

**„OCENA WYSTĘPOWANIA
I ZNACZENIA KLINICZNEGO
WYBRANYCH AUTOPRZECIWCIAŁ
W TWARDZINIE UKŁADOWEJ”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

lek. Paweł Żebryk

Katedra i Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik i promotor: dr hab. n. med. Mariusz J. Puszczewicz, prof. UM

Poznań 2013

*„Nie wiem, jak wyglądam w oczach świata, lecz dla siebie jestem tylko małym
chłopcem bawiącym się na plaży i cieszącym się, gdy od czasu do czasu znajdę
kamyk gładszy od innych lub muszlę ładniejszą od pozostałych,
podczas gdy ogromny ocean prawdy leży niezbadany przede mną.”*

Sir Isaac Newton (1642-1727)

**Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi
Panu dr hab. n. med. Mariuszowi J. Puszczewiczowi, prof. UM
za pomoc w planowaniu i merytorycznej analizie niniejszego badania.**

**Pragnę także podziękować całemu personelowi
Katedry i Kliniki Reumatologii i Chorób Wewnętrznych
za pomoc w zbieraniu materiału kliniczno-laboratoryjnego.**

Spis treści

Skróty użyte w pracy	6
Rozdział I – Wstęp	8
Wprowadzenie	9
Twardzina układowa	10
Krótki rys historyczny	10
Epidemiologia	11
Patomechanizm	13
Przebieg kliniczny	14
Naczynia krwionośne	14
Skóra	19
Układ oddechowy	20
Układ krążenia	22
Układ pokarmowy	23
Układ mięśniowo-szkieletowy	25
Układ moczowy	27
Choroby współistniejące	28
Kryteria klasyfikacyjne	29
Zaburzenia immunologiczne	31
Autoprzeciwciała w twardzinie układowej	31
Przegląd literatury dotyczący nieklasycznych przeciwciał w twardzinie układowej	33
Przesłanki do podjęcia pracy	39
Rozdział II – Cel pracy	40
Rozdział III – Materiał i metody	42

Materiał.....	43
Metody.....	43
Etyka badania naukowego	48
Rozdział IV – Wyniki.....	49
Charakterystyka populacji badanej.....	50
Rozdział V - Dyskusja.....	62
Ograniczenia badania.....	72
Sugerowane kierunki dalszych badań.....	73
Rozdział VI - Wnioski.....	74
Streszczenie	76
Abstract.....	78
Załącznik 1 – Zgoda Komisji Bioetycznej.....	80
Spis rycin	81
Spis tabel.....	82
Rozdział VI – Piśmiennictwo	84

Skróty użyte w pracy

95%CI = *95% confidence interval** – 95% przedział ufności

ACA = *Anti-centromere antibodies* – przeciwciała przeciw centromerom

ACR = *American College of Rheumatology* – Amerykańskie Towarzystwo Reumatologiczne

AFA = *Anti-fibrillar antibodies* – przeciwciała przeciw fibrylarynie

AID = *Autoimmune disease* - choroba autoimmunologiczna

AMA = *Anti-mitochondrial antibodies* – przeciwciała przeciwmitochondrialne

ANA = *Anti-nuclear antibodies* – przeciwciała przeciwiądrowe

ANAP = ANA Profil 3 – test paskowy immunoblot firmy EUROIMMUN wykrywający przeciwciała przeciwiądrowe

ARA = *American Rheumatism Association* – wcześniejsza nazwa Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego

ATA = *Anti-topoisomerase I antibodies* – przeciwciała przeciw topoizomerazie I (anty-Scl70)

CD = *Cluster of differentiation* - antygen różnicowania komórkowego

CENP-A = *Centromere Protein A* - centromerowe białko A

CENP-B = *Centromere Protein B* - centromerowe białko B

CK = *Creatine kinase* – kinaza kreatynowa

CREST = *Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasias* – akronim będący konstelacją objawów często występujących wśród chorych na ograniczoną postać twardziny układowej (M34.1)

dcSSc = *diffuse cutaneous Systemic Sclerosis* – uogólniona skórna postać twardziny układowej (M34.0)

DLCO = *Diffusing capacity of the Lung for Carbon Monoxide* – badanie zdolności dyfuzji tlenu węgla w płucach

eGFR = *estimated Glomerular Filtration Rate* – szacunkowy współczynnik przesączania kłębuszkowego

ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - test immunoenzymatyczny

EUSTAR = *European Scleroderma Trial and Research* – międzynarodowa grupa powołana w celu konsolidacji badań naukowych nad twardziną układową

FEV1 = *Forced Expiratory Volume 1 second* – natężona objętość oddechu w ciągu 1 sekundy

FVC – *Forced Vital Capacity* – natężona pojemność życiowa

HLA = *Human Leukocyte Antigen* – antygen zgodności tkankowej

HRCT = *High Resolution Computed Tomography* – tomografia komputerowa wysokiej rozdzielczości

IIF = *Indirect Immunofluorescence* – metoda immunofluorescencji pośredniej

IL = *Interleukin* - interleukina

ILD = *Interstitial Lung Disease* – śródmiąższowa choroba płuc (J84)

lcSSc = *limited cutaneous Systemic Sclerosis* – ograniczona skórna postać twardziny układowej (M34.1)

ISSc = *limited Systemic Sclerosis* – ograniczona postać twardziny układowej

MEDS = *Minimal Essential Data Set* - zestaw kluczowych danych zbieranych przez EUSTAR gromadzonych dla celów badań naukowych nad twardziną układową

mRSS = *modified Rodnan Skin Score* – zmodyfikowana skala zajęcia skóry wg Rodnana

NYHA = *New York Heart Association* – skala klasyfikacji ciężkości niewydolności krążenia zaproponowana przez Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne

OR = *Odds Ratio* – iloraz szans

PAH = *Pulmonary Arterial Hypertension* – tętnicze nadciśnienie płucne (I27.2)

PBC = *Primary Biliary Cirrhosis* – pierwotna marskość żółciowa wątroby (K74.3)

PDGFR = *Platelet Derived Growth Factor Receptor* – receptor dla płytkowego czynnika wzrostu

PFT = *Pulmonary Function Tests* – testy czynnościowe płuc

RVSP = *Right Ventricular Systolic Pressure* – ciśnienie skurczowe prawej komory serca

SD = *Standard Deviation* – odchylenie standardowe

SIBO = *Small Intestinal Bacterial Overgrowth* – zespół przerostu flory bakteryjnej jelita cienkiego

SRC = *Scleroderma Renal Crisis* – twardzinowy przełom nerkowy

SSc = *Systemic Sclerosis* – twardzina układowa (M34)

SSP = *Systemic Sclerosis Profile* – test paskowy immunoblot firmy EUROIMMUN wykrywający przeciwciała charakterystyczne dla twardziny układowej

TGF β = *Transforming Growth Factor β* – transformujący czynnik wzrostu β

TLC = *Total Lung Capacity* – całkowita pojemność oddechowa

TNF α = *Tumor Necrosis Factor α* – czynnik martwicy nowotworów α

UMP = Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor* – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

*Kursywą zaznaczono w całej pracy nomenklaturę anglojęzyczną;

W nawiasach podano kod jednostki nozologicznej wg Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10.

Rozdział I – Wstęp

Wprowadzenie

Twardzina układowa zaliczana jest do grupy układowych chorób tkanki łącznej, które charakteryzują się zajęciem przez proces chorobowy licznych narządów i układów, czemu zawdzięczają taką nazwę. U podłoża większości chorób z tej grupy leży przewlekły proces zapalny o charakterze autoimmunologicznym, wyzwolony przez nieznane jak dotąd czynniki u osób genetycznie predysponowanych, co prowadzi do postępującego niszczenia tkanek i narządów.

Aktualna i powszechnie stosowana klasyfikacja tej grupy chorób została zaproponowana przez *American Rheumatism Association* (ARA, obecnie *American College of Rheumatology*, ACR) w 1983 roku i jest przedstawiona w Tabeli 1. [1].

Tabela 1. Klasyfikacja układowych chorób tkanki łącznej według *American Rheumatism Association*, 1983 [1]

UKŁADOWE CHOROBY TKANKI ŁĄCZNEJ WEDŁUG <i>AMERICAN RHEUMATISM ASSOCIATION</i>	
I.	Reumatoidalne zapalenie stawów
II.	Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów
III.	Toczeń rumieniowaty układowy
IV.	Twardzina układowa
V.	Zapalenie wielomięśniowe i zapalenie skórno-mięśniowe
VI.	Martwicze zapalenia naczyń i inne choroby naczyń: 1. Guzkowe zapalenie tętnic 2. Zapalenia naczyń z nadwrażliwości 3. Ziarniniak Wegenera 4. Olbrzymiokomórkowe zapalenia tętnic 1. Zapalenie tętnicy skroniowej 2. Zespół Takayasu 5. Choroba Kawasaki 6. Choroba Behçeta 7. Krioglobulinemia
VII.	Zespół Sjögrena
VIII.	Zespoły nakładania
IX.	Inne: 1. Zapalenie tkanki tłuszczowej 2. Rumień guzowaty 3. Nawracające zapalenie chrząstek 4. Zapalenie powięzi z eozynofilią 5. Choroba Still'a u dorosłych

Twardzina układowa

Twardzina układowa (ang. *systemic sclerosis*, łac. *scleroderma*) jest rzadką układową chorobą tkanki łącznej o nieznanej etiologii, nie do końca poznanej patogenezie i patomechanizmie, w którym kluczową rolę odgrywają zaburzenia naczyń mikrokrążenia, złożone zaburzenia immunologiczne i rozległe włóknienie niemal wszystkich narządów organizmu człowieka [2].

Krótki rys historyczny

Pierwszy opis choroby sugerujący twardzinę układową pochodzi z czasów Hipokratesa (460-370 p.n.e.), jednak uważa się, iż z uwagi na niedokładność opisu objawów nie można być pewnym, że niewątpliwie dotyczą tej choroby [3]. Za pierwszy nowożytny opis uznaje się monografię włoskiego lekarza Curzio opublikowaną w Neapolu w 1753r. [4].

Horteloup w swojej pracy doktorskiej obronionej w Paryżu w 1865 opisał 30 przypadków chorych z twardziną układową i przypisał autorstwo terminu „*Scleroderma*” Gintracowi. Praca ta była istotna także z powodu pierwszego w literaturze opisu „miejscowej asfiksji” indukowanej zimnem zaobserwowanej po raz pierwszy przez Maurice Raynaud, znanej dzisiaj jako objaw Raynauda [5].

W XIX wieku twardzinę układową uważano za chorobę skóry, a zajęcie narządów wewnętrznych jako współistniejące i niezależne. Dopiero Matsui w 1924 roku na podstawie autopsji pięciu chorych wysunął podejrzenie zajęcia narządów w przebiegu choroby. W 1945 roku Goetz uznał ponad wszelką wątpliwość, że jest to choroba zajmująca wiele narządów, w tym skórę, jednak najważniejsze jej powikłania są konsekwencją objęcia procesem chorobowym narządów wewnętrznych. W związku z tym, uznał za zasadne odrzucenie terminu „*scleroderma*”, jako podkreślającego jedynie najbardziej oczywisty objaw i zaproponował termin: „postępująca twardzina układowa” [5].

Chorzy na twardzinę układową wywarli na Williamie Oslerze tak duże wrażenie, że napisał o tej jednostce nozologicznej w sposób niezwykle dramatyczny: „W swojej najbardziej zaawansowanej formie uogólniona *scleroderma* jest jedną z najgorszych chorób człowieka. Niczym Tytan powolnie usychał, i jak on pokonany, zrujnowany i wyniszczony, człowiek staje się dosłownie mumią zamkniętą w ciągle

zmniejszającej się, powolnie obkurczającej się skórze ze stali. Taki los nie został opisany w żadnej tragedii zarówno antycznej jak i nowoczesnej” [5].

Epidemiologia

Chorobowość w twardzinie układowej według różnych źródeł szacuje się na 50 do 300 chorych na milion mieszkańców, a zapadalność w granicach 2,3-22,8 na milion mieszkańców [2, 6, 7]. W Europie chorobowość jest większa na południu niż na północy kontynentu i ogólnie mniejsza niż w USA i Australii [8]. Niestety w literaturze brakuje danych epidemiologicznych dla Polski.

Rodzinne występowanie choroby u krewnych pierwszego stopnia obliczono na 1,4-1,6%. Krewni pierwszego stopnia chorych na twardzinę układową mieli 54 razy większe ryzyko zachorowania niż populacja ogólna, ale biorąc pod uwagę rzadkie występowanie choroby ryzyko bezwzględne nie przekracza 1%. Nie zmienia to faktu, że dodatni wywiad rodzinny jest najsilniejszym zidentyfikowanym czynnikiem ryzyka wystąpienia tej choroby [9].

Biorąc pod uwagę etniczność zaobserwowano większą zapadalność, chorobowość i śmiertelność u Afroamerykanów oraz częstsze występowanie uogólnionej postaci choroby w porównaniu do populacji białej [8]. Największą chorobowość (4690 na milion, ponad 10-krotnie większą niż populacja ogólna) w pojedynczej grupie etnicznej stwierdzono u Indian z plemienia Choctaw w Oklahomie (USA). Zhou i wsp. w analizie ich genomu w porównaniu do grupy kontrolnej zidentyfikowali potencjalne loci związane z wyższą częstością zapadalności na twardzinę układową m.in. w obrębie regionu HLA i genu *TOPO1* [10]. W innym badaniu związków alleli układu HLA klasy II stwierdzono istotne związki niektórych alleli z grup DRB1, DQB1, DQA1 oraz DPB1 z chorobą. Co ciekawe, wykazano związki poszczególnych alleli HLA z produkcją określonych przeciwciał u ich nosicieli (np. chorzy z allelem DPB1*1301 mieli 14-krotnie większe szanse na obecność przeciwciał przeciw topoizomerazie I wynoszący OR=14) [11]. Nie ulega więc wątpliwości, że czynniki genetyczne odgrywają rolę w patogenezie twardziny układowej.

