnie zdolne są do zniszczenia wszystkich składników ECM. Odgrywają one również istotną rolę w procesie angiogenezy. Istotność tych enzymów podkreśla fakt, że skuteczność fototerapii w leczeniu chorób przebiegających z włóknieniem skóry wynika m.in. z nasilonej produkcji MMP [68, 74, 275]. Tomimura i wsp. [275] wykazali autoprzeciwciała przeciwko MMP-1 (śródmięszowa kolagenaza typu 1) w surowicy 46% badanych chorych na morfeję. MMP-1 ma inicjować proces rozkładu kolagenu m.in. typu I, II i III [275]. Jednocześnie stwierdzono zmniejszoną ekspresję MMP-1 w fibroblastach w morfeji [19]. Obserwowano też zmniejszone surowicze stężenie MMP-13 w morfeji, zwłaszcza w jej cięższych postaciach [20]. Dżiankowska-Bartkowiak i wsp. [71] wykazali z kolei podwyższone stężenie MMP-9, ale nie MMP-2 w surowicy chorych na morfeję. Uważa się, że MMP-9 może odgrywać rolę przy aktywacji latentnej postaci TGF β [318]. Podnosi się również znaczenie TIMP, które zabezpieczają ECM przed dzia-

łaniem metaloproteinaz, a których zwiększoną ekspresję wykazywały fibroblasty w morfei [180].

1.8. Morfea a liszaj twardzinowy

W literaturze podkreśla się częste współistnienie LS i morfei niekiedy nawet w obrębie jednego wykwitu. Istnieją także opisy sugerujące transmisję jednej choroby w drugą na przestrzeni czasu, co znajdowało potwierdzenie w badaniu histopatologicznym [121, 140, 158, 185]. Stąd też koncepcja, że u podłoża obu chorób leżą podobne zjawiska patogenetyczne, m.in. uszkodzenie komórek śród-błonka jako domniemane zjawisko pierwotne. Część autorów uważa nawet, że LS stanowi szczególną, powierzchowną, odmianę morfei. Niemniej należy zauważyć, że obrazy histologiczne poszczególnych odmian morfei nie różnią się zasadniczo pomiędzy sobą, natomiast to, co obserwujemy w LS przedstawia się odmiennie. Stwierdza się tutaj ścięczenie żywych warstw naskórka, znaczną ortokeratozę, zwyrodnienie wodniczkowe keratynocytów warstwy podstawnej, czopy rogowe w ujściach mieszków włosowych, obrzęk i ujednostajnienie kolagenu w górnych warstwach skóry właściwej z zanikiem włókien elastycznych, pasmowaty naciek zapalny złożony głównie z limfocytów z domieszką komórek tłuszczowych, który w starszych zmianach ulega rozproszeniu. Zmiany w obrębie naskórka oraz degradacja włókien elastycznych są głównymi cechami odróżniającymi oba obrazy [121, 140, 158, 185]. Obraz histologiczny opisanej przez McNiffa i wsp. morfei powierzchownej również odbiega od tego, co obserwujemy w LS i odpowiada obrazowi klasycznych odmian morfei, przy czym włóknienie widoczne jest w górnych partiach skóry właściwej [126, 184]. W przeciwieństwie do morfei, w LS nie jest zachowana ciągłość błony podstawnej [147]. Dodatkowo stopień nasilenia syntezy kolagenu przez fibroblasty LS ma być zdecydowanie niższy niż ten obserwowany w morfei [77]. Klinicznie obie jednostki również wykazują różnice. Wykwity w lokalizacji pozagenitalnej mają charakter płaskowyniosłych, wielokątnych grudek barwy kości słoniowej lub porcelanowej, wykazujących tendencję do zlewania się. Szorstka powierzchnia jest wynikiem wspomnianych już czopów rogowych w ujściach mieszków włosowych. Niekiedy obserwować można wybroczyny. Świąd jest zjawiskiem rzadszym niż w lokalizacji genitalnej, ale nadal częstszym niż w morfei. Częściej też, niż w przypadku morfei, obserwować można pęcherze, szczególnie w lokalizacji genitalnej [121, 140, 158, 185]. W surowicy chorych na LS obserwuje się krążące autoprzeciwciała skierowane przeciwko jednemu z antygenów pemfigoidu – BP180 czy przeciwko białku macierzy zewnątrzkomórkowej typu 1. Te ostatnie występują nawet u 75% chorych na LS [25, 226]. Sugeruje się także podobieństwo, zwłaszcza w lokalizacji obejmującej błony śluzowe LS i liszaja płaskiego [77].

1.9. Morfea a twardzina układowa

Niewątpliwie centralnym zjawiskiem tak w morfeji, jak i w SSc, jest włóknienie w zakresie tkanki łącznej. Niemniej obraz kliniczny obu jednostek jest różny, a stwardnienie skóry (*scleroderma*), które jest makroskopowo widocznym wykładnikiem procesu jej włóknienia, jest stwierdzanym u tych chorych typem wykwitów skórnych. Należy dodatkowo zauważyć, że w rzadkich przypadkach SSc nie jest on w ogóle obserwowany. Wcześniejsze publikacje sugerowały, że jedną z cech dyskryminujących te dwie jednostki jest brak zmian narządowych w przebiegu morfeji i chociaż na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat coraz częściej pojawiają się doniesienia temu przeczące, to jednak zmiany te mają zazwyczaj charakter bezobjawowy, rzadziej łagodny [27, 48, 58, 89, 177, 245, 273, 280, 327]. Kolejnym objawem, który miał odróżniać omawiane choroby jest objaw Raynauda, który jak obecnie wiemy wcale nierzadko stwierdzany jest również u chorych na morfeję, tak zresztą jak i w innych chorobach autoimmunizacyjnych tkanki łącznej [33, 45, 177, 305, 327]. Podobnie jak w SSc, również w morfeji stwierdzane są krążące autoprzeciwciała, ale zazwyczaj o nieustalonej lub odmiennej swoistości od tych charakterystycznych dla SSc, a więc Scl-70 czy ACA [26, 33, 156, 177, 305, 327]. Obserwowano także pewne różnice w badaniach laboratoryjnych w obu omawianych jednostkach, które dotyczyły np. liczby limfocytów T reg w ogniskach twardzinowych, surowiczego poziomu VEGF, MMP-2, CNP czy potencjału angiogennej komórki jednojądrzastej krwi obwodowej [*peripheral blood mononuclear cells (PBMC)*] [13, 71, 174, 222, 223, 243]. Także obraz histologiczny, chociaż powszechnie uważany za jednolity dla obu jednostek, wykazuje pewne odmienności, jak bardziej obfity naciek zapalny czy obecność eozynofili, które to cechy wyróżniają mają morfeję [121, 158, 297]. Opisywane niekiedy w literaturze przypadki przejścia morfeji w SSc są skrajnie rzadkie [31–33, 327]. Z drugiej strony znajdujemy doniesienia o chorych, u których pomimo stwierdzanych krążących przeciwciał przeciwko Scl-70 czy ACA w trakcie wieloletnich obserwacji nie rozwinęły się objawy, które dawałyby podstawę do rozpoznania SSc [33, 177, 305, 327]. Peterson i wsp. [236] w swoich badaniach populacyjnych obejmujących 750 osobo-lat nie obserwowali ani jednego takiego zdarzenia. Być może wyjaśnieniem tego zjawiska jest współistnienie tych dwóch jednostek, co ma często miejsce w przypadku chorób z grupy schorzeń autoimmunizacyjnych i było również opisywane w literaturze w odniesieniu morfeji i SSc. Niejednokrotnie podkreślano również współistnienie morfeji z innymi jednostkami wynikającymi z autoagresji [98, 156, 261]. Być może też część z dawniej opisanych przypadków mogłaby odpowiadać temu, co Yamakage i wsp. nazwali SSc podobną do GM (*GM – like systemic sclerosis*) [299]. Niezależnie jednak czy uznamy, że morfea i SSc to dwie niezależne jednostki, co postuluje coraz większa grupa badaczy [11, 48, 90, 152, 270], czy że jest to ta sama choroba o skrajnie

odmiennych obliczach, to chorzy na morfeę z wysokimi mianami ANA, zwłaszcza o swoistości Scl-70 i ACA, powinni być otoczeni naszą szczególną uwagą. Niemniej ze względu na znaczne różnice pomiędzy obiema jednostkami słuszne wydaje się zalecenie stosowania nazw je wyraźnie oddzielających, a zatem morfea, zamiast twardzina ograniczona i SSc, zamiast sklerodermia [48]. Warto również przypomnieć, że w 1990 roku Maricq i wsp. zaproponowali termin: choroby kręgu twardziny (*scleroderma spectrum disorders*), który wydaje się dobrym rozwiązaniem dla podkreślenia wspólnych cech tej grupy jednostek [305].

1.10. Limfocyty Th17 i ich rola w chorobach autoimmunizacyjnych

IL-17 po raz pierwszy wykryta została w 1993 roku przez Rouviera i wsp. jako transkrypt szczurzych limfocytów T cytotoksycznych [248]. Nazwano ją antygenem związanym z limfocytami T cytotoksycznymi [*Cytotoxic T Lymphocyte associated Antygen (CTLA)*] – 8. Kolejnym krokiem było sklonowanie ludzkiej IL-17 [311]. W 2003 roku Aggarwal i wsp. opisali nową subpopulację limfocytów CD4+, która później nazwana została Th17 [7]. Większość naszej obecnej wiedzy dotyczącej tej nowej klasy limfocytów CD4+ opiera się na badaniach nad myszami. Trzeba jednak zachować ostrożność w interpretacji danych w kontekście komórek ludzkich. U myszy głównymi czynnikami promującymi różnicowanie limfocytów dziewiczych w kierunku Th17 mają być współdziałające ze sobą TGFβ i IL-6. Mają one aktywować czynniki transkrypcyjne, przede wszystkim RORγt oraz przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji [*Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)*] 3 [55, 101, 230, 242]. Wykazano, że zwiększona ekspresja RORγt, poza polaryzacją odpowiedzi w kierunku Th17, wiąże się z blokowaniem różnicowania Th1 i Th2. U myszy pozbawionych RORγt obserwowano zmniejszoną ekspresję IL-17 w odpowiedzi na TGFβ, IL-6, IL-21 [64]. Podobnie, pozbawienie myszy STAT3 związane było z zaburzonym różnicowaniem Th17. STAT3 w obecności TGFβ indukuje RORγt i RORα [310]. Zwiększenie ekspresji STAT3 powodowało nasilenie produkcji IL-17. Negatywnym regulatorem STAT3 jest supresor sygnałów przekazywanych przez cytokiny [*Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)*] 3. Jego delecja sprzyja zwiększonej syntezie IL-17 [43]. Niedobór wspomnianego już RORα powoduje zmniejszenie ekspresji IL-17 i receptora dla IL-23 (IL-23R), ale pozwala na wzbudzenie (choć w łagodniejszej formie) doświadczalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu i rdzenia. Niedobór obu przekaźników – RORα i RORγt – nie pozwalał na wzbudzenie opisywanego procesu [64]. W odróżnieniu od współdziałających ze sobą sygnałów TGFβ i IL-6, stymulowanie limfocytów wyłącznie TGFβ prowadzić ma do przesunięcia odpowiedzi w kierunku limfocytów T reg. Sugeruje się, że pod wpływem czynników różnicujących dochodzi do przełączenia pomiędzy T reg a Th17. Obie linie limfocytów wywodzą się ze wspólnych komórek prekursorowych Foxp3+ i RORγt+

[324]. Sugeruje się jednak, że sama IL-6 nie jest w stanie wzbudzić ekspresji ROR γ t i IL-17, nasila natomiast ekspresję IL-23R [43]. Myszy pozbawione IL-6 wykazują dominację limfocytów T reg wśród limfocytów krwi obwodowej [146]. Z drugiej jednak strony wykazano, że różnicowanie w kierunku Th17 zachodzi również u myszy pozbawionych IL-6, co ma wynikać ze wspomaganego działania IL-21 [146]. Poza IL-21 synergistycznie z TGF β i IL-6 mają działać TNF α i IL-1 β oraz osteopontyna [206, 267]. Wykazano zaburzone różnicowanie limfocytów Th17 u myszy pozbawionych receptora IL-1 [267]. Z kolei IL-23 jest cytokiną niezbędną do podtrzymania fenotypu i proliferacji limfocytów Th17, natomiast nie działa na etapie wzbudzania różnicowania, co wynika z faktu, że dziewicze limfocyty CD4+ nie wykazują ekspresji IL-23R [183, 231]. Co więcej, McGeachy i wsp. wykazali, że mysie limfocyty Th17 produkujące IL-17 pod wpływem IL-6 i TGF β nie wywierały patogennego efektu, co miało być związane jakoby z jednoczasową produkcją IL-10. Z kolei stymulowanie IL-23 powodowało syntezę IL-17, ale nie IL-10, co podkreśla znaczenie IL-23 [183]. Niedawno opublikowane wyniki badań nad doświadczalnie wzbudzonym zapaleniem i włóknieniem płuc u myszy sugerują, że *in vivo* IL-23 może mieć większe znaczenie niż TGF β i IL-6 [167]. Zarówno IL-21, jak i IL-23, podobnie jak IL-6 i TGF β , działają poprzez fosforylację STAT3. Pobudzenie STAT 3 nasila dodatkowo ekspresję IL-23R [43]. Synergistycznie z IL-23 ma działać prostaglandyna E2 i IL-18 [44, 229]. Limfocyty Th17 wykazują ekspresję receptora chemokin CCR6, którego ligandem jest CCL20, odgrywająca, jak się wydaje, istotną rolę w rekrutacji limfocytów Th17 do ogniska zapalenia i wzbudzająca syntezę IL-17 [239]. Potencjalną rolę może odgrywać tutaj również CCR4, którego ekspresję wykazano na limfocytach Th17 [91]. Z kolei do czynników hamujących odpowiedź mediowaną przez limfocyty Th17 należą: IL-2 (działająca za pośrednictwem STAT5), opisana poniżej IL-17E (IL-25) wraz ze wzbudzanymi przez siebie bezpośrednio i pośrednio IL-13, IL-27, IL-10, a także IL-35, IFN γ , IL-4, IL-12, kwasem retinolowym [52, 141, 155, 206, 214, 316]. Warto zauważyć, że limfocyty Th17 wydzielają IL-21 i CCL20, powodując wzmocnienie odpowiedzi na drodze autokrynej, ale równocześnie produkują IL-10 i IFN γ , tworząc w ten sposób negatywne sprzężenie zwrotne [125, 216, 307]. Jäger i wsp. podkreślają plastyczność Th17, które w odpowiednich warunkach zdolne są do produkcji różnych cytokin, i tak środowisko bogate w IL-23 pobudza wydzielanie IL-17, a środowisko IL-12 wydzielanie IFN γ . Plastyczności takiej nie mają wykazywać limfocyty Th1 [125].

Opisane powyżej mechanizmy różnicowania mysich limfocytów Th17 nie zawsze znajdują potwierdzenie w badaniach na komórkach ludzkich. Zasadnicze różnice wynikać mają z faktu posiadania innych ich prekursorów. U ludzi jest to komórka CD4+CD161+, która wykazuje dodatkowo ekspresję RORc (ludzki odpowiednik mysiego ROR γ t) i IL-23R. Inkubowanie tych komórek w środowisku IL-1 β i IL-23 wzbudza ich różnicowanie w kierunku limfocytów Th17, ale z drugiej

strony stymulacja IL-12 lub IL-4 ukierunkowuje je odpowiednio na fenotyp Th1 lub Th2. Ludzkie komórki CD4+CD161+ są zatem wspólnym prekursorem efektorowych komórek Th1, Th2 i Th17 [54, 91, 101, 204]. Przypomnijmy, że u myszy komórka prekursorowa limfocytów Th17 wykazywała ekspresję RORc i FoxP i, co za tym idzie, mogła opcjonalnie różnicować się w komórki T reg [146, 324]. Dowiedziano jednak istnienia ludzkich limfocytów T reg, które mogą różnicować się w kierunku Th17 [91, 144]. Kolejną odmiennością w stosunku do tego co obserwowano u myszy miało być wykazanie, że ludzkie limfocyty Th17 zdolne są do syntezy zarówno IL-17, jak i INF γ . Komórki te wykazują równolegle ekspresję RORc, IL-23R, T-bet i IL-12 β 2 oraz receptorów chemokin: CCR6 i CCR4. Ich stymulacja IL-12 powoduje zwiększenie ekspresji T-bet i produkcję INF γ . Niemniej niedawno dowiedziano, że plastycznością w zakresie produkcji INF γ w warunkach stymulacji IL-12 cechują się również mysie limfocyty Th17 [4, 125, 246]. Należy dalej podkreślić, że u ludzi, w przeciwieństwie do myszy, TGF β wydaje się nie odgrywać istotnej roli w różnicowaniu limfocytów Th17 [250]. Co prawda doniesienia co do roli TGF β we wspomnianym aspekcie nie są jednoznaczne i pierwszym badaniom sugerującym brak wpływu tej cytokiny na różnicowanie limfocytów Th17 zarzucano, że dziewicze limfocyty umieszczano w medium zawierającym ludzką lub byczą surowicę, mogącą być naturalnym źródłem TGF β [175, 204, 288, 309]. Jednakże obecnie wydaje się, że korzystny wpływ TGF β na dominację odpowiedzi Th17 wynika raczej z hamowania ekspresji czynników transkrypcji T-bet, STAT4 i GATA3, a zatem z blokowania różnicowania limfocytów Th1 i Th2, przy jednoczesnym braku działania w odniesieniu do RORc [5, 43, 250]. Sugeruje się, że może to wynikać z niedawno wykazanej w ludzkich limfocytach Th17 zmniejszonej ekspresji klasteryny, która wykazuje działanie proapoptotyczne, przy jednoczesnej zwiększonej ekspresji Bcl-2, która hamuje proces apoptozy. Ma to powodować odporność limfocytów Th17 na supresyjne działanie TGF β [250]. U ludzi także rekrutacja do ogniska zapalenia wydaje się mniej jasna niż na modelach zwierzęcych, jako że poza CCR4 i CCR6 wykazano tutaj równolegle ekspresję receptorów chemokin związanych z Th1, Th2 i T reg, takich jak CCR2, CXCR3, CCR5, CXCR6. CCR7 i CXCR5 [91]. Ligandy CCR4 i CCR6 – odpowiednio CCL17 i CCL20 – lokalizują się m.in. na EC i fibroblastach [284]. W kontekście przedstawionych danych należy zauważyć, że istotnym źródłem IL-1, IL-6, IL-23, TNF, TGF β , ale także IL-27 i INF γ są komórki dendrytyczne, co dodatkowo potwierdza ich znaczenie w patogenezie morfeji [87, 88, 259, 290]. Pobudzone limfocyty Th17 mogą stanowić źródło IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, IL-26, TNF α , G-CSF, CCL20, INF γ [55, 91, 101].

Limfocyty Th17 stanowią główne źródło IL-17, jednak może być ona syntetyzowana również przez neutrofile, aktywowane monocyty, komórki NK, limfocyty T $\gamma\delta$, CD8+, astrocyty, oligodendrocyty, limfocyty T reg CCR6+FoxP3+RORc- oraz limfocyty T pamięci wykazujące ekspresję IL-23R [43, 55, 101, 230]. Pobudze-

nie TCR tych ostatnich skutkuje aktywacją transkrypcji czynnika jądrowego aktywowanych limfocytów T [*Nuclear Factor of Activated T cell* (NFAT)]. Proksymalny rejon promotorowy genu ludzkiej IL-17 zawiera 2 miejsca wiążące NFAT [163]. U ludzi gen kodujący IL-17 lokalizuje się na chromosomie 6p [230]. Obecnie wiemy, że opisana pierwotnie IL-17 stanowi tak naprawdę prototyp rodziny IL-17 i aktualnie nosi ona nazwę IL-17A [230]. Rodzina IL-17 obejmuje 6 cytokin: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (zwaną obecnie częścią IL-25) i IL-17F [55, 230]. Ludzka IL-17A jest glikoproteiną zbudowaną ze 155 aminokwasów o masie cząsteczkowej 15 kDa i wydzielana jest jako homodimer połączony wiązaniem dwusiarczkowym, o łącznej masie 35 kDa. Określenie IL-17 często stosowane jest jako homonim IL-17A. Ma ona aminoterminalną hydrofobową sekwencję sygnałową charakterystyczną dla cytokin, wysoce konserwatywny odcinek karboksyterminalny i 5 reszt cysteinowych, które upodabniają ją do TGF β i czynnika wzrostu nerwów NGF. Sekwencja aminokwasowa IL-17 wykazuje podobieństwo do tej obserwowanej w białkach wirusów z rodziny *Herpesvirus* [230, 311]. Pozostali członkowie rodziny IL-17 wykazują 16–50-procentową homologię ze składem aminokwasowym IL-17A, z czego największą zgodność wykazano w IL-17F [43, 230]. IL-17A i F wydzielane są w postaci homo- lub heterodimerów: IL-17A, IL-17A/F i IL-17F. Z nich największą zdolnością do wzbudzenia odpowiedzi prozapalnej ma IL-17A, a najmniejszą IL-17F. Nie zawsze jednak ekspresja obu białek zachodzi równolegle. Ich biologiczny efekt ma być mediowany przez wzbudzenie czynnika jądrowego κ B [230, 311]. Te IL powodują wzbudzenie szeregu cytokin, w tym CCL2, CCL3, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, TNF α , IL-1, IL-6, IL-9, IL-19, IL-20, IL-24, VEGF, bFGF, HGF, PDGF, G-CSF, GM-CSF, białek o aktywności przeciwbakteryjnej – mucyn, β defensyn, białek zaangażowanych w remodeling tkanek – surowiczego amyloidu A, MMP1, 2, 3, 9 i 13 oraz liganda receptora aktywującego jądrowy czynnik NF κ B [*Receptor Activator of NF κ B ligand* (RANKL)], prostaglandyn – E1 i E2 oraz cząsteczek adhezyjnych – ICAM-1 [203, 224, 229, 230, 242, 268]. Z drugiej strony wykazano, że wynikiem ich działania jest również zmniejszenie ekspresji VCAM-1 i CCL5 [252]. Promują one granulopoezę oraz rekrutację neutrofilii i monocytów do ogniska zapalenia i ich aktywację. Wzmagają również dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz proliferację i różnicowanie do komórek plazmatycznych limfocytów B. Wzbudzają komórki nabłonków płuc, jelit, keratynocyty, synowioocyty, chondrocyty [65, 194, 203, 224, 230, 242]. Wykazano znaczenie obu IL w odpowiedzi przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej [230]. Mają one nasilać angiogenezę [215, 268]. Sugeruje się ich udział w procesach autoimmunizacyjnych. Podwyższone stężenie obu stwierdzono m.in. w łuszczycy, reumatoidalnym zapaleniu stawów, stwardnieniu rozsianym, zapalnych chorobach jelit. Przy czym w trzech pierwszych tu wymienionych, większe znaczenie ma, jak się wydaje, IL-17A,

natomiast w zapalnych chorobach jelit IL-17F [230]. Budowa IL-17E wykazuje 25–35-procentową zgodność z pozostałymi członkami rodziny IL-17. Jest ona wydzielana m.in. przez limfocyty Th2, makrofagi, eozynofile, bazofile, komórki tuczne, komórki nabłonka płuc. W odróżnieniu od IL-17A i F, opisywana IL-17E promuje odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów Th2, a hamuje aktywację limfocytów Th1 i, jak wspomniano powyżej, Th17. Wynikiem jej działania jest eozynofilia i neutrofilia krwi obwodowej, obecność tych komórek w zajętych procesem tkankach, zwiększenie surowiczego stężenia immunoglobulin (Ig) E, IgA i IgG1 oraz cytokin Th2. Jest ona istotna dla eliminacji infekcji pasożytami, ale z drugiej strony jest również zaangażowana w patogenezę reakcji alergicznych, takich jak astma czy atopowe zapalenie skóry [80, 229, 230]. IL-17B, IL-17C i IL-17D wykazują najmniejszą homologię z pozostałymi członkami rodziny IL-17 i szacuje się ją na 23–29%. Uważa się je za cytokiny o aktywności prozapalnej. IL-17B i C wzbudzać mają ekspresję TNF α i IL-1 β – m.in. w monocytach i fibroblastach. IL-17D nasila z kolei syntezę IL-6, CXCL8, GM-CSF. Sugeruje się, że wzmagają one migrację neutrofilii i syntezę MMP3 [230]. Rodzina receptora IL-17 (IL-17R) obejmuje pięciu członków: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD i IL-17RE. Dla wzbudzenia efektów IL-17A i IL-17F, kluczowym jest heterodimer IL-17RA i IL-17RC, przy czym do połączenia takiego dochodzi etapami: początkowo IL łączy się z IL-17RA, a następnie dochodzi do połączenia z kolejnym łańcuchem receptora [85]. Ich ekspresję stwierdza się w wielu tkankach oraz komórkach, m.in. w fibroblastach, neutrofilach, EC, monocytach, komórkach nabłonków, w tym na keratynocytach, komórkach mięśniowych, astrocytach, osteoblastach, chondrocytach [55, 85, 229, 230].

Limfocyty Th17 pełnią ważną ochronną funkcję w chorobach zakaźnych, w których IL-17 poprzez rekrutację i aktywację neutrofilii i makrofagów do ogniska zakażenia sprzyjają usuwaniu czynnika zakaźnego. W ochronie tej istotną rolę odgrywać mają także wydzielane przez Th17 IL-6, IL-21, IL-22, IL-26, TNF α [55, 224]. Dyskutowane jest także ich znaczenie w biologii nowotworów, przy czym sugerowany jest zarówno ich stymulujący, jak i hamujący wpływ na wzrost komórek nowotworowych [111]. Protekcyjne znaczenie postulowano m.in. w raku piersi, gdzie stwierdzano zmniejszenie puli krążących limfocytów Th17 u kobiet chorych na raka piersi w porównaniu z grupą kontrolną, a jej zwiększenie było związane ze skuteczną immunoterapią [106]. Patogenne znaczenie Th17 podnosi się w wielu chorobach autoimmunizacyjnych u ludzi, m.in. w stwardnieniu rozsianym, łuszczycy, reumatoidalnym zapaleniu stawów, cukrzycy typu I, autoimmunizacyjnym zapaleniu naczyń, autoimmunizacyjnym zapaleniu tarczycy, małopłytkowości związanej z autoimmunizacją, zapalnych chorobach jelit, seronegatywnych spondyloartropatiach, toczeniu rumieniowatym układowym [*Systemic Lupus Erythematosus* (SLE)], SSc [101, 230, 242].

2. Założenia i cele pracy

Obecna wiedza dotycząca patomechanizmu morfeji jest niewystarczająca, zwłaszcza w kontekście niewielkich możliwości terapeutycznych, którymi dysponujemy. Wiadomo, że zaburzenia w jej przebiegu obejmują trzy zasadnicze zjawiska: nieprawidłową angiogenezę, wzbudzenie procesów immunologicznych, w tym autoimmunizacyjnych oraz zaburzony metabolizm macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania ostatnich kilku lat ściśle sugerują, że cytokiny związane z nowo opisanymi limfocytami Th17 mogą odgrywać rolę we wszystkich wymienionych powyżej zjawiskach [56, 65, 145, 154, 230, 242, 268]. Jak dotąd nie były one jednak przedmiotem badań w odniesieniu do morfeji. Celem pracy była zatem:

1. Ocena ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, bFGF, VEGF-A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na morfeję z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności.
2. Ocena osoczowego stężenia IL-17A, IL-21, IL-23, IL-1 β w morfeji z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności.
3. Ocena ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A w skórze chorych na morfeję z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności.
4. Porównanie osoczowego stężenia powyżej wymienionych cytokin i ekspresji ich genów w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na morfeję oraz postacię ograniczoną twardziny układowej.

3. Materiał i metody

3.1. Grupy badane i kontrolne

Ogółem badaniami objęto 125 osób, z czego 50 chorych na morfeę oraz 75 osób zakwalifikowanych do grup kontrolnych. W grupie badanej wyróżniono 5 podgrup:

- I – 20 chorych na MEP
- II – 15 chorych na GM
- III – 7 chorych na LM
- IV – 2 chorych na DM
- V – 6 chorych na morfeę ze współistniejącymi wykwitami LS

Do badań kwalifikowano chorych, u których kliniczne rozpoznanie morfeji/LS potwierdzone zostało badaniem histologicznym. Chorzy, w chwili pobierania od nich materiału, pozostawali bez leczenia. Dokładna charakterystyka grupy badanej została przedstawiona w tabeli I.

Tabela I. Charakterystyka grupy badanej – chorzy na morfeę

| | | Morfea | Podtypy morfeji | | | | |
|------------------------|---------|--------------|-----------------|------|-------|------|------|
| | | | MEP | GM | LM | DM | +LS |
| Liczba chorych | n | 50 | 20 | 15 | 7 | 2 | 6 |
| | % | 100 | 40 | 30 | 14 | 4 | 12 |
| Liczba kobiet/mężczyzn | | 29/21 | 10/10 | 7/8 | 5/2 | 1/1 | 6/0 |
| Wiek chorych | Średnia | 46,4 | 43,4 | 49,5 | 33,4 | 53,5 | 61,3 |
| | SD | 17,0 | 18,8 | 13,0 | 17,46 | 2,1 | 8,8 |

MEP – postać plackowata morfeji, GM – postać uogólniona morfeji, LM – postać linijna morfeji, DM – postać głęboka morfeji, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, n – liczba chorych, SD – odchylenie standardowe.

Badania przeprowadzono również w 3 grupach kontrolnych, które obejmowały łącznie 75 osób, w tym:

- I – 47 zdrowych ochotników (35 kobiet i 12 mężczyzn; średni wiek $33,0 \pm 8,58$), niespokrewnionych z chorymi na choroby autoimmunizacyjne; grupa ta stanowiła kontrolę w badaniu ekspresji genów wybranych cytokin w PBMC oraz w badaniu stężenia tych białek w osoczu;
- II – 15 chorych na ISSc (14 kobiet i 1 mężczyzna; średni wiek $52,0 \pm 11,7$); grupa ta stanowiła kontrolę w badaniu ekspresji genów wybranych cytokin w PBMC oraz w badaniu stężenia tych białek w osoczu; rozpoznanie oparte było o kryteria ACR [178], a grupę ISSc wyróżniono stosując system klasyfikacji zaproponowany przez LeRoya i wsp. [157];
- III – 13 chorych na raka piersi, od których pobrano wycinki skóry zdrowej jak to opisano poniżej (13 kobiet, średni wiek $52,15 \pm 17,65$); grupa ta stanowiła kontrolę w badaniu ekspresji genów wybranych cytokin w wycinkach skórnych.

Zarówno osoby z grup badanych, jak i kontrolnych zostały poinformowane o celu badań, a materiał pobrano po uzyskaniu ich pisemnej zgody. Badania zostały zatwierdzone przez lokalną Komisję Bioetyki, działającą przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.2. Materiał

3.2.1. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej i osocze

Krew obwodową uzyskano ogółem od 111 osób, z tego 49 prób pochodziło od chorych kwalifikowanych do grupy badanej (nie pozyskano osocza i PBMC u jednego chorego z podgrupy GM z powodów technicznych), 47 od zdrowych ochotników i 15 od chorych na ISSc. Pięć ml krwi pobierano jałowo do probówek-strzykawków zawierających EDTA (*Monovette, Sarstedt*). PBMC i osocze pozyskane zostały poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Fikolu (*Ficoll-Histopaque 1.007 g/cm³, Sigma Diagnostics, Inc. St. Louis, USA*). Osocze do czasu wykonania badań przechowywane było w temperaturze -80°C . PBMC zostały zdeintegrowane w odczynniku TriPure (*Roche Applied Science*).

3.2.2. Wycinki skóry

Wycinki skóry uzyskano ogółem od 49 osób. Biopsje od 36 chorych z grupy badanej, o największym wymiarze nieprzekraczającym 5 mm, pobierano z miejsc zmienionych chorobowo, po znieczuleniu miejscowym. Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli II. Biopsje skóry klinicznie niezmienionej, kwalifikowane do grupy kontrolnej, pobrano od 13 chorych. Były to chore na nowo-

twory piersi, niewykazujące związku ze skórą. Wycinki te uzyskiwano w trakcie mastektomii, do której wskazaniem była choroba podstawowa. Bezpośrednio po pobraniu, materiał zamrażano w ciekłym azocie, po czym do czasu wykonania badań przechowywano w temperaturze -80°C.

Tabela II. Charakterystyka chorych na morfeę, od których pozyskano wycinki skóry

| | | Morfea | Podtypy morfei | | | | |
|------------------------|---------|--------------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | MEP | GM | LM | DM | +LS |
| Liczba chorych | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 |
| | % | 100 | 36 | 31 | 17 | 6 | 11 |
| Liczba kobiet/mężczyzn | | 17/19 | 5/8 | 3/8 | 4/2 | 1/1 | 4/0 |
| Wiek chorych | Średnia | 45,11 | 44,46 | 47,45 | 28 | 53,50 | 62,25 |
| | SD | 16,01 | 17,27 | 11,77 | 10,88 | 2,12 | 9,46 |

MEP – postać plackowata morfei, GM – postać uogólniona morfei, LM – postać linijna morfei, DM – postać głęboka morfei, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, n – liczba chorych, SD – odchylenie standardowe.