Czynniki środowiskowe mogą także mieć pewne znaczenie w patogenezie choroby. Implikowano rolę rozpuszczalników organicznych, chlorku winylu, pestycydów, żywic epoksydowych, narażenia zawodowego na pył krzemowy, jednak żadna z tych substancji

nie wykazywała silnych i powtarzalnych związków z chorobą [7]. Niedawno Lipworth i wsp. wykazali w metaanalizie, że silikonowe implanty piersi nie zwiększają ryzyka zachorowania na układowe choroby tkanki łącznej w tym twardzinę układową [6, 12].

Czynniki ryzyka zgonu i śmiertelność

W dużym badaniu przyczyn i czynników ryzyka śmierci w twardzinie układowej stwierdzono medianę czasu trwania choroby o postaci uogólnionej (dcSSc) wynoszącą 7,1 lat, a w przypadku postaci ograniczonej (lcSSc) 15 lat. Najczęstszymi przyczynami zgonu związanymi bezpośrednio z chorobą były: włóknienie śródmiąższowe płuc (19%), tętnicze nadciśnienie płucne (14%), choroby mięśnia sercowego (14%) nierzadko prowadzące do zaburzeń rytmu serca, twardzinowy przełom nerkowy (4%), zmiany w przewodzie pokarmowym (3%) [6, 13]. Do przyczyn zgonu niezwiązanych z twardziną układową należały: infekcje (33%), nowotwory (31%), choroby układu sercowo-naczyniowego (29%), w tym u 25% przypadków autorzy podejrzewają, że choroba mogła się przyczynić do ich wystąpienia (zachłystowe zapalenie płuc, posocznica, krwotok do przewodu pokarmowego) [13].

Wśród niezależnych czynników ryzyka zgonu stwierdzono w malejącej kolejności: białkomocz, obecność tętniczego nadciśnienia płucnego w badaniu echokardiograficznym, chorobę restrykcyjną płuc, duszność powyżej NYHA II, zaburzenia dyfuzji tlenu węglą, wiek chorego i stopień zajęcia skóry według skali Rodnana (mRSS) – przy czym im większa wartość tych trzech ostatnich parametrów, tym większe ryzyko zgonu [13].

W badaniu populacji południowoaustralijskiej (n=786) czas przeżycia chorych na twardzinę układową był zdecydowanie krótszy niż populacji ogólnej: wystandaryzowany współczynnik zgonu wyniósł 1,46 (95%CI 1,28-1,69) [14].

Patomechanizm

Istnieje wiele dowodów na to, że twardzina układowa jest chorobą o podłożu autoimmunizacyjnym. Obecnie uważa się, że nieznany jak dotąd czynnik inicjuje przewlekły proces zapalny, który prowadzi do rozwinięcia objawów choroby. Jednym z przejawów autoagresji jest wysoka częstość występowania charakterystycznych autoprzeciwciał w surowicy pacjentów z twardziną układową, co jest przykładem zaburzenia odpowiedzi humoralnej układu immunologicznego [15].

Jednym z pierwszych etapów choroby jest uszkodzenie naczyń mikrokrążenia, zwłaszcza tętniczek. Między komórkami śródbłonna pojawiają się duże odstępy, co zaburza integralność tej warstwy ściany naczynia, a komórki ulegają wakuolizacji. Pojawia się naciek z komórek jednojądrzastych wokół naczyń i, co ciekawe, niektóre z naczyń wykazują pogrubienie błony wewnętrznej (łac. *intima*), prowadzące do zamknięcia ich światła i w konsekwencji do zmian niedokrwiennych. Przerzedzenie kapilar jest jedną z charakterystycznych cech twardziny układowej w jej zaawansowanym stadium. Paradoksalnie, mimo zubożenia ilości kapilar i obecności w surowicy wysokich stężeń VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), jako adaptacji do hipoksji, obserwuje się defekt angiogenezy, którego mechanizm molekularny jest nieznany [2].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o zaburzeniach homeostazy pomiędzy prozapalnymi limfocytami Th17 a subpopulacją limfocytów T regulatorowych, których rolą jest wygaszanie fizjologicznego procesu zapalnego i niedopuszczanie do autoagresji poprzez eliminację klonów rozpoznających antygeny własnego organizmu. Cytokinami uważanymi za istotne w rozwoju włóknienia są TGF β , IL-1 i IL-6. Mają one zdolność do aktywowania fibroblastów, stymulowania ich proliferacji, produkcji kolagenu oraz różnicowania „dziewiczych” limfocytów w kierunku Th17, których zwiększoną obecność udowodniono w tkankach chorych na twardzinę układową i uważa się, że mają one zdolność podtrzymywania przewlekłego procesu zapalnego [16].

Nadmierne odkładanie kolagenu typu I i V w tkankach, charakterystyczne dla twardziny układowej, nie ogranicza się do skóry, ale obejmuje narządy wewnętrzne m.in. serce, nerki, przewód pokarmowy i płuca [2]. Zajęcie narządów wewnętrznych wiąże się z głównymi przyczynami gorszego rokowania w tej jednostce chorobowej [14, 17].

Przebieg kliniczny

Naczynia krwionośne

Objaw Raynauda jest zazwyczaj jednym z pierwszych objawów twardziny układowej i wówczas mówimy o wtórnym objawie Raynauda. Polega on na nadmiernej reakcji kończyn na zimno lub stres, co manifestuje się klinicznie jako zmiana zabarwienia skóry palców rąk i stóp na białą (faza skurczu naczyń, rycina 1.), siną (sinica z powodu odtlenowania hemoglobiny, rycina 2.) oraz czerwoną (przekrwienie). W niektórych przypadkach objaw Raynauda może prowadzić do owrzodzeń opuszek palców, a w skrajnych okolicznościach do krytycznego niedokrwienia i martwicy paliczków [18, 19]. Poza kończynami objaw Raynauda może dotyczyć także nosa, płatków i małżowin usznych.

Patogeneza objawu Raynauda zarówno pierwotnego jak i wtórnego jest złożona i nie do końca poznana. Zjawisko to występuje gdy równowaga pomiędzy czynnikami naczynioskurczowymi a naczyniorozkurczowymi przechyli się w kierunku tych pierwszych. W badaniach nad patomechanizmem objawu Raynauda zwraca się uwagę na zaburzenia czynności komórek śródbłonna (nadprodukcja endoteliny-1, nadreaktywność receptorów α_2 -adrenergicznych), jak i ich uszkodzenie strukturalne, rolę zakończeń nerwowych i w najmniejszym stopniu na udział czynników wewnątrznaczyniowych [18].

Powszechnie uważa się, że w twardzinie układowej odpowiedź naczyniorozszerzająca śródbłonna jest upośledzona, natomiast istotnie zwiększona jest w nim produkcja czynników naczynioskurczowych, jak endotelina 1 i angiotensyna II. Zaburzenia strukturalne ściany naczyń pod postacią hiperplazji błony wewnętrznej w mikrokrążeniu i w obrębie tętnic palcowych rąk i stóp przyczyniają się do ich nieprawidłowego ukrwienia. Mikroangiopatia charakterystyczna dla twardziny układowej może być nieinwazyjnie obserwowana podczas wykonywania kapilaroskopii, gdzie przy użyciu mikroskopu lub oftalmoskopu poszukuje się nieprawidłowej morfologii kapilar [18, 20]. Według klasyfikacji z 2000 roku [21] wśród typowych zmian w badaniu kapilaroskopowym wałów paznokciowych u chorych na twardzinę układową wyróżnia się 3 grupy: wczesne, aktywne i późne. W fazie wczesnej typowa jest obecność pojedynczych megakapilar i mikrokrwotoków na tle względnie normalnych kapilar. W fazie aktywnej przeważają liczne megakapilary i mikrokrwotoki.

Natomiast w fazie późnej pojawiają się ogniska awaskularne (pozbawione naczyń) oraz naczynia drzewkowate, posiadające liczne odgałęzienia na skutek neoangiogenezy [21, 22].

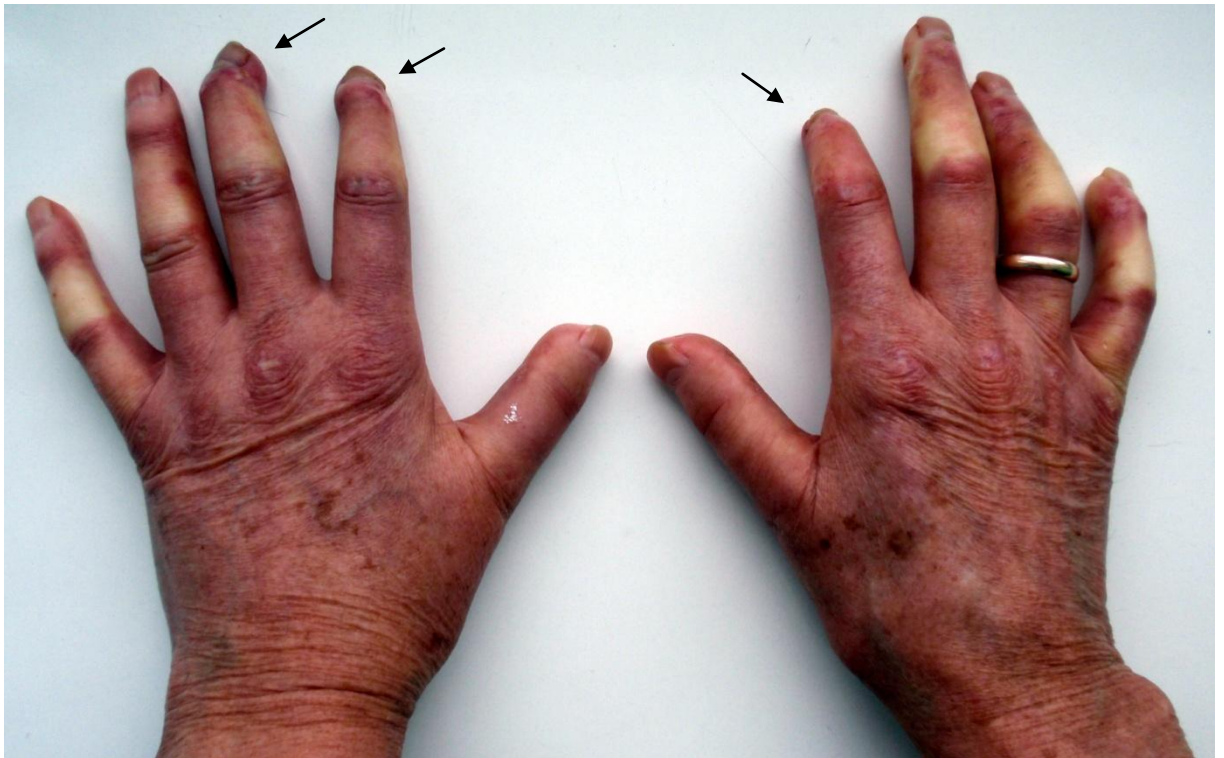
Kapilaroskopia ma przede wszystkim znaczenie w różnicowaniu pierwotnego i wtórnego objawu Raynauda [22]. Koenig i wsp. w badaniu prospektywnym 586 pacjentów z objawem Raynauda w ciągu 3197 osobolat stwierdzili częstość wystąpienia twardziny układowej w tej grupie chorych na 12,6%. Niezależnymi czynnikami ryzyka jej wystąpienia były obecność swoistych dla twardziny układowej przeciwciał i charakterystyczne zmiany w obrazie kapilaroskopowym. W przypadku występowania obu ww. czynników stwierdzono 60-krotnie większe ryzyko rozwoju twardziny układowej niż w grupie kontrolnej [23].



Rycina 1. Objaw Raynauda u chorego na twardzinę układową (faza skurczu naczyń). Fot. ze zbiorów własnych autora.



Rycina 2. Objaw Raynauda u chorej na twardzinę układową (faza zasinienia). Fot. ze zbiorów własnych autora.



Rycina 3. Zanik opuszków palców (strzałki) u chorej na twardzinę układową. Fot. ze zbiorów własnych autora.



Rycina 4. RTG rąk w projekcji a-p chorej ze zdjęcia powyżej (rycina 3.). Widoczna akroosteoliza paliczka II ręki prawej oraz II i III ręki lewej, zwapnienia zaznaczono strzałkami. Radiogram ze zbiorów własnych autora.



Rycina 5. Owrzodzenie paliczka w wyniku niedokrwienia (strzałka) z powodu wtórnego objawu Raynauda u chorej na twardzinę układową. Fot. ze zbiorów własnych autora.



Rycina 6. Ogniska hiper- i hipopigmentacji skóry u pacjentki u chorej na twardzinę układową. Fot. ze zbiorów własnych autora.

Skóra

Stwardnienie skóry jest charakterystycznym objawem twardziny układowej a jego nasilenie koreluje z zaawansowaniem zmian w narządach wewnętrznych. Pogrubienie i usztywnienie skóry wynika w początkowej fazie choroby z obrzęku, a z upływem czasu z nadmiernego odkładania kolagenu i macierzy pozakomórkowej w obrębie skóry właściwej, co uniemożliwia ujęcie skóry w prawidłowy fałd [24]. Ewolucja zmian skórnych przechodzi przez 3 etapy: fazę obrzęku, następnie stwardnienia i w końcu fazę zanikową [2, 25].

W fazie obrzękowej pacjenci najczęściej skarżą się na spuchnięte palce rąk, zwłaszcza po przebudzeniu, natomiast później wspomniany objaw występuje w sposób ciągły. Obrzęk jest zazwyczaj niepodatny na ucisk, bezbolesny i często towarzyszy mu objaw Raynauda. [25]. U jego podłoża obrzęku leży uszkodzenie naczyń mikrokrążenia oraz przewlekły proces zapalny, które są najprawdopodobniej pierwszym etapem choroby [26].

Obrzęknięta skóra stopniowo staje się twarda i napięta (faza stwardnienia), co w postaci uogólnionej choroby (*diffuse cutaneous Systemic Sclerosis*, dcSSc) trwa od kilku miesięcy do kilku lat, a w ograniczonej (*limited cutaneous Systemic Sclerosis*, lcSSc) zazwyczaj 5-15 lat. Skóra staje się połyskliwa i przytwierdzona do tkanki podskórnej. Skóra właściwa jest istotnie pogrubiała, natomiast naskórek ulega ścieńczeniu, co prowadzi do utraty bruzd naskórka (m.in. linii papilarnych). Następuje także niszczenie przez otaczający kolagen gruczołów potowych, łojowych i mieszków włosowych w górnej części skóry właściwej, co objawia się utratą włosów i zmniejszoną potliwością. Charakterystyczne są ogniska hiper- i hipopigmentacji skóry (rycina 6.). Na twarzy zwraca uwagę uwydatnienie nosa i nieco „mysi” jej wygląd (niem. *Mauskopf*). Stwardnienie skóry w lcSSc jest zdecydowanie mniej wydatne niż obserwowane teleangiektazje, odpowiadające skupieniom poszerzonych i poskręcanych pętli kapilar [25].

Po wielu latach stwardniała skóra ulega zmiękczeniu (faza zaniku lub atrofii) i albo powraca do pierwotnej grubości, bądź też staje się jeszcze cieńsza niż normalnie, a jednocześnie przytwierdza się do tkanki podskórnej, co można pomylić z pogrubieniem skóry [24, 25].

Owrzodzenia skóry w twardzinie układowej mają pochodzenie wieloczynnikowe. Te na opuszkach palców najczęściej mają etiologię niedokrwienną (rycina 5.), natomiast te zlokalizowane nad wyniosłościami kostnymi, a zwłaszcza stawami międzypaliczkowymi i łokciowymi, prawdopodobnie spowodowane są przykurczami, dużym stopniem napięcia skóry, ścięciem naskórka i urazami [25].

Zwapnienia różnej wielkości (od małych ziaren, aż po duże konglomeraty) występują zazwyczaj na opuszkach palców (rycina 4.), w tkankach okołostawowych i miejscach podatnych na ucisk (kaletka wyrostka łokciowego, powierzchnia wyprostna przedramion, okolice rzepki i pośladki) [25].

Układ oddechowy

Zajęcie układu oddechowego wiąże się z istotną chorobowością i śmiertelnością wśród chorych na twardzinę układową [27]. Najczęściej przybiera ono postać choroby śródmiąższowej płuc związanej z twardziną układową (*Systemic Sclerosis related Interstitial Lung Disease*, SSc-ILD), zwanej często w uproszczeniu włóknieniem śródmiąższowym płuc.

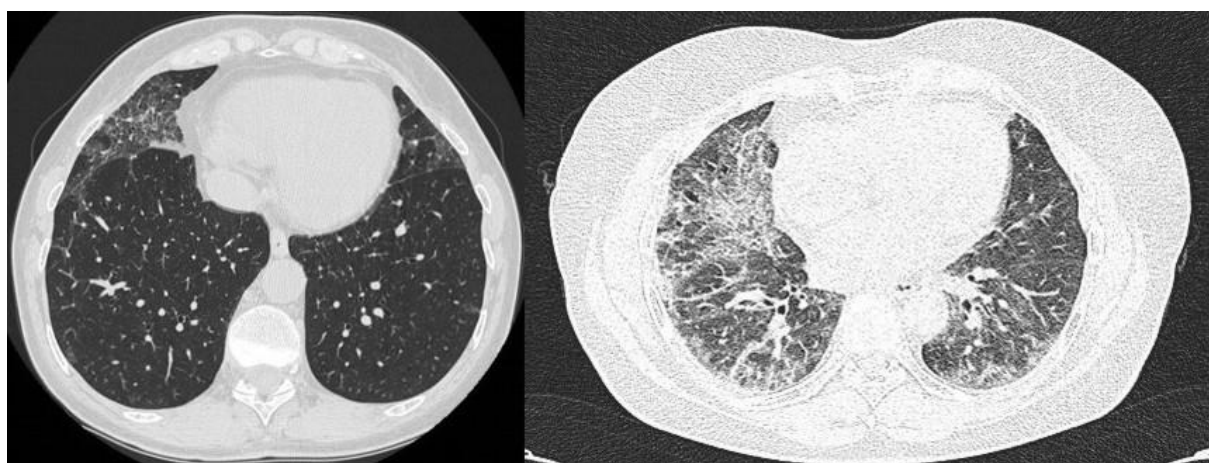
Występowanie SSc-ILD stwierdzone w HRCT wynosi wg różnych doniesień 60-91% [28, 29], a na podstawie badań autopsyjnych 74-100% [30]. Mimo to tylko część pacjentów ma objawy i postępujące upośledzenie funkcji układu oddechowego [28].

W badaniach radiologicznych SSc-ILD charakteryzuje się trzema podstawowymi obrazami: włóknienia płucnego (*Pulmonary Fibrosis*, PF, rozumianego jako siateczkowate pogrubienie miąższu wewnątrzrzazikowego, poszerzenia oskrzeli z pociągania i poszerzenia oskrzelików), mlecznej szyby i plastra miodu. Goldin i wsp. na podstawie obrazów HRCT stwierdzili wśród pacjentów z twardziną układową i towarzyszącymi objawami z układu oddechowego częstość włóknienia płucnego u 92,3%, obraz mlecznej szyby u 49,4% i plastra miodu u 37,2%. Wykazali także ujemną korelację rozległości włóknienia płuc z wynikami badań czynnościowych: FVC, DLCO i TLC. Klinicznie zajęcie układu oddechowego w tej grupie chorych charakteryzowała duszność (100%), kaszel (67,9%), nadmierne wydzielanie plwociny (46,1%) [29].

Moore i wsp. stwierdzili trzykrotnie większe ryzyko śmierci lub pogorszenia funkcji oddechowej (definiowane jako potrzeba tlenoterapii ambulatoryjnej lub przeszczepu płuc) u pacjentów z wyjściowym rozległym zajęciem miąższu płucnego w HRCT (>20%) w stosunku do chorych z ograniczonym zajęciem (<20%) [28]. Rycina 7. poniżej ilustruje charakterystyczny obraz włóknienia śródmiąższowego płuc w SSc-ILD.

Pod względem histopatologicznym w preparatach biopsyjnych płuc najczęściej stwierdzano niespecyficzne śródmiąższowe zapalenie płuc (*Nonspecific Interstitial Pneumonia*, NSIP), które radiologicznie koreluje z obrazem włóknienia płucnego (PF) i mleczej szyby. Na drugim miejscu pod względem częstości jest zwykłe śródmiąższowe zapalenie płuc (*Usual Interstitial Pneumonia*, UIP) [29], w którym dominuje obraz plastra miodu [31]. Oba histologiczne podtypy SSc-ILD charakteryzuje tendencja do obejmowania procesem chorobowym podstaw płuc [27].

Meier i wsp. stwierdzili w grupie chorych z EUSTAR (*European Scleroderma Trial and Research*) objawy duszności wysiłkowej u 35,3%, cechy włóknienia śródmiąższowego płuc na tradycyjnych radiogramach u 39,5%, używając HRCT u 51,9% (w tym obraz mleczej szyby u 29,8%), a w testach czynnościowych cechy restrykcji u 32% [32]. Należy jednak z dużą ostrożnością podchodzić do interpretacji przedstawionych wyników, zwłaszcza w kontekście badań obrazowych, gdyż brak danych aż u 37% osób z grupy badanej.



Rycina 7. Włóknienie śródmiąższowe płuc uwidocznione w badaniu HRCT w przebiegu twardziny układowej (po lewej zmiany wczesne, po prawej zaawansowane). Ze zbiorów autora pracy.

Układ krążenia

Zajęcie serca w przebiegu twardziny układowej przyjmuje różne formy od choroby małych naczyń (niedokrwienie mięśnia sercowego), poprzez włóknienie mięśnia sercowego, dysfunkcję skurczową i rozkurczową lewej komory, choroby osierdzia i zaburzenia rytmu serca (brady- i tachyarytmie). Uszkodzenie serca w przebiegu choroby dzieli się na pierwotne, gdzie narząd jest bezpośrednio zajęty, oraz wtórne do tętniczego nadciśnienia płucnego, choroby śródmiąższowej płuc lub choroby nerek [33].

Tętnicze nadciśnienie płucne (*Systemic Sclerosis-related Pulmonary Arterial Hypertension*, SSc-PAH) jest jednym z najgroźniejszych powikłań twardziny układowej. Wystąpienie SSc-PAH skraca medianę przeżycia u chorych nieleczonych według różnych doniesień do 1-2 lat [34]. W jego przebiegu dochodzi do ograniczenia przepływu w tętniczym krążeniu płucnym, co powoduje zwiększenie oporu naczyniowego i w rezultacie prowadzi do prawokomorowej niewydolności serca [35, 36].

SSc-PAH definiowane jest jako średnie ciśnienie w tętnicy płucnej większe lub równe 25 mmHg w spoczynku, mierzone podczas cewnikowania prawego serca, przy prawidłowym ciśnieniu zaklinowania i nieobecności innych cech powodujących przedwłośniczkowe nadciśnienie płucne. Częstość występowania SSc-PAH na podstawie bezpośredniego pomiaru ciśnienia w tętnicy płucnej wynosi od 8 do 14% [37].

Pacjenci z SSc-PAH najczęściej skarżą się na: duszność wysiłkową, zmęczenie i ograniczenie tolerancji wysiłku. W późniejszym etapie mogą dołączyć się objawy prawokomorowej niewydolności serca [36, 37].

U podłoża SSc-PAH leży m.in. uogólniona waskulopatia i dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, będąca charakterystyczną cechą twardziny układowej. To co odróżnia SSc-PAH od innych podtypów nadciśnienia płucnego to współistniejący remodeling płucnych naczyń żylnych oraz często towarzysząca śródmiąższowa choroba płuc (*Systemic Sclerosis-related Interstitial Lung Disease*, SSc-ILD). Włóknienie miąższu płucnego prowadzi do uwężnienia małych tętniczek oraz skurczu naczyń wywołanym hipoksją [38].

Mięsień sercowy często jest zajęty przez chorobę najczęściej pod postacią włóknienia całego miocardium włącznie z układem bodźco-przewodzącym, jednak jego przebieg

jest nierzadko niemy klinicznie lub skąpoobjawowy, co powoduje że proces może postępować niezauważony [39].

Allanore i wsp. stwierdzili obniżenie frakcji wyrzutowej lewej komory < 55% (LVEF) u 5,4% chorych. Niezależnymi czynnikami związanymi z dysfunkcją lewej komory były: płeć męska, wiek, zapalenie mięśni i owrzodzenia palców. Autorzy twierdzą, że związek między tymi ostatnimi, a upośledzeniem czynności mięśnia sercowego może być objawem rozległego uszkodzenia mikrokrążenia ponieważ poza płcią męską żadne inne klasyczne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego nie były powiązane z obniżeniem LVEF. Powyższe obserwacje są w zgodzie z poprzednimi doniesieniami na temat dominującego wpływu mikroangiopatii, w przeciwieństwie do miażdżycy, na rozwój pierwotnego uszkodzenia mięśnia sercowego w SSc [40].

Meier i wsp. w kohorcie pacjentów chorujących na twardzinę układową odnotowali następujące częstości występowania zaburzeń układu sercowo-naczyniowego: kołatania serca (23,7%), nadciśnienie tętnicze (20,6%), zaburzenia przewodnictwa w EKG (11%), zaburzenia funkcji rozkurczowej lewej komory (17,4%), wysięk w osierdziu (8,6%) [32].

Wśród chorób osierdzia u chorych na twardzinę układową zwykle występuje bezobjawowy wysięk, rzadziej ostre zapalenie osierdzia, tamponada serca i zaciskowe zapalenie osierdzia. Objawowe zaburzenia rytmu serca nie są częste wśród chorych na twardzinę układową, jednakże bezobjawowe komorowe i nadkomorowe arytmie nie należą do rzadkości [33].

Układ pokarmowy

Objawy ze strony przewodu pokarmowego w twardzinie układowej są częste zarówno w postaci uogólnionej, jak i ograniczonej. Pod względem częstości objawy z górnej części przewodu pokarmowego przeważają nad tymi z jego dolnego odcinka [32]. Zaburzenia dotyczą najczęściej ruchomości i czasu pasażu, o przebiegu od bezobjawowego po ciężki. Mogą występować na całej długości przewodu pokarmowego od jamy ustnej do odbytu [41].

Meier i wsp. w kohorcie EUSTAR stwierdzili objawy ze strony przełyku u 67,3% chorych, żołądka u 24,1% i jelitowe u 23,5% chorych [32].

Mikrostomia, czyli zmniejszone maksymalne rozwarcie ust powoduje problemy z utrzymaniem higieny jamy ustnej oraz utrudnia spożywanie pokarmów. Na skutek refluksu żołądkowo-przełykowego (*Gastro-Esophageal Reflux Disease*, GERD) dochodzi do zapalenia dziąseł, ubytków szkliwa i wcześniejszej utraty zębów [42].