3.3. Metody

3.3.1. Ocena aktywności choroby

Chorzy, u których w ciągu ostatnich 6 miesięcy stwierdzono pojawienie się nowych ognisk, szerzenie się uprzednio istniejących lub obecność rumieniowej obwódki, kwalifikowano do grupy chorych z procesem aktywnym. Chorzy, u których powyższych objawów nie obserwowano zaliczani byli do grupy z procesem nieaktywnym [177, 282].

3.3.2. Ocena rozległości i nasilenia zmian skórnych

Oceny dokonano z zastosowaniem wskaźnika rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w morfeii (*Localized Scleroderma Severity Index, LoSSI*), zaproponowanego przez Arkachaisriego i wsp. i przedstawionego w tabeli III [14]. Zgodnie z przyjętymi wytycznymi ocenie podlegały: rozległość zmian, rumień, grubość skóry. Wszystkie wymienione parametry oceniano w skali od 0 do 3. W odniesieniu do rozległości zmian: 0 – oznaczało brak zmian w danej lokalizacji, 1 – zajęcie do 1/3 powierzchni skóry, 2 – zajęcie od 1/3 do 2/3 ocenianego obsza-

ru i 3 – zajęcie powyżej 2/3 danej lokalizacji. Przy ocenie rumienia, 0 – oznaczało jego brak, 1 – rumień delikatny o różowym odcieniu, 2 – wyraźny, żywo czerwony wykwit, 3 – obecność ciemnoczerwonego rumienia. Badanie grubości skóry oparte było na zmodyfikowanym systemie oceny skóry Rodnana, polegającym na możliwości ujęcia skóry w fałd: 0 – oznaczało brak pogrubienia, 1 – łagodne pogrubienie, umożliwiające ujęcie fałdu skórniego, 2 – umiarkowane pogrubienie, utrudniające ujęcie skóry w fałd, 3 – znaczne pogrubienie, uniemożliwiające ujęcie fałdu skórniego. Ocenie podlegała również aktywność wykwitów. Stwierdzenie nowego ogniska lub szerzenie się uprzednio istniejącego, na przestrzeni miesiąca poprzedzającego badanie, skutkowało przyznaniem 3 punktów, w przeciwnym razie punktów nie przyznawano. Przedstawionej analizie podlegało 14 lokalizacji anatomicznych: głowa, szyja, przednia powierzchnia klatki piersiowej, brzuch, górna część pleców, dolna część pleców, ramię prawe, przedramię i ręka prawa, udo i pośladek prawy, podudzie i stopa prawa, ramię lewe, przedramię i ręka lewa, udo i pośladek lewy, podudzie i stopa lewa. Rumień i stwardnienie skóry oceniano w zakresie najbardziej zaawansowanego wykwitu dla danej lokalizacji. Wszystkie otrzymane wyniki były następnie sumowane, a maksymalna uzyskana punktacja wynosić mogła 168 [14]. Ocenę dokonano u chorych z grupy badanej, z wyłączeniem podgrupy ze współistniejącymi wykwitami LS, co było podyktowane tym, że wskaźnik przeznaczony jest do oceny zmian o typie morfeii i tylko w takiej grupie był do tej pory badany. Należy podkreślić, że w większości przypadków nie można jednoznacznie rozróżnić wykwitów morfeii i LS występujących u jednego chorego, zwłaszcza jeżeli wykazują one kolokalizację.

Tabela III. Ocena rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych z zastosowaniem LoSSI wg Arkachaisriego i wsp. [14]

| | Powierzchnia (SA) | Rumień (ES) | Pogrubienie skóry (ST) | Aktywność (N/E) |
|---|---|---|---|--|
| | 0 – brak zmian 1 – $\leq 1/3$ 2 – $1/3-2/3$ 3 – $\geq 2/3$ | 0 – brak 1 – delikatny/ różowy 2 – wyraźny/ czerwony 3 – ciemno- czerwony | 0 – brak 1 – łagodne 2 – umiarkowane 3 – znaczne | 0 – brak 3 – nowe ognisko lub szerzenie się zmian |
| Głowa | | | | |
| Szyja | | | | |
| Przednia powierzchnia klatki piersiowej | | | | |
| Brzuch | | | | |
| Górna część pleców | | | | |
| Dolna część pleców | | | | |
| Ramię prawe | | | | |
| Przedramię i ręka prawa | | | | |
| Udo, pośladek prawy | | | | |
| Podudzie, stopa prawa | | | | |
| Ramię lewe | | | | |
| Przedramię i ręka lewa | | | | |
| Udo, pośladek lewy | | | | |
| Podudzie, stopa lewa | | | | |

Wszystkie otrzymane wyniki są następnie sumowane. Maksymalna uzyskana punktacja wynosi 168.

LoSSI – wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w morfeji (*Localized Scleroderma Skin Severity Index*), SA – powierzchnia zmian (*surface area score*), ES – rumień (*erythema score*), ST – pogrubienie skóry (*skin thickness*) – badanie oparte na zmodyfikowanym systemie oceny grubości skóry Rodnana, w którym pomiaru dokonuje się poprzez próbę ujęcia skóry w fałd, N/E – aktywność zmian (*new lesion/lesion extension*) – każde nowe ognisko lub powiększenie już istniejącego w ciągu ostatniego miesiąca.

3.3.3. Badanie immunoenzymatyczne ELISA

Badanie osoczowego stężenia IL-17A, IL-23, IL-1 β metodą immunoenzymatyczną ELISA wykonano z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów R&D System (Minneapolis, USA). Oznaczenia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta.

Natomiast badanie osoczowego stężenia IL-21 metodą immunoenzymatyczną ELISA wykonano z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów e-Bioscience (Wiedeń, Austria). Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta.

3.3.4. Badanie ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

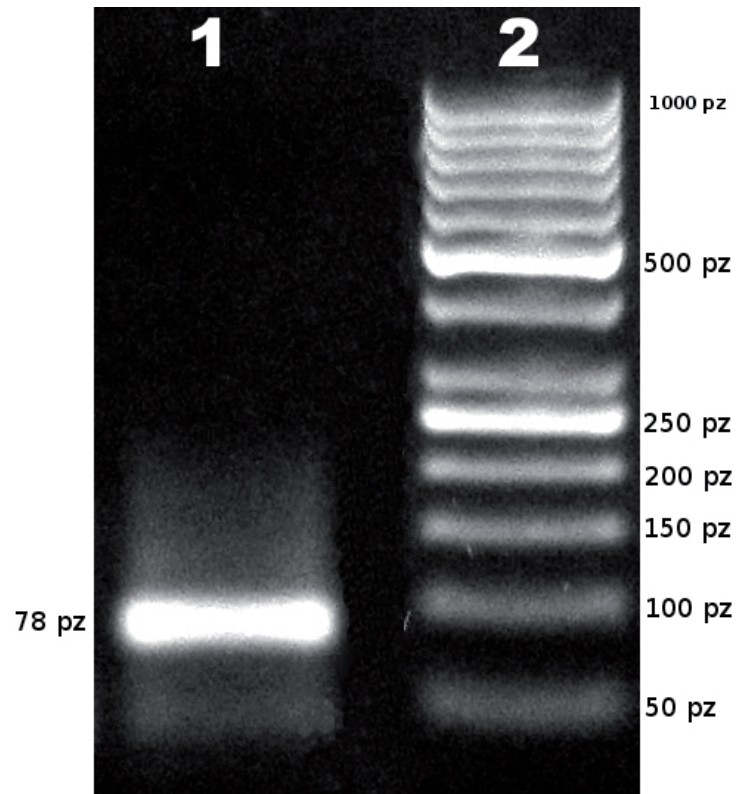
Całkowite komórkowe RNA, izolowane z PBMC, uzyskano zgodnie z metodą opisaną przez Chomczyńskiego i wsp. [47]. W celu uniknięcia zanieczyszczeń DNA genomowym, wykorzystano zestaw zawierający rekombinowaną DNAzę I (Ambion, USA). Do tej reakcji w każdym przypadku pobrany został 1 μ g RNA. Odwrotną transkrypcję wykonano wykorzystując zestaw dostępny komercyjnie (*Roche Applied Science*). Uzyskane po odwrotnej transkrypcji próby cDNA poddano ilościowej analizie ekspresji z zastosowaniem metody reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym [*real time Quantitative PCR* (rt-PCR)]. Do badań wykorzystano system Light Cycler 2 (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Niemcy) oraz komercyjny zestaw do reakcji rt-PCR zawierający polimerazę DNA HotStartTag, bufor reakcyjny, mieszaninę trójfosforanów deoksynukleozydów (dNTP), a także barwnik Sybr Green SG (*Roche Applied Science*).

Analizie poddano wybrane fragmenty genów o długości 78–237 par zasad (pz). We wszystkich przypadkach amplikony obejmowały przynajmniej jeden intron, co w połączeniu z odpowiednio krótkim czasem elongacji, minimalizowało możliwość amplifikacji niepożądaných sekwencji pochodzenia genomowego. Skuteczność DNAzowania, a tym samym eliminacji zanieczyszczeń DNA genomowym została potwierdzona poprzez reakcję rt-PCR na materiale, na którym nie przeprowadzono reakcji odwrotnej transkrypcji (kontrola negatywna). Wszystkie próby RNA przed przeprowadzeniem reakcji odwrotnej transkrypcji zostały przetestowane na obecność takich zanieczyszczeń i były wystarczająco czyste (mniej niż jedna kopia genu referencyjnego na reakcję po podstawieniu punktu przecięcia [*crossing point* (Cp)] do krzywej standardowej lub nie wykryto w nich zanieczyszczeń w ogóle). Sondy, którymi posłużono się w doświadczeniach zostały zaprojektowane we własnym zakresie, na podstawie sekwencji bazowych dostępnych w zasobach światowych baz danych *GeneBank* i *Ensembl* lub pozyskane z internetowej bazy danych starterów <http://www.rtpimerdb.org/> (Tabela IV).

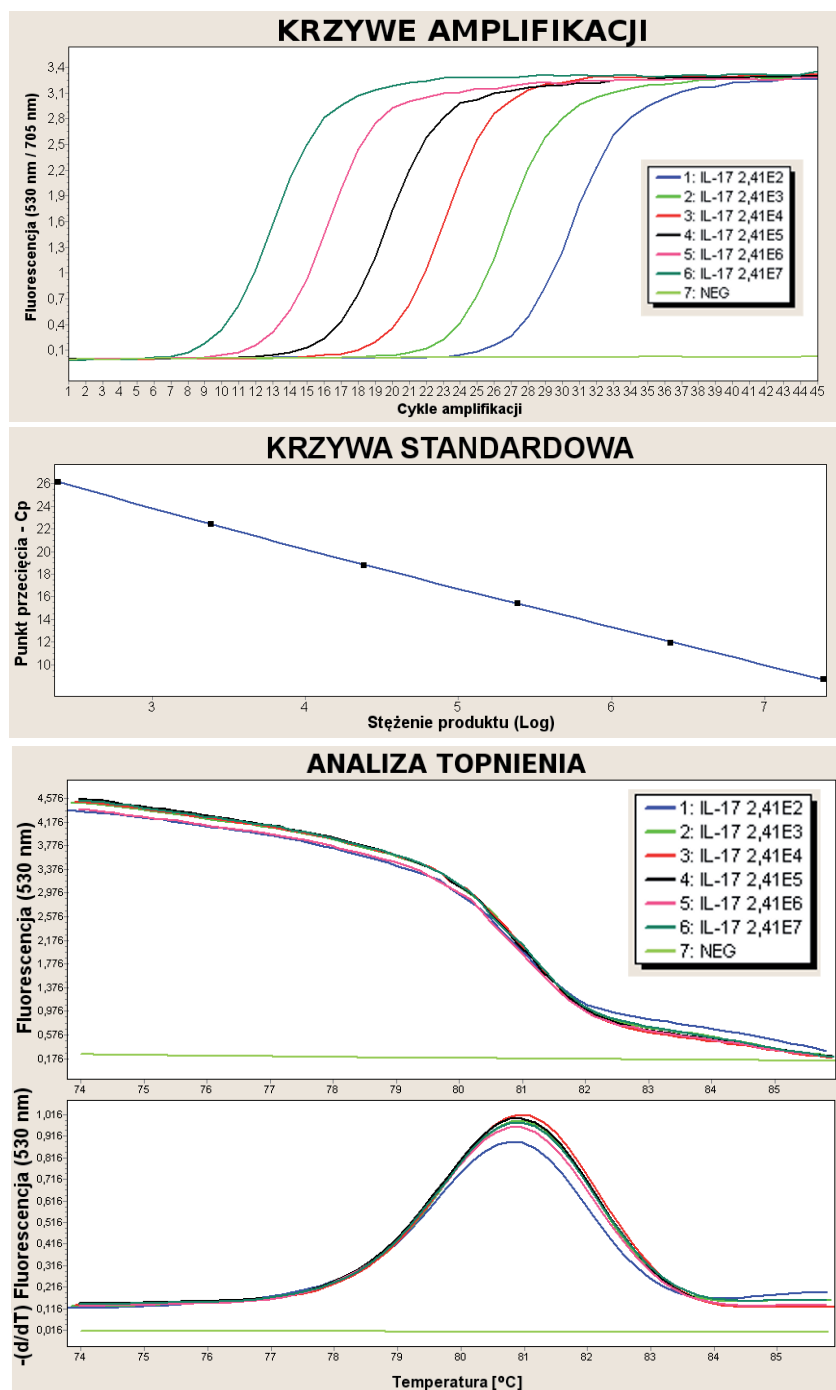
Reakcje rt-PCR optymalizowano, dostosowując parametry amplifikacji i skład mieszaniny reakcyjnej do możliwie najlepszego poziomu. Wielkość produktu oceniano na podstawie elektroforezy w żelu agarozowym z barwnikiem SYBR Safe (Rycina 1.). Reakcję uznawano za zoptymalizowaną, jeżeli uzyskano pojedynczy, wyraźny i co najważniejsze prążek o odpowiedniej długości na żelu elektroforetycznym, a także jeżeli analiza temperatury topnienia amplikonu po reakcji rt-PCR wskazywała na pojedynczy i jednorodny produkt amplifikacji. Ilościowego określenia liczby kopii badanych transkryptów dokonano na podstawie krzywej standardowej sporządzonej dla prób syntetycznego DNA o znanych stężeniach (Rycina 2.). Uzyskane wyniki zostały wyrażone w liczbie kopii w przeliczeniu na milion kopii transkryptu genu dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej (GAPDH) jako genu referencyjnego, z grupy genów podstawowego metabolizmu komórkowego (*housekeeping gene*). Skuteczność wykorzystania właśnie tego genu jako genu referencyjnego, w przypadku opisywanych badań, znajduje uzasadnienie w piśmiennictwie [36].

Tabela IV. Startery zastosowane w badaniu

| Nazwa | Sekwencja 5'-3' | Długość amplikonu [pz] | Źródło lub sekwencja bazowa |
|---------|--------------------------|------------------------|---|
| GAPDH-F | CTGCACCACCAACTGCTTAG | 105 | Ensembl: ENST00000229239 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GAPDH-R | TTCTGGGTGGCAGTGATG | | |
| IL17A-F | CTCATTGGTGTCACTGCTACTG | 78 | http://www.rtpimerdb.org/assay_report.php?assay_id=7754 |
| IL17A-R | CCTGGATTCGTGGGATTGTG | | |
| IL23-F | ACACATGGATCTAAGAGAAGAGG | 201 | http://www.rtpimerdb.org/assay_report.php?assay_id=7758 |
| IL23-R | CTATCAGGGAGCAGAGAAGG | | |
| TGFB1-F | GTGACAGCAGGGATAACACACTG | 81 | http://www.rtpimerdb.org/assay_report.php?assay_id=1005 |
| TGFB1-R | CATGAATGGTGGCCAGGTC | | |
| IL1B-F | TGGAGCAACAAGTGGTGT | 157 | http://www.rtpimerdb.org/assay_report.php?assay_id=3054 |
| IL1B-R | TTGGGATCTACACTCTCCAGC | | |
| HGF-F | TGCCTCTGGTCCCCTTCAATAGCA | 174 | NM_000601.4 Homo sapiens hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor) (HGF) |
| HGF-R | ACTCCAGGGCTGACATTTGATGCC | | |
| VEGFA-F | CCATGCCAAGTGGTCCCAGGC | 106 | NM_001025370.2 Homo sapiens vascular endothelial growth factor A (VEGFA) |
| VEGFA-R | TGGATGGCAGTAGCTGCGCTG | | |
| bFGF-F | GTGTGTGCTAACCGTTACCT | 237 | Pattyn F., Speleman F., De Paepe A. i wsp. RTPimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. Nucleic Acids Research 2003;31:122-3 (233) |
| bFGF-R | GCTCTTAGCAGACATTGGAAG | | |



Rycina 1. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla genu IL-17A (1 – produkt PCR dla IL-17A, 2 – wzorzec długości fragmentów DNA GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50–1000 bp, Fermentas, Kanada).



Rycina 2. Krzywe amplifikacji produktu genu IL-17A; wykreślona krzywa standardowa i krzywe topnienia.

3.3.5. Badanie ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF w skórze metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

Izolację całkowitego komórkowego RNA z biopsji skóry przeprowadzono poprzez homogenizację głęboko mrożonych próbek w odczynniku TriPure (Roche Applied Science). Ze względu na obecność dużej ilości zanieczyszczeń, przeprowadzono podwójną ekstrakcję fenolem i chloroformem, przedzieloną przemywaniem izopropanolem i 75-procentowym etanolem. Dodatkowo, wszystkie preparaty poddano trawieniu rekombinowaną DNAzą I. Kolejne etapy oceny ekspresji były identyczne jak w przypadku materiału pobranego z PBMC.

3.3.6. Ocena przeciwciał przeciwjądrowych

Badanie miana ANA metodą immunofluorescencji pośredniej na substracie komórek nowotworowych raka krtani HEP-2 i wątroby małpiej wykonano z zastosowaniem komercyjnie dostępnego zestawu (Euroimmun, Lubeka, Niemcy). Do oceny swoistości przeciwciał zastosowano test paskowy typu blot – Euroline ANA Profile 3 (Euroimmun, Lubeka, Niemcy).

3.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano według metod i procedur opisanych przez Stanisza [265]. Opracowanie statystyczne przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statistica 9.1 (Statsoft) w Katedrze i Zakładzie Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. W celu opisu zmienności w obrębie grupy badanej, jej podgrup i grup kontrolnych wyznaczono odpowiednie statystyki opisowe: średnią i odchylenie standardowe [*standard deviation* (SD)] dla wieku i długości trwania choroby oraz, z uwagi na niespełnienie założenia o zgodności z rozkładem normalnym, medianę i wartości minimalne i maksymalne dla pozostałych analizowanych zmiennych. Do oceny istotności różnic pomiędzy grupą badaną i odpowiednimi kontrolnymi zastosowano test U Manna-Whitney'a. Do oceny istotności różnic w rozkładach wartości zmiennych w poszczególnych podtypach choroby użyto testu ANOVA Kruskala-Wallis. Do opisu zależności pomiędzy LoSSI, długością trwania choroby a rozważanymi zmiennymi, zarówno w podgrupach, jak i całej grupie badanej oraz zależności pomiędzy poszczególnymi cytokinami u danego chorego wykorzystano korelację porządku rang Spearmana. Wyniki były oceniane jako istotne statystycznie przy $p < 0,05$. Do prezentacji graficznej zaproponowano wykresy skrzynkowe.

4. Wyniki

4.1. Badanie podmiotowe i przedmiotowe

Wyniki badania podmiotowego chorych na morfeę wyrażone za pomocą LoSSI oraz dane dotyczące aktywności choroby i długości jej trwania przedstawiono w tabeli V. W tabeli VI przedstawiono te same dane dla grupy chorych na morfeę, od których pobrano wycinki skóry. Nie stwierdzono zależności pomiędzy LoSSI a długością trwania choroby.

Współistniejącą z morfeą chorobę autoimmunizacyjną obserwowano u 6 chorych i były to: w 3 – przypadkach bielactwo, w 2 – zapalenie tarczycy typu Hashimoto, w 1 – łysienie plackowate i w 1 – stwardnienie rozsiane, przy czym u jednego chorego stwierdzono 2 choroby autoimmunizacyjne – bielactwo i zapalenie tarczycy typu Hashimoto. U chorych tych rozpoznano: u 3 – GM, u 2 – MEP i u 1 – morfeę z towarzyszącymi wykwitami LS. Choroby autoimmunizacyjne u krewnych podawało 6 chorych na morfeę, przy czym u 2 z nich choroby występowały u kilkorga z krewnych. W 4 przypadkach byli to krewni 1. stopnia i w 2 – 2. stopnia. Były to: bielactwo (3 osoby), reumatoidalne zapalenie stawów (2 osoby), łuszczyca (2 osoby), stwardnienie rozsiane (1 osoba). Dolegliwości bólowe stawów podawało 7 chorych z grupy badanej, z tego u 4 rozpoznano GM, u 2 – LM i u 1 – DM. U żadnego z wymienionych chorych nie obserwowano współistniejącej choroby autoimmunizacyjnej.

Tabela V. LoSSI, aktywność choroby, długość trwania choroby w grupie badanej

| | | Morfea | Podtypy morfeji | | | | |
|--------------------------------|----------------|--------------|-----------------|-------|------|-------|-----|
| | | | MEP | GM | LM | DM | +LS |
| Liczba chorych | n | 50 | 20 | 15 | 7 | 2 | 6 |
| | % | 100 | 40 | 30 | 14 | 4 | 12 |
| Długość trwania choroby | Średnia (lata) | 5,6 | 3,4 | 3,7 | 14,3 | 3,0 | 8,3 |
| | SD | 8,0 | 4,5 | 3,0 | 17,3 | 2,8 | 7,3 |
| LoSSI | Mediana | 9 | 4 | 14 | 10 | 38 | – |
| | Min.-max | 2–65 | 2–10 | 10–36 | 6–59 | 11–65 | – |
| Choroba aktywna/ nieaktywna | | 32/18 | 10/10 | 13/2 | 4/3 | 2/0 | 3/3 |

MEP – postać plackowata morfeji, GM – postać uogólniona morfeji, LM – postać linijna morfeji, DM – postać głęboka morfeji, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardziny, n – liczba chorych, SD – odchylenie standardowe, LoSSI – wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w morfeji wg Arkachaisriego i wsp. [14]. W grupie ze współistniejącymi wykwitami liszaja twardziny nie oceniano LoSSI – wyjaśnienie w tekście.

Tabela VI. LoSSI, aktywność choroby, długość trwania choroby w grupie chorych na morfeę, od których pobrano wycinki skóry

| | | Morfea | Podtypy morfeji | | | | |
|----------------------------|----------------|--------------|-----------------|-------|------|-------|-------|
| | | | MEP | GM | LM | DM | +LS |
| Liczba chorych | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 |
| | % | 100 | 36 | 31 | 17 | 6 | 11 |
| Długość trwania choroby | Średnia (lata) | 5 | 4,00 | 2,64 | 8,67 | 3,00 | 10,00 |
| | SD | 6,3 | 5,24 | 2,42 | 9,69 | 2,83 | 8,83 |
| LoSSI | Mediana | 10 | 5 | 13 | 12 | 38 | – |
| | Min.-max | 2–65 | 2–10 | 10–36 | 6–59 | 11–65 | – |
| Choroba aktywna/nieaktywna | | 24/12 | 8/5 | 9/2 | 3/3 | 2/0 | 2/2 |

MEP – postać plackowata morfeji, GM – postać uogólniona morfeji, LM – postać liniowa morfeji, DM – postać głęboka morfeji, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, n – liczba chorych, SD – odchylenie standardowe, LoSSI – wskaźnik rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w morfeji wg Arkachaisriego i wsp. [14]. W grupie ze współistniejącymi wykwitami liszaja twardzinowego nie oceniano LoSSI – wyjaśnienie w tekście.

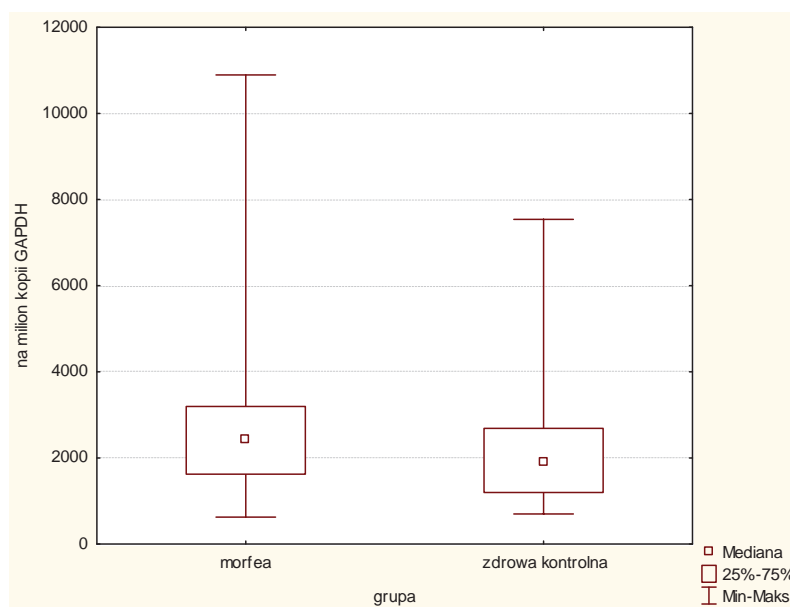
4.2. Ekspresja genu IL-17A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jej osoczowe stężenie oraz ekspresja jej genu w skórze chorych na morfeę

Uzyskane wartości ekspresji genu IL-17A w PBMC na milion kopii GAPDH, osoczowe stężenia IL-17A (pg/ml) oraz ekspresji jej genu w skórze na milion kopii GAPDH w całej grupie badanej oraz w poszczególnych podgrupach przedstawiono w tabeli VII. Z uwagi na nieparametryczny rozkład danych posłużono się medianą i wartościami minimalnymi i maksymalnymi. Wykazano istotnie wyższą ekspresję IL-17A w PBMC w całej grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p = 0,027$) (Rycina 3.). Nie wykazano znamiennej różnicy w osoczowym stężeniu badanej cytokiny w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej (Rycina 4.). Wykazano istotnie niższą ekspresję jej genu w skórze chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p = 0,027$) (Rycina 5.). Analizując podgrupy morfeji wykazano znamienne statystycznie różnice w poziomach ekspresji IL-17A w PBMC badanych chorych ($p = 0,02$) oraz w jej osoczowym stężeniu ($p = 0,007$), ale nie w poziomie ekspresji w skórze. Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy ekspresją IL-17A w skórze, a LoSSI ($p = -0,04$), ale nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją IL-17A w PBMC bądź jej osoczowym stężeniem a omawianym wskaźnikiem. Ani ekspresja IL-17A w PBMC czy skórze, ani osoczowe jej stężenie nie korelowały natomiast z aktywnością choroby i długością jej trwania.

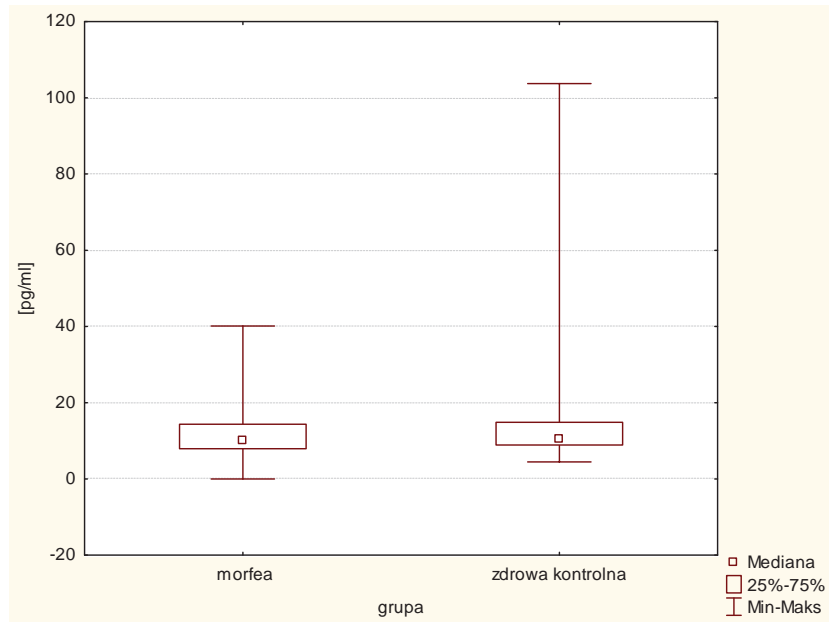
Tabela VII. Ekspresja genu IL-17A w PBMC, jej stężenie osoczowe i ekspresja w skórze w grupie badanej i kontrolnej

| | | Morfea | MEP | GM | LM | DM | +LS | Kontrola |
|--|---------|-----------|---------|-----------|---------|---------|---------|----------|
| Ekspresja w PBMC (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 2434,9 | 2922,9 | 2524,0 | 2434,9 | 4970,6 | 761,0 | 1906,0 |
| | Min. | 626,0 | 1161,3 | 1134,2 | 1524,0 | 3779,3 | 626,0 | 701,9 |
| | Max | 10895,5 | 10895,5 | 4706,0 | 3109,2 | 6161,9 | 4355,8 | 7540,1 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Stężenie osoczowe (pg/ml) | Mediana | 9,9 | 10,2 | 10,4 | 11,4 | 13,1 | 0,0 | 10,4 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 7,9 | 5,9 | 9,9 | 0,0 | 4,5 |
| | Max | 40,0 | 25,3 | 40,0 | 18,3 | 16,3 | 2,1 | 103,7 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Ekspresja w skórze (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 9224,7 | 12743,4 | 12811,2 | 6815,9 | 19102,7 | 10326,0 | 19112,9 |
| | Min. | 0,0 | 2148,8 | 0,0 | 2200,3 | 6118,1 | 4033,6 | 6907,1 |
| | Max | 2899083,0 | 79533,7 | 2899083,0 | 39256,2 | 32087,2 | 32606,1 | 223283,6 |
| | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 | 13 |

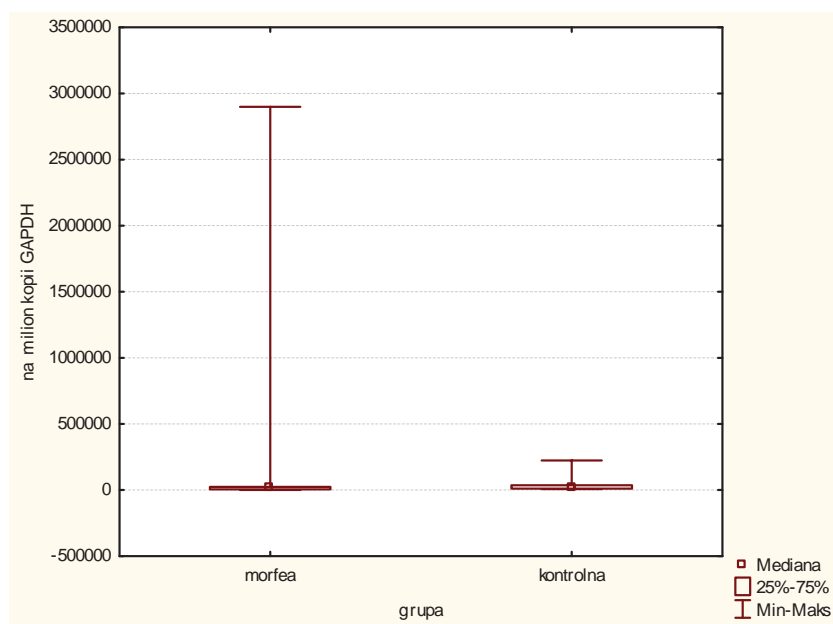
PBMC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, MEP – morfea plackowata, GM – morfea uogólniona, LM – morfea linijna, DM – morfea głęboka, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.



Rycina 3. Ekspresja genu IL-17A w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.



Rycina 4. Osoczowy poziom IL-17A w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.



Rycina 5. Ekspresja genu IL-17A w skórze w grupie badanej i kontrolnej.

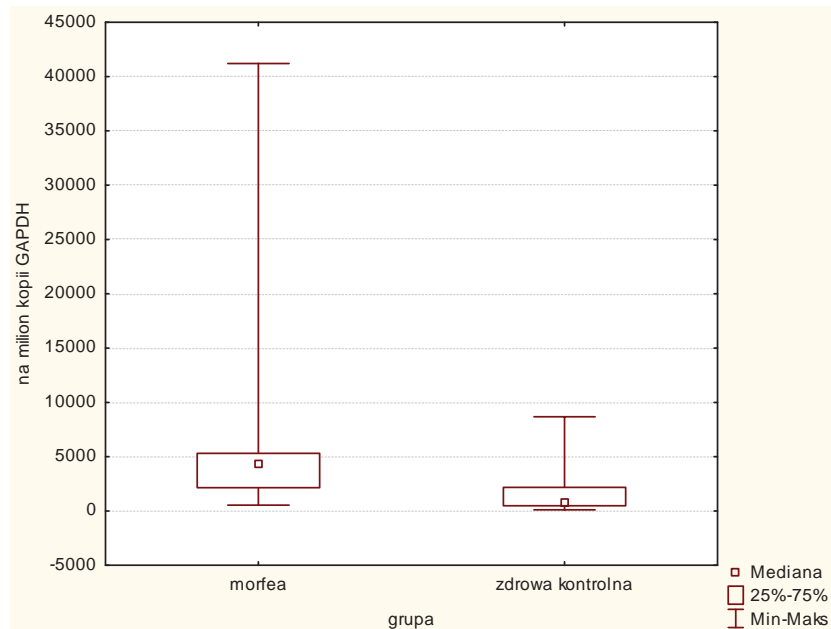
4.3. Ekspresja genu IL-23 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jej osoczowe stężenie oraz ekspresja jej genu w skórze chorych na morfeę

Uzyskane wartości ekspresji genu IL-23 w PBMC na milion kopii GAPDH, osoczowe stężenia IL-23 (pg/ml) oraz ekspresji jej genu w skórze na milion kopii GAPDH w całej grupie badanej oraz w poszczególnych podgrupach przedstawiono w tabeli VIII. Z uwagi na nieparametryczny rozkład danych posłużono się medianą i wartościami minimalnymi i maksymalnymi. Wykazano istotnie wyższą ekspresję IL-23 w PBMC w całej grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$) (Rycina 6.). Nie wykazano znamiennej różnicy w osoczowym stężeniu badanej cytokiny w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej ani w ekspresji jej genu w skórze chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej. Analizując podgrupy morfeji, nie wykazano znamienych statystycznie różnic, ani w poziomie ekspresji IL-23 w PBMC badanych chorych, ani w jej osoczowym stężeniu, ani w poziomie ekspresji w skórze. Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy osoczowym stężeniem IL-23 a LoSSI ($p = -0,04$), ale nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją IL-23 w PBMC czy skórze a omawianym wskaźnikiem. Na granicy istotności statystycznej prezentowała się korelacja pomiędzy ekspresją IL-23 w skórze a aktywnością choroby ($p = 0,05$). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją IL-23 w PBMC i osoczowym jej stężeniem a aktywnością choroby. Uzyskano natomiast korelację pomiędzy osoczowym stężeniem IL-23 a długością trwania choroby ($p = 0,01$), ale nie pomiędzy ekspresją IL-23 w PBMC czy skórze a omawianą zmienną.

Tabela VIII. Ekspresja genu IL-23 w PBMC, jej stężenie osoczowe i ekspresja w skórze w grupie badanej i kontrolnej

| | | Morfea | MEP | GM | LM | DM | +LS | Kontrola |
|--|---------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|----------|
| Ekspresja w PBMC (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 4347,6 | 4542,1 | 4680,5 | 3008,7 | 4687,9 | 2604,6 | 807,6 |
| | Min. | 535,8 | 1350,2 | 719,6 | 1005,2 | 4543,1 | 535,8 | 105,9 |
| | Max | 41201,9 | 10710,7 | 6843,0 | 5907,6 | 4832,8 | 41201,9 | 8682,2 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Stężenie osoczowe (pg/ml) | Mediana | 4,8 | 5,6 | 1,4 | 12,1 | 7,4 | 5,8 | 6,5 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 4,6 | 4,6 | 2,05 | 0,0 |
| | Max | 160,9 | 75,5 | 137,0 | 160,9 | 10,2 | 17,8 | 89,4 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Ekspresja w skórze (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 229,8 | 228,4 | 630,3 | 305,2 | 34,7 | 113,2 | 427,08 |
| | Min. | 0,0 | 42,0 | 31,9 | 9,2 | 3,1 | 0,0 | 7,9 |
| | Max | 97706,0 | 767,0 | 97706,0 | 516,5 | 66,2 | 428,6 | 926,9 |
| | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 | 13 |

PBMC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, MEP – morfea plackowata, GM – morfea uogólniona, LM – morfea linijna, DM – morfea głęboka, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.



Rycina 6. Ekspresja genu IL-23 w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.

4.4. Osoczowe stężenie IL-21 u chorych na morfeę

Badanie przeprowadzono w grupie 49 chorych na morfeę i u 37 osób zdrowych. Wartości osoczowego stężenia IL-21 wahały się od 0,0 do 409 pg/ml (mediana 0,0), przy wartościach uzyskanych w zdrowej grupie kontrolnej wynoszących odpowiednio: 0,0–49,9 pg/ml (mediana 0,0). Różnica nie była znamienne statystycznie. Nie obserwowano też istotnych statystycznie różnic w stężeniu tej cytokiny pomiędzy poszczególnymi podgrupami. Stwierdzono natomiast korelację z LoSSI ($p = 0,002$), ale nie z aktywnością czy długością trwania choroby.

4.5. Ekspresja genu IL-1 β w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jej osoczowe stężenie oraz ekspresja jej genu w skórze chorych na morfeę

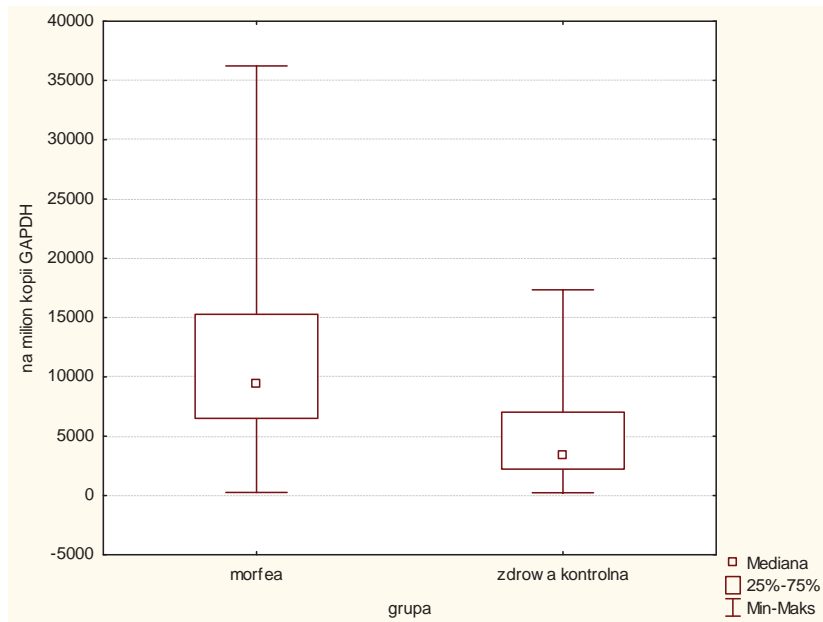
Uzyskane wartości ekspresji genu IL-1 β w PBMC na milion kopii GAPDH, osoczowego stężenia IL-1 β (pg/ml) oraz ekspresji jej genu w skórze na milion kopii GAPDH w całej grupie badanej oraz w poszczególnych podgrupach przedstawiono w tabeli IX. Z uwagi na nieparametryczny rozkład danych posłużono się medianą

i wartościami minimalnymi i maksymalnymi. Wykazano istotnie wyższą ekspresję IL-1 β w PBMC w całej grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$) (Rycina 7.), a także wyższe osoczowe stężenie IL-1 β ($p = 0,0005$) (Rycina 8.). Nie wykazano znamiennej różnicy w ekspresji jej genu w skórze chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej. Nie obserwowano też istotnych statystycznie różnic w ekspresji IL-1 β w PBMC, jej stężeniu osoczym i ekspresji w skórze pomiędzy poszczególnymi podgrupami. Nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją tej cytokiny w PBMC a LoSSI bądź aktywnością choroby, podobnie jak nie wykazano tych korelacji pomiędzy osoczym jej stężeniem i ekspresją w skórze a badanymi zmiennymi. Wykazano natomiast odwrotną korelację pomiędzy jej ekspresją w skórze a długością trwania choroby ($p = -0,02$), ale nie pomiędzy ekspresją IL-1 β w PBMC bądź jej osoczym stężeniem a badaną zmienną.

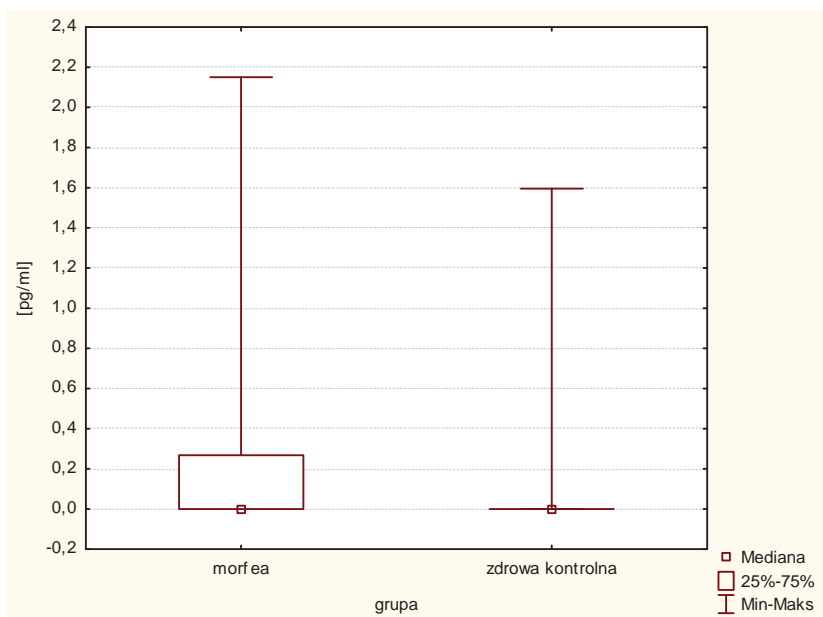
Tabela IX. Ekspresja genu IL-1 β w PBMC, jej stężenie osoczowe i ekspresja w skórze w grupie badanej i kontrolnej

| | | Morfea | MEP | GM | LM | DM | +LS | Kontrola |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| Ekspresja w PBMC (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 9345,0 | 9912,3 | 8010,9 | 8294,1 | 17326,5 | 8135,0 | 3441,7 |
| | Min. | 258,1 | 2695,7 | 3350,6 | 2445,4 | 5723,2 | 258,1 | 233,1 |
| | Max | 36229,5 | 33087,6 | 20891,0 | 36229,5 | 28929,8 | 11057,7 | 17348,2 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Stężenie osoczowe (pg/ml) | Mediana | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,4 | 0,5 | 0,0 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Max | 2,1 | 2,0 | 1,0 | 0,3 | 0,8 | 2,1 | 1,6 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Ekspresja w skórze (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 669,9 | 728,1 | 459,6 | 437,6 | 327,0 | 1238,2 | 2145,8 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 301,7 | 0,0 | 483,0 | 0,0 |
| | Max | 44050,0 | 5050,0 | 44050,0 | 1927,2 | 654,0 | 2309,1 | 18865,7 |
| | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 | 13 |

PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, MEP – morfea plackowata, GM – morfea uogólniona, LM – morfea linijna, DM – morfea głęboka, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.



Rycina 7. Ekspresja genu IL-1β w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.



Rycina 8. Osoczowe stężenie IL-1β w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.

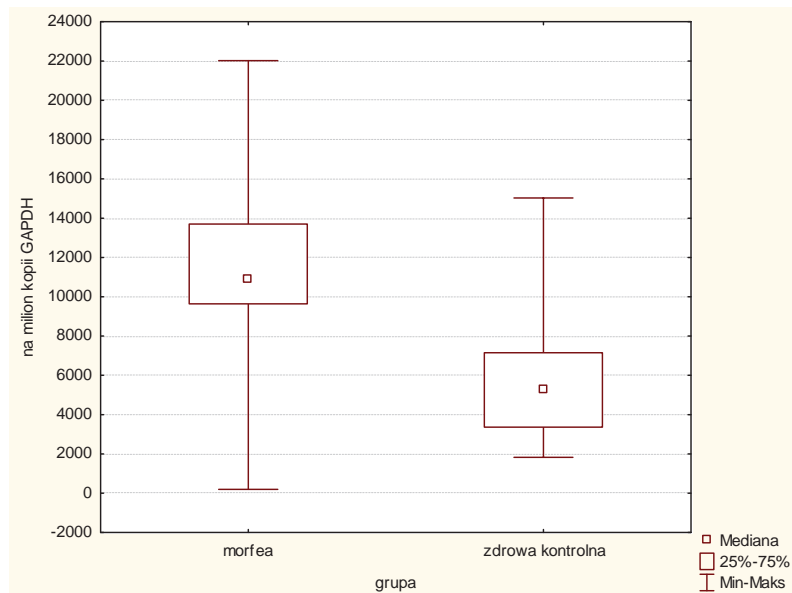
4.6. Ekspresja genu VEGF-A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze chorych na morfeę

Uzyskane wartości ekspresji genu VEGF-A w PBMC na milion kopii GAPDH oraz ekspresji jego genu w skórze na milion kopii GAPDH w całej grupie badanej oraz w poszczególnych podgrupach przedstawiono w tabeli X. Z uwagi na nieparametryczny rozkład danych posłużono się medianą i wartościami minimalnymi i maksymalnymi. Wykazano istotnie wyższą ekspresję VEGF-A w PBMC w całej grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$) (Rycina 9.) oraz istotnie niższą ekspresję jej genu w skórze chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej ($p = 0,000009$) (Rycina 10.). Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji VEGF-A w PBMC i w skórze pomiędzy poszczególnymi podgrupami. Zarówno ekspresja badanej cytokiny w PBMC, jak i w skórze nie wykazywała korelacji ze zmiennymi, takimi jak LoSSI, aktywność choroby, długość trwania choroby.

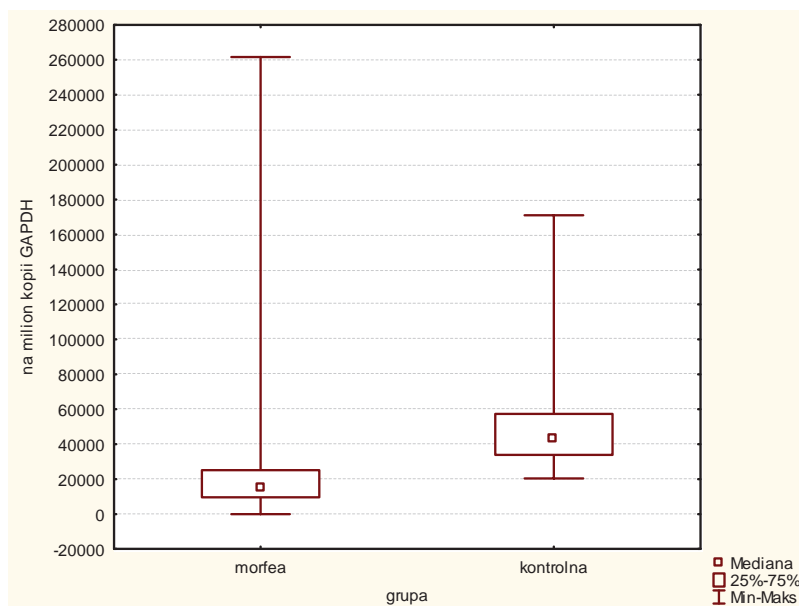
Tabela X. Ekspresja genu VEGF-A w PBMC i w skórze w grupie badanej i kontrolnej

| | | Morfea | MEP | GM | LM | DM | +LS | Kontrola |
|--|---------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|
| Ekspresja w PBMC (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 10910,4 | 11541,1 | 10296,7 | 10920,0 | 10776,5 | 11523,0 | 5257,9 |
| | Min. | 195,3 | 6082,9 | 5108,2 | 6031,3 | 10652,2 | 195,3 | 1825,9 |
| | Max | 22019,0 | 17789,8 | 17308,0 | 12868,0 | 10900,8 | 22012,0 | 15027,9 |
| | n | 48 | 20 | 13 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Ekspresja w skórze (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 15179,3 | 9889,5 | 17091,8 | 13691,7 | 10360,2 | 20369,7 | 42983,9 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 2488,6 | 2464,5 | 10253,2 | 12800,0 | 20350,9 |
| | Max | 261658,0 | 261658,0 | 37815,0 | 23347,1 | 10467,3 | 37922,1 | 171044,8 |
| | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 | 13 |

PBMC – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, MEP – morfea plackowata, GM – morfea uogólniona, LM – morfea linijna, DM – morfea głęboka, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.



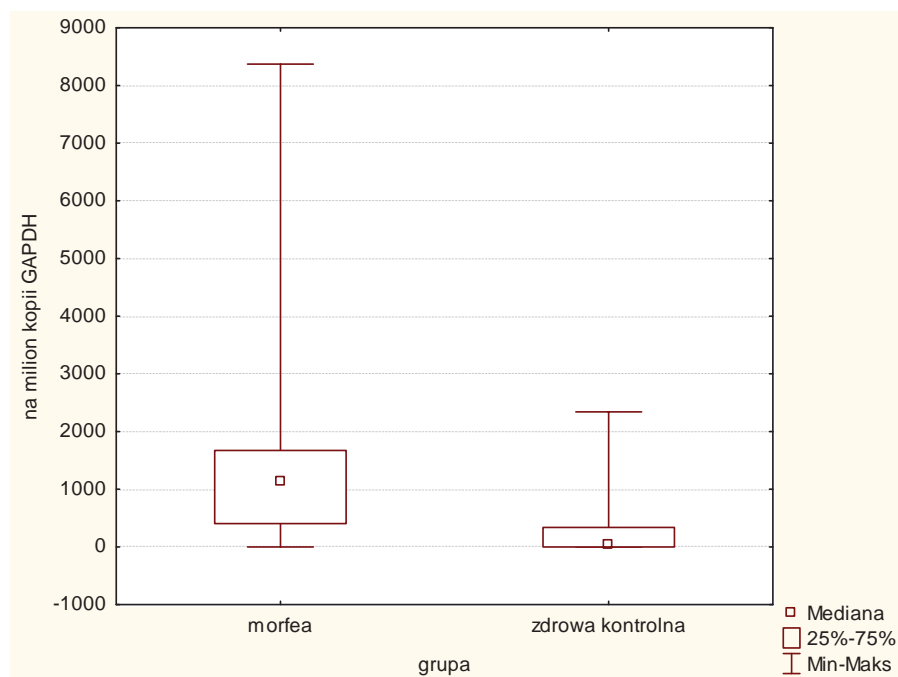
Rycina 9. Ekspresja genu VEGF-A w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.



Rycina 10. Ekspresja genu VEGF-A w skórze w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.

4.7. Ekspresja genu bFGF w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej chorych na morfeę

Uzyskane wartości ekspresji genu bFGF w PBMC na milion kopii GAPDH wahały się od 0,0 do 8372,0 pg/ml (mediana 1127,5), przy wartościach uzyskanych w zdrowej grupie kontrolnej wynoszących odpowiednio: 0,0–2342,4 pg/ml (mediana 40,8). Różnica ta była znamienna statystycznie ($p < 0,000005$) (Rycina 11.). Nie obserwowano natomiast istotnych statystycznie różnic w stężeniu tej cytokiny pomiędzy poszczególnymi podgrupami. Nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją tej cytokiny w PBMC a LoSSI czy aktywnością choroby. Wykazano natomiast korelację pomiędzy jej ekspresją w PBMC a długością trwania choroby ($p = 0,004$). Badanie przeprowadzono na grupie 49 chorych na morfeę i 47 zdrowych z grupy kontrolnej.



Rycina 11. Ekspresja genu bFGF w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.

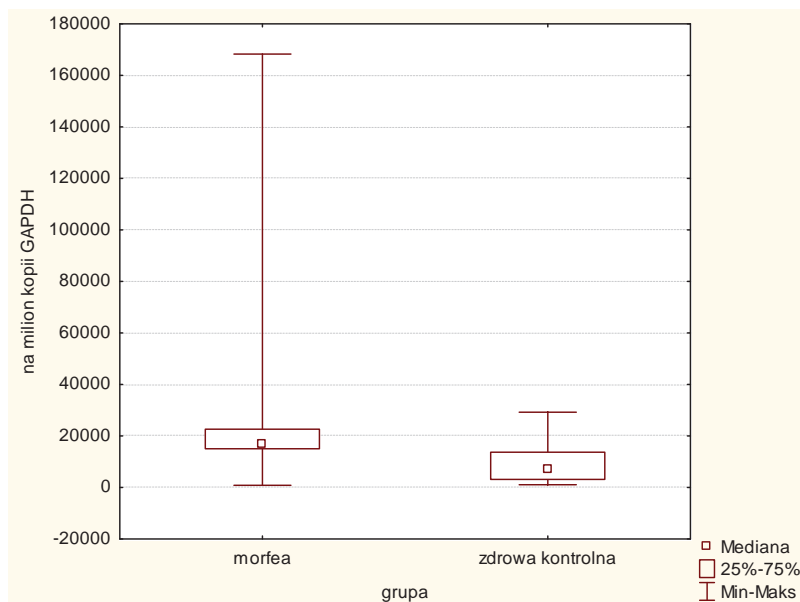
4.8. Ekspresja genu HGF w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze chorych na morfeę

Uzyskane wartości ekspresji genu HGF w PBMC na milion kopii GAPDH oraz ekspresji jego genu w skórze na milion kopii GAPDH w całej grupie badanej oraz w poszczególnych podgrupach przedstawiono w tabeli XI. Z uwagi na nieparametryczny rozkład danych posłużono się medianą i wartościami minimalnymi i maksymalnymi. Wykazano istotnie wyższą ekspresję HGF w PBMC w całej grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$) (Rycina 12.). Nie wykazano różnicy pomiędzy jego ekspresją w skórze chorych na morfeę a ekspresją w grupie kontrolnej. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji HGF w PBMC i w skórze pomiędzy poszczególnymi podgrupami. Wykazano odwrotną korelację pomiędzy ekspresją HGF w skórze a LoSSI ($p = -0,03$), ale nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją HGF w PBMC a LoSSI. Zarówno ekspresja badanej cytokiny w PBMC, jak i w skórze nie wykazywała korelacji ze zmiennymi, takimi jak aktywność choroby czy długość trwania choroby.

Tabela XI. Ekspresja genu HGF w PBMC i w skórze w grupie badanej, kontrolnej i podgrupach badanych

| | | Morfea | MEP | GM | LM | DM | +LS | Kontrola |
|--|---------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
| Ekspresja w PBMC (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 16993,5 | 17324,4 | 19885,5 | 16173,9 | 19391,9 | 15051,0 | 6836,2 |
| | Min. | 845,9 | 7188,9 | 7575,8 | 7232,4 | 16710,2 | 845,9 | 1038,9 |
| | Max | 168269,2 | 30599,1 | 36524,0 | 24609,7 | 22073,6 | 168269,2 | 29224,8 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Ekspresja w skórze (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 3088,3 | 3167,5 | 3689,6 | 1641,9 | 4335,2 | 2975,2 | 3634,33 |
| | Min. | 53,4 | 1011,2 | 53,4 | 674,6 | 2299,1 | 2160,0 | 1964,9 |
| | Max | 29128,8 | 18471,5 | 29128,0 | 3543,4 | 6371,3 | 3175,8 | 11194,0 |
| | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 | 13 |

PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, MEP – morfea plackowata, GM – morfea uogólniona, LM – morfea linijna, DM – morfea głęboka, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.



Rycina 12. Ekspresja genu HGF w PBMC w grupie badanej i w zdrowej grupie kontrolnej.

4.9. Ekspresja genu TGFβ1 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w skórze chorych na morfeę

Uzyskane wartości ekspresji genu TGFβ1 w PBMC na milion kopii GAPDH oraz ekspresji jego genu w skórze na milion kopii GAPDH w całej grupie badanej oraz w poszczególnych podgrupach przedstawiono w tabeli XII. Z uwagi na nieparametryczny rozkład danych posłużono się medianą i wartościami minimalnymi i maksymalnymi. Nie wykazano znamienych statystycznie różnic tak w zakresie ekspresji TGFβ1 w PBMC w całej grupie badanej, jak i w zakresie jego ekspresji w skórze w odniesieniu do odpowiednich grup kontrolnych. Nie obserwowano też istotnych statystycznie różnic w ekspresji TGFβ1 w PBMC i w skórze pomiędzy poszczególnymi podgrupami. Wykazano natomiast słabą odwrotną korelację pomiędzy ekspresją TGFβ1 w PBMC a LoSSI ($p = -0,047$), natomiast ekspresja TGFβ1 w skórze była wprost proporcjonalna do LoSSI ($p = 0,01$). Zarówno ekspresja badanej cytokiny w PBMC, jak i w skórze nie wykazywała korelacji ze zmiennymi, takimi jak aktywność choroby czy długość trwania choroby.

Tabela XII. Ekspresja genu TGF β 1 w PBMC i w skórze w grupie badanej, kontrolnej i podgrupach badanych

| | | Morfea | MEP | GM | LM | DM | +LS | Kontrola |
|--|---------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| Ekspresja w PBMC (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 221714,3 | 218673,9 | 219859,2 | 214869,0 | 297113,1 | 290197,0 | 217452,8 |
| | Min. | 32078,8 | 136538,5 | 138095,2 | 201600,0 | 206266,3 | 32078,8 | 108746,4 |
| | Max | 706730,8 | 574074,1 | 344771,0 | 259007,8 | 387959,9 | 706730,8 | 513292,4 |
| | n | 49 | 20 | 14 | 7 | 2 | 6 | 47 |
| Ekspresja w skórze (na milion kopii GAPDH) | Mediana | 26781,3 | 29502,8 | 27480,9 | 21324,3 | 28336,1 | 32336,4 | 32089,6 |
| | Min. | 9526,1 | 10066,9 | 12283,1 | 9526,1 | 21651,1 | 15272,7 | 19469,0 |
| | Max | 7339450,0 | 77760,0 | 7339450,0 | 28615,7 | 35021,1 | 54117,6 | 83283,6 |
| | n | 36 | 13 | 11 | 6 | 2 | 4 | 13 |

PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, MEP – morfea plackowata, GM – morfea uogólniona, LM – morfea linijna, DM – morfea głęboka, +LS – morfea ze współistniejącymi ogniskami liszaja twardzinowego, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.

4.10. Zależności pomiędzy IL-17A a wybranymi cytokinami mającymi potencjalny wpływ na polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th17 u chorych na morfeę

Zmienne poddane analizie z wykorzystaniem korelacji porządku rang Spearmana: ekspresja IL-17A w PBMC, osoczowe stężenie IL-17A, ekspresja IL-17A w skórze, ekspresja IL-23 w PBMC, osoczowe stężenie IL-23, ekspresja IL-23 w skórze, osoczowe stężenie IL-21, ekspresja IL-1 β w PBMC, osoczowe stężenie IL-1 β , ekspresja IL-1 β w skórze, ekspresja TGF β 1 w PBMC, ekspresja TGF β 1 w skórze. Wykazano odwrotną korelację pomiędzy osoczowym stężeniem IL-17A a ekspresją IL-1 β w PBMC ($p = -0,03$), pomiędzy osoczowym stężeniem IL-17A a ekspresją IL-1 β w skórze ($p = -0,007$) oraz pomiędzy ekspresją IL-17A i ekspresją IL-1 β w skórze ($p = -0,04$). Z drugiej strony wykazano korelację pomiędzy ekspresją IL-17A w skórze a ekspresją IL-1 β w PBMC ($p = 0,02$) oraz odwrotną korelację pomiędzy ekspresją IL-1 β w PBMC i skórze ($p = -0,01$). Ekspresja IL-17A w PBMC korelowała z osoczowym stężeniem IL-23 ($p = 0,03$) i ekspresją IL-23 w skórze ($p=0,02$). Ekspresja IL-23 w skórze była z kolei odwrotnie proporcjonalna do ekspresji w niej IL-17A ($p = -0,03$). Osoczowe stężenie IL-23 korelowało również z ekspresją TGF β 1 w PBMC ($p = 0,046$), ekspresja IL-23 w skórze, wykazywała dodatkowo korelację z osoczowym stężeniem IL-1 β ($p = 0,01$) oraz z ekspresją tej ostatniej w skórze ($p = 0,046$). Ekspresja IL-23 w PBMC korelowała z osoczowym stężeniem IL-21 ($p = 0,02$). Wykazano też odwrotną korelację pomiędzy ekspresją IL-23 w PBMC a ekspresją IL-1 β w skórze ($p = -0,0004$).

4.11. Zależności pomiędzy IL-17A a wybranymi cytokinami proangiogennymi i związanymi z procesem włóknienia

Analiza zależności pomiędzy IL-17A a wybranymi cytokinami proangiogennymi i związanymi z procesem włóknienia: VEGF-A, HGF, bFGF i TGF β 1 wykazała jedynie korelację pomiędzy ekspresją TGF β 1 w PBMC a ekspresją HGF w skórze ($p = 0,02$) oraz ujemne korelacje pomiędzy ekspresją TGF β 1 w PBMC a ekspresją VEGF-A w skórze ($p = -0,03$) oraz pomiędzy ekspresją IL-17A w PBMC a ekspresją VEGF-A w skórze ($p = -0,047$). Ekspresja TGF β 1 w PBMC korelowała również z ekspresją IL-17A w skórze ($p = 0,008$). Dodatkowo wykazano korelację pomiędzy osoczymym stężeniem IL-1 β a ekspresją HGF w PBMC ($p = 0,03$) oraz pomiędzy osoczymym stężeniem IL-21 a ekspresją HGF w skórze ($p = 0,048$). Ujemną korelację zaobserwowano pomiędzy osoczymym stężeniem IL-23 a ekspresją bFGF w PBMC ($p = -0,04$).

4.12. Ocena zależności pomiędzy mianem przeciwciał przeciwjądrowych a wybranymi danymi laboratoryjnymi i klinicznymi

ANA, badane techniką immunofluorescencji pośredniej na komórkach nowotworowych raka krtani HEp-2 i wątroby szczura w mianie $\geq 1/80$, wykryto u 39 z 50 chorych na morfeę (78%), a w mianie $\geq 1/160$ u 24 z 50 (48%) (Tabela XIII). W MEP obserwowano je odpowiednio u 80 i 50% badanych, w GM u 78,6 i 35,7%, w LM u 85,7 i 71,4%, w DM w 100% i w grupie chorych na morfeę ze współistniejącymi wykwitami LS w 57,1 i 28,6% badanych. U jednej chorej, u której obserwowano pojedyncze ognisko MEP zlokalizowane na skórze przedniej powierzchni klatki piersiowej, a które pojawiło się na rok przed wykonywanymi badaniami, stwierdzono miano ANA 1/2560. Dokładna ich charakterystyka ujawniła przeciwciała przeciwko Scl-70. U chorej obserwowano również objaw Raynauda, ale nie stwierdzono innych wykładników SSc zgodnych z kryteriami ACR. U kolejnej chorej na LM stwierdzono krążące ANA w mianie 1/1280, a ich identyfikacja wykazała przeciwciała przeciwko SS-A i SS-B. Nie stwierdzano żadnych wykładników współistniejącej choroby autoimmunizacyjnej. U pozostałych dwóch chorych, u których intensywność wybarwienia prążków w teście opartym na metodzie immunoblotingu była już zdecydowanie słabsza niż w powyżej opisanych przypadkach, zidentyfikowano: u pierwszej osoby przeciwciała przeciwko SS-B, SS-A, Jo-1, histonom (miano ANA 1/320, rozpoznanie: MEP), u drugiej przeciwciała przeciwko AMA-M2 i PCNA (miano ANA 1/320, rozpoznanie DM). Także u tych osób nie obserwowano innych cech choroby autoimmunizacyjnej, niż te rozpoznane jako objawy morfeii. Chorzy pozostają w obserwacji Poradni Przyklinicznej Katedry i Kliniki Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Analiza statystyczna nie ujawniła znamiennych zależności pomiędzy mianem ANA a ekspresją genów badanych cytokin w PBMC, ich stężeniem osoczkowym czy ekspresją w skórze. Podobnie jak nie wykazano istotności przy ocenie zależności pomiędzy mianem ANA a LoSSI, długością trwania choroby czy jej aktywnością.

Tabela XIII. ANA u chorych na morfeę

| Miano ANA | Morfea (n = 50) | MEP (n = 20) | GM (n = 14) | LM (n = 7) | DM (n = 2) | M+LS (n = 7) |
|-----------|-----------------|--------------|-------------|------------|------------|--------------|
| 0 | 11 | 4 | 3 | 1 | 0 | 3 |
| 1/80 | 15 | 6 | 6 | 1 | 0 | 2 |
| 1/160 | 9 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 1/320 | 7 | 5 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 1/640 | 4 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| 1/1280 | 3 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 1/2560 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ANA – przeciwciała przeciwnajdrowe, MEP – morfea plackowata, GM – morfea uogólniona, LM – morfea linijna, DM – morfea głęboka, M+LS – morfea ze współistniejącymi wykwitami liszaja twardzinowego, n – liczba badanych

4.13. Ocena ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , VEGF-A, bFGF, HGF i TGF β 1 oraz stężenia osoczkowego IL-17A, IL-21, IL-23 i IL-1 β u chorych na morfeę w porównaniu z chorymi na postać ograniczoną twardziny układowej

Uzyskane wartości ekspresji genów poszczególnych badanych cytokin w PBMC na milion kopii GAPDH i ich osoczkowego stężenia w grupie chorych na morfeę, ISSc i w grupie kontrolnej przedstawiono w tabelach XIV i XV. Z uwagi na nieparametryczny rozkład danych posłużono się medianą i wartościami minimalnymi i maksymalnymi. Analiza statystyczna danych uzyskanych od chorych na ISSc w odniesieniu do zdrowej grupy kontrolnej wykazała: istotnie niższą ekspresję IL-17A w PBMC oraz jej osoczkowe stężenie w grupie ISSc (odpowiednio: $p = 0,00001$ i $p = 0,005$) (Ryciny 13. i 14.); istotnie wyższą ekspresję IL-23 w PBMC ISSc ($p = 0,009$) (Rycina 15.), ale brak różnicy w odniesieniu do jej stężenia osoczkowego; istotnie wyższą ekspresję IL-1 β w PBMC oraz jej osoczkowe stężenie w grupie ISSc (odpowiednio: $p = 0,005$ i $p = 0,000004$) (Ryciny 16. i 17.); istotnie wyższe osoczkowe stężenie IL-21 w grupie ISSc ($p = 0,0003$) (Rycina 18.); istotnie wyższą ekspresję VEGF-A, HGF i bFGF w PBMC w grupie ISSc (odpowiednio: $p = 0,00004$, $p = 0,0003$ i $p = 0,00001$) (Ryciny 19., 20., 21.). Nie stwierdzono znamiennych różnic w poziomach ekspresji TGF β 1 w PBMC chorych na ISSc i zdrowej grupy kontrolnej.