Przełyk jest najczęściej zajęтым odcinkiem przewodu pokarmowego (70-90% chorych) w twardzinie układowej i nierzadko jego zaburzenia przebiegają bezobjawowo [41, 43]. Objawy dysfagii spowodowane są głównie upośledzeniem lub brakiem perystaltyki dystalnej części przełyku. Obniżone napięcie dolnego zwieracza przełyku i zaburzenia perystaltyki wiążą się z częstym występowaniem w tej grupie pacjentów GERD (50-80%), co może prowadzić po dłuższym czasie do zapalenia przełyku, tworzenia zrostów przełykowych i metaplazji jelitowej (tzw. przełyk Barreta), która istotnie zwiększa ryzyko wystąpienia u chorych raka przełyku, głównie o typie gruczolakoraka [41, 42].

Najczęstszym zaburzeniem czynności żołądka jest jego opóźnione opróżnianie (u 38% chorych) [44], co przyczynia się do GERD i objawia się jako uczucie wczesnej pełności po posiłku, wzdęcia, nudności, wymioty a w konsekwencji może prowadzić do niedożywienia. Rzadziej obserwuje się niedokrwistość z niedoboru żelaza z powodu krwawień z poszerzonych naczyń wpustu (teleangiektazje), co nazywane jest żołądkiem arbuzowatym [43].

Objawy ze strony jelita cienkiego obejmują: wzdęcia, nudności, wymioty, bóle brzucha, biegunki i stany rzekomej niedrożności, a w skrajnych przypadkach zespół złego wchłaniania i utratę masy ciała [42].

Niedożywienie i niezależna od woli utrata masy ciała są objawami zaawansowanej twardziny układowej [45]. Najczęściej wiąże się to z występowaniem u chorych zespołu rozrostu bakteryjnego jelita cienkiego (*Small Intestinal Bacterial Overgrowth*, SIBO) oraz zaburzeniami motoryki przewodu pokarmowego prowadzącymi do uczucia wczesnej pełności po jedzeniu, uporczywych nudności i wymiotów [43]. Marie i wsp. ocenili częstość

występowania SIBO wśród chorych na twardzinę układową na 43,1%. Zespół ten przyczynia się w dużej mierze do zespołu złego wchłaniania, co wiąże się z większą śmiertelnością [46].

Najczęstszymi objawami dotyczącymi jelita grubego są nietrzymanie stolca i zaparcia, a ich prawdziwa częstość jest niedoszacowana, gdyż pacjenci niechętnie zgłaszają te objawy lekarzowi. Przyczyną nietrzymania stolca jest atrofia i włóknienie mięśnia wewnętrznego zwieracza odbytu [42].

Pierwotna żółciowa marskość wątroby (*Primary Biliary Cirrhosis*, PBC) jest przykładem narządowo-swoistej choroby autoimmunologicznej u podłoża której dominuje włóknienie ograniczone do wątroby [16]. Jest to najczęstsze powikłanie twardziny układowej ze strony wątroby i dróg żółciowych [42]. W populacji chorych na SSc 2-3% ma współistniejącą PBC [47], a do 8% chorych na PBC cierpi także na SSc, najczęściej jej postać ograniczoną z obecnością przeciwciał przeciwcentromerowych [48].

Układ mięśniowo-szkieletowy

Zajęcie stawów w przebiegu twardziny układowej jest częste, a bywa że może być pierwszym objawem choroby równoczasowo lub przed wystąpieniem objawu Raynauda. Natomiast w odległej perspektywie przyczynia się do niepełnosprawności i obniżenia jakości życia. Spektrum problemów stawowych w tej jednostce chorobowej obejmuje artralgię, zapalenie stawów, przykurcze aż po zjawisko tarcia ścięgien [49].

Według różnych doniesień szeroko rozumiane problemy stawowe dotyczą od 46-97% pacjentów z twardziną układową [50]. Bóle stawów stwierdzono u 48 i 61% chorych w badaniach odpowiednio Ostojica i Melcarne [49]. W rejestrze EUSTAR, obejmującym ponad 7200 chorych, częstość klinicznie jawnego zapalenia stawów, definiowanego jako bolesność i obrzęk stawu, stwierdzono u 16% chorych, natomiast zjawisko tarcia ścięgien, rozumiane jako uczucie tarcia i skrzypienie ścięgna przy poruszaniu aktywnym i biernym, u 11% pacjentów [51].

Wśród chorych na twardzinę układową zapalenie stawów jest zdecydowanie rzadsze niż ból i nieznaczna sztywność. Praktycznie każdy staw może być zajęty, jednak najczęściej

są to stawy śródręczno-paliczkowe i międzypaliczkowe bliższe rąk, nadgarstkowe oraz skokowe, a przebieg kliniczny najczęściej charakteryzuje się okresami zaostrzeń i remisji. Wraz z postępowaniem choroby tworzą się przykurcze, które upośledzają ruchomość stawu. W rejestrze EUSTAR przykurcze, definiowane jako nieprawidłowe, najczęściej nieodwracalne skrócenie mięśnia lub tkanki bliznowatej, które skutkuje wadliwym ułożeniem bądź deformacją zwłaszcza stawu, obserwowano u 31% chorych. Objawy zapalenia stawów w twardzinie układowej polegają na zlokalizowanej bolesności i obrzęku stawu, rzadziej wiążą się z wysiękiem, który jest najczęściej łagodny [49].

Zjawisko akustyczne tarcia ścięgien spowodowane jest złoгами włóknistymi na pochewkach ścięgniastych i powierzchniach powięzi. W obrębie kończyny dolnej najczęściej dotyczy to ścięgien mięśnia piszczelowego przedniego lub Achillesa, a w górnej na ścięgien mięśni zginaczy i prostowników nadgarstka. Czasem dochodzi do zespołu cieśni kanału nadgarstka wskutek zajęcia pochewek ścięgniastych bezpośrednio pod więzadłem poprzecznym nadgarstka [49].

Czasem zdarza się zapalenie kaletek najczęściej w okolicy łokciowej i krętarzowej. Zapalenie pochewek ścięgniastych może natomiast prowadzić nawet do zerwania ścięgna [49].

W klasycznych radiogramach obserwuje się osteoporozę okołostawową, zwężenie szpar stawowych i nadżerki przypominające łuszczycowe zapalenie stawów, chorobę zwyrodnieniową (w tym postać nadżerkową) oraz czasem reumatoidalne zapalenie stawów. Typowe dla twardziny układowej jest uwidocznienie zwapnień na radiogramach (rycina 4). Ultrasonografia i rezonans magnetyczny mają przewagę w wykrywaniu zapalenia stawów i ścięgien, choć brakuje dużych badań systematycznie oceniających ich zastosowanie w tej jednostce chorobowej [49, 52].

Pakozdi i wsp. stwierdzili u 7,3% populacji chorych z SSc występowanie nakładania twardziny układowej i zapalenia mięśni (PM/SSc), definiowanego wg kryteriów Bohena i Petera [53]. PM/SSc jest najczęstszym zespołem nakładania z inną układową chorobą tkanki łącznej [54].

Według raportu Meiera i wsp. z rejestru EUSTAR z 2012 roku (n=7655) osłabienie siły mięśniowej stwierdzono u 25%, zaniki mięśniowe u 12,2%, a zwiększoną aktywność enzymów mięśniowych u 8,7% wszystkich chorych na twardzinę układową [32].

Układ moczowy

Najistotniejszym powikłaniem twardziny układowej w obrębie układu moczowego jest twardzinowy przełom nerkowy (*Scleroderma Renal Crisis*, SRC), który definiuje się jako złośliwe nadciśnienie tętnicze i oliguryczna lub anuryczna ostra niewydolność nerek po wykluczeniu innych przyczyn niż SSc. Częstość tego powikłania wynosi 2-4%, a pięcioletnia śmiertelność u chorych z SRC wynosi obecnie 65% [55].

Twardzinowy przełom nerkowy klinicznie objawia się głównie jako nadciśnienie złośliwe, encefalopatia nadciśnieniowa, zastoinowa niewydolność serca i arytmia. Czynnikiem ryzyka wystąpienia SRC są terapia wysokimi dawkami glikokortykosteroidów [55] oraz obecność przeciwciał przeciw RNA Polimerazie III [55, 56]. Przełomem w terapii SRC było wprowadzenie do leczenia inhibitorów konwertazy angiotensyny (*Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor*, ACEI), które zmniejszyły 12-miesięczną śmiertelność z 76% do 15% [55].

Inne powikłania nerkowe wśród chorych na twardzinę układową to zakażenia układu moczowego i hipowolemia z odwodnienia u osób z zajęciem przewodu pokarmowego lub niewydolnością serca wymagającą leczenia moczopędnego [55].

Obniżenie GFR nie jest częstym zjawiskiem w twardzinie układowej. Scheija i wsp. w szwedzkim badaniu 461 chorych stwierdzili obniżony GFR (< 70% wartości należnej dla wieku) u 1,1% chorych z lcSSc i 8,7% z dcSSc. Wśród pacjentów z obniżonym GFR stwierdzono w większości klasyczne czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego jak nadciśnienie tętnicze i choroby mięśnia sercowego. Jedynie u 1,4% chorych nie udało się wyjaśnić obniżenia GFR [57].

Choroby współistniejące

Blisko jedna czwarta pacjentów chorujących na twardzinę układową cierpi także na inne choroby autoimmunologiczne (*Autoimmune diseases, AIDs*), a 3,9% choruje na co najmniej dwie dodatkowe [58].

Elhai i wsp. dokonali przeglądu systematycznego i metaanalizy 10 badań obejmujących 6103 pacjentów z twardziną układową i stwierdzili następującą częstość współwystępujących AIDs: autoimmunologiczne choroby tarczycy, w tym zapalenie tarczycy Hashimoto i choroba Graves-Basedowa (10,4%), zespół Sjögrena (7,7%), zapalenie skórno-mięśniowe/wielomięśniowe (5,6%), reumatoidalne zapalenie stawów (4,2%), pierwotna żółciowa marskość wątroby (3%), toczeń rumieniowaty układowy (2,6%) [58].

Kryteria klasyfikacyjne

W rozpoznaniu choroby używa się powszechnie kryteriów klasyfikacyjnych *American Rheumatism Association* (ARA, obecnie *American College of Rheumatology*, ACR) z 1980 roku, które zostały przedstawione w tabeli 2. [59].

Tabela 2. Kryteria klasyfikacyjne twardziny układowej wg Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego [59] w tłumaczeniu [60].

Kryteria klasyfikacyjne twardziny układowej wg Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego (ARA 1980)	
Kryterium duże	proksymalne stwardnienie skóry (skleroderma) pogrubienie, stwardnienie i napięcie skóry proksymalnie od stawów śródrečno-paliczkowych lub stawów śródstopno-paliczkowych, zazwyczaj obustronne, symetryczne i prawie zawsze obejmujące także sklerodaktylię
Kryteria małe	sklerodaktylia pogrubienie, stwardnienie i napięcie skóry ograniczone do palców rąk lub stóp
	naparstkowate blizny lub ubytki tkanek na opuszkach palców zagłębienia lub ubytki tkanek na opuszkach palców jako wyraz niedokrwienia palców, a nie urazu lub zewnętrznej przyczyny
	obustronne, przypadkowe włóknienie płuc obustronne zmiany siateczkowate w postaci linijnych lub linijno-guzkowych zagęszczeń, najbardziej nasilone w przypadkowych partiach płuc na standardowym zdjęciu klatki piersiowej
Do rozpoznania choroby konieczne jest spełnienie kryterium dużego lub co najmniej dwóch kryteriów małych.	

Wyróżnia się dwie postaci kliniczne choroby: ograniczoną (*limited cutaneous Systemic Sclerosis*, lcSSc) o łagodniejszym przebiegu, która zajmuje części ciała dystalne od łokci, kolan i obojczyków oraz postać uogólnioną (*diffuse cutaneous Systemic Sclerosis*, dcSSc),

o bardziej agresywnym i dynamicznym przebiegu, zajmującą skórę większości ciała oraz narządy wewnętrzne w większym stopniu niż postać ograniczona [61]. Ponieważ kryteria klasyfikacyjne ARA charakteryzują się dużą swoistością, ale niską czułością zwłaszcza w odniesieniu do pacjentów z postacią ograniczoną choroby, LeRoy i Medsger zaproponowali kryteria klasyfikacyjne wczesnej twardziny układowej, które zwiększają czułość z 33% do 92% w odniesieniu do kryteriów ARA [62]. Dodali oni do tradycyjnych kryteriów kapilaroskopię i autoprzeciwciała swoiste dla twardziny układowej, co umożliwiło rozpoznanie choroby u dużej części chorych z lcSSc. Wśród swoistych autoprzeciwciał wymienili oni te skierowane przeciw centromerom, topoizomerazie I, fibrylarynie, PM-Scl, RNA Polimerazie I i III [62]. Omawiane kryteria zostały zaprezentowane w tabeli 3.:

Tabela 3. Kryteria klasyfikacyjne wczesnej twardziny układowej wg LeRoy i Medsger, 2001 [62] w tłumaczeniu [60].