Tabela XIV. Ekspresja genów poszczególnych cytokin w PBMC na milion kopii GAPDH w grupie chorych na morfeę, ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej

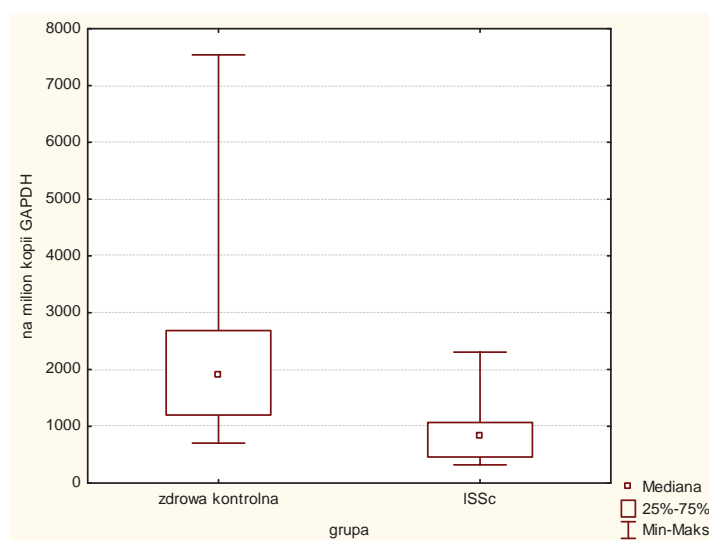
| | | Morfea | ISSc | Kontrola |
|---------------|---------|----------|----------|----------|
| IL-17A | Mediana | 2434,9 | 819,6 | 1906,0 |
| | Min. | 626,0 | 321,9 | 701,9 |
| | Max | 10895,5 | 2306,3 | 7540,1 |
| | n | 49 | 15 | 47 |
| IL-23 | Mediana | 4347,6 | 2135,9 | 807,6 |
| | Min. | 535,8 | 530,7 | 105,9 |
| | Max | 41201,9 | 5764,3 | 8682,2 |
| | n | 49 | 15 | 47 |
| IL-1 β | Mediana | 9345,0 | 8267,3 | 3441,7 |
| | Min. | 258,1 | 2418,8 | 233,1 |
| | Max | 36229,5 | 13350,5 | 17348,2 |
| | n | 49 | 15 | 47 |
| VEGF-A | Mediana | 10910,4 | 9441,7 | 5257,9 |
| | Min. | 195,3 | 4386,3 | 1825,9 |
| | Max | 22019,0 | 15258,6 | 15027,9 |
| | n | 48 | 15 | 47 |
| bFGF | Mediana | 1127,5 | 948,1 | 40,8 |
| | Min. | 0,0 | 96,8 | 0,0 |
| | Max | 8372,0 | 4359,0 | 2342,4 |
| | n | 49 | 15 | 47 |
| HGF | Mediana | 16993,5 | 15151,5 | 6836,2 |
| | Min. | 845,9 | 5956,7 | 1038,9 |
| | Max | 168269,2 | 32642,9 | 29224,8 |
| | n | 49 | 15 | 47 |
| TGF β 1 | Mediana | 221714,3 | 280519,5 | 217452,8 |
| | Min. | 32078,8 | 132489,5 | 108746,4 |
| | Max | 706730,8 | 390086,2 | 513292,4 |
| | n | 49 | 15 | 47 |

ISSc – postać ograniczona twardziny układowej, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.

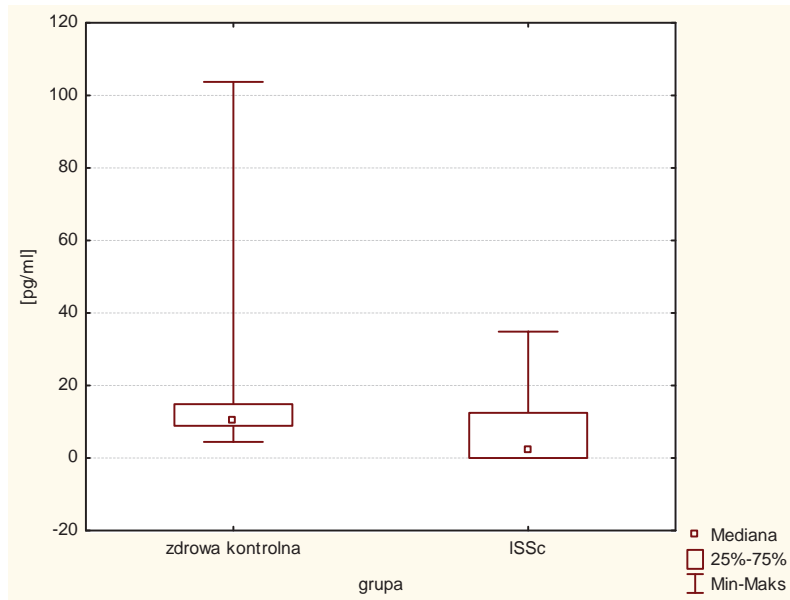
Tabela XV. Osoczowe stężenie (pg/ml) poszczególnych cytokin w grupie chorych na morfeę, ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej

| | | Morfea | ISSc | Kontrola |
|--------------|---------|--------|-------|----------|
| IL-17A | Mediana | 9,9 | 2,1 | 10,4 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 4,5 |
| | Max | 40,0 | 34,9 | 103,7 |
| | n | 49 | 14 | 47 |
| IL-23 | Mediana | 4,8 | 5,5 | 6,5 |
| | Min. | 0,0 | 0,7 | 0,0 |
| | Max | 160,9 | 36,9 | 89,4 |
| | n | 49 | 14 | 47 |
| IL-21 | Mediana | 0,0 | 39,0 | 0,0 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Max | 409,0 | 798,5 | 49,9 |
| | n | 49 | 14 | 37 |
| IL-1 β | Mediana | 0,0 | 0,4 | 0,0 |
| | Min. | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | Max | 2,1 | 3,1 | 1,6 |
| | n | 49 | 14 | 47 |

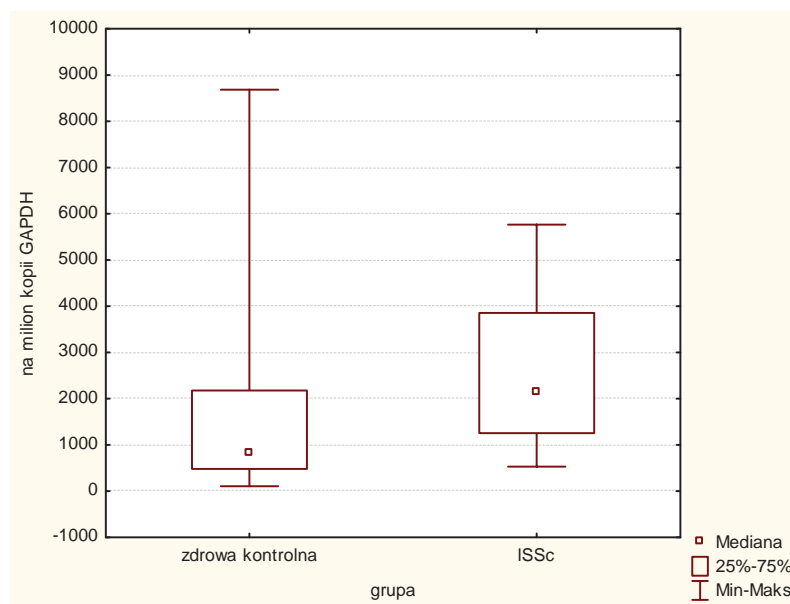
ISSc – postać ograniczona twardziny układowej, Min. – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, n – liczebność grupy. Opis tabeli zawarto w tekście.



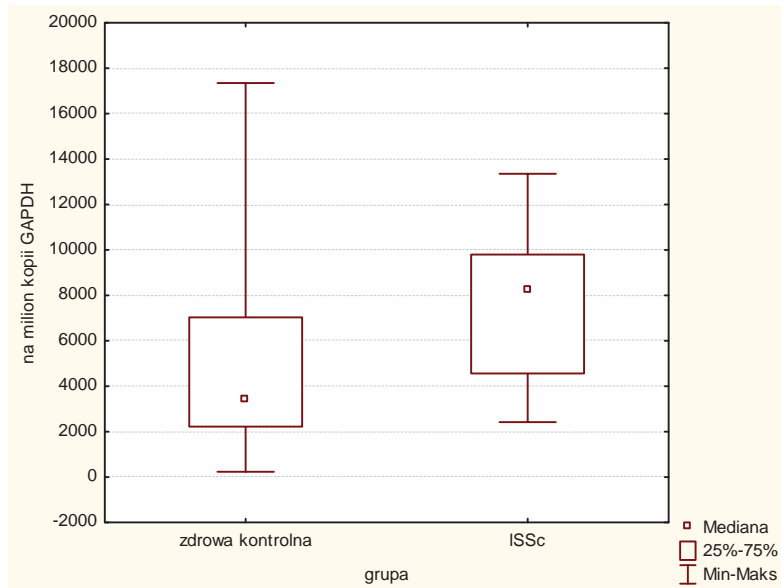
Rycina 13. Ekspresja genu IL-17 w PBMC w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.



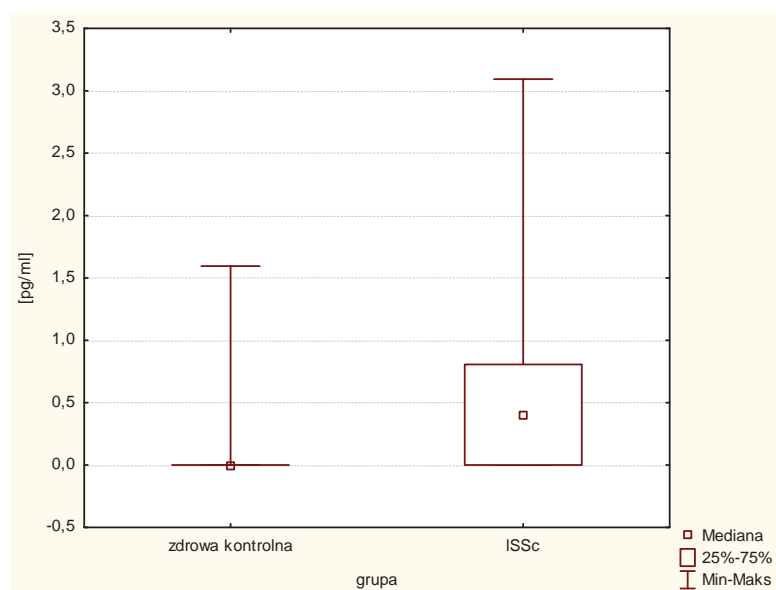
Rycina 14. Osoczowe stężenie IL-17A w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.



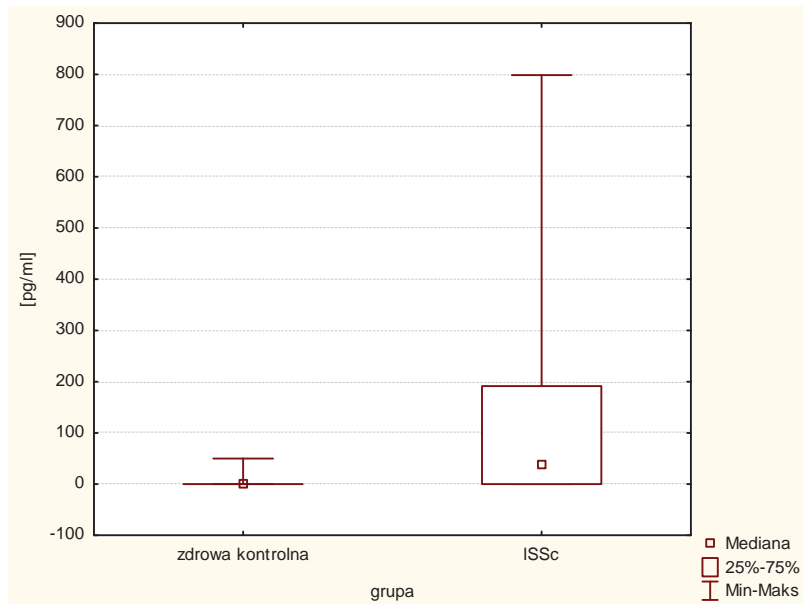
Rycina 15. Ekspresja genu IL-23 w PBMC w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.



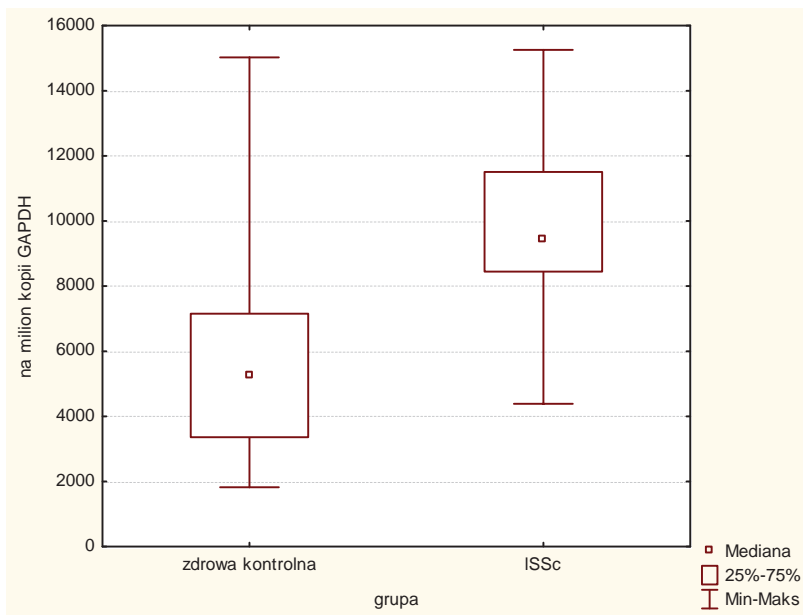
Rycina 16. Ekspresja genu IL-1 β w PBMC w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.



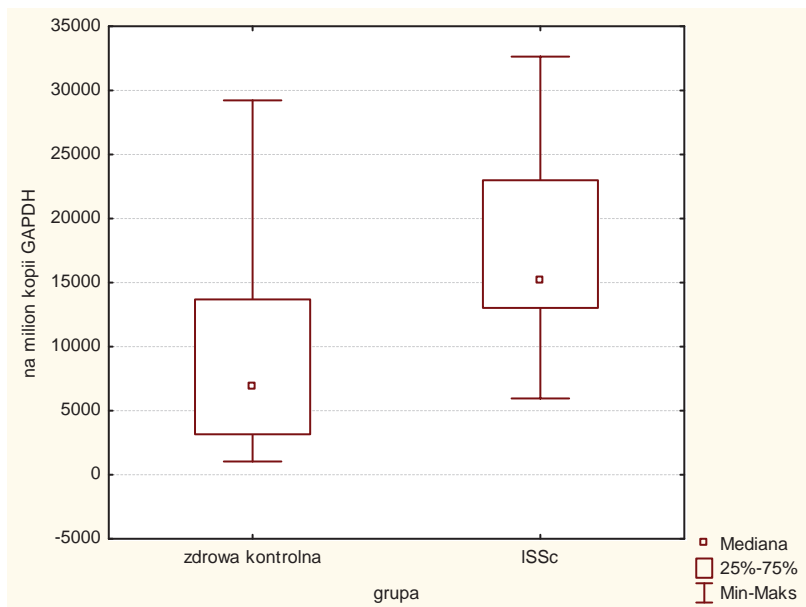
Rycina 17. Osoczowe stężenie IL-1 β w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.



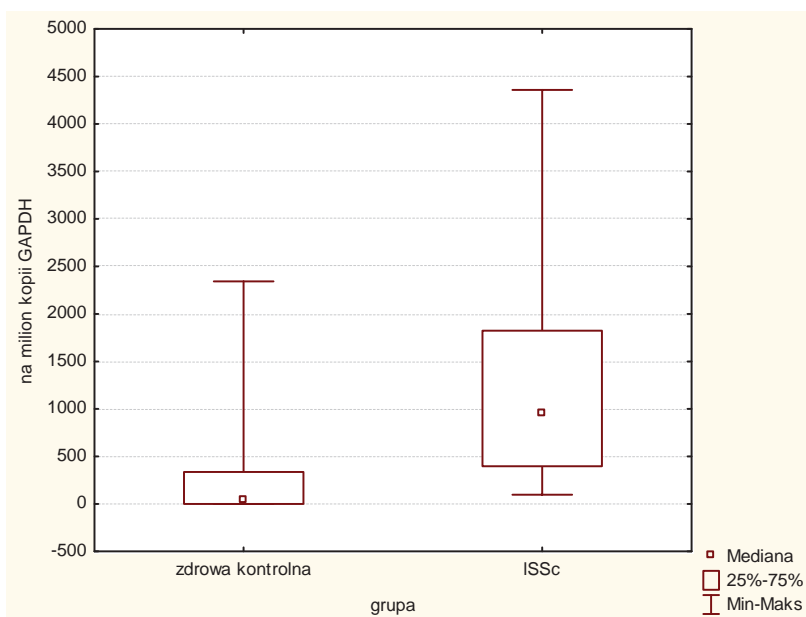
Rycina 18. Osoczowe stężenie IL-21 w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.



Rycina 19. Ekspresja genu VEGF-A w PBMC w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.

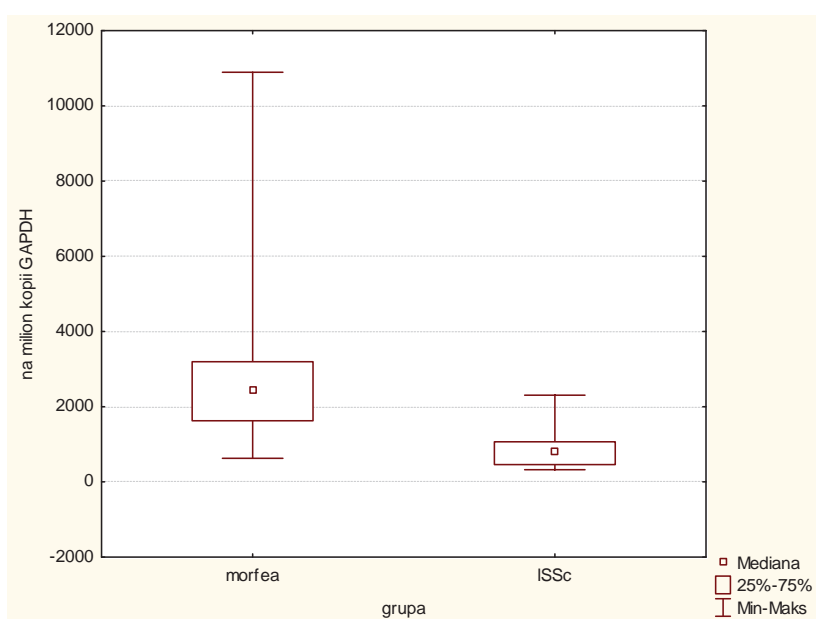


Rycina 20. Ekspresja genu HGF w PBMC w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.

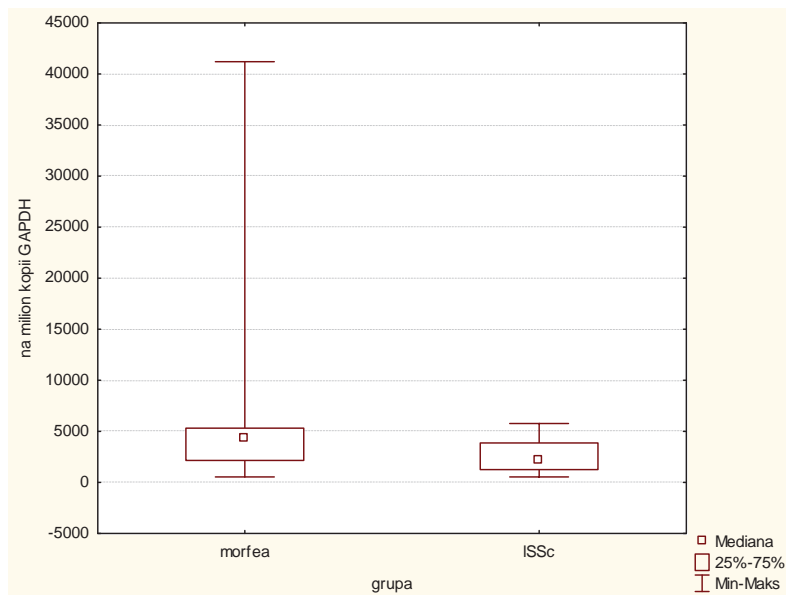


Rycina 21. Ekspresja genu bFGF w PBMC w grupie chorych na ISSc i w zdrowej grupie kontrolnej.

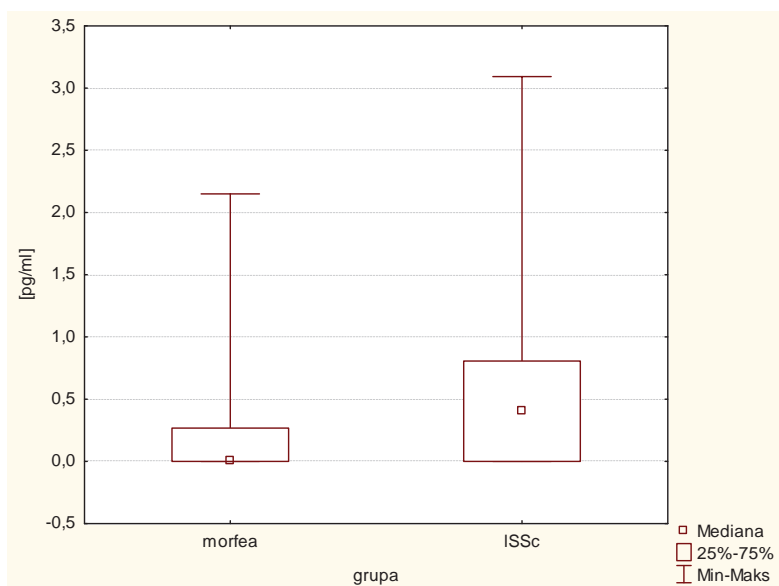
Analiza statystyczna danych uzyskanych od chorych na ISSc w odniesieniu do chorych na morfeę wykazała: istotnie niższą ekspresję IL-17A w PBMC w grupie ISSc ($p = 0,000001$) (Rycina 22.) i niższe jej stężenie osoczowe, choć zależność ta pozostawała na granicy istotności statystycznej ($p = 0,05$); istotnie niższą ekspresję IL-23 w PBMC ISSc ($p = 0,02$) (Rycina 23.), ale brak różnicy w jej stężeniu osoczym pomiędzy oboma badanymi grupami; istotnie wyższe osoczowe stężenie IL-1 β i IL-21 w grupie ISSc (odpowiednio $p = 0,03$ i $p = 0,0009$) (Ryciny 24. i 25.). Nie stwierdzono znamiennej różnic w poziomach ekspresji IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF w PBMC chorych na ISSc i chorych na morfeę.



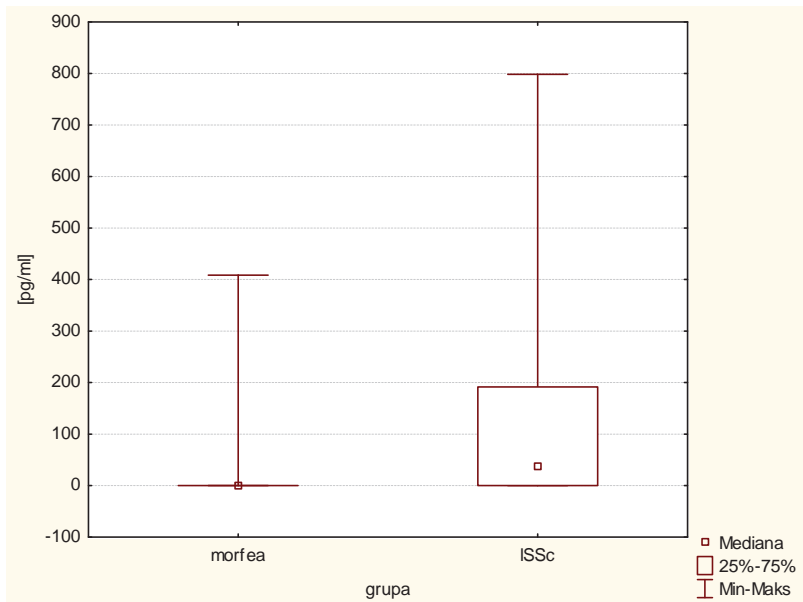
Rycina 22. Ekspresja genu IL-17A w PBMC w grupie chorych na ISSc i w grupie chorych na morfeę.



Rycina 23. Ekspresja genu IL-23 w PBMC w grupie chorych na ISSc i w grupie chorych na morfeę.



Rycina 24. Osoczowe stężenie IL-1 β w grupie chorych na ISSc i w grupie chorych na morfeę.



Rycina 25. Osoczowe stężenie IL-21 w grupie chorych na ISSc i w grupie chorych na morfeę.

5. Dyskusja

5.1. Wybrane cytokiny odpowiedzi Th17 w morfeji

W ostatnich latach znaczenie Th17 sugerowano w wielu chorobach autoimmunizacyjnych u ludzi, m.in. w: stwardnieniu rozsianym, łuszczycy, reumatoidalnym zapaleniu stawów, cukrzycy typu I, autoimmunizacyjnym zapaleniu naczyń, zapaleniu tarczycy typu Hashimoto, autoimmunizacyjnym zapaleniu wątroby, małopłytkowości o podłożu autoimmunizacyjnym, zapalnych chorobach jelit, seronegatywnych spondyloartropatiach, SLE, SSc [10, 91, 101, 154, 192, 196, 230, 242, 256]. Myszy pozbawione IL-17 rozwijają jedynie słabe objawy doświadczalnie wzbudzanego zapalenia stawów, a pełnoobjawową chorobę znoszą przeciwciała przeciwko IL-17R [224]. Objawy eksperymentalnie wzbudzanego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego są łagodzone lub znoszone przez podanie przeciwciał przeciwko IL-17, rozpuszczalnego IL-17R lub neutralizację osteopontyny [224]. Blokowanie IL-17R w mysim modelu zapalenia jelita grubego znacząco osłabiało migrację neutrofilów do ogniska [320]. Dokładny mechanizm zależności chorób autoimmunizacyjnych od limfocytów Th17 nie jest jednak do końca jasny. Ostatnio wykazano, że zarówno eksperymentalnie wzbudzone zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, jak i doświadczalne zapalenie siatkówki mogą być mediowane zarówno przez limfocyty Th17, jak i Th1 [150, 204]. W kontekście wcześniej omawianych odmienności międzygatunkowych należy jednak mieć na uwadze ograniczoną przydatność zwierzęcych modeli chorób do badania ich zależności od Th17 u ludzi.

Jak już wspomniano, głównymi cytokinami wzbudzającymi i wzmacniającymi odpowiedź Th17 u ludzi mają być IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23. Szczególnie istotna ma być IL-23, która u ludzi (w odróżnieniu od myszy, gdzie ma jedynie podtrzymywać zainicjowaną wcześniej syntezę IL-17) pobudza również prekursorów limfocytów Th17. Wykazano bowiem, że na powierzchni tych ostatnich obecne są IL-23R [7, 55]. Rola TGF β jest mniej jasna [5, 43, 250]. Do tej pory nie badano IL-17, -21 i -23 w grupie chorych na morfeję, a istnieją jedynie pojedyncze doniesienia o podwyższonym surowiczym stężeniu IL-1 [9].

W prezentowanych badaniach podjęto się oceny ekspresji genu IL-17A oraz wybranych, związanych z nią cytokin w PBMC chorych na morfeję, a także osoczowego stężenia tych białek i ekspresji ich genu w skórze zmienionej. Wykazano istotnie wyższą ekspresję IL-17A w PBMC chorych na morfeję ($p = 0,027$), ale nie wykazano zwiększonej ilości produktu tego genu w osoczu tych chorych. Co więcej obserwowano jednocześnie znamienne niższą ekspresję genu IL-17A w skórze zmienionej w porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,027$). Nie stwier-

dzono jednak zależności pomiędzy badanymi zmiennymi. Wyniki te dowodzą zaangażowania IL-17A w patomechanizm tej grupy chorób. Wykazano też istotne statystycznie różnice w poziomach ekspresji badanej cytokiny w PBMC i jej osoczowego stężenia w poszczególnych badanych podgrupach morfeii. Obserwowano odwrotną korelację pomiędzy ekspresją IL-17A w skórze a LoSSI ($p = -0,04$), co może sugerować, że IL-17A działa głównie lokalnie i ma raczej ochronne niż destrukcyjne znaczenie w patogenezie morfeii. Odmiennie wyniki uzyskano na przykład w różnych odmianach tocznia, w których stwierdzono zwiększoną liczbę komórek IL-17A+ i IL-17F+, zarówno zresztą w obrębie skóry zmienionej, jak i niezmienionej [272]. Być może warto byłoby zatem ocenić ekspresję IL-17A także w skórze zdrowej, otaczającej ogniska morfeii. Co wydaje się jednak ciekawe i znamienne, nie wykazano zależności pomiędzy ekspresją genu badanej cytokiny w PBMC, skórze czy jej osoczowym stężeniu a aktywnością procesu oraz, co już wspomniano, długością trwania choroby. Nie stwierdzono też zależności pomiędzy tą ostatnią zmienną a LoSSI. Można zatem domniemywać, że IL-17A nie odgrywa szczególnej roli w początkowych, zapalnych fazach choroby. Pozostawałoby to w zgodzie z wynikami badań, według których glikokortykosteroidy, pomimo swojego znanego potencjału przeciwzapalnego, nie wpływają na ekspresję genów czy surowicze stężenie IL-17 bądź 23 [154, 196, 283]. Dla kontrastu sugerowano, że w SSc limfocyty Th17 mają znaczenie głównie w początkowych stadiach choroby [81, 145, 154, 203]. Należy podkreślić, że pozostaje aspekt, który nie został poddany analizie w prezentowanym badaniu, a jest to poziom ekspresji receptorów, które są oczywistym, istotnym elementem w odpowiedzi komórek na cytokiny. Namysł, który nie wykazał zwiększonej ekspresji IL-17 w PBMC chorych na SSc, obserwował zwiększoną ekspresję jej receptora w tych komórkach [212]. Z kolei Nakashima i wsp. [209] stwierdzili obniżoną ekspresję IL-17R w hodowli fibroblastów SSc.

Interleukina-23, wytwarzana przez komórki dendrytyczne i makrofagi, jest heterodimerem zbudowanym z podjednostek p19 i p40. Podjednostki te kodowane są przez geny zlokalizowane odpowiednio na chromosomach 12 i 11. Podjednostka p40 występuje również w IL-12, natomiast podjednostka p19 ma sekwencje homologiczne do IL-6, G-CSF i podjednostki p35 IL-12 [55, 88]. Wykazano, że myszy pozbawione podjednostki p40 wykazywały łagodne objawy choroby autoimmunizacyjnej, natomiast pełen obraz choroby rozwijały te pozbawione podjednostki p35, co sugeruje, że to IL-23, a nie IL-12 odgrywa istotniejszą rolę w patomechanizmie chorób autoimmunizacyjnych. Blokowanie IL-23 skutkowało zmniejszeniem produkcji IL-17 i IL-6 i hamowało rozwój doświadczalnie wzbudzanego zapalenia jelita grubego u myszy [313]. Jednocześnie dowiedziono skuteczności przeciwciał przeciwko podjednostce p40 w leczeniu choroby Crohna, w stwardnieniu rozsianym i łuszczycy [228, 284]. Sugeruje się, że poza wymienionymi powyżej, IL-23 zaangażowana jest także w patogenezę reumatoidal-

nego zapalenia stawów, choroby trzewnej, alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, SLE, SSc [6, 55, 145, 196, 242, 272]. Co ciekawe, Mok i wsp., którzy nie wykazali podwyższonego surowiczego stężenia tej cytokiny u chorych na SLE, stwierdzili jednocześnie znamienne wyższe jej wartości w grupie ze współistniejącymi zmianami skórными [196]. W szczególnych postaciach SSc (z krążącymi przeciwciałami przeciwko Scl-70) oraz w zapalnych chorobach jelit i w łuszczycy wykazano związek z polimorfizmem genu IL-23R [6]. Pobudzenie IL-23R wzmacnia syntezę IL-1 β , TNF α i IL-17 [55]. Potencjalne znaczenie IL-23 w chorobach przebiegających z włóknieniem podkreśla fakt, że *in vitro* transkrypcja podjednostki p40 hamowana jest przez IL-10, która powszechnie postrzegana jest jako cytokina antyfibrotyczna [321]. Ale chociaż IL-23 wydaje się być, zwłaszcza u ludzi, główną cytokiną stymulującą odpowiedź Th17 [7, 55], to nie zawsze jej patogeny wpływ wynikać ma wyłącznie z wzbudzenia syntezy IL-17. Sugeruje się na przykład, że indukcja akantozy w łuszczycy przez IL-23 mediowana jest raczej przez TNF α , a nie IL-17 [284]. Z kolei makrofagi jelitowe CD14+ w chorobie Crohna stymulowane IL-23 produkują IFN γ [133]. Kolejnym mechanizmem, który może nie być związany z działaniem IL-23 mediowanym przez IL-17, jest hamowanie różnicowania się limfocytów T reg. Wykazano bowiem, że blokowanie IL-23 powoduje zwiększenie liczby limfocytów T reg w jelicie w przebiegu chorób zapalnych [204].

W prezentowanych badaniach ekspresja genu IL-23 w PBMC u chorych na morfeę była istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej ($p < 0,000005$). Nie wykazano jednak różnicy w osoczym stężeniu i ekspresji jej genu w skórze w porównaniu do grup kontrolnych. Stwierdzono natomiast ujemną korelację pomiędzy osoczym stężeniem IL-23 a LoSSI ($p = -0,04$). Może to pośrednio dowodzić, że nie tylko wyższe stężenie IL-23, ale także wzbudzenie odpowiedzi mediowanej przez IL-17A związane jest z łagodniejszym przebiegiem choroby. Pozostaje to ponadto w zgodzie z wcześniej przedstawionymi wynikami, według których niska ekspresja genu IL-17A w skórze koreluje z wyższymi wartościami wskaźnika LoSSI. O tym, że efektem działania IL-23 jest wzbudzenie IL-17A świadczyć z kolei może wprost proporcjonalna zależność, jaką obserwowano pomiędzy osoczym stężeniem IL-23 a ekspresją IL-17A w PBMC ($p = 0,03$). Sugerowano, że w SSc szczególnie wysokie stężenie IL-23 ma być związane z wczesnymi fazami choroby [145]. W prezentowanych badaniach stwierdzono natomiast korelację osoczego stężenia IL-23 z długością trwania procesu ($p = 0,01$), a wzięwszy pod uwagę wspomnianą już odwrotnie proporcjonalną zależność między osoczym stężeniem IL-23 a LoSSI, zjawisko to można by tłumaczyć naturalną skłonnością morfeji do samoograniczającego się przebiegu. Oznaczałoby to, że jednym z mechanizmów sprzyjających poprawie w zakresie sklerotycznej blaszki jest wzbudzenie odpowiedzi mediowanej przez IL-23 i IL-17A.

Skłonowana w 2000 roku IL-21, należąca do rodziny IL-2, jest prozapalną cytokiną wzmacniającą różnicowanie limfocytów w kierunku Th17, proliferację

i dojrzewanie limfocytów B, CD8+ oraz komórek NK, a hamującą odpowiedź Th1 i T reg. Jej głównym źródłem mają być komórki NK, ale wydzielana jest również przez limfocyty Th17, pobudzając te ostatnie m.in. do produkcji IL-17 i IL-23R [53, 101, 146, 216, 323]. Istnieją badania wskazujące, że poza IL-17, receptor IL-17RA zlokalizowany na limfocytach CD8+ mogą pobudzać także IL-15 i 21 [230].

W prezentowanych badaniach nie wykazano podwyższonego osoczowego stężenia IL-21 u chorych na morfeę, w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Obserwowano natomiast korelację pomiędzy jej osoczowym stężeniem a ekspresją IL-23 w PBMC ($p = 0,02$), ale nie osoczowym stężeniem tej ostatniej. Nie stwierdzono też zależności pomiędzy osoczowym stężeniem IL-21 a ekspresją genu IL-17A w PBMC, osoczowym stężeniem czy ekspresją jej genu w skórze. Wydaje się zatem, że w patogenezie morfeii IL-23 bardziej wydajnie wzbudza produkcję IL-17A niż IL-21. Co ciekawe, wykazano natomiast korelację pomiędzy stężeniem IL-21 a LoSSI ($p = 0,002$), co może świadczyć, że w morfeii IL-21 działa w mechanizmie niezależnym od IL-17A. Być może osoczowe stężenie IL-21 mogłoby też stanowić marker cięższego przebiegu choroby i służyć jego monitorowaniu, niemniej prezentowane badania przeprowadzono u każdego chorego z jednego pobrania krwi, a potwierdzenie powyższej sugestii wymagałoby raczej kilkukrotnych badań u tych samych chorych na przestrzeni czasu, co może być przyczynkiem do dalszych badań.

Kolejną cytokiną zaangażowaną w odpowiedź immunologiczną związaną z Th17 u ludzi jest IL-1 β . Należy ona do rodziny IL-1, w skład której wchodzi 10 cząsteczek. IL-1 β jest rozpowszechnioną w organizmie, plejotropową cytokiną, która z jednej strony ma hamować syntezę kolagenu, a z drugiej wzmacnia proliferację fibroblastów [21]. W tym zakresie jej działanie przypomina TNF α [21]. Nie stwierdzono podwyższonej ekspresji IL-1 β w niefrakcjonowanych komórkach popłuczyn oskrzelowo płucnych od chorych na SSc z towarzyszącym zapaleniem płuc, w porównaniu z chorymi bez zmian płucnych i grupą kontrolną [170]. Jak wspomniano, IL-1 β promuje odpowiedź Th17 u ludzi, ale jednocześnie IL-17 może też zwrotnie nasilać wydzielanie IL-1 β przez makrofagi [55, 230].

W prezentowanych badaniach obserwowano zwiększoną ekspresję genu IL-1 β w PBMC chorych na morfeę ($p < 0,000005$) oraz zwiększenie jej osoczowego stężenia ($p = 0,0005$) w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Wykazano też ujemną korelację pomiędzy ekspresją jej genu w skórze a długością trwania choroby ($p = -0,02$), co może świadczyć o zaangażowaniu tej cytokiny głównie we wczesne etapy patogenezy morfeii. A dodatkowo, jako że cytokiny rodziny IL-1 są kluczowymi mediatorami stanu zapalnego [169], może to dowodzić stopniowego wygasania tego procesu w skórze chorych na morfeę. Warto też przypomnieć, że IL-1 β może wzbudzać przemianę EC w miofibroblasty [134]. Obserwowano również odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy osoczowym stężeniem IL-17A a ekspresją IL-1 β w PBMC i w skórze (odpowiednio $p = -0,03$ i $p = -0,007$).

Dodatkowo ujemną korelację wykazano pomiędzy ekspresją IL-17A i IL-1 β w skórze ($p = -0,04$) oraz pomiędzy ekspresją IL-1 β w skórze i PBMC ($p = -0,01$), a zależność wprost proporcjonalną między ekspresją IL-17A w skórze a IL-1 β w PBMC ($p = 0,02$). Ponadto zarówno osoczowe stężenie IL-1 β , jak i jej ekspresja w skórze korelowały z ekspresją IL-23 w skórze (odpowiednio $p = 0,01$ i $p = 0,046$), a ekspresja IL-23 w PBMC wykazywała odwrotnie proporcjonalną zależność z ekspresją IL-1 β w skórze ($p = -0,0004$). Powyższe zależności mogą sugerować, że podobnie jak IL-21 także IL-1 β ma mniejszy potencjał wzbudzania syntezy IL-17A niż IL-23, a dodatkowo potwierdzać wcześniejsze przypuszczenia co do wtórnego charakteru odpowiedzi mediowanej przez IL-17 w morfeji. Należy zauważyć, że ekspresję genu IL-1 β wzbudzać mają IL-17B i C [230], które nie były przedmiotem badania. W kontekście zwiększonej ekspresji genu IL-1 β w PBMC i jej osoczowego stężenia u chorych na morfeję warto wspomnieć, że obecnie cytokina ta postrzegana jest za kluczową w patogenezie chorób autozapalnych [193]. Niemniej morfeja nie spełnia kryteriów rozpoznania tych ostatnich [193], choćby w związku z dużą częstością, z jaką stwierdzane są autooprzeciwiactwa w surowicy osób na nią cierpiących. Być może jednak warto byłoby rozważyć zastosowanie (w szczególnie ciężkich i niepoddających się standardowym schematom leczenia przypadkach) inhibitorów IL-1 β , takich jak anakinra czy kanakinumab.

Podsumowując, wydaje się, że wbrew wcześniejszym sugestiom, jakoby IL-17 nasilała patologiczne procesy w przebiegu chorób, w których centralnym zjawiskiem jest włóknienie tkanek [154, 242], na podstawie przeprowadzonych badań podejrzewać można, że przynajmniej w morfeji, zwłaszcza lokalnie w obrębie sklerotycznie zmienionej skóry, IL-17A ma raczej korzystny niż destrukcyjny wpływ na omawiane zjawiska. Może to tłumaczyć zjawisko samoograniczającego przebiegu choroby. Co więcej, takie postrzeganie roli IL-17A może też stanowić wytłumaczenie dla nieoczekiwanego braku efektu IFN γ w chorobach kręgu twardego, jako że cytokina ta jest znanym czynnikiem hamującym odpowiedź Th17. Niejednoznaczne są wyniki badań dotyczących wpływu inhibitorów TNF α na skórę chorych na SSc [238], a jak wykazano, u chorych na łuszczycę poddawanych temu leczeniu dochodzi do zmniejszenia ekspresji IL-17 i -23 [192]. Niedawno opisano też chorego, u którego leczenie anty-TNF α doprowadziło do wzbudzenia wykwitów o typie morfeji [181]. Z kolei korzystny wpływ fototerapii w tej grupie chorób, poza potwierdzonym wzbudzeniem aktywności MMP i hamowaniem ich inhibitorów, może również wynikać z hamowania syntezy IFN γ i wzbudzenia IL-6, co prowadziłoby do nasilenia odpowiedzi Th17. Niemniej doniesienia co do wpływu promieniowania UV na IFN γ i IL-6 są sprzeczne [22, 151, 315]. Dodatkowo zarówno u ludzi chorych na łuszczycę, jak i u myszy poddawanych fototerapii obserwowano blokowanie IL-17 i IL-23 [130, 258]. Rozbieżne opinie dotyczą również wpływu glikokortykosteroidów i takrolimusu na ekspresję i surowiczy poziom IL-17 i -23, chociaż co ciekawe, spora grupa badaczy podkreśla

brak istotnych zmian w poziomach badanych cytokin w związku ze stosowanym leczeniem [83, 154, 165, 196, 283]. Mogłoby to znaczyć, że blokowanie mediatorów innych niż IL-17 i -23 przynosi potencjalne korzyści terapeutyczne w ograniczaniu fazy zapalnej morfeji i, tym samym, pośrednio potwierdzać może koncepcję protekcyjnej roli tych ostatnich. Ochronne, a nie destrukcyjne znaczenie IL-17 wykazano w kilku badaniach na zwierzęcych modelach zapalenia jelit, astmy, GVHD, cukrzyca. Co ciekawe, korzystne efekty IL-17 wiążano z neutralizacją przez nią IFN γ [217]. W mysim modelu zapalenia okrężnicy pozbawienie zwierząt IL-17A nie wpływało znacząco na stopień nasilenia nacieku zapalnego w blaszce właściwej w aktywnej fazie procesu, ale jednocześnie obserwowano silniej wyrażone wrzodzenie nabłonka. Sugerowano, że w przeciwieństwie do ochronnej funkcji IL-17A, uszkodzenie tkanek nasilać może, nieobjęta prezentowanym badaniem, IL-17F [217, 218]. Z kolei w modelu ostrej postaci GVHD, wzbudzonej podaniem komórek śledziony pozbawionych IL-17A, obserwowano przebieg cięższy niż w przypadku zwierząt, które otrzymały w celu wywołania choroby komórki z ekspresją omawianej cytokiny. Poprawę przynosiła natomiast neutralizacja IFN γ [314]. Warto też podkreślić, że u myszy Scl-GVHD jedną z najwcześniej obserwowanych zmian w zakresie cytokin po wzbudzeniu choroby było zwiększenie ekspresji IFN γ [322]. Wydaje się, że niezależna od IL-17 jest również doświadczalnie wzbudzana postać przelekła GVHD [42]. U ludzi protekcyjne znaczenie IL-17 dyskutowane jest w niektórych chorobach nowotworowych, jak np. w nowotworze piersi [106]. W przeprowadzonych badaniach wykazano także istotne znaczenie IL-1 β w patogenezie morfeji, co może stanowić uzasadnienie dla wdrożenia nowych, dostępnych komercyjnie metod leczenia, takich jak inhibitory IL-1 β . Należy dalej zauważyć, że w patomechanizmie morfeji znaczenie może mieć również, niebadana w niniejszej pracy, pofibrotyczna IL-6, która jak, wspomniano, tak u ludzi, jak i u myszy jest istotnym czynnikiem wzbudzającym Th17, a której podwyższone surowicze stężenie obserwowano u chorych na morfeję [7, 55, 115]. Co ciekawe stwierdzono, że sama IL-6 wzbudza Th17 do syntezy IL-22, ale nie IL-17, natomiast działając wspólnie z TGF β hamuje ekspresję IL-22 i pobudza IL-17 [284]. Warto przy tym zauważyć, że IL-22 z jednej strony działa jako czynnik uszkodzający tkanki, np. w łuszczycy czy rzs, ale wykazano też jej ochronne działanie w zwierzęcych modelach chorób zapalnych jelit i protekcyjne w odniesieniu do hepatocytów. Co więcej, również w tym przypadku miało być to związane z działaniem przeciwnym w odniesieniu do IFN γ [217].

5.2. Interleukina-17A a wybrane cytokiny proangiogenne w morfeii

W kontekście udokumentowanych znacznych nieprawidłowości w zakresie mikrokrążenia u chorych na choroby przebiegające z włóknieniem, należy podkreślić, że IL-17 sprzyjać ma angiogenezie zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio. Wzbudza ona syntezę takich proangiogennych czynników, jak CXCL8, VEGF, HGF, bFGF, PDGF, ale też NO [215, 224, 230, 268]. Badania przeprowadzone na hodowli komórek EC sugerowały, że stymulować ma ona ich migrację [215]. Takahashi i wsp. nie obserwowali jednak bezpośredniego wpływu IL-17 na proliferację ludzkich EC w badaniach *in vitro*. Dodanie jej jednak do hodowli EC pobudzonych uprzednio HGF, bFGF i VEGF potęgowało działanie tych ostatnich. Gdy natomiast stymulowano hodowlę EC najpierw IL-17, a następnie dodawano wspomniane HGF, bFGF czy VEGF, wzmocnienie odpowiedzi proliferacyjnej EC uzyskiwano tylko w hodowlach poddawanych działaniu bFGF, co jak wnioskowali autorzy mogło wynikać ze wzbudzenia przez IL-17 receptorów bFGF [268]. Warto też przypomnieć, że farmakologiczna blokada NO w modelach zwierzęcych prowadziła do remodelingu naczyń oraz wzbudzenia syntezy kolagenu I i III [41].

Alexandrakis i wsp. obserwowali zwiększanie się poziomu IL-17 wraz ze stopniem nasilenia stwardnienia rozsianego. Nasilenie procesu, jak dowiedziono we wcześniejszych badaniach, związane jest z nasileniem angiogenezy. A zatem obserwacja ta mogłaby sugerować, że wyższe stężenie IL-17 może korelować ze stopniem angiogenezy [10]. Z kolei w SSc, przynajmniej według części badaczy, limfocyty Th17 mają mieć znaczenie głównie w początkowych stadiach choroby [145, 154, 203]. W odróżnieniu bowiem od stwardnienia rozsianego, w chorobach z kręgu twardziny, w tym morfeii, nasiloną angiogenezę obserwuje się właśnie we wczesnym okresie choroby, a następnie jej cechy zanikają [8, 100, 143, 147, 253].

VEGF to rodzina 7 czynników, które są produktami białkowymi różnych genów i regulują wzrost i różnicowanie się naczyń krwionośnych i limfatycznych. Produkowane są przez wiele komórek, w tym EC, aktywowane limfocyty T, makrofagi, fibroblasty, płytki krwi i monocyty w odpowiedzi na niedotlenienie tkanek i bodźce immunologiczne [269, 308]. Pierwszym opisanym białkiem tej grupy był VEGF-A. Jest to homodimeryczna glikoproteina, występująca w minimum 9 izoformach różniących się liczbą aminokwasów w cząsteczce: 120, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189, 206. Izoformy te powstają na drodze alternatywnego składowania genu, zlokalizowanego na chromosomie 6 w prążku 21.3. Dominującą izoformą jest VEGF 165 [269, 308]. Produkcja VEGF stymulowana jest przede wszystkim przez hipoksję i hipoglikemię, ale także przez szereg cytokin, m.in. IL-17, IL-1 β , TGF β , TNF α oraz estrogeny, TSH, NO, onkogeny, a hamowane przez IL-4 i -10 [211, 228, 269, 308]. Poszczególne izoformy VEGF charakteryzują się różnym powinowactwem do heparyny, a ich ostateczna aktywacja wymaga od-

dzielenia białka od ECM, co zachodzi przy udziale MMP [269]. Biologiczne efekty VEGF mediowane są przez dwa receptory: VEGFR-1 i VEGFR-2, należące do nadrodziny receptorowych kinaz tyrozynowych [308]. Pobudzenie receptorów skutkuje promocją przeżycia, proliferacji i migracji EC, na powierzchni których pojawiają się MMP, przyczyniające się do degradacji fibryny w miejscu tworzenia nowych naczyń. Ochronna funkcja VEGF w odniesieniu do EC wynikać może m.in. z wzbudzania DAF, który to czynnik, jak już wspomniano, zapobiega zniszczeniu komórek przez komplement. Synergistycznie z VEGF w tym zakresie działać ma bFGF. Co znamienne, zmniejszoną ekspresję DAF wykazano w skórze zmienionej w przebiegu morfeii [88, 179, 198, 286]. Pod wpływem VEGF zwiększeniu ulega też przepuszczalność naczyń dla białek osocza, co sprzyja powstaniu istotnego dla procesu angiogenezy żelu fibrynowego. Czynnik ten, poza wspomnianymi już MMP, nasilać ma także syntezę cząsteczek adhezyjnych, HGF, IL-6 i NO [171, 269, 308]. Dowiedziono także jego roli neuroprotekcijnej [211].

Potencjalne znaczenie VEGF w chorobach kręgu twardej podnoszono już wielokrotnie. U myszy SclGVHD obserwowano zwiększoną ekspresję VEGF, ale wcześniej od tego ostatniego dochodziło do zwiększenia ekspresji PDGF, aFGF, EGF i NGFβ [322]. Wyniki badań dotyczących surowiczego stężenia VEGF w grupie chorych na SSc są rozbieżne [69–71, 92, 139]. Sugerowano, że podwyższone stężenie VEGF wiązało się z mniejszym ryzykiem powstawania owrzodzeń w tej grupie chorych, ale z drugiej strony korelowało z progresją choroby [68]. Z kolei w biopsjach błony śluzowej jamy ustnej i skóry chorych na SSc wykazano mniejszą ekspresję VEGF [173, 227]. Podnoszono potencjalne korzyści z blokowania VEGF, ale jednocześnie przestrzegano przed możliwym niekorzystnym wpływem takiego podejścia na obszary cechujące się niewydolną angiogenezą, np. owrzodzenia [30]. Istnieją również badania podejmujące to zagadnienie w morfeii. Farrel i wsp. w badaniu immunohistochemicznym 2 biopsji skóry chorych na morfeę nie wykazali różnic w odniesieniu do grupy kontrolnej [76]. Z kolei Dziankowska-Bartkowiak i wsp. wykazali zwiększenie surowiczego stężenia VEGF, ale co ciekawe nie w grupie SSc. Jednocześnie badacze ci zwrócili uwagę, że większe stężenie VEGF w morfeii wiązało się z mniejszym stężeniem rozpuszczalnej postaci VEGFR-2. Nie wykazali oni natomiast zależności pomiędzy stężeniem VEGF a MMP-9. Stwierdzili jednak podwyższone surowicze stężenie tej ostatniej. Brak korelacji pomiędzy oboma białkami tłumaczyli potencjalnym brakiem syntezy tej ostatniej przez EC w odpowiedzi na VEGF [71]. Warto przypomnieć, że sekwestracja VEGF z ECM zachodzi m.in. przy udziale MMP-9 [269].

W przeprowadzonych badaniach wykazano znamienne podwyższoną ekspresję genu VEGF-A w PBMC chorych na morfeę ($p < 0,000005$) i istotnie obniżoną w skórze ($p = 0,000009$). Wykazano też ujemną korelację pomiędzy ekspresją VEGF-A w skórze a ekspresją IL-17A w PBMC ($p = -0,047$). Może to stanowić potwierdzenie wyników powyżej cytowanych autorów [71, 76] i dowodzić zaburzo-

nej angiogenezy w obrębie blaszek twardzinowych morfeii. Badając VEGF-A nie wykazano jednak korelacji ze zmiennymi takimi, jak LoSSI, aktywność choroby czy długość jej trwania.

W wielu aspektach synergistycznie z VEGF działać ma, należący do rodziny co najmniej ośmiu białek, bFGF. Jego źródłem mogą być m.in. komórki tuczne, makrofagi, EC i fibroblasty. Wykazuje on mitogenną aktywność m.in. w odniesieniu do EC i fibroblastów. Działa poprzez 4 receptory należące do nadrodziny receptorowych kinaz tyrozynowych. Jego udział w patomechanizmie morfeii związany może być z dużym potencjałem wzbudzania angiogenezy oraz nasileniem przez omawiane białko syntezy proteaz i aktywatorów plazminogenu [75, 198, 301]. Sugeruje się, że zarówno TGF β , jak i IL-17 w zakresie swojego działania proangiogenne część efektów uzyskują poprzez wzbudzenie bądź potęgowanie działania bFGF [198, 268]. Stwierdzono jego zwiększoną ekspresję w zmienionej skórze bleomycynowego modelu SSc [301]. Wyniki badań dotyczących surowiczego stężenia bFGF w SSc są jednak rozbieżne. Distler i wsp. nie wykazali różnic w odniesieniu do zdrowej grupy kontrolnej [63]. Natomiast Kadono i wsp. oraz Hummers i wsp. obserwowali podwyższone stężenie bFGF w SSc, przy czym ci pierwsi wykazali, że szczególnie wysokie było ono w podgrupie chorych z krążącymi ACA, w przeciwieństwie do Hummersa i wsp., którzy nie obserwowali związku z żadnym badanym przez nich wykładnikiem klinicznym (długością trwania choroby, nasileniem objawu Raynauda, stopniem stwardnienia skóry, ACA, Scl-70) [108, 132]. Do tej pory bFGF nie był badany w morfeii.

Analiza prezentowanych wyników wykazała zwiększoną ekspresję genu bFGF w PBMC w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną ($p < 0,000005$). Co więcej, w przeciwieństwie do tego co obserwowano badając VEGF-A, ekspresja bFGF miała się zwiększać wraz z długością trwania choroby ($p = 0,004$), a mając na uwadze duży potencjał morfeii do samoograniczającego się przebiegu, może to dowodzić korzystnego działania tej cytokiny w patomechanizmie omawianej jednostki. Warto w tym miejscu przypomnieć, że zgodnie z obserwacjami Takahashi i wsp., którzy wykazali, że efekt proangiogeny IL-17 mediowany jest co prawda przez VEGF, HGF i bFGF, ale to działanie tej ostatniej jest szczególnie silnie, gdy równocześnie działa IL-17 [268]. Opisano korzystne efekty leczenia owrzodzeń w przebiegu SSc z zastosowaniem miejscowo aplikowanego bFGF [304].

Kolejnym białkiem o dużym potencjale wzbudzania angiogenezy jest produkowany przez hepatocyty, ale także przez EC i makrofagi HGF, o m.cz. 92 kDa [75, 137, 220, 295, 301]. Do czynników mających wzbudzać jego syntezę należą m.in. IL-17 i IL-1 β [172, 268]. Biologiczne efekty mediowane są przez receptor c-met [75, 128]. HGF wykazuje istotne mitogenne działanie w odniesieniu do komórek nerek i wątroby, a dodatkowo wzmaga ruchliwość komórek nabłonka i EC oraz pobudza limfocyty B [75, 137, 220, 295, 301]. Dowiedziono, że HGF nasila ekspresję MMP i urokinazowego aktywatora plazminogenu, a obniża TIMP-1 i -2,

a zatem białek zaangażowanych w remodeling tkanek. Ma działanie antyapoptotyczne i wzmacnia nowotworzenie naczyń [164, 220, 295, 301]. Zmniejszać ma również syntezę kolagenu [128]. Okunishi i wsp., obserwując korzystny wpływ HGF na doświadczalnie wzbudzone kolagenem zapalenie stawów u myszy, sugerowali, że wynikać on może z hamowania aktywacji komórek dendrytycznych we wczesnych fazach choroby oraz z nasilenia produkcji IL-10, INF γ i blokowania syntezy IL-17 i 23 w fazach późniejszych [220]. Wu i wsp. wykazali, że HGF podawany myszom, u których symultanicznie próbowano wzbudzić chorobę twardzino-podobną poprzez wstrzykiwanie bleomycyny, zapobiegał rozwojowi włóknienia skóry, a co więcej, znosił on także już rozwinięte, klinicznie jawne stwardnienie skóry u myszy, u których chorobę wzbudzono przed zastosowaniem HGF [295]. Sugerowano, że HGF jest produkowany w odpowiedzi na włóknienie tkanek [108, 137]. Jego potencjalna rola w tym zakresie omówiona zostanie dokładniej w kolejnym podrozdziale.

Wyniki odnoszące się do surowiczego stężenia HGF u chorych na SSc są rozbieżne. Kawaguchi i wsp. stwierdzili podwyższone jego stężenie i obserwowali korelację z ciężkością przebiegu choroby [136], natomiast Hummers i wsp. wykazali obniżenie tej wartości, chociaż bez istotności statystycznej w odniesieniu do grupy kontrolnej [108]. Ci ostatni wykazali jednak korelację stężenia HGF ze stopniem nasilenia zmian naczyniowych, ale nie ze stopniem stwardnienia skóry [108]. W badaniach *in vitro* wykazano natomiast zarówno zwiększoną produkcję HGF przez fibroblasty twardzinowe, jak i ekspresję c-met w porównaniu z komórkami kontrolnymi [128, 137]. Do tej pory HGF nie był badany w morfeu.

Analiza prezentowanych wyników wykazała istotnie wyższą ekspresję genu HGF w PBMC u chorych na morfeu w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną ($p < 0,000005$), ale nie wykazano znamiennej różnicy pomiędzy ekspresją HGF w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu do grupy kontrolnej. Niemniej ekspresja omawianej cytokiny w skórze była odwrotnie proporcjonalna do LoSSI ($p = -0,03$). Stoi to w zgodzie z obserwowanym u myszy korzystnym wpływem HGF na proces włóknienia skóry [295]. Jeżeli jednocześnie zauważymy, że podanie HGF miało też blokować wzbudzanie twardzino-podobnej choroby u myszy poddanych działaniu bleomycyny [295], robi to z omawianego białka interesującego kandydata do rozwoju nowych strategii terapeutycznych w tej grupie schorzeń. Niestety ogólne jego podawanie może wiązać się z dużym ryzykiem wzbudzenia procesu nowotworowego, szczególnie, że sugeruje się, iż potencjalne lecznicze efekty działania HGF osiąmane są dopiero przy stężeniach znacznie przekraczających te fizjologiczne [127, 137, 220, 295].

Dalsza analiza zależności pomiędzy HGF a pozostałymi cytokinami wykazała, że stopień ekspresji jej genu w PBMC jest wprost proporcjonalny do osoczowego stężenia IL-1 β ($p = 0,04$), a stopień ekspresji w skórze do osoczowego stężenia IL-21 ($p = 0,048$). Jako że ta ostatnia produkowana jest m.in. przez Th17, to obser-

wowane korelacje mogą potwierdzać zaangażowanie tych komórek we wzbudzenie angiogenezy w zmianach twardzinowych w morfeji. Warto jeszcze zauważyć, że nie wykazano zależności pomiędzy następującymi zmiennymi: ekspresją genu VEGF-A w PBMC chorych na morfeję i jego ekspresją w skórze, ekspresją genu bFGF w PBMC oraz ekspresją genu HGF w PBMC i skórze tej grupy chorób. Może to wynikać z różnych mechanizmów regulacji syntezy omawianych białek.

5.3. Interleukina-17A a kluczowa cytokina profibrotyczna – TGFβ1 w morfeji

TGFβ jest cytokiną, charakteryzującą się znaczną wielokierunkowością działania, ale w kontekście chorób przebiegających z włóknieniem postrzegana przede wszystkim jako główny czynnik profibrotyczny. TGFβ produkowany jest w formie nieaktywnej jako propeptyd. Zbudowany on jest z właściwego TGFβ, białka związanego z utajeniem (*latency associated peptide*) β oraz białka wiążącego nieaktywny TGFβ (*latent TGFβ binding protein*) i pozostaje w interakcji z ECM, w tym z fibryliną 1, głównym składnikiem mikrowłókien ECM, która posiada domeny homologiczne z białkiem wiążącym nieaktywny TGFβ. Co ciekawe, defekt genu fibryliny 1 leży u podłoża mysiego modelu SSc – Tsk1/+, a ponadto wykazano go u rdzennej populacji amerykańskiej, która obarczona jest dużym ryzykiem rozwoju SSc. U blisko 30% chorych na morfeję obserwuje się ponadto autoprzeciwi-cięcia przeciwko fibrylinie 1 [16, 60, 270, 285]. Powstanie formy aktywnej TGFβ mediowane jest przez trombospondynę, plazminę, integryny i THY-1 (CD90), ale także MMP-9. W morfeji wykazano zwiększoną ekspresję integryny alfavbeta5, a co ciekawe jej blokowanie w badaniach *in vitro* znosiło transformację fibroblastów w kierunku miofibroblastów. Obserwowano również podwyższone stężenie MMP-9 [17–19, 75, 88, 282, 285, 301, 318]. TGFβ występuje w trzech homodimerycznych odmianach β1, β2 i β3 o masie cząsteczkowej 25 kDa. TGFβ1 uwalniany jest m.in. przez EC, β2 przez komórki nerwowe i komórki śródbłonnków, a β3 przez komórki mezenchymalne [75, 88, 241]. Wyróżnia się także trzy jej receptory (TGFβR), przy czym najistotniejszy wydaje się kompleks kinaz serynowo-treoninowych receptorów I i II. Aktywny TGFβ reaguje z TGFβRII, co powoduje transfosforylację i wiązanie z TGFβRI. Tak powstały kompleks doprowadza do fosforylacji białek Smads. Pobudzone Smads przechodzą do jądra komórkowego, gdzie wiążą się z elementem regulatorowym w genie docelowym. We wzbudzeniu transkrypcji biorą udział koaktywatory i enzymy modyfikujące chromatynę, takie jak p300/CBP. W rezultacie dochodzi do syntezy mRNA. Wewnątrzcytoplazmatyczną kaskadę zablokować mogą Smad7, przeciwdziałając fosforylacji poszczególnych jej elementów [75, 88, 152, 285]. W SSc stwierdzono zaburzenia dotyczące przekazywania informacji poprzez Smads: zwiększoną aktywność

Smad3 i 4. Doniesienia co do poziomu ekspresji Smad7 w SSC i zwierzęcych modelach tej choroby są niejednoznaczne [285, 301]. Okazuje się jednak, że w przewodzeniu sygnału TGF β biorą udział także ścieżki niezależne od Smads i obejmują one kinazy białkowe i lipidowe bądź zależną od wapnia fosfatazę kalcineuryny [285]. Ostatecznie efektem działania TGF β jest migracja do ogniska fibroblastów, monocytów, limfocytów T i neutrofilii, pobudzenie fibroblastów, wzmocnienie ich adhezji i stymulacja do różnicowania się w kierunku miofibroblastów oraz nasilenie produkcji składników ECM, w tym kolagenu typu I, III, VI, VII, X, fibronektyny i proteoglikanów, osłabienie syntezy MMP, zwiększenie wytwarzania TIMP oraz inhibitora aktywatora plazminogenu [*Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)*]. TGF β wpływa również modulująco na ekspresję integryn i wzbudza syntezę CTGF. Pobudza on również FoxP3, a co za tym idzie różnicowanie limfocytów T reg, które odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu tolerancji w odniesieniu do własnych antygenów [242, 325]. TGF β nasilać ma także syntezę IL-9, której udział postuluje się ostatnio w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych [28].