Postać choroby	Kryteria (konstelacja)
ograniczona postać twardziny układowej (ISSc)	objaw Raynauda (potwierdzony obiektywnie) oraz jedno z dwóch 1) mikroangiopatia typowa dla twardziny układowej 2) autoprzeciwciała swoiste dla twardziny układowej
	objaw Raynauda (rozpoznanie subiektywne) oraz oba 1) mikroangiopatia typowa dla twardziny układowej 2) autoprzeciwciała swoiste dla twardziny układowej
ograniczona postać skórna twardziny układowej (lcSSc)	kryteria ograniczonej postaci twardziny układowej oraz dystalne zmiany skórne
uogólniona postać skórna twardziny układowej (dcSSc)	kryteria ograniczonej postaci twardziny układowej oraz proksymalne zmiany skórne

Zaburzenia immunologiczne

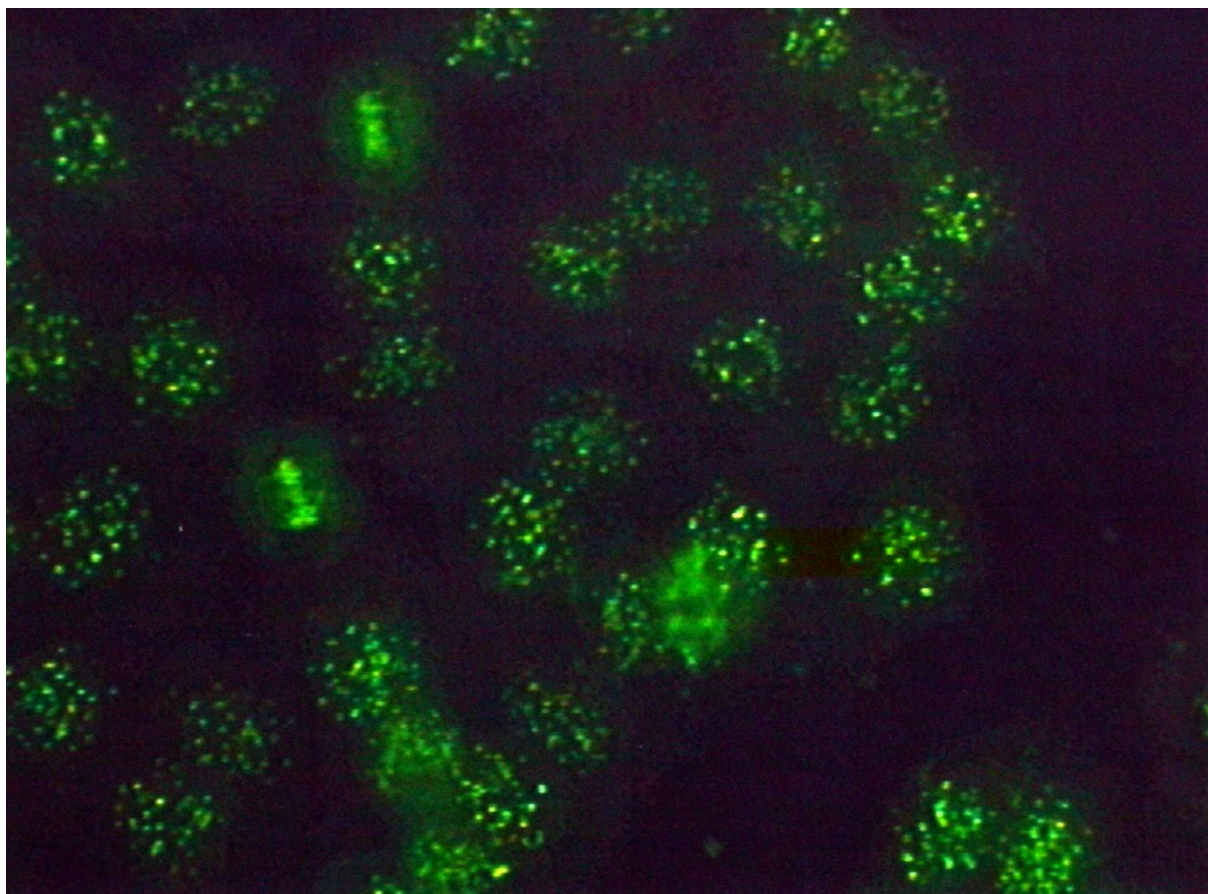
Wykrycie komórek LE przez Hargraves'a w 1948 roku, a następnie odkrycie przeciwciał przeciwjądrowych (*Anti-nuclear Antibodies*, ANA) w latach pięćdziesiątych XX wieku i opracowanie techniki ich wykrywania metodą immunofluorescencji pośredniej było początkiem badań serologicznych, wykorzystywanych w diagnostyce chorób reumatologicznych [63, 64]. U pewnej części zdrowych ludzi można wykryć przeciwciała przeciwjądrowe, ale najczęściej są one w niskim mianie [65].

Według różnych doniesień u 90-95% chorych na twardzinę układową można wykazać obecność przeciwciał przeciwjądrowych metodą immunofluorescencji pośredniej. Typowe jest występowanie dwóch "klasycznych" przeciwciał przeciwjądrowych: przeciw topoizomerazie I (Scl-70) i przeciwcentromerowych (ACA) wykrywanych metodą ELISA oraz obecnie powszechnie dostępną metodą immunoblot [15].

Autoprotekcja w twardzinie układowej

Przeciwciała przeciwcentromerowe (ACA)

Białka centromerów, kluczowych składników komórkowych w organizacji chromosomów w metafazie, są celem dla tych swoistych dla twardziny układowej przeciwciał. Wśród nich zidentyfikowano wiele autoantygenów CENP-A do G oraz CENP-O (*Centomere Proteins*, CENP), natomiast znaczenie kliniczne przypisuje się jedynie CENP-A i CENP-B [66]. Pacjenci z obecnością przeciwciał ACA stanowią 20-30% chorych na twardzinę układową i najczęściej rozwijają jej ograniczoną postać (lcSSc) [15]. Istnieje w tej grupie większe ryzyko tętniczego nadciśnienia płucnego (SSc-PAH) i pierwotnej marskości żółciowej wątroby (PBC), a mniejsze włóknienia śródmiąższowego płuc. Stwierdzono silną zależność między obecnością ACA, a występowaniem zespołu CREST (*Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal Dysmotility, Telangiectasias*) jako wariantu postaci ograniczonej [67]. Russo i wsp. oszacowali swoistość przeciwciał przeciwko CENP-A i CENP-B na odpowiednio 93% i 96,5% [68], natomiast Reveille i Solomon, opierając się na danych pochodzących z 6 badań, w których wzięło udział ponad 800 chorych, stwierdzili że swoistość ACA metodą immunofluorescencji pośredniej (rycina 8.) wynosiła 99,9% [67].



Rycina 8. Centromerowy typ świecenia przeciwciał w immunofluorescencji pośredniej. Fot. ze zbiorów dr hab. n. med. Mariusza J. Puszczewicza, prof. UM.

Przeciwciała przeciw topoizomerazie I (Scl-70, ATA)

Autoantygen Scl-70 to białko o masie 70 kDa, wykryte metodą immunoprecypitacji, a następnie zidentyfikowane biochemicznie jako produkt degradacji 100 kDa DNA topoizomerazy I, enzymu uczestniczącego w replikacji DNA [69]. Chorzy z obecnością przeciwciał anti-Scl70 (ATA) zazwyczaj rozwijają postać uogólnioną twardziny i wiąże się to z gorszym rokowaniem [69]. Czułość tych przeciwciał obliczono na 41%, a swoistość na 99,5%. Ich występowanie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem włóknienia śródmiąższowego płuc, twardzinowego przełomu nerkowego i chorób serca [67].

Warto podkreślić, że przeciwciała przeciw Scl-70 lub centromerom można wykryć u ok. 60% chorych, a co za tym idzie u 40% chorych spełniających kryteria rozpoznania twardziny układowej nie można było zidentyfikować przeciwciał przeciwjądrowych, mimo że u większości z nich stwierdza się obecność ANA metodą immunofluorescencji pośredniej [70, 71].

Przegląd literatury dotyczący nieklasycznych przeciwciał w twardzinie układowej

W laboratoriach serologicznych zidentyfikowano rzadsze przeciwciała (zwane czasem nieklasycznymi) charakterystyczne dla twardziny układowej jak: przeciwciała przeciw RNA Polimerazie III, Fibrylarynie (anty U3-RNP), NOR90 (anti-hUBF), Th/To, PM-Scl, Ku i PDGFR, jednak długo nie można było ich rutynowo oceniać w praktyce klinicznej z uwagi na mało dostępne metody ich oznaczania (m.in. metoda radioizotopowa). W ostatnich latach dokonał się postęp w dziedzinie serologii, stworzono wiarygodne, powtarzalne i nietrudne w wykonaniu testy wykrywające ich obecność w surowicy [71-74].

Znaczenie kliniczne przeciwciał nieklasycznych jest mniej ugruntowane niż w przypadku ATA i ACA. Istnieją doniesienia o różnicach fenotypowych u chorych z różnych grup etnicznych i brak jest w dostępnym piśmiennictwie danych na temat ich występowania w populacji polskiej.

Przeciwciała przeciw RNA Polimerazie III (anty-RNAP III)

Celem dla tych przeciwciał jest enzym RNA Polimeraza III biorący udział w transkrypcji RNA [75]. Swoistość tych przeciwciał w twardzinie oszacowano na 98,8% a czułość 10,7% [76]. Obecność tych przeciwciał wiąże się z uogólnionym wariantem choroby i wyraźnie koreluje z wystąpieniem twardzinowego przełomu nerkowego (SRC) [77]. W badaniu japońskim przeprowadzonym z udziałem 29 pacjentów, w których krwi stwierdzono to przeciwciało, częstość tego powikłania wyniosła 10% [76]. Z kolei w szwedzkiej grupie 16 chorych z SRC Hesselstrand i wsp. stwierdzili, że aż 7 było nosicielami anty-RNAP III, a iloraz szans na rozwinięcie przełomu nerkowego wyniósł $OR=8,9$ (95%CI 2,6-29,6, $p=0,001$) przy obecności tych przeciwciał [56].

Przeciwciała przeciw Th/To

Antygen Th/To to konglomerat rybonukleoproteinowy nazywany także kompleksem ludzkiej RNazy MRP o właściwościach endonukleazy [78]. Mitri i wsp. z Tennessee (USA), dokonali przeglądu przebiegu choroby pacjentów z twardziną układową z obecnością przeciwciał Th/To (n=87 chorych, wszyscy lcSSc) w porównaniu z chorymi ACA dodatnimi.

Wykazano większą częstość tętniczego nadciśnienia płucnego w grupie Th/To względem ACA dodatnich (28% vs. 18%) i śródmiąższowej choroby płuc (48% vs. 13%) [79]. W badaniu 216 włoskich pacjentów z twardziną układową stwierdzono 3,7% osób z przeciwciałem przeciw Th/To. Podobnie jak w badaniu amerykańskim wszyscy mieli ograniczoną postać choroby i stwierdzono związek z występowaniem choroby śródmiąższowej płuc i zapaleniem osierdza, a przebieg choroby określono jako łagodny [80].

Przeciwciała przeciw fibrylarynie (anty-U3RNP, AFA)

Fibrylaryna to rybonukleoproteina będąca wczesnym markerem tworzenia jąderka w komórkach dzielących się. Jej podjednostka o masie 35kDa jest celem dla anty-U3RNP [81]. Przeciwciała to wiąże się z uogólnioną postacią choroby i jest dla niej swoiste. Jego częstość wśród chorych na twardzinę układową w Wielkiej Brytanii oszacowano na 4,1% i stwierdzono częste występowanie w tej podgrupie pacjentów cech zapalenia mięśni, tętniczego nadciśnienia płucnego, zajęcia serca i nerek [82]. W grupie Afroamerykanów przeciwciała to stwierdzono u 18,5% chorych. Pacjenci z jego obecnością byli młodszy, częściej u nich występowały owrzodzenia palców, biegunki, zapalenie osierdza, natomiast w porównaniu do chorych bez obecności tego przeciwciała stwierdzano u nich mniejsze zajęcie płuc [81].

Przeciwciała przeciw PM-Scl

PM/Scl to jąderkowy kompleks makromolekularny zwany ludzkim egzosomem o właściwościach rybonukleazy, istotny w obróbce rybosomalnego RNA oraz degradacji mRNA. Jego dwie podjednostki o masie cząsteczkowej 75 i 100 kDa stanowią antygeny dla przeciwciał anty-PM-Scl [83, 84]. Hanke i wsp. przeanalizowali występowanie przeciwciał przeciw PM-Scl-75 i PM-Scl-100 i stwierdzili częstość występowania w SSc odpowiednio 10,4% i 7,1%, a sumaryczną czułość anty-PM-Scl w twardzinie układowej na 12,5%. U chorych z dcSSc przeciwciała te występowały w 19,8%, natomiast w zespołach nakładania w 17,6%. Co ciekawe, pacjenci z dcSSc wykazywali reaktywność głównie w odniesieniu do PM-Scl-75, a chorzy z zespołami nakładania wobec obu przeciwciał jednocześnie. Obecność tych przeciwciał wiązała się z zapaleniem mięśni, zajęciem płuc i owrzodzeniami palców, natomiast rzadziej występowało w tej grupie tętnicze nadciśnienie płucne [85].

Przeciwciała przeciw Ku

Ku jest białkiem wiążącym dwuniciowe DNA i pełni fundamentalną rolę w jego naprawie [86]. Belizna i wsp. podają, że przeciwciała przeciw Ku występują u 55% chorych z nakładaniem zapalenia wielomięśniowego i twardziny układowej [86]. Nie są one swoiste dla twardziny układowej, gdyż wykazano je w niezróżnicowanej chorobie tkanki łącznej, toczeniu rumieniowatym układowym, reumatoidalnym zapaleniu stawów, zapaleniu wielomięśniowym i zespole Sjögrena [87]. Wśród chorych na twardzinę układową Rozman i wsp. stwierdzili ich częstość na poziomie 2,2% oraz wykazali dodatnią korelację z objawami zajęcia układu mięśniowo-szkieletowego: zwiększonym stężeniem markerów zapalenia mięśni, zapaleniem stawów i przykurczami stawowymi, natomiast ujemną korelację stwierdzono z obecnością owrzodzeń palców i teleangiektazji [88].