Wyniki opublikowanych dotąd badań dotyczących TGF β w morfeji są sprzeczne. Higley i wsp., Lipko-Godlewska oraz Uziel i wsp. obserwowali zwiększone surowicze stężenie TGF β 1 u chorych na morfeję [105, 159, 282]. W przeciwieństwie do nich Antiga i wsp. wykazali wręcz obniżone stężenie omawianej cytokiny w tej grupie chorych [13]. Z kolei Peltonen i wsp. oraz Glimour i wsp. stwierdzili zwiększoną ekspresję TGF β 1 w wycinkach skóry zmienionej chorobowo [87, 234]. Querfeld i wsp. [241], którzy podobnie jak Peltonen i wsp. zbadali zaledwie 3 chorych na morfeję, wykazali zwiększoną ekspresję TGF β 1 i β 2, ale nie β 3 w porównaniu z grupą kontrolną [234]. Badania immunohistochemiczne Higleya i wsp. oraz Querfelda i wsp. sugerowały zwiększoną ilość tego białka w badanej skórze w odniesieniu do osób zdrowych; Restrepo i wsp. oraz Helmbold i wsp. takich zmian nie potwierdzili, a Antiga i wsp. obserwowali nawet zmniejszoną jego produkcję [13, 100, 105, 241, 244]. Niejednoznaczne były również wyniki badań uwzględniających aktywność procesu chorobowego [87, 105, 241, 282]. Jednym z możliwych tłumaczeń dla przedstawionych powyżej niezgodności, poza oczywiście różnymi technikami, którymi posługiwali się autorzy powyżej przedstawionych badań i niejednorodnymi, a niekiedy także bardzo małymi grupami badanymi, jest zwiększona ekspresja TGF β R, co potwierdzono stwierdzając w ogniskach morfeji istotnie większą ekspresję zarówno TGF β RI, jak i TGF β RII [152, 282, 285]. Niemniej myszy, którym wszczepiono fibroblasty ze zmutowaną formą TGF β RII paradoksalnie wykazywały aktywację ścieżki sygnałowej TGF β , a klinicznie prezentowały cechy zwłóknienia skóry, a niekiedy również płuc [60]. Z drugiej strony ekspresję TGF β RII w skórze zmniejsza ma promieniowanie UV [151].

W prezentowanych badaniach nie wykazano znamienych statystycznie różnic tak w zakresie ekspresji TGF β 1 w PBMC, jak i w zakresie jego ekspresji w skórze u chorych na morfeję w odniesieniu do zdrowej grupy kontrolnej i kontrol-

nych wycinków skóry. Wykazano natomiast słabą odwrotną korelację pomiędzy TGFβ1 w PBMC a LoSSI ($p = -0,047$) oraz wprostproporcjonalną zależność pomiędzy ekspresją TGFβ1 w skórze a LoSSI ($p = 0,01$). Zwłaszcza ta ostatnia obserwacja potwierdza znaczenie badanej cytokiny w patogenezie procesu włóknienia w morfeii.

W ostatnich latach pojawiły się sugestie o potencjalnej roli IL-17 w chorobach przebiegających z włóknieniem, chociaż dane na ten temat są niejednoznaczne. Kurasawa i wsp. dowodzili, że IL-17 wzbudza proliferację ludzkich fibroblastów, ale w odróżnieniu od TGFβ, nie nasila syntezy kolagenu. TGFβ natomiast nie ma mieć wpływu na syntezę przez fibroblasty cytokin prozapalnych [154]. Niemniej Yoshizaki i wsp. wykazali, że stymulacja mysich fibroblastów *in vitro* IL-17, poza wzbudzeniem ich proliferacji, nasila również syntezę kolagenu I i TGFβ [317]. Z drugiej strony Lo Re i wsp. sugerują, że limfocyty Th17 wzbudzone przez IL-23 pochodzącą z makrofagów, są zaangażowane we wczesne, zapalne etapy doświadczalnie wzbudzonej krzemicy płuc, ale nie biorą udziału w procesie włóknienia [167]. Z kolei Chakir i wsp. obserwowali zwiększoną ekspresję TGFβ, kolagenu I i III oraz IL-17 w badaniu immunohistochemicznym biopsji oskrzeli chorych na astmę i wnioskowali, że IL-17 jest zaangażowana w proces włóknienia błony podstawnej w przebiegu astmy [39]. Podobnie Faust i wsp. sugerują udział IL-17 w procesie włóknienia w mysim modelu późnej reakcji odrzucania przeszczepu. Myszy IL-17^{-/-} wykazywały istotne osłabienie procesu włóknienia w stosunku do grupy kontrolnej [78]. Możliwe mechanizmy działania IL-17 w procesie włóknienia obejmują zarówno bezpośrednio nasilenie ekspresji kolagenu, jak i pośrednie wzbudzenie cytokin profibrotycznych, jak choćby TGFβ czy IL-6 oraz białek zaangażowanych w remodeling tkanek, w tym surowiczego amyloidu A, MMP1, 2, 3, 9 i 13 [55, 78, 224, 317, 319].

Analiza zależności pomiędzy TGFβ1, IL-17A i wybranymi cytokinami związanymi z odpowiedzią Th17 wykazała korelację pomiędzy osoczymym stężeniem IL-23 a ekspresją genu TGFβ1 w PBMC ($p = 0,046$) oraz pomiędzy ekspresją genu TGFβ1 w PBMC a ekspresją genu IL-17A w skórze ($p = 0,008$). Warto podkreślić, że TGFβ1 pośrednio faworyzuje różnicowanie się limfocytów w kierunku Th17, bo hamuje odpowiedź Th1 [12].

Jak już wspomniano, także HGF może brać udział w patogenezie chorób przebiegających z włóknieniem. Dowiedziono, że HGF nasila ekspresję białek zaangażowanych w remodeling tkanek oraz zmniejsza syntezę kolagenu [128, 164, 295, 301]. Co więcej blokuje on rozwój bleomycynowego modelu SSc i znosi objawy choroby u myszy, u których chorobę wzbudzono jeszcze przed podaniem HGF [295]. Obserwowano również jego korzystny wpływ na włóknienie płuc, wątroby i nerek w mysich modelach SSc [195, 295, 312]. Warto zauważyć, że TGFβ wzbudzać ma prezentację c-met na powierzchni ludzkich fibroblastów twardzinowych [128]. Wydawałoby się zatem, że HGF znosi efekty działania TGFβ, którego re-

gion promotorowy zawiera element wiążący HGF [301]. Jednakże wyniki badań na modelach zwierzęcych są w tym zakresie niejednoznaczne. W doświadczalnym zapaleniu stawów HGF zmniejszał ekspresję TGF β , ale w mysim modelu przeszczepu serca, w którym HGF redukował liczbę niepowodzeń ekspresja ta była zwiększona [220, 302]. Z kolei Wu i wsp. obserwowali zmniejszoną liczbę fibroblastów TGF β 1+ u myszy, którym jednocześnie ze wzbudzeniem procesu twarzynowego podawano HGF, ale nie u zwierząt z chorobą rozwiniętą jeszcze przed podaniem cytokiny [295]. Odmienne właściwości HGF i TGF β w procesie włóknienia potwierdzają Nakaya i wsp., którzy blokując oś CXCL10/CXCR3 u myszy promowali u nich włóknienie, czemu towarzyszyła zwiększona ekspresja TGF β i obniżona HGF [210]. Okunishi i wsp. sugerowali z kolei, że HGF nasila syntezę IL-6 i INF γ oraz blokuje syntezę IL-17A i 23 [220].

Analiza prezentowanych wyników nie wykazała jednak bezpośrednich zależności pomiędzy IL-17A, -23 i HGF. Obserwowano natomiast korelację pomiędzy ekspresją genu TGF β 1 w PBMC a ekspresją genu HGF w skórze chorych na morfeę ($p = 0,02$) oraz odwrotnie proporcjonalną zależność między ekspresją genu TGF β 1 w PBMC a ekspresją genu VEGF-A w skórze ($p = -0,047$). Zważywszy na fakt, że jednocześnie ekspresja HGF w skórze była odwrotnie proporcjonalna do LoSSI ($p = -0,03$), może to dowodzić, że osłabiona angiogeneza, której wykładnikiem jest m.in. obniżona ekspresja VEGF-A w skórze, jest wtórnie kompensowana działaniem HGF. Mechanizm działania HGF w morfeji polegałby zatem raczej na wzbudzaniu angiogenezy, niż bezpośrednim hamowaniu procesu włóknienia. Udział w tym procesie Th17 potwierdzają z kolei wspomniane w poprzednim rozdziale korelacje pomiędzy IL-1 β i IL-21 a HGF.

5.4. Interleukina-17A i wybrane cytokiny z nią związane a zjawiska autoimmunizacyjne w morfeji

Doreau i wsp. wykazali, że IL-17 u chorych na SLE współdziała z czynnikiem aktywującym limfocyty B, należącym do rodziny TNF (*B cell activating factor belonging to TNF family*, BAFF), promując w ten sposób różnicowanie limfocytów B do komórek plazmatycznych i tym samym nasilając produkcję autoprzeciwciał [65]. Wykazano ponadto, że limfocyty Th17 wykazują ekspresję CXCL13, będącej czynnikiem chemotaktycznym dla limfocytów B, a zatem mogą być one zaangażowane w rekrutację limfocytów B do ogniska zapalenia [56]. Przeciwciała produkowane pod wpływem IL-17 należą do IgG2a i IgG3 [194]. Także IL-21, będąca jedną z cytokin odpowiedzi Th17, ma wzbudzać proliferację i dojrzewanie limfocytów B [101]. Znaczenie ANA w morfeji pozostaje jednak niejasne. Sugeruje się, że wysokie miana ANA o określonej swoistości powinny skłaniać do bardziej skrupulatnej obserwacji chorego w związku z ryzykiem rozwoju

innej choroby autoimmunizacyjnej [33, 156]. W opisywanej grupie badanej ANA w mianie $\geq 1/80$ wykryto u 78%, a w mianie $\geq 1/160$ u 48% chorych, co znajduje potwierdzenie w danych literaturowych [16, 48, 57, 82, 177, 189, 190, 207, 270, 273, 275]. W 4 przypadkach wykazano ich swoistość, z czego u 1 chorej obserwowano przeciwciała przeciwko Scl-70, czemu towarzyszył objaw Raynauda, a u kolejnych 3 chorych stwierdzono przeciwciała przeciwko: SS-B, SS-A, Jo-1, histonom, AMA-M2 i PCNA. U żadnego z nich nie potwierdzono współistnienia drugiej choroby autoimmunizacyjnej.

W zakresie cytokin poddanych analizie w prezentowanym badaniu: IL-17A, IL-23, IL-21, IL-1 β , VEGF-A, HGF, bFGF, TGF β 1, zarówno ekspresja ich genów w PBMC, jak i osoczowe stężenie bądź ekspresja genów w skórze nie wykazały jednak zależności z mianem ANA. Podobnie jak nie stwierdzono korelacji pomiędzy mianem ANA a LoSSI, aktywnością choroby czy długością jej trwania. A zatem wydaje się, że przynajmniej w morfeji IL-17A i pozostałe badane cytokiny nie odgrywają zasadniczej roli w procesach autoimmunizacyjnych, a same ANA nie stanowią dobrego markera aktywności czy ciężkości przebiegu choroby.

5.5. Interleukina-17A i wybrane cytokiny z nią związane w morfeji i w postaci ograniczonej twardziny układowej

W badaniach biorących za swój przedmiot patogenezę SSc wiele uwagi poświęcano zaburzeniom angiogenezy, a czynniki proangiogenne były szeroko opracowywane, chociaż ich wyniki są niejednoznaczne. I tak obserwowano podwyższone surowicze stężenie VEGF w grupie chorych na SSc, ale nie były to obserwacje potwierdzane przez wszystkich autorów [71, 92, 108, 139]. Podobnie w odniesieniu do surowiczego stężenia bFGF, a także HGF w SSc, opisywano zarówno ich podwyższone wartości, jak i brak różnic w porównaniu do grupy kontrolnej [63, 108, 132, 137]. W prezentowanych badaniach wykazano znamienne podwyższoną ekspresję genu zarówno VEGF, bFGF, jak i HGF w PBMC chorych na ISSc w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną (odpowiednio: $p = 0,00004$, $p = 0,0003$ i $p = 0,00001$). Nie wykazano natomiast różnicy pomiędzy tymi wartościami w grupie chorych na ISSc, a chorych na morfeję. Wyniki takie dowodzą istotnej roli zaburzeń angiogenezy w patogenezie obu chorób.

W piśmiennictwie pojawiło się też kilka prac poświęconych roli IL-17 w patomechanizmie SSc. Kurasawa i wsp. [154] wykazali zwiększoną ekspresję genu IL-17 w PBMC chorych na SSc oraz w 2 z 4 biopsji skóry, a także w limfocytach z płuczyn oskrzelowo-płucnych u 3 z 3 badanych chorych. Stwierdzili oni również zwiększone surowicze stężenie tej cytokiny. Równocześnie u chorych z nadprodukcją IL-17 stwierdzono krótszy czas trwania choroby, ale nie wykazano związku z produkcją ANA i obecnością zmian płucnych w przebiegu SSc [154]. W opozycji

do powyżej przedstawionych wyników, Namysł nie wykazał zwiększonej ekspresji IL-17 w PBMC, niemniej stwierdził on zwiększoną ekspresję receptora dla tej IL [212]. Zwiększone surowicze stężenie IL-17 korelujące ze wczesnymi fazami choroby obserwowali Murata i wsp. [203]. Autorzy ci stwierdzali tendencję do stopniowego obniżenia się tego stężenia w przebiegu choroby. Z kolei Radstake i wsp. [242] wykazali zwiększoną liczbę krążących limfocytów Th17 u chorych na SSc, przy czym nie wykryli oni IL-17 w surowicy tych chorych, przy równoczesnym zwiększonym stężeniu IL-6 i IL-23. Meloni i wsp. [186] nie obserwowali natomiast zwiększonej liczby limfocytów Th17 w popłuczynach oskrzelowo-płucnych chorych na SSc, u których obserwowano objawy zajęcia płuc. Analiza prezentowanych wyników wykazała z kolei znamienne obniżoną ekspresję genu IL-17A w PBMC chorych na ISSc ($p = 0,00001$), czemu towarzyszyło istotnie niższe jej stężenie osoczowe ($p = 0,005$). Komura i wsp. stwierdzili podwyższone surowicze stężenie IL-23 u chorych na SSc, zwłaszcza u chorych z krótszym wywiadem. Nie wykazali oni natomiast związku z nasileniem zmian skórnych, w odróżnieniu od korelacji ze zmianami płucnymi [145]. Podwyższone osoczowe stężenie IL-23 w SSc obserwowali również Radstake i wsp. [242]. W prezentowanych badaniach nie wykazano co prawda zwiększonego osoczowego stężenia IL-23, ale obserwowano istotnie wyższą ekspresję jego genu w PBMC chorych na ISSc, w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną ($p = 0,009$). Dodatkowo stwierdzono znamienne wyższą ekspresję genu IL-1 β w PBMC ($p = 0,005$) i wyższe osoczowe stężenie IL-1 β i IL-21 (odpowiednio $p = 0,000004$ i $p = 0,0003$). Co więcej, w porównaniu do grupy chorych na morfeę obserwowano istotnie niższą ekspresję genu IL-17A w PBMC w grupie ISSc ($p = 0,000001$) i niższe jej stężenie osoczowe, choć zależność ta pozostawała na granicy istotności statystycznej ($p = 0,05$); istotnie niższą ekspresję IL-23 genu w PBMC ISSc ($p = 0,02$), ale brak różnicy w jej stężeniu osoczym pomiędzy obiema badanymi grupami; istotnie wyższe osoczowe stężenie IL-1 β i IL-21 w grupie ISSc (odpowiednio $p = 0,03$ i $p = 0,0009$). Obserwacje te dowodzą zaangażowania IL-17A w patogenezę ISSc. Przypuszczać można dalej, że mechanizmy wzbudzające syntezę IL-17A są bardziej wydolne w morfeji, co może być przyczyną łagodniejszego jej przebiegu i mogłoby sugerować, że podobnie jak w tej ostatniej również w SSc IL-17A odgrywa raczej ochronną niż destrukcyjną rolę. Z drugiej jednak strony, prezentowane wyniki mogą dowodzić odmienności tych dwóch jednostek chorobowych, jakkolwiek kwestia ta nadal pozostaje nierozstrzygnięta.

Reasumując, w prezentowanej pracy podjęto się próby scharakteryzowania roli IL-17A i wybranych cytokin z nią związanych w patogenezie morfeji. Należy podkreślić, że choroba ta nieczęsto jest indywidualnie przedmiotem badań naukowych, stąd wiedza na jej temat jest ograniczona, często wywodzona z doświadczeń obejmujących w głównej mierze chorych na SSc i pojedyncze przy-

padki morfeji. Co więcej, brak tej wiedzy radykalnie ogranicza nasze możliwości terapeutyczne w omawianej jednostce. IL-17A została wybrana z uwagi na wiele obiecujących doniesień jej dotyczących w innych chorobach o podłożu autoimmunizacyjnym, w tym o potencjalnych korzyściach jakie mogłyby płynąć z jej farmakologicznego blokowania. Niemniej na podstawie prezentowanych wyników uzyskano dowody z jednej strony potwierdzające jej udział w patomechanizmie morfeji, tak samo jak i innych poddanych badaniu cytokin, ale wydaje się, że być może wywiera ona raczej ochronny niż destrukcyjny wpływ na tkanki objęte procesem chorobowym. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że dotyczy to wyłącznie poddanej badaniu IL-17A i nie można odnieść tych sugestii do innych członków rodziny IL-17. Dodatkowo wydaje się, że podobne wnioski wysnuć można także w odniesieniu do ISSc, z zastrzeżeniem, że cięższy przebieg choroby może wynikać z bardziej niewydolnych niż w morfeji mechanizmów wzbudzania odpowiedzi Th17. Oczywiście należy tutaj zaznaczyć, że badana grupa chorych na ISSc była niewielka i z pewnością w celu potwierdzenia prawdziwości tej tezy w SSc należałoby ją powiększyć, a badania rozszerzyć o ocenę ekspresji zaproponowanych cytokin w skórze i/lub innych organach zajętych procesem chorobowym. Na podstawie prezentowanych wyników nie można rozstrzygnąć też kwestii oddzielności omawianych jednostek, chociaż pewne rozbieżności, które wykazano, wydają się dowodzić, że bezpieczniej jest używać terminu: choroby kręgu twardziny. Niewątpliwie ciekawą obserwacją w prezentowanej pracy są wyniki dotyczące HGF, które to białko wydaje się być interesującym kandydatem do rozwoju nowych strategii terapeutycznych w grupie chorób kręgu twardziny. Z kolei z uwagi na wysokie wartości zarówno ekspresji genu IL-1 β , jak i jej osoczowego stężenia, zwłaszcza we wczesnych okresach choroby, można by się pokusić o rozważenie próby wdrożenia do leczenia fazy zapalnej morfeji inhibitorów IL-1 β . Przedstawione badania przyczyniły się zatem do pogłębienia wiedzy dotyczącej patogeny morfeji, pozwoliły na nowe spojrzenie na rolę IL-17A w jej patomechanizmie i patomechanizmie chorób pokrewnych oraz wskazały interesujące kierunki rozwoju nowych strategii terapeutycznych w tych jednostkach.

6. Wnioski

1. Interleukina-17A i wybrane cytokiny związane z różnicowaniem limfocytów Th17, a zatem IL-23, IL-1 β i IL-21, biorą udział w patomechanizmie morfeji, niemniej można przypuszczać, że zwłaszcza lokalnie w skórze objętej włóknieniem mogą one mieć raczej korzystny niż negatywny wpływ na przebieg choroby.
2. Jednym z kluczowych zjawisk leżących u podłoża patogenezy morfeji są upośledzone procesy angiogenetyczne, co wynika ze zwiększonej ekspresji genów badanych czynników proangiogennych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i obniżonej w skórze chorych na morfeę.
3. Z uwagi na sugerowany korzystny efekt działania czynnika wzrostu hepatocytów na włóknienie skóry u chorych na morfeę oraz wykazaną we wcześniejszych badaniach na myszach jego potencjalną zdolność do hamowania rozwoju choroby, wydaje się, że białko to jest szczególnie interesujące w kontekście rozwoju nowych strategii terapeutycznych w chorobach kręgu twardziny.
4. Wysokie wartości zarówno ekspresji genu IL-1 β w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej chorych na morfeę i jej osoczkowego stężenia, zwłaszcza we wczesnych okresach choroby, mogą skłaniać do rozważenia próby wdrożenia do leczenia fazy zapalnej morfeji inhibitorów IL-1 β .
5. Znaczne różnice w ekspresji genów, zwłaszcza IL-17A i IL-23 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w ich osoczkowym stężeniu w morfeji i postaci ograniczonej twardziny układowej, sugerują z jednej strony, że u podłoża obu jednostek mogą leżeć nieco odmienne zjawiska patogenetyczne, ale mogą też dowodzić, że łagodniejszy przebieg morfeji wynika z bardziej wydolnych mechanizmów wzbudzających odpowiedź Th17.

7. Streszczenie

Morfea (*morphea*), zwana także twardziną ograniczoną (*localized scleroderma*, *scleroderma circumscripta*) jest przewlekłą chorobą skóry o nieznanym, przypuszczalnie autoimmunizacyjnej etiologii. Zaliczana jest do grupy chorób tkanki łącznej. Określenie „*scleroderma*”, wprowadzone blisko 200 lat temu, oznacza dosłownie twardą skórę i ma opisywać choroby przebiegające z włóknieniem skóry i struktur przyległych. Główne odmiany morfeji obejmują postać ograniczoną, uogólnioną, liniową i głęboką. Jest to choroba narażająca chorego w swoich najłagodniejszych, aczkolwiek najczęstszych postaciach, przede wszystkim na problemy natury estetycznej, niemniej może prowadzić również do znacznych zaburzeń funkcjonalnych, takich jak np. spowolnienie wzrostu kończyny czy ograniczenie ruchomości w stawach i w konsekwencji do pogorszenia jakości życia. Kwestią dyskusji jest, czy morfea i twardzina układowa [*Systemic Scleroderma* (SSc)] to odmiany tej samej choroby, czy dwie różne jednostki o zbliżonych cechach klinicznych i procesach patogenetycznych. Obecna wiedza dotycząca patomechanizmu morfeji jest niewystarczająca, zwłaszcza w kontekście niewielkich możliwości terapeutycznych, którymi dysponujemy. Wiadomo, że zaburzenia w jej przebiegu obejmują trzy zasadnicze zjawiska: nieprawidłową angiogenezę, wzbudzenie procesów immunologicznych, w tym autoimmunizacyjnych oraz zaburzony metabolizm macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania ostatnich kilku lat ściśle sugerują, że cytokiny związane z nowo opisanymi limfocytami Th17 mogą odgrywać rolę we wszystkich wymienionych powyżej zjawiskach. Znaczenie IL-17 podnoszono w pojedynczych badaniach w kontekście SSc. Jak dotąd nie były one jednak przedmiotem badań w odniesieniu do morfeji.

Celem pracy była: (1) ocena ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, bFGF, VEGF-A w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej [*Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC)] chorych na morfeję z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności; (2) ocena osoczonego stężenia IL-17A, IL-21, IL-23, IL-1 β w morfeji z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności; (3) ocena ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A w skórze chorych na morfeję z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia oraz aktywności; (4) porównanie osoczonego stężenia powyżej wymienionych cytokin i ekspresji ich genów w PBMC chorych na morfeję oraz postać ograniczoną SSc [*Limited SSc* (lSSc)].

Ogółem badaniami objęto 125 osób, z czego 50 chorych na morfeję oraz 75 osób zakwalifikowanych do grup kontrolnych. W grupie badanej wyróżniono 5 podgrup: (1) 20 chorych na morfeję plackowatą, (2) 15 chorych na morfeję uogólnioną, (3) 7 chorych na morfeję liniową, (4) 2 chorych na morfeję głęboką, (5) 6 chorych na morfeję ze współistniejącymi wykwitami liszaja twardzinowego. Do badań kwalifikowano chorych, u których kliniczne rozpoznanie morfeji/liszaja twar-

dzinowego potwierdzone zostało badaniem histologicznym. Badania przeprowadzono również w 3 grupach kontrolnych, które obejmowały łącznie 75 osób, w tym: (1) 47 zdrowych ochotników; (2) 15 chorych na ISSc – grupy te stanowiły kontrolę w badaniu ekspresji genów wybranych cytokin w PBMC oraz w badaniu stężenia tych białek w osoczu; (3) 13 chorych na raka piersi, od których pobrano wycinki skóry zdrowej – grupa ta stanowiła kontrolę w badaniu ekspresji genów wybranych cytokin w wycinkach skórnych. Krew obwodową, z której pozyskiwano PBMC i osocze pobrano u 110 osób, w tym: 49 z grupy badanej, 47 zdrowych ochotników, 15 chorych na ISSc. Wycinki skóry uzyskano od 49 osób, w tym: 36 chorych z grupy badanej, 13 chorych z grupy kontrolnej.

Chorych poddano ocenie aktywności procesu chorobowego i długości trwania choroby oraz rozległości, nasilenia i aktywności zmian skórnych w morfeii z zastosowaniem wskaźnika *Localized Scleroderma Severity Index* - LoSSI, zaproponowanego przez Arkachaisriego i wsp. w 2008 r. Następnie w grupach badanych i odpowiednich kontrolnych oznaczono osoczowe stężenie IL-17A, IL-23, IL-1 β metodą immunoenzymatyczną ELISA z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów R&D System (Minneapolis, USA) oraz osoczowe stężenie IL-21 z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów e-Bioscience (Wiedeń, Austria). Przeprowadzono również badanie ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF w PBMC metodą reakcji łańcuchowej polimerazy [*Polymerase Chain Reaction* (PCR)] w czasie rzeczywistym. Izolację całkowitego komórkowego RNA przeprowadzono metodą opisaną przez Chomczyńskiego i wsp. Do badania wykorzystano system Light Cycler 2 (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy) oraz komercyjne zestawy do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Analizowano fragmenty genów o długości 78–237 par zasad, wszystkie obejmowały przynajmniej jeden intron. Startery projektowano we własnym zakresie w oparciu o sekwencje bazowe dostępne w zasobach światowych baz danych *GeneBank* i *Ensembl* lub pozyskane z internetowej bazy danych starterów <http://www.rtprimerdb.org/> [107]. Wykonywano elektroforezę produktu na żelu agarozowym oraz analizę topnienia amplikonu. Ilościowej oceny dokonano w oparciu o krzywe standardowe, a za gen referencyjny obrano dehydrogenazę gliceraldehydo-3-fosforanową (GAPDH). Przeprowadzono także badanie ekspresji genów IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A w skórze metodą PCR w czasie rzeczywistym. Izolację całkowitego komórkowego RNA z biopsji skóry przeprowadzono poprzez homogenizację głęboko zamrożonych tkanek w odczynniku TriPure (Roche Applied Science), z następową podwójną ekstrakcją fenolem i chloroformem, przedzieloną przymywaniem izopropanolem i 75% etanolem. Dalsze etapy były takie same, jak w przypadku materiału uzyskanego z PBMC. Przeciwciała przeciwjądrowe [*Anti-nuclear Antibodies* (ANA)] oceniano metodą immunofluorescencji pośredniej na substracie komórek nowotworowych raka krtani HEp-2 z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów Euroimmun (*Madizinische Labordiagnostika*, Lube-

ka, Niemcy) oraz testem paskowym opartym na technice blotu Euroline ANA3 Euroimmun (*Medizinische Labordiagnostika*, Lubeka, Niemcy).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując w tym celu statystyki opisowe, test U Manna-Whitney'a, test ANOVA Kruskala-Wallisa, korelację porządku rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznano te, które osiągnęły wartości $p < 0,05$.

Wykazano istotnie wyższą ekspresję genu IL-17A w PBMC chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p = 0,027$). Nie stwierdzano natomiast znamiennej różnicy w osoczym stężeniu IL-17A w grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej. Obserwowano istotnie niższą ekspresję genu IL-17A w skórze chorych na morfeę w porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,027$). Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy ekspresją IL-17A w skórze chorych na morfeę a LoSSI ($p = -0,04$). Wykazano istotnie wyższą ekspresję genu IL-23 w PBMC chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$). Nie obserwowano znamiennej różnicy w osoczym stężeniu IL-23 ani ekspresji jej genu w skórze w grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy osoczym stężeniem IL-23 chorych na morfeę a LoSSI ($p = -0,04$). Nie wykazano znamiennej różnicy w osoczym stężeniu IL-21 u chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej. Obserwowano istotnie wyższą ekspresję genu IL-1 β w PBMC chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$). Wykazano istotnie wyższe osocze stężenie IL-1 β w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych ($p = 0,0005$). Nie stwierdzono znamiennej różnicy w ekspresji genu IL-1 β w skórze w grupie badanej w odniesieniu do grupy kontrolnej. Nie obserwowano korelacji pomiędzy ekspresją tej cytokiny w PBMC, jej osoczym stężeniem czy ekspresją w skórze a LoSSI. Wykazano istotnie wyższą ekspresję genu VEGF-A w PBMC chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$) oraz istotnie niższą ekspresję genu VEGF-A w skórze chorych na morfeę w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,000009$). Obserwowano też istotnie wyższą ekspresję genu bFGF w PBMC chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$). Stwierdzono również istotnie wyższą ekspresję genu HGF w PBMC chorych na morfeę w odniesieniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,000005$). Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji HGF w skórze chorych na morfeę i grupie kontrolnej, natomiast stwierdzono odwrotną korelację pomiędzy ekspresją HGF w skórze a LoSSI ($p = -0,03$). Nie obserwowano istotnych różnic w ekspresji genu TGF β 1 w PBMC chorych na morfeę i grupy kontrolnej osób zdrowych. Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji genu TGF β 1 w skórze chorych na morfeę i grupy kontrolnej. Stwierdzono słabą odwrotną korelację pomiędzy ekspresją TGF β 1 w PBMC a LoSSI ($p = -0,047$) i istotną statystycznie zależność pomiędzy ekspresją TGF β 1 w skórze a LoSSI ($p = 0,01$). Ekspresja genu IL-17A w PBMC korelowała z ekspresją genu

IL-23 w PBMC ($p = 0,03$) i w skórze ($p = 0,02$). Z kolei ekspresja IL-23 w skórze była odwrotnie proporcjonalna do ekspresji w niej IL-17A ($p = -0,03$). Ekspresja genu TGF β 1 w PBMC korelowała z ekspresją IL-17A w skórze ($p = 0,008$). Natomiast ekspresja IL-17A w PBMC była odwrotnie proporcjonalna do ekspresji VEGF-A w skórze ($p = -0,047$). ANA w mianie $\geq 1/80$ wykryto u 39 z 50 chorych na morfeę (78%). U jednej chorej na morfeę plackowatą miano ANA wynosiło 1/2560, a ich dokładna analiza wykazała, że są one skierowane przeciwko topoizomerazie I. U kolejnej chorej, u której rozpoznano morfeę linijną, miano ANA oceniono na 1/1280 i swoistość w kierunku antygenów: SS-A i SS-B. Żadna z tych osób nie spełniała kryteriów rozpoznania innej, współistniejącej choroby autoimmunizacyjnej poza morfeę. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy mianem ANA a ekspresją genów badanych cytokin w PBMC, ich osoczymym stężeniem czy ekspresją genów w skórze. Nie wykazano też znamiennych korelacji pomiędzy mianem ANA a LoSSI, długością trwania choroby czy jej aktywnością.

Analiza statystyczna danych uzyskanych w grupie chorych na ISSc w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych wykazała: istotnie niższą ekspresję IL-17A w PBMC oraz jej osoczone stężenie ($p = 0,00001$; $p = 0,005$); istotnie wyższą ekspresję IL-23 w PBMC ($p = 0,009$); istotnie wyższą ekspresję IL-1 β w PBMC oraz jej osoczone stężenie ($p = 0,005$; $p = 0,000004$); istotnie wyższe osoczone stężenie IL-21 ($p = 0,0003$); istotnie wyższą ekspresję VEGF-A, HGF, bFGF w PBMC ($p = 0,00004$; $p = 0,0003$; $p = 0,00001$); brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy ekspresją TGF β 1 w PBMC. Analiza statystyczna danych uzyskanych w grupie chorych na ISSc w porównaniu z grupą chorych na morfeę wykazała: istotnie niższą ekspresję IL-17A w PBMC oraz na granicy istotności statystycznej niższe osoczone stężenie IL-17A ($p = 0,000001$; $p = 0,05$); istotnie niższą ekspresję IL-23 w PBMC ($p = 0,02$); istotnie wyższe osoczone stężenie IL-1 β i IL-21 ($p = 0,03$; $p = 0,0009$); brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy ekspresją IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF w PBMC.