Przeciwciała przeciw NOR90 (anty-hUBF)

Autoprzeciwciała te reagują swoście z jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym NOR 90, zwanym także hUBF (*human Upstream Binding Factor*) uczestniczącym w syntezie podjednostek rybosomalnego RNA [89, 90]. Przeciwciała te nie są swoiste dla twardziny układowej; można je stwierdzić w pierwotnym zespole Raynauda, toczeniu rumieniowatym układowym, reumatoidalnym zapaleniu stawów i zespole Sjögrena. Brak badań kohortowych oceniających występowanie tych przeciwciał i ich korelacji klinicznych, ale z opisu przypadku wynika, że ich występowanie wiąże się raczej z postacią ograniczoną choroby, niedużym zajęciem narządów wewnętrznych i dobrym rokowaniem [15, 90]. Villalta i wsp. niedawno stwierdzili występowanie tych przeciwciał u 4,8% chorych na twardzinę układową, a wśród pacjentów z obecnością przeciwciał anty-NOR90 aż 9 z 10 chorych miało postać ograniczoną choroby [73].

Przeciwciała przeciw receptorowi dla PDGF (anty-PDGFR)

Po raz pierwszy opisał je Baroni, identyfikując te przeciwciała u wszystkich pacjentów z twardziną układową w grupie badanej i nie stwierdzając ich u żadnej osoby z grupy kontrolnej z innymi chorobami reumatycznymi [91]. Miały one mieć właściwości agonistyczne dla receptora płytkowego czynnika wzrostu (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*, PDGFR). Loizos nie potwierdził jednak swoistości tych przeciwciał dla twardziny

układowej (obecne były u 32,7% chorych z twardziną układową oraz 34% osób z grupy kontrolnej) [92], natomiast Classen nie wykazał aktywności agonistycznej anty-PDGFR [93]. Brak powtarzalności i ogromne rozbieżności między wynikami uzyskanymi przez Baroniego i wsp. a innymi badaczami budzą niemałe kontrowersje w środowisku naukowym i nakazują podchodzić do nich z dużą ostrożnością.

Przeciwciała przeciw Ro-52

Antygen SS-A/Ro składa się z dwóch polipeptydów o masie 60 i 52 kDa. Drugi z nich jest cytoplazmatyczną rybonukleoproteiną swoistą dla ludzi i celem dla przeciwciał anty-Ro-52 [94]. Są to jedne z najczęściej wykrywanych autoprzeciwciał i występują w wielu chorobach reumatycznych m.in. toczeniu rumieniowatym układowym, toczeniu skórny, zespole Sjögrena, twardzinie układowej, zapaleniach mięśni, wrodzonym bloku serca oraz autoimmunologicznych chorobach wątroby jak pierwotna żółciowa marskość wątroby (PBC) i autoimmunologiczne zapalenie wątroby (AIH). Ich znaczenie diagnostyczne polega głównie na współistnieniu tych przeciwciał z innymi bardziej swoistymi chorobowo przeciwciałami [94]. Mogą one jednak występować w sposób izolowany lub jako współistniejące np. w zapaleniach mięśni [95, 96] oraz twardzinie układowej [96]. Nie stwierdzono jak dotąd związku z jakąkolwiek kliniczną postacią twardziny układowej [96].

W tabeli 4. podsumowano udokumentowane w literaturze związki obecności przeciwciał z manifestacjami klinicznymi twardziny układowej.

Tabela 4. Podsumowanie opisywanych w literaturze związków między obecnością przeciwciał przeciw antygenom a wybranymi manifestacjami twardziny układowej.

Przeciwciała przeciw antygenowi	Istotne związki manifestacji twardziny układowej w podgrupach pacjentów według przeciwciał
Scl-70 (ATA)	Występują u 60% chorych z dcSSc; czułość 24% swoistość 99,6%, większa częstość zajęcia skóry i włóknienia śródmiąższowego płuc, przykurczy i zmian w EKG, owrzodzeń palców oraz ogólnie bardziej aktywna choroba niż u chorych bez tego przeciwciała [69]
CENP-A i CENP-B (białka centromerów)	Występują u 57% chorych z lcSSc [70]; łagodniejszy przebieg choroby [97], mniejsze zajęcie skóry według skali Rodnana, mniej owrzodzeń palców, rzadsze włóknienie śródmiąższowe płuc, twardzinowy przełom nerkowy i myositis, większa częstość tętniczego nadciśnienia płucnego [66]
RNA Polimeraza III	Zazwyczaj chorzy rozwijają postać dcSSc i osiągają wysokie wartości zajęcia skóry wg Rodnana (mRSS) [76]; częstsze zajęcie nerek niż u chorych z ATA [98]; większa częstość twardzinowego przełomu nerkowego [99, 100], zapalenia stawów, mięśni i przykurczy; większe ryzyko nowotworu w ciągu 5 lat od początku zmian skórnych [101]
Fibrylaryna (anty-U3RNP, AFA)	2/3 chorych rozwija dcSSc; częściej w tej grupie występuje tętnicze nadciśnienie płucne, zapalenie mięśni i zajęcie nerek [82]; młodszy wiek chorych, większa częstość owrzodzeń palców, zapalenia osierdzia i ciężkiego zajęcia dolnego odcinka przewodu pokarmowego, mniej ciężkie zajęcie płuc [81]
NOR90 (anty-hUBF)	lcSSc, brak dużych badań oceniających zależności przeciwciała z manifestacjami twardziny układowej; nie są swoiste dla choroby, występują także w zespole Sjögrena i reumatoidalnym zapaleniu stawów [89]

Przeciwciała przeciw antygenowi	Istotne związki manifestacji twardziny układowej w podgrupach pacjentów według przeciwciał
Th/To	Zazwyczaj postać lcSSc; większa częstość włóknienia śródmiąższowego płuc i zapalenia osierdzia [80]; obserwuje się w tej grupie większą częstość tętniczego nadciśnienia płucnego i SSc-ILD, a mniejsze zajęcie skóry w stosunku do chorych ACA dodatnich [79]
PM-Scl	Zespoły nakładania twardziny układowej i zapalenia wielomięśniowego (PM/SSc) lub postać lcSSc; zapalenie mięśni (w tym wzrost CK), zajęcie płuc i owrzodzenia palców, rzadsze występowanie tętniczego nadciśnienia płucnego i zaburzeń przewodu pokarmowego [85, 102]
Ku	Występują u 55% chorych z zespołem nakładania twardziny układowej i zapalenia wielomięśniowego (PM/SSc) [86]; Charakterystyczne jest występowanie klinicznych wykładników zapalenia mięśni, stawów i przykurczy [88]; W dużym badaniu wśród chorych z tym przeciwciałem stwierdzono: u 31% chorych niezróżnicowaną chorobę tkanki łącznej; 29% twardzinę układową; 18% toczeń rumieniowaty układowy; 11% reumatoidalne zapalenie stawów; 7% zapalenie wielomięśniowe i u 3% zespół Sjögrena [87].
PDGFR	Kontrowersyjne doniesienia na temat częstości występowania od 1 do 100% chorych na twardzinę układową [91-93, 103]. Brak badań zależności między obecnością przeciwciał a objawami klinicznymi choroby.
Ro-52	We wtórnym zespole Sjögrena w twardzinie układowej [104], niespecyficzne [105] i występują w wielu konfiguracjach z innymi przeciwciałami swoistymi dla twardziny układowej. Nie stwierdza się szczególnych związków z objawami klinicznymi [96].

Przesłanki do podjęcia pracy

Twardzina układowa, jako jedna ze słabiej poznanych chorób reumatycznych, nadal oczekuje na przełom w metodach leczniczych [106] porównywalny do tego, jaki przyniosło wykorzystanie glikokortykosteroidów w toczeniu rumieniowatym układowym i wprowadzenie klasycznych leków modyfikujących przebieg choroby w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Produkty biologii molekularnej, jakimi są leki z grupy antagonistów *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α) lub anty-CD20, zrewolucjonizowały reumatologię i dały nadzieję pacjentom na większą sprawność i aktywność życiową. Nie dotyczy to jednak chorych na twardzinę układową.

Istnieje potrzeba dalszych badań nad patomechanizmem twardziny układowej oraz rozszerzeniem możliwości diagnostycznych lekarzy reumatologów poprzez nowe testy serologiczne. Systematyczna ocena wartości predykcyjnej tychże testów w odniesieniu do zmian narządowych, będących największą przyczyną chorobowości [77], a nawet zgonów w tej jednostce chorobowej jest potrzebna w różnych populacjach chorych, aby uzyskać dobrej jakości informacje, pozwalające klinicyście podejmować decyzje. W literaturze bardzo niewiele jest danych na temat polskiej populacji chorych z twardziną układową i niniejsza praca ma częściowo uzupełnić tę lukę.

Możliwość predykcji zmian narządowych u chorych na podstawie obecności poszczególnych autoprzeciwciał ułatwiłaby monitorowanie i wczesne włączenie objawowego leczenia np. antagonistów receptora dla endoteliny w tętnicznym nadciśnieniu płucnym, inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI) w twardzinowym przełomie nerkowym [107] lub cyklofosfamidu w śródmiąższowej chorobie płuc [108]. Byłoby to źródłem korzyści dla chorych chronionych w ten sposób przed odległymi powikłaniami narządowymi.

Rozdział II – Cel pracy

Celem pracy była ocena występowania i znaczenia klinicznego wybranych autoprzeciwciał w twardzinie układowej.

W tym celu poszukiwano odpowiedzi na następujące pytania:

1. Jaka jest częstość występowania poszczególnych autoprzeciwciał wśród chorych na twardzinę układową?
2. Czy istnieją związki pomiędzy występowaniem autoprzeciwciał a objawami twardziny układowej?

Celem dodatkowym była próba porównania czułości nowego testu laboratoryjnego Systemic Sclerosis Profil (SSP), względem starszego ANA Profil 3 (ANAP):

3. Czy zastosowanie SSP istotnie zwiększa czułość metody laboratoryjnego wykrywania autoprzeciwciał w twardzinie układowej względem ANAP?

Rozdział III – Materiał i metody

Material

Badanie miało charakter przekrojowy i prospektywny. Z uwagi na rzadkie występowanie choroby przeprowadzono je na 75 pacjentach spełniających kryteria klasyfikacyjne *American College of Rheumatology* [59] dla twardziny układowej głównie z województwa wielkopolskiego i lubuskiego, a także kujawsko-pomorskiego. Pacjenci byli w większości chorymi hospitalizowanymi w Klinice Reumatologii i Chorób Wewnętrznych w Poznaniu; część chorych została skierowana z Poradni Reumatologicznych, Dermatologicznych i Kardiologicznych.

Populacja badana składała się z 11 mężczyzn i 64 kobiet w wieku $53,3 \pm 14,3$ lat i średnim czasie trwania choroby mierzonym od pojawienia się objawu Raynauda $11,7 \pm 8,7$ lat.

Metody

Chorzy byli poddani badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu. Ponadto przeprowadzono badania laboratoryjne, obrazowe oraz specjalistyczne badania kardiologiczne i pulmonologiczne.

Badanie lekarskie

Badanie podmiotowe i przedmiotowe było przeprowadzone przez autora niniejszej pracy, co wykluczyło w tym zakresie różnice wynikające z niezgodności między badaczami.

Zostało ono ukierunkowane na charakterystyczne cechy twardziny układowej i w celu standaryzacji oparto je na schemacie *Minimal Essential Data Set* (MEDS), opracowanym i stosowanym przez *European Scleroderma Trial and Research group* (EUSTAR) [109]. Zawierało ono pytania o: początek objawu Raynauda, początek innej cechy choroby niż objaw Raynauda, datę rozpoznania, wiek, problemy z przewodem pokarmowym (połykanie, nudności, refluks żołądkowo-przełykowy, wymioty, biegunki, zaparcia), nadciśnienie tętnicze, twardzinowy przełom nerkowy, istotną duszność ($\geq$ NYHA II) i kołatania serca. Dodatkowo odnotowywane były istotne choroby współistniejące.

Przedmiotowo oceniane były: zajęcie skóry za pomocą zmodyfikowanej skali Rodnana (*modified Rodnan Skin Score*, mRSS) [24, 110, 111], obecność objawu Raynauda,

owrzodzenia palców, cechy zapalenia stawów, przykurcze, zaniki mięśniowe, osłabienie siły mięśniowej, występowanie nadciśnienia tętniczego.

Badanie kardiologiczne

Przeprowadzono badanie kardiologiczne, na które składały się: EKG i echokardiografia dopplerowska ze szczególnym uwzględnieniem cech tętniczego nadciśnienia płucnego oraz oceną kurczliwości, ponadto pytano o występowanie i objawy zaburzeń rytmu serca.

Osoby z klinicznym podejrzeniem nadciśnienia płucnego i jego cechami w badaniu echokardiograficznym m.in. powiększeniem prawej komory serca, zwiększonym ciśnieniem skurczowym prawej komory (*Right Ventricular Systolic Pressure, RVSP*) były kwalifikowane przez kardiologa do cewnikowania prawego serca celem ustalenia rozpoznania i rozważenia włączenia specyficznego leczenia zgodnie z zaleceniami *American Heart Association* [34, 35, 38, 112].

Badanie kardiologiczne było wykonywane w I Klinice Kardiologii UMP, przy czym echokardiografię wykonywano używając aparatu Vivid 7 firmy General Electric.

Badanie pulmonologiczne

Na badanie pulmonologiczne składały się testy czynnościowe układu oddechowego: spirometria i bodypletyzmografia, w których poszukiwano cech choroby restrykcyjnej płuc, oraz dyfuzja tlenu węgla metodą pojedynczego oddechu skorygowanego o poziom hemoglobiny (DLCOc). Testy czynnościowe zostały przeprowadzone zgodnie z zaleceniami *American Thoracic Society* i *European Respiratory Society* [113-115].