Reasumując, w prezentowanej pracy podjęto się próby scharakteryzowania roli IL-17A i wybranych cytokin z nią związanych w patogenezie morfeii. Na podstawie prezentowanych wyników uzyskano dowody potwierdzające jej udział w patomechanizmie morfeii, tak samo jak i innych poddanych badaniu cytokin, ale wydaje się, że wbrew wcześniejszym sugestiom jakoby IL-17 nasilała patologiczne procesy w przebiegu chorób, w których centralnym zjawiskiem jest włóknienie tkanek, na podstawie przeprowadzonych badań podejrzewać można, że przynajmniej w morfeii, zwłaszcza lokalnie w obrębie sklerotycznie zmienionej skóry, IL-17A ma raczej korzystny niż destrukcyjny wpływ na omawiane zjawiska. Wynika to m.in. z obserwowanej ujemnej korelacji pomiędzy ekspresją genu IL-17A w obrębie sklerotycznej blaszki a stopniem nasilenia i rozległości zmian skórnych i braku zależności z długością trwania choroby oraz z odwrotnie proporcjonalnego związku pomiędzy osoczymym stężeniem IL-23 a ciężkością przebiegu choroby. Co

więcej, takie postrzeganie roli IL-17A może stanowić wytłumaczenie dla nieoczekiwanego braku efektu IFN γ w chorobach kręgu twardziny, jako że cytokina ta jest znanym czynnikiem hamującym odpowiedź Th17. Protekcyjne znaczenie IL-17 podnoszono w zwierzęcych modelach zapalenia jelit, astmy, choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, cukrzycy oraz w chorobach nowotworowych u ludzi. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że zawarte w pracy sugestie dotyczą wyłącznie poddanej badaniu IL-17A i nie można ich odnosić do innych członków rodziny IL-17. Ponadto, wydaje się, że podobne wnioski wysnuć można także w odniesieniu do ISSc, z zastrzeżeniem, że cięższy przebieg choroby może wynikać z bardziej niewydolnych niż w morfeji mechanizmów wzbudzania odpowiedzi Th17. Oczywiście należy tutaj zaznaczyć, że badana grupa chorych na ISSc była niewielka i z pewnością w celu potwierdzenia prawdziwości tej tezy w SSc należałoby ją powiększyć, a badania rozszerzyć o ocenę ekspresji zaproponowanych cytokin w skórze i/lub innych organach zajętych procesem chorobowym. Na podstawie prezentowanych wyników nie można rozstrzygnąć też kwestii oddzielności omawianych jednostek, chociaż pewne rozbieżności, które wykazano, wydają się dowodzić, że bezpieczniej jest używać terminu: choroby kręgu twardziny. Niewątpliwie ciekawą obserwacją, wynikającą z prezentowanej pracy, są wyniki dotyczące HGF. Białko to, jak sugerowano na podstawie badań na modelach zwierzęcych, nie tylko zapobiega procesowi włóknienia w przebiegu choroby twardzinopodobnej, ale wręcz znosi klinicznie jawne jego objawy. W prezentowanej pracy wykazano odwrotną korelację pomiędzy ekspresją genu tej cytokiny w blaszce sklerotycznej morfeji a stopniem nasilenia i rozległości zmian skórnych, ale nie z długością trwania choroby. Jako że omawiana jednostka wykazuje naturalną skłonność do samoograniczającego się przebiegu, razem czyni to z HGF interesującego kandydata do rozwoju nowych strategii terapeutycznych w grupie chorób kręgu twardziny. Z kolei z uwagi na wysokie wartości zarówno ekspresji genu IL-1 β i jej osoczowego stężenia, zwłaszcza we wczesnych okresach choroby, można by się pokusić o rozważenie próby wdrożenia do leczenia fazy zapalnej morfeji inhibitorów IL-1 β . Przedstawione badania przyczyniły się zatem do pogłębienia wiedzy dotyczącej patomechanizmu morfeji, pozwoliły na nowe spojrzenie na rolę IL-17A w jej patogenezie i patogenezie chorób pokrewnych oraz wskazały interesujące kierunki rozwoju nowych strategii terapeutycznych w tych jednostkach.

Przedstawione wyniki badań pozwoliły na wysnucie następujących wniosków:

1. Interleukina-17A i wybrane cytokiny związane z różnicowaniem limfocytów Th17, a zatem IL-23, IL-1 β i IL-21, biorą udział w patogenezie morfeji, niemniej można przypuszczać, że zwłaszcza lokalnie w skórze objętej włóknieniem mogą one mieć raczej korzystny niż negatywny wpływ na przebieg choroby.
2. Jednym z kluczowych zjawisk leżących u podłoża patogenezy morfeji są upośledzone procesy angiogenetyczne, co wynika ze zwiększonej eks-

presji genów badanych czynników proangiogennych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i obniżonej w skórze chorych na morfeę.

3. Z uwagi na sugerowany korzystny efekt działania czynnika wzrostu hepatocytów na włóknienie skóry u chorych na morfeę oraz wykazaną we wcześniejszych badaniach na myszach jego potencjalną zdolność do hamowania rozwoju choroby, wydaje się, że białko to jest szczególnie interesujące w kontekście rozwoju nowych strategii terapeutycznych w chorobach kręgu twardziny.
4. Wysokie wartości zarówno ekspresji genu IL-1 β w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej chorych na morfeę i jej osoczkowego stężenia, zwłaszcza we wczesnych okresach choroby, mogą skłaniać do rozważenia próby wdrożenia do leczenia fazy zapalnej morfeii inhibitorów IL-1 β .
5. Znaczne różnice w ekspresji genów zwłaszcza IL-17A i IL-23 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz w ich osoczkowym stężeniu w morfeii i postaci ograniczonej twardziny układowej sugerują z jednej strony, że u podłoża obu jednostek mogą leżeć nieco odmienne zjawiska patogenetyczne, ale z drugiej strony mogą też dowodzić, że łagodniejszy przebieg morfeii wynika z bardziej wydolnych mechanizmów wzbudzających odpowiedź Th17.

8. Summary

Morphea, termed also the localized scleroderma (*scleroderma circumscripta*), represents a chronic dermal disease of an unclear, probably autoimmune aetiology. It is thought to belong to the group of connective tissue diseases. The term of *scleroderma*, introduced almost 200 years ago, literally denotes an indurated skin and is supposed to describe diseases developing with fibrosis of skin and adjacent structures. Principal varieties of morphea include a limited form, a generalised form, a linear form and a deep form. In its modest, although the most common, forms the disease exposes patients to problems of an aesthetic nature, but it may also lead to significant functional disturbances, such as slowed down growth of an extremity or reduced mobility in joints and, consequently, deteriorated quality of life. It is debatable whether morphea and systemic scleroderma (SSc) represent varieties of the same disease or two distinct morbid units of similar clinical traits and pathogenetic processes. Current knowledge on pathogenesis of morphea is insufficient, particularly in view of the insufficient therapeutic potential in our disposal. Disturbances which appear in its course are known to include three principal phenomena: abnormal angiogenesis, stimulated immune processes, including autoaggressive reactions and a disturbed turnover of extracellular matrix. Results of the recent few years strictly suggest that cytokines of the newly described lymphocytes Th17 may be involved all the above mentioned phenomena. Significance of IL-17 was already accentuated in individual investigations on SSc but till now it has not been addressed to morphea.

The study aimed at: (1) evaluation of IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, bFGF, VEGF-A gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with morphea, taking into account individual varieties of the disease, its intensity and activity; (2) evaluation of IL-17A, IL-21, IL-23, IL-1 β concentrations in plasma in morphea, taking into account individual varieties of the disease, its intensity and activity; (3) evaluation of IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A gene expression in skin of patients with morphea taking into account individual varieties of the disease, its intensity and activity; (4) comparison of plasma concentrations manifested by the above mentioned cytokines on one hand and expression of their gene expressions in PBMC on the other in patients with morphea or the limited form of SSc (lSSc).

The studies were conducted on 125 persons, including 50 patients with morphea and 75 persons qualified to control groups. In the former group 5 subgroups were distinguished, including: (1) 20 patients with macular morphea, (2) 15 patients with generalised morphea, (3) 7 patients with linear morphea, (4) 2 patients with deep morphea, (5) 6 patients with morphea coexisting with eruptions of lichen sclerosus. The patients were qualified to studies when clinical diagnosis of morphea/lichen sclerosus was confirmed by histological examination.

The studies were performed also on 3 control groups, including the total of 75 individuals, i.e., (1) 47 healthy individuals; (2) 15 patients with ISSc; the groups constituted a reference in studies on gene expression of selected cytokines in PBMC and in studies on plasma levels of the proteins; (3) 13 patients with breast carcinoma, from whom samples of healthy skin were obtained; they served as a reference group in studies on selected cytokine gene expression in skin samples. Peripheral blood, from which PBMC and plasma were obtained, was sampled in 110 persons, including: 49 patients of the morphea group, 47 healthy individuals, 15 patients with ISSc. Skin fragments were sampled in 49 persons, including: 36 patients with morphea, 13 patients from the control group.

In the patients activity and duration of the disease process, spread, intensity and activity of skin lesions in morphea were evaluated using the *Localized Scleroderma Severity Index* (LoSSI), suggested by Arkachaisri et al. in 2008. Then, in the studied groups and respective control groups plasma levels of IL-17A, IL-23, IL-1 β were estimated by immunoenzymatic ELISA technique, using commercially available R&D System kits (Minneapolis, USA) and plasma level of IL-21 was evaluated employing commercially available kits produced by e-Bioscience (Vienna, Austria). Expression of IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF genes in PBMC was examined by polymerase chain reaction (PCR) in the real time. Total cellular RNA was isolated using the technique of Chomczyński et al. In the experiments the Light Cycler 2 system (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy) and commercial kits for PCR in real time were used. Gene fragments of 78-237 bp in length were estimated, all of which included at least a single intron. We designed the primers using the base sequences available in the world data bases of *GeneBank* and *Ensembl*, or obtained from on-line primer data base of <http://www.rtpriimerdb.org/>. The products were separated using agarose gel electrophoresis and analysis of amplicon melting temperature was conducted. The quantitative analysis took advantage of standard curves and gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was selected as the reference gene. Expression of IL-17A, IL-23, IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A genes in a skin was examined using PCR in a real time. Total cellular RNA was isolated from skin biopsies was conducted by homogenization of deep frozen tissues in TriPure reagent (Roche Applied Science), followed by double extraction with phenol and chloroform, spaced by washes with isopropanol and 75% ethanol. Subsequent stages mimicked those used for the material obtained from PBMC. Antinuclear antibodies (ANA) were evaluated using indirect immunofluorescence test on the substrate of neoplastic laryngeal carcinoma cells, HEp-2 and commercially available Euroimmun kits (*Medizinische Labordiagnostika*, Lübeck, Germany) and the immunoblotting technique, Euroline ANA3 Euroimmun (*Medizinische Labordiagnostika*, Lübeck, Germany).

The obtained results were subjected to statistical analysis, using for the purpose descriptive statistics, U test of Mann and Whitney, ANOVA test of Kruskal-Wallis, Spearman's rank correlation analysis. The differences were assumed to be significant at $p < 0.05$.

As compared to the control group of healthy individuals, PMBC of morphea patients manifested a significantly higher expression of IL-17A gene ($p = 0.027$). On the other hand, no significant difference was detected in plasma concentration of IL-17A between the studied group and the control group. A significantly lower expression of IL-17A gene was detected in skin of morphea patients, as compared to the control group ($p = 0.027$). Expression of IL-17A in the skin of patients with morphea was found to exhibit negative correlation with LoSSI ($p = -0.04$). A significantly higher expression of IL-23 gene was noted in PBMC of morphea patients, as compared to that in the control group of healthy individuals ($p < 0.000005$). As compared to the control group, the morphea patients manifested no significant differences in plasma level of IL-23 or expression of the respective gene in the skin. In patients with morphea plasma levels of IL-23 showed a negative correlation with LoSSI ($p = -0.04$). No significant difference in plasma level of IL-21 could be detected between morphea patients and the control group. A significantly higher expression of IL-1 β gene in PBMC was noted in morphea patients as compared to the control group of healthy individuals ($p < 0.000005$). As compared to the control group of healthy individuals, the patients manifested a significantly higher plasma concentration of IL-1 β ($p = 0.0005$). No significant difference on expression of IL-1 β gene in the skin could be noted between the investigated group and the control group. Expression of the cytokine in PMBC, its plasma level or its expression in the skin demonstrated no correlations with LoSSI. A significantly higher expression of VEGF-A gene was noted in PBMC of morphea patients, as compared to the control group of healthy individuals ($p < 0.000005$) and a significantly lower expression of VEGF-A gene in the skin of morphea patients, as compared to the control group ($p = 0.000009$). Also, a significantly higher expression of bFGF gene was detected in PBMC of morphea patients, as compared to the control group of healthy individuals ($p < 0.000005$). A significantly higher expression of HGF gene was detected in PBMC of morphea patients, as compared to control group of healthy individuals ($p < 0.000005$). No significant differences were detected in expression of HGF gene in the skin were detected between morphea patients and the control individuals but a reverse correlation was documented between the expression and LoSSI ($p = -0.03$). No significant differences were disclosed between morphea patients and the control group of healthy individuals in expression of TGF β 1 gene in PMBC. The two groups manifested also no significant difference in expression of TGF β 1 gene in the skin. A weak negative correlation was detected between TGF β 1 expression in PBMC and LoSSI ($p = -0.047$) and a significant correlation between TGF β 1

expression in the skin and LoSSI ($p = 0.01$). Expression of IL-17A gene in PBMC demonstrated a correlation with expression of IL-23 gene in PBMC ($p = 0.03$) and in the skin ($p = 0.02$). In turn, expression of IL-23 in the skin proved to be inversely proportional to expression of IL-17A in the skin ($p = -0.03$). Expression of TGF β 1 gene in PBMC manifested a correlation with expression of IL-17A in the skin ($p = 0.008$). On the other hand, expression of IL-17A in PBMC manifested an inverse correlation with expression of VEGF-A in the skin ($p = -0.047$). ANA at the titre of $\geq 1/80$ was detected in 39 out of 50 morphea patients (78%). In one of female patients with macular morphea ANA titre amounted to 1/2560, and their detailed analysis demonstrated that the antibodies are directed to topoisomerase I. In a subsequent female patient with linear morphea the ANA titre was estimated at 1/1280 and the antibodies were specific for SS-A and SS-B antigens. None of the patients exhausted diagnostic criteria of a coexisting autoimmune disease other than morphea. No significant relationships could be disclosed between titre of ANA on one hand and expression of studied cytokine genes in PBMC, their plasma concentration or expression of the genes in the skin on the other. Also, no significant correlations were detected between ANA titre on one hand, LoSSI, duration of the disease or its activity on the other.

Statistical analysis of the data obtained in the group of patients with ISSc, as compared to those detected in the control group of healthy individuals, demonstrated: a significantly lower expression of IL-17A in PBMC and a significantly lower concentration of the cytokine in plasma ($p = 0.00001$; $p = 0.005$); a significantly higher expression of IL-23 in PBMC ($p = 0.009$); a significantly higher expression of IL-1 β in PBMC and a significantly higher plasma level of the cytokine ($p = 0.005$; $p = 0.000004$); a significantly higher plasma concentration of IL-21 ($p = 0.0003$); significantly higher expressions of VEGF-A, HGF, bFGF in PBMC ($p = 0.00004$; $p = 0.0003$; $p = 0.00001$); no significant differences between expression of TGF β 1 in PBMC. Statistical analysis of the data obtained in the group of patients with ISSc, as compared to the group of patients with morphea, demonstrated: a significantly lower expression of IL-17A in PBMC and, at the threshold of statistical significance, a lower plasma concentration of IL-17A ($p = 0.000001$; $p = 0.05$); a significantly lower expression of IL-23 in PBMC ($p = 0.02$); a significantly higher plasma concentrations of IL-1 β and IL-21 ($p = 0.03$; $p = 0.0009$); no significant differences in expressions of IL-1 β , TGF β 1, HGF, VEGF-A, bFGF in PBMC.

Summing up, the study represents an attempt to characterize roles of IL-17A and of selected linked to it cytokines in pathogenesis of morphea. The results provided proof for their involvement in pathogenesis of morphea but, in contrast to earlier expressed suggestions that IL-17 intensifies pathological processes in the course of diseases focused around fibrosis of tissues, the results allow to suspect that, at least in morphea, particularly locally, within the sclero-

tically altered skin, IL-17A exerts a favourable, rather than damaging effect on the discussed phenomena. This is manifested, i.a., by the documented negative correlation between expression of IL-17A gene within the sclerotic lamina on one hand and intensity and spread of dermal lesions on the other and absence of relationship between the expression and duration of the disease. Moreover, such a role of IL-17A may provide an explanation for the unexpected absence of IFN γ effects in diseases of the scleroderma group, since the cytokine represents a factor recognised to inhibit response of Th17. A protective role of IL-17 was suggested in animal models of intestinal inflammation, of asthma, graft-vs-host diseases, diabetes mellitus and neoplastic diseases in humans. Nevertheless, it should be stressed that suggestions contained in this study are exclusively related to the investigated IL-17A and they cannot be extended to other members of IL-17 family. In addition, perhaps similar conclusions can be drawn in the case of ISSc, with the reservation that the more severe course of the disease may reflect more insufficient than in morphea mechanisms of Th17 response induction. Obviously, it should be noted that the studied group of patients with ISSc was small and it should be enlarged attempting to corroborate the suggestion in SSc while the investigations should be extended by evaluating the expression of suggested cytokines in the skin and/or other organs involved by the pathological process. Also, the obtained results do not permit to resolve the problem of whether the discussed morbid units represent distinct or the same disease although certain divergences which have been disclosed seem to indicate that it is more safe to use the term of scleroderma-spectrum disorders. Undoubtedly, an interesting finding involves the data related to HGF. As suggested already in studies on animal models, the protein not only prevents against fibrosis in the course of a scleroderma-related disease but it openly eliminates its clear signs/symptoms. In this study a negative correlation has been documented between expression of the cytokine gene in sclerotic lamina of morphea on one hand and intensity and spread of skin lesions but not duration of the disease on the other. Since the discussed morbid unit manifests a natural tendency for a self-restricting course, this seems to point to HGF as a natural candidate for development of novel therapeutic strategies in group of scleroderma-like diseases. In turn, the high values of IL-1 β gene expression and high plasma concentrations of the cytokine, particularly at early stages of the disease, lure attempts to introduce IL-1 β inhibitors to therapy of morphea inflammatory phase. Thus, the presented results promote development of a deeper knowledge on role of IL-17A in morphea pathogenesis and pathogenesis of related diseases and they suggest interesting directions of novel therapeutic strategies in the diseases.

The presented results allow to draw the following conclusions:

1. Interleukin-17A and selected cytokines linked to differentiation of lymphocytes Th17, and, thus, IL-23, IL-1 β and IL-21, are involved in pathoge-

nesis of morphea. Nevertheless, it may be suggested that the cytokines exert more favourable than negative effects on the disease course, particularly locally in the skin affected by fibrosis.

2. Inhibited angiogenetic processes represent one of key phenomena which determine morphea pathogenesis and which reflect augmented expression of genes coding the studied pro-angiogenetic factors in peripheral blood mononuclear cells and their decreased expression in the skin of patients with morphea.
3. In view of the suggested favourable effect of hepatocyte growth factor in dermal fibrosis in patients with morphea and its potential ability to inhibit development of a disease, demonstrated in earlier experiments on mice, the protein seems to be particularly interesting in development of novel therapeutic strategies in scleroderma-related diseases.
4. The high levels of IL-1 β gene expression in peripheral blood mononuclear cells of morphea patients and high plasma levels of the cytokine, particularly at early stages of the disease, may lure investigators to contemplate introduction of IL-1 β inhibitors to treatment of morphea inflammatory phase.
5. The pronounced differences in gene expression, particularly of IL-17A and IL-23 on peripheral blood mononuclear cells and on their plasma levels between morphea patients and patients with a limited form of scleroderma on one hand suggest a slightly different character of pathogenetic phenomena which provide ground for the pathologies but, on the other hand, may prove that the less severe course of morphea reflects more efficient mechanisms of stimulating Th17 response.

9. Piśmiennictwo

1. Abbasi N., Firoz B., Bossenbroek N.M. i wsp. Inflammatory morphea in the context of Raynaud phenomenon. *Dermatol. Online J.* 2008;14:11
2. Aberer E., Neumann R., Stanek G. Is localised scleroderma a Borrelia infection? *Lancet* 1985;2:278
3. 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
4. Acosta-Rodriguez E.V., Rivino L., Geginat J. i wsp. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 2007;8:639-46
5. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A. i wsp. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 2007;8:942-9
6. Agarwal S.K., Gourh P., Shete S. i wsp. Association of interleukin 23 receptor polymorphisms with anti-topoisomerase-I positivity and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2009;36:2715-23
7. Aggarwal S., Ghilardi N., Xie M.H. i wsp. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of intrleukin-17. *J. Biol. Chem.* 2003;278:1910-4
8. Akimoto S., Ishikawa O., Yokoyama Y. i wsp. Generalized morphea with vascular involvement. A case report and disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans. *Acta Derm. Venereol.* 1996;76:141-3
9. Alecu M., Geleriu L., Coman G. i wsp. The interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha serological levels in localized and systemic sclerosis. *Rom. J. Intern. Med.* 1998;36:251-9
10. Alexandrakis M.G., Pappa C.A., Miyakis S. i wsp. Serum interleukin-17 and its relationship to angiogenic factors in multiple myeloma. *Eur. J. Intern. Med.* 2006:412-6
11. Alimova E., Farhi D., Plantier F. i wsp. Morphoea (localized scleroderma): baseline body surface involvement and antinuclear antibody may have a prognostic value. *Clin. Exp. Dermatol.* 2009;34:491-2
12. Annunziato F., Cosmi L., Liotta F. i wsp. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *International Immunology* 2008;20:1361-8
13. Antiga E., Quaglino 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
14. Arkachaisri T., Pino S. Localized scleroderma severity index and global assessment: a pilot study of outcome instruments. *J. Rheumatol.* 2008;35:650-7
15. Arkachaisri T., Vilaiyuk S., Li S i wsp. The localized sklerodermia 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
16. Arnett F.C., Tan F.K., Uziel Y. i wsp. Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin 1, in patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2656-9

17. Asano Y., Ihn H., Yamane K. i wsp. Increased expression of integrin $\alpha(v)\beta3$ contributes to the establishment of autocrine TGF- β signaling in scleroderma fibroblasts. *J. Immunol.* 2005;175:7708-18
18. Asano Y., Ihn H., Yamane K. i wsp. Increased expression of integrin $\alpha v\beta 5$ induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 2006;168:499-510
19. Asano Y., Ihn H., Jinnin M. i wsp. Involvement of $\alpha v\beta 5$ integrin in the establishment of autocrine TGF- β signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126:1761-9
20. Asano Y., Ihn H., Kubo M. i wsp. Clinical significance of serum matrix metalloproteinase-13 levels in patients with localized scleroderma. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2006;24:394-9
21. Atamas S.P., White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:537-50
22. Badea I., Taylor M., Rosenberg A. i wsp. Pathogenesis and therapeutic approaches for improved topical treatment in localized scleroderma and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009;48:213-21
23. Baildam E.M., Ennis H., Foster H.E. i wsp. Influence of childhood scleroderma on physical function and quality of life. *J. Rheumatol.* 2010;38:167-73
24. Bakst R., Kovarik C., Werth V.P. A case of localized scleroderma in a sculptor and his wife. *J. Clin. Rheumatol.* 2009;15:399-401
25. Baldo M., Bhogal B., Groves R.W. i wsp. Childhood vulval lichen sclerosus: autoimmunity to the basement membrane zone protein BP180 and its relationship to autoimmunity. *Clin. Exp. Dermatol.* 2010;35:543-5
26. Beltramelli M., Verellesi P., Frasin A. i wsp. Localized severe scleroderma: a retrospective study of 26 pediatric patients. *Pediatric Dermatology* 2010;27:476-80
27. Bergler-Czop B., Dukalska M., Rokicki W. i wsp. Obserwacja zmian w układzie krążenia i stanu dermatologicznego u chorych z twardziną ograniczoną. *Post. Dermatol. Alergol.* 2005;22:81-6
28. Beriou G., Bradshaw E.M., Lozano E. i wsp. TGF- β induces IL-9 production from human Th17 cells. *J. Immunol.* 2010;185:46-54
29. Bernatsky S., Joseph L., Pineau C.A. i wsp. Scleroderma prevalence: demographic variations in a population-based sample. *Arthritis Rheum.* 2009;61:400-4
30. Beyer C., Distler J.H., Distler O. Are tyrosine kinase inhibitors promising for the treatment of systemic sclerosis and other fibrotic diseases? *Swiss. Med. Wkly.* 2010;140:w13050
31. Birdi N., Laxer R.M., Thorner P. i wsp. Localized scleroderma progressing to systemic disease. *Arthritis and Rheumatism* 1993;36:410-5
32. Błaszczak M., Janniger C.K., Jabłońska S. Childhood scleroderma and its peculiarities. *Cutis* 1996;58:148-52
33. Błaszczak M., Jarząbek-Chorzelska M., Jabłońska S. Związek między twardziną ograniczoną a układową. Czy badania immunopatologiczne są pomocne w ustalaniu przejścia twardziny skórnej w postać układową? *Przegląd Dermatologiczny* 2000;87:119-25
34. Błaszczak M., Królicki L., Krasau M. i wsp. Progressive facial hemiatrophy: central nervous system involvement and relationship with scleroderma en coup de sabre. *J. Rheumatol.* 2003;30:1997-2004

35. Bologna J.L., Orlow S.J., Glick S.A. Lines of Blaschko. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994;31:157-9
36. 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
37. Branton M.H., Kopp J.B. TGF- β and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999;1:1349-65
38. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H. i wsp. *Dermatologia*. Wydawnictwo Czelej Lublin 2002
39. Chakir J., Shannon J., Molet S. i wsp. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111:1293-8
40. Chanoki M., Ishii M., Kobayasi H. i wsp. Increased expression of lysyl oxidase in skin with scleroderma. *Br. J. Dermatol.* 1995;133:710-5
41. Chatziantoniou C., Boffa J.J., Ardaillou R. i wsp. Nitric oxide inhibition induces early activation of type 1 collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice. Role of endothelin. *J. Clin. Invest.* 1998;101:2780-9
42. Chen X., Das R., Komorowski R. i wsp. Interleukin 17 is not required for autoimmune – mediated pathological damage during chronic graft versus host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010;16:123-8
43. Chen Z., O’Shea J.J. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 2008;41:71-8
44. Chizzolini C., Chicheportiche R., Alvarez M. i wsp. Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* 2008;112:3696-703
45. Choczaj-Kukuła A., Dziańkowska-Bartkowiak B., Torzecka J.D., Sysa-Jędrzejowska A. Markery immunologiczne w różnych postaciach twardziny. *Przegląd Dermatol.* 2001;88:27-34
46. Choczaj-Kukuła A., Dziańkowska-Bartkowiak B., Torzecka J.D., Sysa-Jędrzejowska A. Rozpuszczalny receptor interleukiny-2 u chorych na twardzinę układową i skórną. *Przegląd Dermatol.* 2001;88:37-40
47. Chomczyński P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-9
48. Christen-Zaech S., Hakim M.D., Afsar F.S. i wsp. Pediatric morphea (localized scleroderma): review of 136 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008;59:385-96
49. Chung L., Lin J., Furst D.E. i wsp. Systemic and localized scleroderma. *Clin. Dermatol.* 2006;24:374-92
50. Coelho L.F.L., de Oliveira J.G., Kroon E.G. Interferons and scleroderma – a new clue to understanding the pathogenesis of scleroderma? *Immunology Letters* 2008;118:110-5
51. Colver G.B., Rodger A., Mortimer P.S. i wsp. Post-irradiation morphea. *Br. J. Dermatol.* 1989;120:831-5
52. Coombes J.L., Siddiqui K.R., Arancibia-Cárcamo C.V. i wsp. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 2007;204:1757-64
53. Coquet J.M., Kyparissoudis K., Pellicci D.G. i wsp. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* 2007;178:2827-34

54. Cosmi L., De Palma R., Santarasci V. i wsp. Human interleukin-17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T-cell precursor. *J. Exp. Med.* 2008;205:1903-16
55. Costa V.S., Mattana T.C., da Silva M.E. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010;88:222-6
56. Crome S.Q., Wang A.Y., Levings M.K. Translation mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2010;159:109-19
57. Davis K., Boros P., Keltz M., i wsp. Circulating Fcγ receptor – specific autoantibodies in localized and systemic scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995;33:612-6
58. Dehen L., Roujeau J.C., Cosnes A. i wsp. Internal involvement in localized scleroderma. *Medicine* 1994;73:241-5
59. Denton C.P., Shi-Wen X., Sutton A. i wsp. Scleroderma fibroblasts promote migration of mononuclear leucocytes across endothelial cell monolayers. *Clin. Exp. Immunol.* 1998;114:293-300
60. Denton C.P., Abraham D.J. Transgenic analysis of scleroderma: understanding key pathogenic events in vivo. *Autoimmun. Rev.* 2004;3:285-93
61. Diaz-Perez J.L., Connolly S.M., Winkelmann R.K. Disabling pansclerotic morphea of children. *Arch. Dermatol.* 1980;116:169-73
62. Di Lorenzo G., Mansueto P., Melluso M. i wsp. Morphea after silicone gel breast implantation for cosmetic reasons in an HLA-B8, DR3 – positive woman. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997;112:93-5
63. Distler O., Del Roso 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
64. Dong C. Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:337-48
65. Doreau A., Belot A., Bastid J. i wsp. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 2009;10:778-85
66. Drake L.A., Dinehart S.M., Farmer E.R. i wsp. Guidelines of care for scleroderma and sclerodermoid disorders. American Academy of Dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996;35:609-14
67. Duymaz A., Karabekmez F.E., Keskin M. i wsp. Parry-Romberg syndrome: facial atrophy and its relationship with other regions of the body. *Ann. Plast. Surg.* 2009;63:457-61
68. Dziankowska-Bartkowiak B., Waszczykowska E., Żebrowska A. Udział metaloproteinaz i ich inhibitorów w patomechanizmie wybranych chorób skóry. *Alergia Astma Immunologia* 2004;9:71-9
69. Dziankowska-Bartkowiak B., Torzecka J.D., Waszczykowska E. Wpływ zaburzeń angiogenezy i waskulogenezy na rozwój twardziny układowej – przegląd piśmiennictwa. *Post. Dermatol. Alergol.* 2006;23:224-7
70. Dziankowska-Bartkowiak B. Znaczenie wybranych parametrów klinicznych i laboratoryjnych w procesie włóknienia i przebiegu twardziny układowej. Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Medyczny, Łódź 2006

71. Dziańska-Bartkowiak B., Żebrowska A., Wągrowa-Danielewicz M. i wsp. Twardzina układowa i ograniczona do skóry – zaburzenia w stężeniu wybranych czynników w surowicy odpowiedzialnych za zmiany naczyniowe i ekspresja CD34 w chorobowo zmienionej skórze. *Przegląd Lekarski* 2009;66:1040-5
72. Eisendle K., Grabner T., Zelger B. Morphoea: a manifestation of infection with *Borrelia* species? *Br. J. Dermatol.* 2007;157:1189-98
73. El-Fékih N., Réjaibi I., Kamoun H. i wsp. Les sclérodermies localisées: étude rétrospective de 92 cas. *La Tunisie Medicale* 2009;87:573-8
74. El-Mofty M., Mostafa W., Esmat S. i wsp. Suggested mechanisms of action of UVA phototherapy in morphea: a molecular study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004;20:93-100
75. Epstein R.J. *Biologia molekularna człowieka*. Czelej, Lublin 2005
76. Farrel A.M., Dean D., Charnock M. i wsp. Distribution of transforming growth factor-beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3 and vascular endothelial growth factor in vulvar lichen sclerosus. *J. Reprod. Med.* 2001;46:117-24
77. Farrel A.M., Dean D., Millard P.R. i wsp. Cytokine alternations in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *Br. J. Dermatol.* 2006;155:931-40
78. Faust S.M., Lu B., Marini B.L. i wsp. Role of T cell TGFβ signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection. *J. Immunol.* 2009;183:7297-306
79. Ferzli G.T., El-Tal A., Kibbi A. i wsp. Localized morphea: a rare adverse effect of valproic acid. *Pediatr. Neurol.* 2003;29:253-5
80. Fort M.M., Cheung J., Yen D. i wsp. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th-2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15:985-95
81. Frisullo G., Nociti V., Iorio R. i wsp. IL17 and IFNγ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* 2008;44:22-5
82. Fujimoto M., Sato S., Ihn H., i wsp. Autoantibodies to mitochondrial 2-oxo-acid dehydrogenase complexes in localized scleroderma. *Clin. Exp. Immunol.* 1996;105:297-301
83. Furakawa Y., Yoshikawa H., Iwasa K. i wsp. Clinical efficacy and cytokine network-modulating effects of tacrolimus in myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* 2008;195:108-15
84. Gabrielli A., Svegliati S., Moroncini G. i wsp. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets. *Autoimmun. Rev.* 2007;7:121-6
85. Gaffen S. Structure and signaling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9:556
86. Gerceker-Turk B., Urkmez A., Kilinc Karaarslan I. i wsp. Unilateral generalized morphoea: could vibration be a stimulating factor? *Clin. Exp. Dermatol.* 2010;35:165-6
87. Glimour T.K., Wilkinson B., Breit S.N. i wsp. Analysis of dendritic cell populations using a revised histological staging of morphoea. *Br. J. Dermatol.* 2000;143:1183-92
88. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. i wsp. *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009
89. Guariso G., Conte S., Galeazzi F. i wsp. Esophageal involvement in juvenile localized scleroderma: a pilot study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2007;25:786-9
90. Gupta R.A., Fiorentino D. Localized scleroderma and systemic sclerosis: is there a connection? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2007;21:1025-36