W celu oceny śródmiąższu płuc wykonywano u chorych badanie HRCT (*High Resolution Computed Tomography*) płuc i na podstawie obrazu rozpoznawano chorobę śródmiąższową płuc [27, 31, 116]. Badanie HRCT było wykonywane aparatem Aquilion 64 CT firmy Toshiba.

Całość badań pulmonologicznych została przeprowadzona w Klinice Pulmonologii i Onkologii Pulmonologicznej UMP oraz przyklinicznej Poradni Pulmonologicznej.

Badania laboratoryjne

W badaniach laboratoryjnych oceniano markery zapalenia takie jak: Odczyn Biernackiego (OB) i stężenie białka C-reaktywnego (CRP); ponadto stężenie kreatyniny w osoczu krwi, obecność białka w badaniu ogólnym moczu (białkomocz) i aktywność kinazy kreatynowej (CK).

Za normę przyjęto OB (≤ 15 u kobiet i ≤ 10 u mężczyzn), CRP (≤ 5,9 mg/L), CK (<140 U/L) i nieobecność białka w badaniu ogólnym moczu.

Ponadto wyliczony został szacunkowy klirens kreatyniny (*estimated Glomerular Filtration Rate*, eGFR) według wzoru MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease Study Equation*):

$$186 \times (\text{Cr} / 88.4)^{-1.154} \times (\text{Wiek})^{-0.203} \times (0.742 \text{ jeśli kobieta}) \times (1.210 \text{ jeśli rasy czarnej})$$

w oparciu o stężenie kreatyniny (Cr) w osoczu, płeć, rasę i wiek pacjenta [117]. U pacjentów, których eGFR utrzymywał się powyżej trzech miesięcy na poziomie niższym lub równym 60 ml/min rozpoznano przewlekłą chorobę nerek (PChN) zgodnie z zaleceniami *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) [118, 119].

Badania laboratoryjne przeprowadzono w Centralnym Laboratorium Ortopedyczno-Rehabilitacyjnego Szpitala Klinicznego im. W. Degi UMP.

Badania serologiczne

Surowice krwi pacjentów z rozpoznaniem twardziny układowej zostały zabezpieczone w jałowych probówkach i gromadzone w zamrażarce w temperaturze -20°C do czasu wykonania oznaczeń. W dniu przeprowadzenia analizy materiał rozmrażano poprzez umieszczenie w temperaturze pokojowej i oznaczano w nim:

1. Przeciwciała przeciwjądrowe (*Anti-nuclear Antibodies*, ANA) metodą immunofluorescencji pośredniej (*Indirect Immunofluorescence*, IIF), co uważa się za złoty standard wykrywania ANA [64]. Źródłem antygenu służącym do wykrywania ANA były komórki z linii HEp-2 (*Human Epithelioma type 2*) oraz wątroby mały. W pierwszym etapie наносzono surowice pacjentów w odpowiednim rozcieńczeniu na szkiełka z ww. antygenem i po okresie inkubacji

dodawano znakowane fluoresceiną kozie przeciwciała przeciw ludzkim IgG i ponownie poddawano inkubacji. Następnie próbki były oceniane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Surowice były rozcieńczane w postępie geometrycznym począwszy od 40-krotnego z ilorazem $q=2$ (40, 80, 160 itd.). Za wynik miana ANA uznano największe rozcieńczenie przeciwciał, w którym stwierdza się dodatnią reakcję fluorescencyjną;

2. ANA Profil 3 (ANAP), zawierający antygeny: RNP/Sm, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP-B, PCNA, dsDNA, Nukleosomy, Histony, Rybosomalne białko P i AMA-M2;
3. Systemic Sclerosis Profil (SSP) zawierający antygeny: Scl-70, CENP-A, CENP-B, RNA Polimerazę III 11 kDa, RNA Polimerazę III 155 kDa, Fibrylarynę, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR i Ro-52.

Wszystkie zestawy do oznaczeń serologicznych pochodziły od EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Niemcy) a oznaczenia zostały przeprowadzone zgodnie z zaleceniami producenta.

Panele 2 i 3 wykorzystują metodę EUROLINE (immunoblot), w której na syntetycznych paskach umieszczono rekombinowane antygeny (za wyjątkiem Scl-70, który był antygenem natywnym). W pierwszej fazie inkubowano paski z surowicami pacjentów, a następnie po wypłukaniu dodawano koniugat przeciwciał anti-IgG sprzężonych z enzymem. W kolejnej fazie po wypłukaniu dodawano substrat, który pod wpływem ww. enzymu dawał reakcję barwną odczytywaną przez elektroniczny czytnik EUROLine Scan (EUROIMMUN AG), a jej intensywność wyrażona została w formie graficznej. Za normę przyjęto brak obecności przeciwciał, a wynik dodatni od punktu odcięcia zalecanego przez producenta. Wyniki graniczne uznano za ujemne, zgodnie z metodologią stosowaną w przeważającej części literatury.

Badania serologiczne zostały przeprowadzone przez doświadczoną Pracownię Diagnostyki Reumatologicznej przy Klinice Reumatologii i Chorób Wewnętrznych UMP. Dużym atutem jest precyzja oznaczania przeciwciał przeciwjądrowych metodą immunofluorescencji pośredniej przez doświadczonego diagnostę laboratoryjnego, co przy

subiektywnym charakterze tej metody ma ogromne znaczenie dla czułości i porównywalności wyników.

Kapilaroskopia

W badaniu kapilaroskopowym oceniane były naczynia wału paznokciowego pod kątem obecności lub braku zmian typowych dla twardziny układowej, takich jak: megakapilary, ogniska awaskularyzacji, poskręcane pętle naczyniowe i mikrokrwotoki [20, 120, 121]. Badanie przeprowadzono przy użyciu kapilaroskopu firmy Nikon SMZ800.

Analiza statystyczna wyników

Dane w skali interwałowej jeżeli spełniały kryteria rozkładu normalnego zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe średniej (SD), natomiast dane nieparametryczne oraz te mierzone w skali porządkowej jako mediana i rozstęp międzykwartylowy w nawiasie. Dane nominalne zostały przedstawione w postaci liczności i jako odsetek całości w procentach.

Przeprowadzona została analiza statystyczna uzyskanych wyników badań serologicznych w kontekście wpływu na postać choroby i zajęcia przez proces chorobowy poszczególnych narządów. W tym celu użyto zależnie od potrzeby testu Chi kwadrat (χ^2) lub dokładnego testu Fishera w programie Excel 2007 (Microsoft, Redmond, USA). Obliczono ilorazy szans oraz ich 95% przedziały ufności dla istotnych statystycznie wyników używając programu GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, San Diego, USA) z aproksymacją Woolfa. Ponadto, w celu oceny czułości dwóch różnych testów laboratoryjnych użyto testu McNemary w pakiecie STATISTICA 10 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Za wartość znamioną statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

Etyka badania naukowego

Niniejsze badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o sygnaturze 988/11 (vide Załącznik 1 – Zgoda Komisji Bioetycznej).

Dane pacjentów były gromadzone i przechowywane zgodnie z obowiązującą ustawą o ochronie danych osobowych z 1997 roku [122]. Pacjenci biorący udział w badaniu zostali dogłębnie o jego procedurze poinformowani, mieli możliwość zadawania pytań i uzyskania na nie odpowiedzi oraz mieli prawo w każdym momencie odstąpić od udziału w badaniu. Wszyscy pacjenci włączeni do badania wyrazili na nie świadomą zgodę w formie pisemnej.

Rozdział IV – Wyniki

Charakterystyka populacji badanej

Grupa badana składała się z 75 chorych na twardzinę układową spełniających kryteria klasyfikacyjne ACR z 1980 roku. Krótka charakterystyka demograficzna populacji badanej została przedstawiona w tabeli 5. Rozkład wieku spełniał kryteria rozkładu normalnego w teście Kołmogorowa – Smirnowa. W tabeli 6. przedstawiono charakterystykę laboratoryjną populacji badanej.

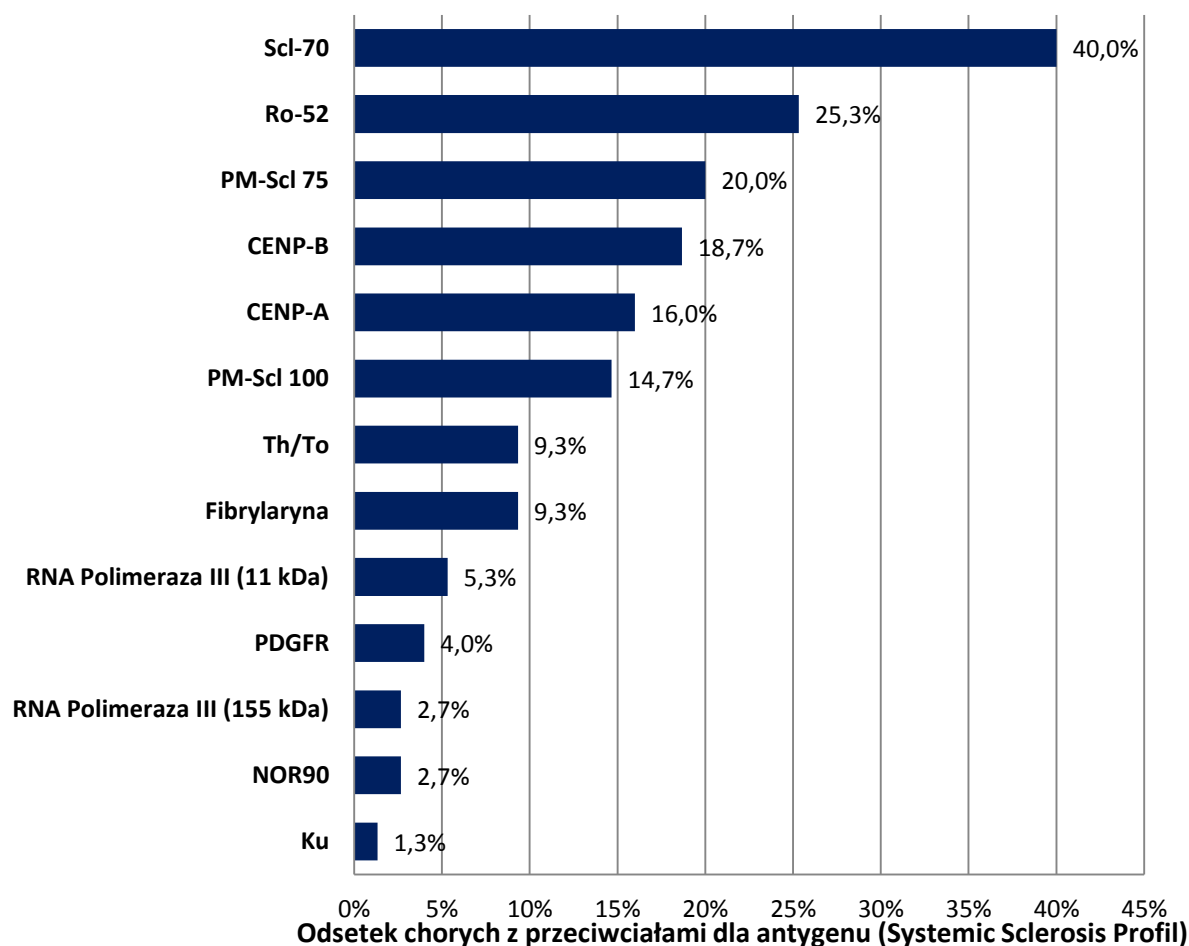
Tabela 5. Charakterystyka ogólna populacji badanej.

Cecha	Wartość $\pm$ SD; minimum(Min) i maximum(Max)
Wiek	53,3 $\pm$ 14,3 Min=23; Max=79
Płeć	M/K 11/64; M=14,7%, K=85,3%
Postać choroby	ograniczona (lcSSc): 41 (54,6%) uogólniona (dcSSc): 26 (34,7%) nakładanie twardziny układowej i zapalenia wielomięśniowego (PM/SSc): 8 (10,7%)
Średnia liczba lat od pojawienia się objawu Raynauda	11,7 $\pm$ 8,7 Min=0; Max=40
Średnia liczba lat od początku innej cechy choroby niż objaw Raynauda	8,4 $\pm$ 7,9 Min=0; Max=39
Średnia liczba lat od rozpoznania choroby	6,3 $\pm$ 7,6 Min=0; Max=39

Tabela 6. Charakterystyka laboratoryjna populacji badanej.

Parametry laboratoryjne	Mediana (rozstęp międzykwartylowy) lub odsetek populacji
ANA metodą immunofluorescencji pośredniej	1/1280 (1/320-1/2580)
Odsetek chorych ANA dodatnich	96,0%
Odsetek chorych z przyspieszonym OB	45,3%
Odsetek chorych ze zwiększonym stężeniem CRP	20,0%

Poniżej przedstawiono w formie graficznej (rycina 9.) i tabelarycznej (tabela 7.) wynik badania obecności przeciwciał w surowicach chorych przy użyciu Systemic Sclerosis Profil (SSP), badającego obecność charakterystycznych przeciwciał dla twardziny układowej.