91. Hammerich L., Heymann F., Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2011;345803
92. Harada M., Mitsuyama K., Yoshida H. i wsp. Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 1998;27:377-80
93. 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
94. Hasegawa M., Hamaguchi Y., Yanaba K. i wsp. B-lymphocyte depletion reduces skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse model for systemic sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2006;169:954-66
95. Hatamochi A., Ono M., Arakawa M. i wsp. Analysis of collagen gene expression by cultured fibroblasts in morphea. *Br. J. Dermatol.* 1992;126:216-21
96. Hausteil U.F. Scleroderma and pseudo-scleroderma: uncommon presentations. *Clin. Dermatol.* 2005;23:480-90
97. Hawk A., English J.C. 3rd localized and systemic scleroderma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 2001;20:27-37
98. Hayashi M., Ichiki Y., Kitajima Y. Coexistence of recurrent generalized morphea and systemic sclerosis. *Acta Derm. Venereol.* 2009;89:329-30
99. Heidary N., Cheung W., Wang N. i wsp. Eosinophilic fasciitis/generalized morphea overlap. *Dermatol. Online J.* 2009;15:2
100. Helmbold P., Fiedler E., Fischer M. i wsp. Hyperplasia of dermal microvascular pericytes in scleroderma. *J. Cutan. Pathol.* 2004;31:431-40
101. Hemdan N.Y.A., Birkenmeier G., Wichmann G. i wsp. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmunity Rev.* 2010;9:785-92
102. Herrick A.L., Ennis H., Bhushan M. i wsp. Incidence of childhood linear scleroderma and systemic sclerosis in the UK and Ireland. *Arthritis Care Res.* 2010;62:213-8
103. Herrmann T., Günther C., Csere P. Localized morphea – a rare but significant secondary complication following breast cancer radiotherapy. Case report and review of the literature on radiation reaction among patients with scleroderma/morphea. *Strahlenther Onkol.* 2009;185:603-7
104. 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
105. 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
106. Horlock C., Stott B., Dyson P.J. i wsp. The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2009;100:1061-7
107. <http://www.rtpimerdb.org/>
108. Hummers L.K., Hall A., Wigley F.M. i wsp. Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma. *J. Rheumatol.* 2009;36:576-82
109. 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

110. Hunzelmann N., Scharffetter-Kochanek K., Hager C. i wsp. Management of localized scleroderma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 1998;17:34-40
111. Hus I., Maciąg E., Roliński J. Znaczenie limfocytów Th17 w odporności przeciwnowotworowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2010;64:244-50
112. Igarashi A., Nashiro K., Kikuchi K. i wsp. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J. Invest. Dermatol.* 1996;106:729-33
113. 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.* 1994;31:591-5
114. Ihn H., Sato S., Fujimoto M. i wsp. Demonstration of interleukin-8 in serum samples of patients with localized scleroderma. *Arch. Dermatol.* 1994;130:1327-8
115. 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
116. 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
117. Ihn H., Yazawa N., Kubo M. i wsp. Circulating levels of CD30 are increased in patients with localized scleroderma and correlated with serological and clinical features of the disease. *J. Rheumatol.* 2000;27:698-702
118. Ihn H., Yamane K., Kubo M. i wsp. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum.* 2001;44:474-80
119. Iranzo P., Lopez I., Palou J. i wsp. Morphoea in three siblings. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2001;15:46-7
120. Ishikawa H., Takeda K., Okamoto A. i wsp. Induction of autoimmunity in bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129:1688-95
121. Jabłońska S. Scleroderma and pseudoscleroderma. Warszawa PZWL 1975
122. Jabłońska S., Błaszczak M. Is superficial morphea synonymus with atrophoderma Pasini-Pierini? *J. Am. Acad. Dermatol.* 2004;50:979-80
123. Jabłońska S., Majewski S. Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową. Warszawa PZWL 2006
124. Jacobson L., Palazij R., Jaworsky C. Superficial morphea. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003;49:323-5
125. Jäger A., Dardalhon V., Sobel R.A. i wsp. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* 2009;183:7169-77
126. Jaworsky C. Reply to Jabłońska S., Błaszczak M. Is superficial morphea synonymus with atrophoderma Pasini-Pierini? *J. Am. Acad. Dermatol.* 2004;50:980
127. 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
128. Jinnin M., Ihn H., Mimura Y. i wsp. Effects of hepatocyte growth factor on the expression of type I collagen and matrix metalloproteinase-1 in normal and scleroderma dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 2005;124:324-30

129. Jinnin M., Ihn H., Asano Y. i wsp. Platelet derived growth factor induced tenascin-C transcription is phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and mediated by Ets family transcription factors. *J. Cell. Physiol.* 2006;206:718-27
130. Johnson-Huang L.M., Suárez-Fariñas M., Sullivan-Whalen M. i wsp. Effective narrow-band UVB radiation therapy suppresses the IL-23/IL-17 axis in normalized psoriasis plaques. *J. Invest. Dermatol.* 2010;130:2654-63
131. Kähäri V.M., Sandberg M., Kalimo H. i wsp. Identification of fibroblast responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. *J. Invest. Dermatol.* 1988;90:664-70
132. Kadono T., Kikuchi K., Kubo M. i wsp. Serum concentrations of basic fibroblast growth factor in collagen diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996;35:392-7
133. Kamada N., Hisamatsu T., Okamoto S. i wsp. Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *J. Clin. Invest.* 2008;118:2269-80
134. Karasek M.A. Does transformation of microvascular endothelial cells into myofibroblasts play a key role in the etiology and pathology of fibrotic disease? *Med. Hypotheses* 2007;68:650-5
135. 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
136. Kawaguchi Y., Harigai M., Fukasawa C. i wsp. Increased levels of hepatocyte growth factor in sera of patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 1999;26:1012-3
137. Kawaguchi Y., Harigai M., Hara M. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2002;29:1877-83
138. Kencka D., Błaszczuk M., Jabłońska S. Atrophoderma Pasini-Pierini is a primary atrophic abortive morphea. *Dermatology* 1995;190:203-6
139. 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
140. Kim D.H., Lee K.R., Kim T.Y. i wsp. Coexistence of lichen sclerosus with morphea showing bilateral symmetry. *Clin. Exp. Dermatol.* 2009;34:416-8
141. Kleinschek M.A., Owyang A.M., Joyce-Shaikh B. i wsp. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 2007;204:161-70
142. Kobayasi T., Serup J. Nerve changes in morphea. *Acta Derm. Venereol.* 1983;63:321-7
143. Kobayasi T., Serup J. Vascular changes in morphea. *Acta Derm. Venereol.* 1985;65:116-20
144. Koenen H.J., Smeets R.L., Vink P.M. i wsp. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008;112:2340-52
145. Komura K., Fujimoto M., Hasegawa M. i wsp. Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 2008;35:120-5
146. Korn T., Bettelli E., Gao W. i wsp. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484-7
147. Kowalewski C., Kozłowska A., Górka M. i wsp. Alterations of basement membrane zone and cutaneous microvasculature in morphea and extragenital lichen sclerosus. *Am. J. Dermatopathol.* 2005;27:489-96

148. Krell J.M., Solomon A.R., Glavey C.M. i wsp. Nodular scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995;32:343-5
149. Kreuter A., Krieg T., Worm M. i wsp. Diagnosis and therapy of localized scleroderma. *J. Detsch. Dermatol. Ges.* 2009;7 suppl. 6:S1-S14
150. Kroenke M.A., Carlson T.J., Adjelkovic A.V. i wsp. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J. Exp. Med.* 2008;205:1535-41
151. Kroft E.B., Berkhof N.J., van de Kerkhof P.C. i wsp. Ultraviolet A phototherapy for sclerotic skin diseases: a systematic review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008;59:1017-30
152. Kubo M., Ihn H., Yamane K. i wsp. Up-regulated expression of transforming growth factor β receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2001;44:731-4
153. Kühnl P., Sibrowski W., Kalmar G. i wsp. HLA-antigen frequencies in patients with progressive systemic sclerosis and morphea. *Beit. Infusionsther.* 1990;26:287-9
154. Kurasawa K., Hirose K., Sano H. i wsp. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2455-63
155. Laurence A., Tato C.M., Davidson T.S. i wsp. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26:371-81
156. Leitenberger J.J., Cayce R.L., Haley R.W. i wsp. Distinct autoimmune syndromes in morphea: a review of 245 adult and pediatric cases. *Arch. Dermatol.* 2009;145:545-50
157. LeRoy E.C., Black C., Flieschmajer R. i wsp. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subset and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 1988;15:202-5
158. Lever W.F., Schaumburg-Lever G. Histopathology of the skin. Lippincott Company 1990
159. Lipko-Godlewska S. Wybrane cytokiny w procesie włóknienia skóry i tkanki podskórnej w różnych postaciach twardziny. Rozprawa doktorska. Kraków 2005, Katedra i Klinika Dermatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
160. Lipko-Godlewska S., Wojas-Pelc A. Stężenie INF γ w surowicy chorych na twardzinę skórną plackowatą i atrophodermia Pasini-Pierini z uwzględnieniem klinicznej aktywności choroby. *Post. Dermatol. Alergol.* 2008;25:214-9
161. Lis-Święty A., Rogala-Poborska I., Wyględowska-Kania M., Brzezińska-Wcisło L. Disabling pansclerotic morphea u dorosłej kobiety. *Dermatologia Estetyczna* 2008;54:62-6
162. Liu B., Connolly M.K. The pathogenesis of cutaneous fibrosis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 1998;17:3-11
163. Liu X.K., Lin X., Gaffen S.L. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 2004;279:52762-71
164. Liu Y., Rajur K., Tolbert E. i wsp. Endogenous hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal injury by activating matrix degradation pathways. *Kidney Int.* 2000;58:2028-43
165. Liu Z., Yuan X., Luo Y. i wsp. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. *Cytokine* 2009;45:141-7
166. Longo F., Saletta S., Lepore L. i wsp. Localized scleroderma after infection with Epstein-Barr virus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1993;11:681-3

167. Lo Re S., Dumoutier L., Couillin I. i wsp. IL-17A-producing $\gamma\delta$ T and Th17 lymphocytes mediate lung inflammation but not fibrosis in experimental silicosis. *J. Immunol.* 2010;184:6367-77
168. Ludwig R.J., Werner R.J., Winker W. i wsp. Chronic venous insufficiency – a potential trigger for localized scleroderma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2006;20:96-9
169. Luheshi N.M., Rothwell N.J., Brough D. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. *British Journal Pharmacology* 2009;157:1318-29
170. Luzina I.G., Atamas S.P., Wise R. i wsp. Gene expression in bronchoalveolar lavage cells from scleroderma patients. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2002;26:549-57
171. Łojko A., Komarnicki M. Naczyniowo-śródłonkowy czynnik wzrostu a angiogeneza w chorobach nowotworowych. *Współczesna Onkologia* 2004;8:1-4
172. Maas-Szabowski N., Fusenig N.E. Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1996;107:849-55
173. 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
174. Majewski S. Zmiany naczyniowe i zaburzenia immunologiczne w twardzinie – ich wzajemne powiązania. Praca habilitacyjna, Akademia Medyczna, Warszawa 1988
175. Manel N., Unutmaz D., Littman D.R. i wsp. The differentiation of human Th17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat. Immunol.* 2008;9:641-9
176. Maragh S.H., Davis M.D., Bruce A.J. i wsp. Disabling pansclerotic morphea: clinical presentation in two adults. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005;53:S115-9
177. Marzano A.V., 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
178. Masi A., Rodnan G., Medsger T. i wsp. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980;23:581-90
179. Mason J.C., Lidington E.A., Ahmad S.R. i wsp. bFGF and VEGF synergistically enhance endothelial cytoprotection via decay-accelerating factor induction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001;282:C578-87
180. Mattila L., Airola K., Ahonen M. i wsp. Activation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 [TIMP-3] mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1998;110:416-21
181. Mattozzi C., Richetta A.G., Cantisani C. i wsp. Morphea, an unusual side effect of anti-TNF- α treatment. *Eur. J. Dermatol.* 2010;20:400-1
182. Mayes M.D. Classification and epidemiology of scleroderma. *Sem. Cutan. Med. Surg.* 1998;17:22-6
183. McGeachy M.J., Chen Y., Tato C.M. i wsp. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* 2009;10:314-24
184. McNiff J.M., Glusac E.J., Lazova R.Z. i wsp. Morphea limited to the superficial reticular dermis: an underrecognized histologic phenomenon. *Am. J. Dermatol.* 1999;21:315-9

185. Meffert J.J., Davis B.M., Grimwood R.E. Lichen sclerosus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995;32:393-416
186. Meloni F., Solari N., Cavagna L. i wsp. Frequency of Th1, Th2 and Th17 producing T lymphocytes in bronchoalveolar lavage of patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2009;27:765-72
187. Mihas A.A., Abou-Assi S.G., Heuman D.M. Cutae morphea associated with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2003;39:458-9
188. Miklaszewska M., Wąsik F. Dermatologia pediatryczna. Wrocław 2000, Volumes
189. Mimura Y., Ihn H., Jinnin M., i wsp. Rheumatoid factor isotypes in localized scleroderma. *Clin. Exp. Dermatol.* 2005;30:405-8
190. Mimura Y., Ihn H., Jinnin M., i wsp. Anti-agalactosyl immunoglobulin G antibodies in localized scleroderma. *Int. J. Dermatol.* 2005;44:817-20
191. Mimura Y., Ihn H., Jinnin M. i wsp. Epidermal growth factor affects the synthesis and degradation of type I collagen in cultured human dermal fibroblasts. *Matrix Biology* 2006;25:202-12
192. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect.* 2009;11:625-30
193. Mitroulis I., Skendros P., Ritis K. Targeting IL-1 β in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome. *Eur. J. Int. Med.* 2010;21:157-63
194. Mitsdoerffer M., Lee Y., Jäger A. i wsp. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010;107:14292-7
195. Mizuno S. i wsp. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J. Clin. Invest.* 1998;101:1827-34
196. Mok M.Y., Wu H.J., Lo Y. i wsp. The relations of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to TH1/TH2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 2010;37:2046-52
197. Montagna P., Medori R., Zappia M. i wsp. Gowers local panatropy. *Ital. J. Neurol. Sci.* 1984;5:457-9
198. Moretti S., Spallanzani A., Pinzi C. Skin angiogenesis: biologic bases for pathological processes. *Clinics in Dermatology* 1999;17:629-31
199. Morfin Maciel B.M., Castillo Morfin B.M. Scleroderma related to specific immunotherapy. A report of a case. *Rev. Alerg. Mex.* 2009;56:136-45
200. Mosterd K., Winnepennickx V., Vermeulen A., i wsp. Morphea following surgery and radiotherapy: an evolving problem. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2009;23:1099-101
201. Moulin C., Cavailles A., Balme B. i wsp. Morphoea-like plaques revealing an eosinophilic (Shulman) fasciitis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2009;34:851-3
202. Mukaddes K., Ilkin Z., Cuyan D. i wsp. Intertriginous bullous morphea: a clue for the pathogenesis? *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2007;73:262-4
203. Murata M., Fujimoto M., Matsushita T. i wsp. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? *J. Dermatol. Sci.* 2008;50:240-2
204. Murdaca G., Colombo B.M., Puppo F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern. Emerg. Med.* 2011; ahead of print

205. Murell D.F. A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993;28:78-85
206. Murugaiyan G., Mittal A., Weiner H.L. Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN- γ limits IL-17-mediated autoimmune inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010;107;11495-500
207. 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
208. Nagai Y., Igarashi N., Ishikawa O. Generalized morphea-like systemic sclerosis: a subtype of diffuse cutaneous systemic sclerosis presenting with unusual cutaneous features. *Eur. J. Dermatol.* 2008;18:715-6
209. Nakashima T., Jinnin M., Ikko K. i wsp. Regulatory mechanisms of collagen expression by interleukin-17 signaling scleroderma fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 2010;130 suppl 2:S10
210. Nakaya I., Wada T., Furuichi K. i wsp. Blockade of IP-10/CXCR3 promotes progressive renal fibrosis. *Nephron Exp. Nephrol.* 2007;107:12-21
211. Namiecińska M., Marciniak K., Nowak J.Z. VEGF jako czynnik angiogeny, neurotroficzny i neuroprotekcynny. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2005;59:573-83
212. Namysł J. Identyfikacja i analiza ekspresji endogennych sekwencji retrowirusowych oraz genów kodujących wybrane cytokiny i ich receptory w przebiegu twardziny układowej i różnych odmian klinicznych łuszczycy. Rozprawa doktorska. Poznań 2006, Katedra i Klinika Dermatologii AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
213. Nelson A.M. Localized scleroderma including morphea, linear scleroderma, and eosinophilic fasciitis. *Curr. Probl. Pediatr.* 1996;9:105-11
214. Niedbala W., Wei X.Q., Cai B. i wsp. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effect against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 2007;37:3021-9
215. Numasaki M., Watanabe M., Suzuki T. i wsp. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J. Immunol.* 2005;175:6177-89
216. Nurieva R., Yang X.O., Martinez G. i wsp. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007;448:480-3
217. O'Connor W., Zenewicz L.A., Flavell R.A. The dual nature of Th17 cells: shifting the focus to function. *Nature Immunol.* 2010;11:471-6
218. Ogawa A., Andoh A., Araki Y. i wsp. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Immunol.* 2004;110:55-62
219. Ohmatsu H., Tada Y., Yazawa N. i wsp. Generalized morphea positive for anticentromere antibody. *Eur. J. Dermatol.* 2008;18:718-9
220. Okunishi K., Dohi M., Fujio K. i wsp. Hepatocyte growth factor significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* 2007;179:5504-13
221. Olewicz-Gawlik A., Dańczak-Pazdrowska A., Klama K. i wsp. Decreased serum levels of C-type natriuretic peptide in patients with localized scleroderma. Praca prezentowana na 17. Kongresie EADV, Paryż 2008
222. Olewicz-Gawlik A., Dańczak-Pazdrowska A., Klama K. i wsp. Increased serum levels of soluble E-selectin and P-selectin in patients with localized scleroderma. Praca prezentowana na 17. Kongresie EADV, Paryż 2008

223. 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
224. Onishi R.M., Gaffen S.L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010;129:311-21
225. Orzechowski N.M., Davis D.M., Mason T.G. 3rd i wsp. Health-related quality of life in children and adolescents with juvenile localized scleroderma. *Rheumatology* 2009;48:670-2
226. Oyama N., Chan I., Neill S.M. i wsp. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *Lancet* 2003;362:118-23
227. Ozcelik O., Haytac C., 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
228. Pandya N.M., Dhalla N.S., Santani D.D. Angiogenesis – a new target for future therapy. *Vascul. Pharmacol.* 2006;44:265-74
229. Pappu B.P., Angkasekwinai P., Dong C. Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: new lessons learned from interleukin 17 family cytokines. *Pharmacol. Ther.* 2008;117:374-84
230. Pappu R., Ramirez-Carrozzi V., Ota N. i wsp. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J. Clin. Immunol.* 2010;30:185-95
231. Parham C., Chirica M., Timans J. i wsp. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* 2002;168:5699-708
232. Patrizi A., Marzaduri S., Marini R. A familial case of scleroderma en coup de sabre. *Acta Derm. Venereol.* 2000;80:237
233. Pattyn, F., Speleman, F., De Paepe A. i wsp. RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Research.* 2003;31:122-3
234. Peltonen J., Kähäri L., Jaakkola S. i wsp. Evaluation of transforming growth factor beta and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization. *J. Invest. Dermatol.* 1990;94:365-71
235. Peterson L.S., Nelson A.M., Su W.P. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin. Proc.* 1995;70:1068-76
236. Peterson L.S., Nelson A.M., Su W.P. i wsp. The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted Country 1960-1993. *J. Rheumatol.* 1997;24:73-80
237. Petrov I., Gantcheva M., Miteva L. i wsp. Lower lip squamous cell carcinoma in disabling pansclerotic morphea of childhood. *Pediatr. Dermatol.* 2009;26:59-61
238. Phumethum V., Jamal S., Johnson S.R. Biologic therapy for systemic sclerosis: a systematic review. *J. Rheumatol.* 2011;38:289-96
239. Potzl J., Botteron C., Tausch E. i wsp. Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination. *PLoS ONE* 2008;3:e2951
240. Prinz J.C., Kutasi Z., Weisenseel P. i wsp. "Borrelia-associated early-onset morphea": a particular type of scleroderma in childhood and adolescence with high titer antinuclear antibodies? Results of a cohort analysis and presentation of three cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2009;60:248-55

241. Querfeld C., Eckes B., Huerkamp C. i wsp. Expression of TGF- β 1, - β 2 and - β 3 in localized and systemic scleroderma. *J. Dermatol. Sci.* 1999;21:13-22
242. Radstake T.R., van Bon L., Broen J. i wsp. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGF β and INF γ distinguishes SSc phenotypes. *PLoS ONE* 2009a;4:e5903
243. Radstake T.R., van Bon L., Broen J. i wsp. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF β expression. *PLoS ONE* 2009b;4:e5981
244. Restrepo J.F., 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
245. Rokicki W., Rubisz-Brzezińska J., Dukalska M. i wsp. Echocardiography examinations in children suffering from cutaneous forms of scleroderma. *Pol. Merkur. Lekarski* 1996;1:407-9
246. Romagnani S., Maggi E., Liotta F. i wsp. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol. Immunol.* 2009;47:3-7
247. Romero L. I., Zhang D.N., Cooke J.P. i wsp. Differential expression of nitric oxide by dermal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma. *Vasc. Med.* 2000;5:147-58
248. Rouvier E., Luciani M.F., Mattéi M.G. i wsp. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol.* 1993;150:5445-56
249. Saleh Z., Arayssi T., Saleh Z. i wsp. Superficial morphea: 20-year follow up in a patient with concomitant psoriasis vulgaris. *J. Cutan. Pathol.* 2009;36:1105-8
250. Santarlaschi V., Maggi L., Capone M. i wsp. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 2009;39:207-15
251. 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
252. Schnyder B., Schnyder-Candrian S., Pansky A. i wsp. IL-17 reduces TNF-induced Rantes and VCAM-1 expression. *Cytokine* 2005;31:191-202
253. Sgonc R., Gruschwitz M.S., Dietrich H. i wsp. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest.* 1996;98:785-92
254. Shabrawi-Caelen El., Poelt P., Aberer W. i wsp. Progressive circumscribed sclerosis – a novel side-effect of immunotherapy with aluminium-absorbed allergen extracts. *Allergy* 2009;64:965-967
255. Shahin A.A., Esmat S.M., Shaker O.G. i wsp. Role of the free radical release process in the pathogenesis of morphea in contrast to systemic sclerosis. *Mod. Rheumatol.* 2001;11:321-7
256. Shi Y., Wang H., Su Z. i wsp. Differentiation imbalance of Th1/Th17 in peripheral blood mononuclear cells might contribute to pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Scand. J. Immunol.* 2010;72:250-5
257. Silny W., Płusa T., Stępień B. i wsp. Wyniki oznaczeń przeciwko *Borrelia burgdorferi* u chorych na twardzinę ograniczoną. *Pol. Tyg. Lek.* 1996;329:23-6

258. Singh T.P., Schön M.P., Wallbrecht K. i wsp. 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A therapy acts via inhibition of the IL-23/Th17 axis and induction of Foxp3+ regulatory T cells involving CTLA4 signaling in a psoriasis-like skin disorder. *J. Immunol.* 2010;184:7257-67
259. Skobieranda K., Helm K.F. Decreased expression of the human progenitor cell antigen (CD34) in morphea. *Am. J. Dermatopathol.* 1995;17:471-5
260. Soldano S., Montagna P., Villaggio B. i wsp. Endothelin and sex hormones modulate the fibronectin synthesis by cultured human skin scleroderma fibroblasts. *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68:599-602
261. Soma Y., Tamaki T., Kikuchi K. i wsp. Coexistence of morphea and systemic sclerosis. *Dermatology* 1993;186:103-5
262. 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
263. Spirer Z., Ilie B., Pick I.A. i wsp. Localized scleroderma following varicella in a three-year-old girl with IgA deficiency. *Acta Paediatr. Scand.* 1979;68:783-5
264. Srinivasan S.K., DiMaio D. Superficial morphea in a man. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2004;51:S156-8
265. Stanisz A. Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STSTATISTICA PL na przykładach z medycyny. STANTSOFT, Kraków 2007
266. Stone J., Franks A.J., Guthrie J.A. i wsp. Scleroderma "en coup de sabre": pathological evidence of intracerebral inflammation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001;70:382-5
267. Sutton C., Brereton C., Koegh B. i wsp. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2006;203:1685-91
268. Takahashi H., Numasaki M., Lotze M.T. i wsp. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunology Letters* 2005;98:189-93
269. Takahashi H., Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 2005;109:227-41
270. Takehara K., Sato S. Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology* 2005;44:274-9
271. Tamura M., Ishikawa O. An increase of mature type skin collagen cross-link, histidinohydroxylysinonorleucine, in the sclerotic skin of morphea. *J. Dermatol. Sci.* 2001;25:83-6
272. Tanasescu C., Balanescu E., Balanescu P. i wsp. IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *Eur. J. Intern. Med.* 2010;21:202-7
273. Toledano C., Rabhi S., Kettaneh A. i wsp. Localized scleroderma: a series of 52 patients. *Eur. J. Intern. Med.* 2009;20:331-6
274. Tollefson M.M., Witman P.M. En coup de sabre morphea and Parry-Romberg syndrome: a retrospective review of 54 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007;56:257-63
275. 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

276. Trattner A., Figer A., David M. i wsp. Circumscribed scleroderma induced by post-lumpectomy radiation therapy. *Cancer* 1991;68:2131-3
277. Trevisan G., Stinco G., Nobile C. i wsp. Detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsies from patients with morphea by polymerase chain reaction. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 1996;6:15-9
278. Tuffanelli D.L. Localized scleroderma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 1998;17:27-33
279. Uziel Y., Krafchik B.R., Feldman B. i wsp. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor. A marker of disease activity in localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1994;37:898-901
280. Uziel Y., Krafchik B.R., Silverman E.D. i wsp. Localized scleroderma in childhood: a report of 30 cases. *Semin. Arthritis. Rheum.* 1994;23:328-40
281. Uziel Y., Laxer R.M., Krafchik B.R. i wsp. Children with morphea have normal self-perception. *J. Pediatr.* 2000;137:727-30
282. Uziel Y., Feldman B.M., Krafchik B.R. i wsp. Increased serum levels of TGF β 1 in children with localized scleroderma. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* 2007;5:22
283. Vanaudenaerde B.M., Wuyts W.A., Geudens N. i wsp. Macrolides inhibit IL-17-induced IL-8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells. *Am. J. Transplant.* 2007;7:76-82
284. van Beelen A.J., Teunissen M.B.M., Kapsenberg M.L. i wsp. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007;7:374-81
285. Varga J., Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J. Clin. Invest.* 2007;117:557-67
286. Venneker G.T., Das P.K., 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
287. Vierra E., Cunningham B.B. Morphea and localized scleroderma in children. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 1999;18:210-25
288. Volpe E., Servant N., Zollinger R. A critical function for transforming growth factor- β , interleukin-23 and proinflammatory cytokines in driving and modulation human Th17 responses. *Nat. Immunol.* 2008;9:650-7
289. Vuorio T., Mäkelä J.K., Kähäri V.M. i wsp. Coordinated regulation of type I and type III collagen production and mRNA levels of pro alpha 1(I) and pro alpha 2(I) collagen in cultured morphea fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 1987;279:154-60
290. Walters R., Pulitzer M., Kamino H. Elastic fiber pattern in scleroderma/morphea. *J. Cutan. Pathol.* 2009;36:952-7
291. Wojas-Pelc A. Twardzina głęboka i choroby twardzinopodobne skóry z zajęciem powięzi: badania ultrastrukturalne i immunohistochemiczne. Rozprawa habilitacyjna, Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003
292. Wollenberg A., Baumann L., Plewig G. Linear atrophoderma of Moulin: a disease which follows Blaschko's lines. *Br. J. Dermatol.* 1996;135:277-9
293. Wolnik-Trzeciak G., Bowszyc-Dmochowska M., Dańczak-Pazdrowska A. i wsp. Budowa i czynność transglutaminaz oraz ich rola w opryszczkowatym zapaleniu skóry. *Dermatologia Kliniczna* 2005;7:37-43
294. Woźniak J., Dąbrowski R., Łuczak D. i wsp. Evaluation of heart rhythm variability and arrhythmia in children with systemic and localized scleroderma. *J. Rheumatol.* 2009;36:191-6

295. Wu M.H., Yokozeki H., Takagawa S. i wsp. Hepatocyte growth factor both prevents and ameliorates the symptoms of dermal sclerosis in a mouse model of scleroderma. *Gene. Ther.* 2004;11:170-80
296. Xie Y., Zhang X., Inoue Y. i wsp. Expression of CD1a and CD86 on scleroderma Langerhans cells. *Eur. J. Dermatol.* 2008;18:50-4
297. Xie Y., Zhang X., Wakasugi S. i wsp. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in localized scleroderma. *Int. J. Dermatol.* 2008;47:438-42
298. Xie-yi Z., Jian-zhong Z., Ping T. 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
299. Yamakage A., Ishikawa H. Generalized morphea-like scleroderma occurring in people exposed to organic solvents. *Dermatologica* 1982;165:186-93
300. Yamamoto T., Takagawa S., Katayama I. i wsp. Effect of superoxide dismutase on bleomycin-induced dermal sclerosis: implications for the treatment of systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* 1999;113:843-7
301. Yamamoto T., Matsushita M., Yokozeki H. Role of cytokines in scleroderma: use of animal models. *Clin. Applied. Immunol. Rev.* 2006;6:1-19
302. Yamamura K., Ito K., Tsukioka K. i wsp. Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation. *Circulation* 2004;110:1650-7
303. Yamanaka C.T., Gibbs N.F. Trauma-induced linear scleroderma. *Cutis* 1999;63:29-32
304. Yamanaka K., Inaba T., Nomura E. i wsp. Basic fibroblast growth factor treatment for skin ulcerations in scleroderma. *Cutis* 2005;76:373-6
305. Yamanaka M., Ishikawa O. Guttate morphea in scleroderma spectrum disorder patient with anticentromere antibody. *Eur. J. Dermatol.* 2009;19:630-1
306. 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
307. Yamazaki T., Yang X.O., Chung Y. i wsp. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J. Immunol.* 2008;181:8391-401
308. Yamazaki Y., Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol. Divers.* 2006;10:515-527
309. Yang L., Anderson D.E., Baecher-Allan C. i wsp. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008;454:350-2
310. Yang X.O., Panopoulos A.D., Nurieva R. i wsp. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem.* 2007;282:9358-63
311. Yao Z., Painter S.L., Fanslow W.C. i wsp. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 1995;155:5483-6
312. Yasuda H.E., Imai E., Shiota A. i wsp. Antifibrogenesis effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1996;24:636-42
313. Yen D., Cheung J., Scheerens H. i wsp. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1310-6
314. Yi T., Zhao D., Lin C.L. i wsp. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008;112:2101-10

315. York N.R., Jacob H.T. UVA1 phototherapy: a review mechanism and therapeutic application. *Int. J. Dermatol.* 2010;49:623-30
316. Yoshida H., Yoshiyuki M. Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol. Rev.* 2008;226:234-47
317. Yoshizaki A., Yanaba K., Iwata Y. i wsp. Cell adhesion molecules regulate fibrotic proces via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J. Immunol.* 2010;185:2502-15
318. Yu Q., Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes. Dev.* 2000;15:163-76
319. Zhang Q., Yamaza T., Kelly A.P. i wsp. Tumor-like stem cells derived from human keloid are governed by the inflammatory niche driven by IL-17/IL-6 axis. *PLoS ONE* 2009;4:e7798
320. Zhang Z., Zheng M., Bindas J. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2006;12:382-8
321. Zhou L., Nazarian A.A., Smale S.T. Interleukin-10 inhibits interleukin-12 p40 gene transcription by targeting a late event in the activation pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24:2385-96
322. 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
323. Zhou L., Ivanov I.I., Spolski R. i wsp. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 2007;8:967-74
324. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M. i wsp. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature* 2008;453:236-40
325. Zhou X., Kong N., Zou H. i wsp. Therapeutic potential of TGF- β -induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2011;44:43-50
326. Zollinger T., Mertz K.D., Schmid M. i wsp. *Borrelia* in granuloma annulare, morphea and lichen sclerosus: a PCR-based study and review of the literature. *J. Cutan. Pathol.* 2010;37:571-7
327. Zulian F., Vallongo C., Woo P. i wsp. Localized scleroderma in childhood is not just a skin disease. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2873-81
328. Zulian F., Vallongo C., de Oliveira S.K.F. i wsp. Congenital localized scleroderma. *J. Pediatr.* 2006;149:248-51
329. Živković S.A., Medsger T.A. Jr Myasthenia gravis and scleroderma: two cases and a review of the literature. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2007;109:388-91