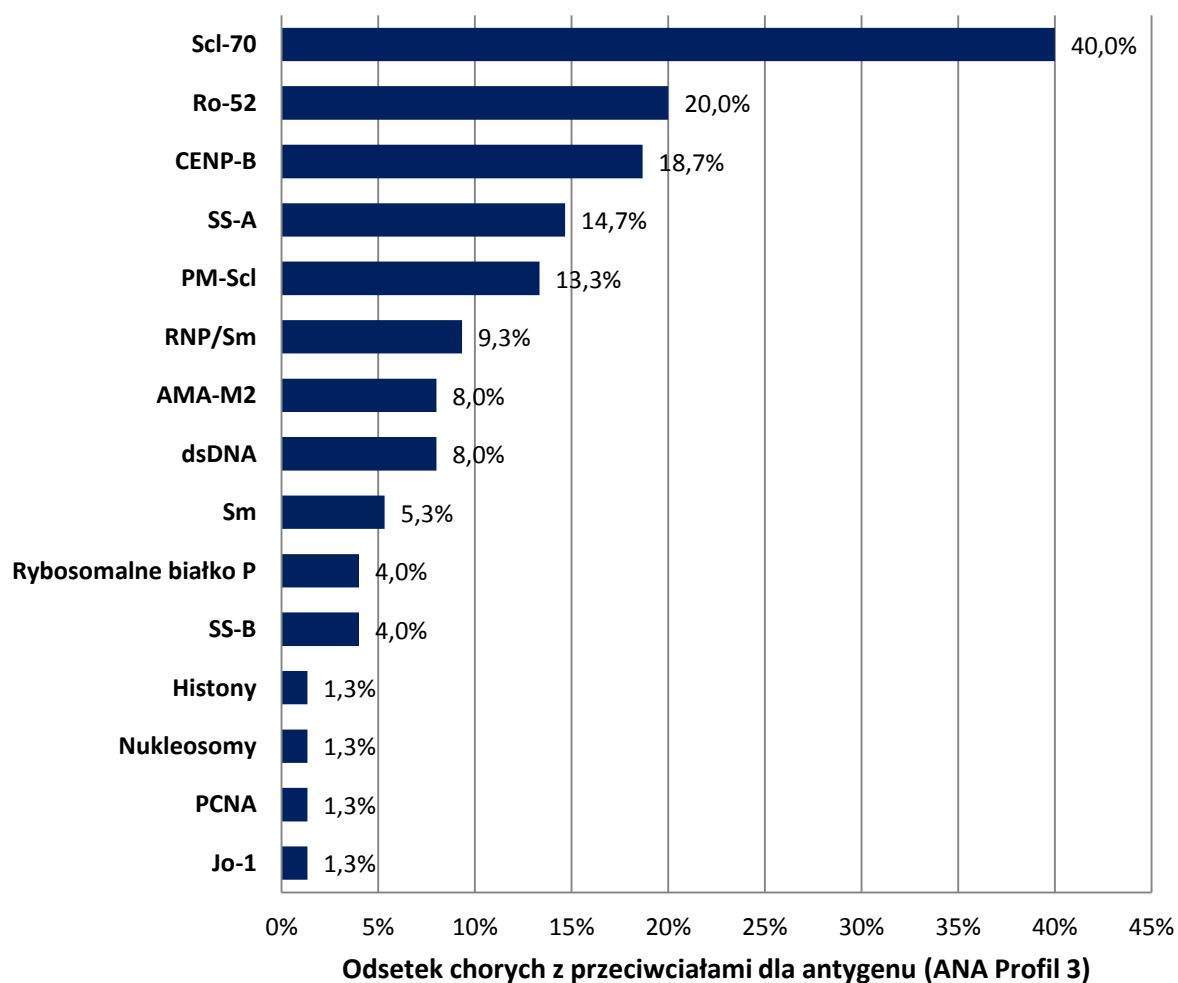


Rycina 9. Odsetek chorych z obecnością przeciwciał dla antygenów charakterystycznych dla twardziny układowej w populacji badanej.

Tabela 7. Liczba chorych z obecnością charakterystycznych dla twardziny układowej przeciwciał przeciw antygenom.

Antygen	Liczba pacjentów z obecnością przeciwciał przeciw antygenowi	Antygen	Liczba pacjentów z obecnością przeciwciał przeciw antygenowi
Scl-70	30	Th/To	7
Ro-52	19	RNA Polimeraza III (11 kDa)	4
PM-Scl 75	15	PDGFR	3
CENP-B	14	RNA Polimeraza III (155 kDa)	2
CENP-A	12	NOR90	2
PM-Scl 100	11	Ku	1
Fibrylaryna	7		

Według tej samej konwencji przedstawiono wynik oznaczenia przeciwciał w badanej populacji w ANA Profil 3 (rycina 10. i tabela 8.).

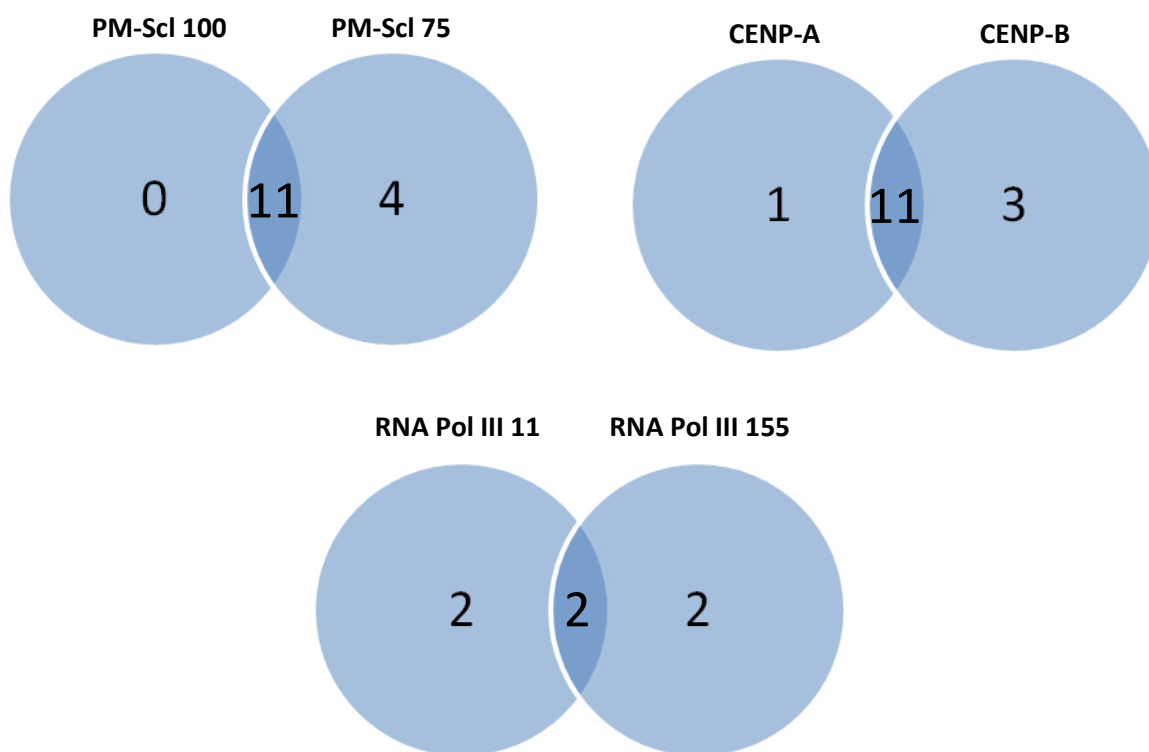


Rycina 10. Odsetek chorych z obecnością przeciwciał dla antygenów w ANA Profil 3.

Tabela 8. Liczba chorych z obecnością przeciwciał przeciw antygenom w ANA Profil 3.

Antygen	Liczba pacjentów z obecnością przeciwciał przeciw antygenowi	Antygen	Liczba pacjentów z obecnością przeciwciał przeciw antygenowi
Scl-70	30	Sm	4
Ro-52	15	SS-B	3
CENP-B	14	Rybosomalne białko P	3
SS-A	11	Jo-1	1
PM-Scl	10	PCNA	1
RNP/Sm	7	Nukleosomy	1
dsDNA	6	Histony	1
AMA-M2	6		

Ponieważ przeciwciała w Systemic Sclerosis Profil w trzech przypadkach rozróżniają po dwa warianty antygeny podsumowano to zjawisko na rycinie 11. w formie diagramu Venna.

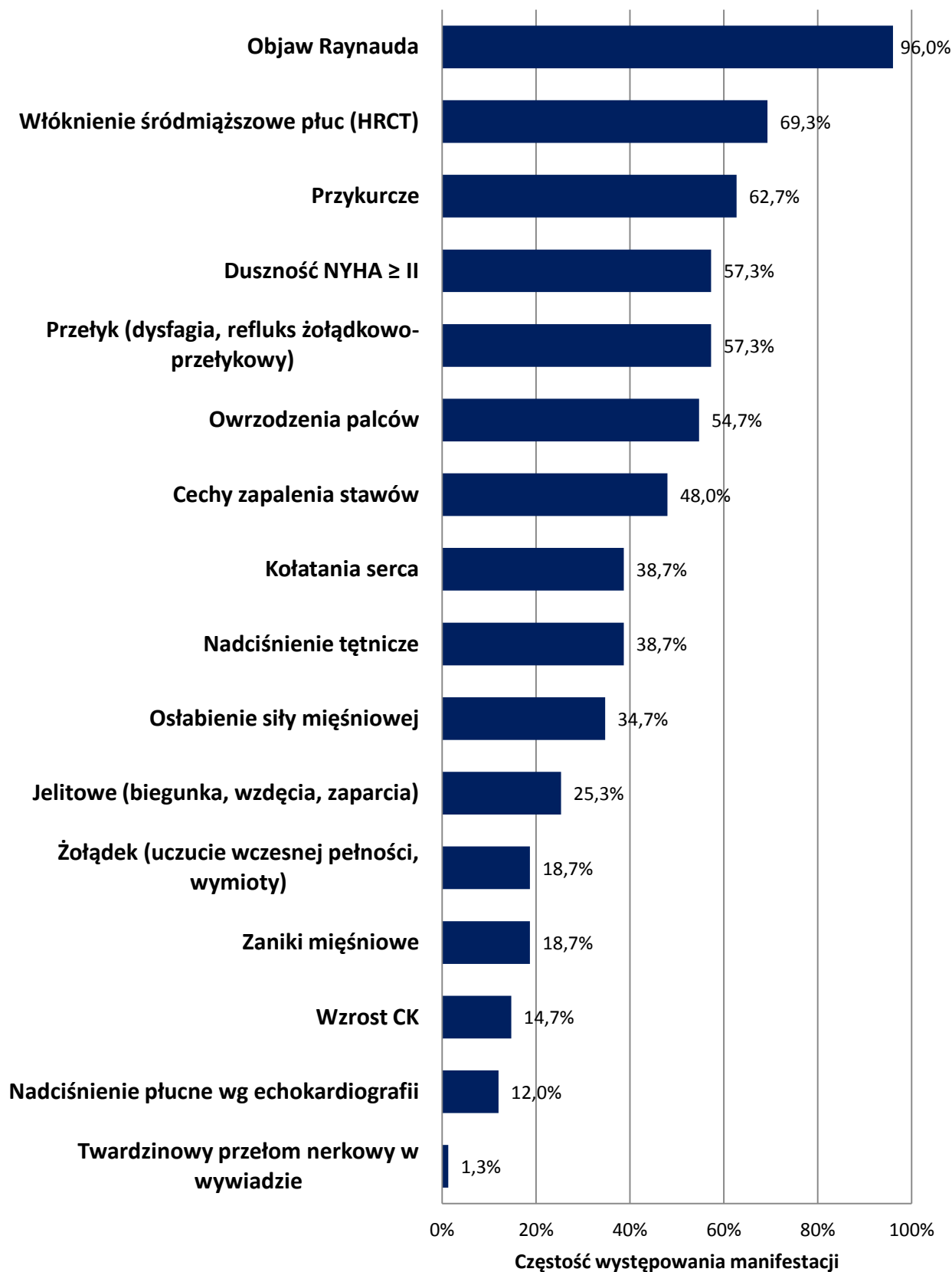


Rycina 11. Diagram Venna obrazujący liczbę pacjentów z obecnością przeciwciał przeciw poszczególnym antygenom oraz współistniejących w Systemic Sclerosis Profil.

Charakterystyka kliniczna populacji badanej opierała się na wystandaryzowanym kwestionariuszu *Minimal Essential Data Set*, utworzonym i rekomendowanym przez EUSTAR. Częstość występowania poszczególnych manifestacji choroby w porządku malejącym została przedstawiona w formie tabeli 9. i wykresu (rycina 12.)

Tabela 9. Częstość występowania objawów i powikłań charakterystycznych dla twardziny układowej w populacji badanej uszeregowane w kolejności malejącej.

Cecha choroby	Częstość występowania	Liczba chorych
Objaw Raynauda	96,0%	72
Włóknienie śródmiąższowe płuc (HRCT)	69,3%	52
Przykurcze	62,7%	47
Przełyk (dysfagia, refluks żołądkowo-przełykowy)	57,3%	44
Duszność NYHA $\geq$ II	57,3%	44
Owrzodzenia palców	54,7%	41
Cechy zapalenia stawów	48,0%	36
Nadciśnienie tętnicze	38,7%	29
Kołatania serca	38,7%	29
Oslabienie siły mięśniowej	34,7%	27
Jelitowe (biegunka, wzdęcia, zaparcia)	25,3%	19
Zaniki mięśniowe	18,7%	14
Żołądek (uczucie wczesnej pełności, wymioty)	18,7%	14
Wzrost CK	14,7%	11
Nadciśnienie płucne wg echokardiografii	12,0%	9
Twardzinowy przełom nerkowy w wywiadzie	1,3%	1



Rycina 12. Częstość występowania manifestacji charakterystycznych dla twardziny układowej w populacji badanej uszeregowana w kolejności malejącej.

Bardziej szczegółową charakterystykę kliniczną populacji badanej w rozbiu na poszczególne układy narządów i ich zaburzenia przedstawiono w tabeli 10.:

Tabela 10. Zajęcie skóry oraz układów krążenia, oddechowego, moczowego i pokarmowego w populacji badanej.

Układy narządów	Rodzaj zaburzeń	Wartość $\pm$ SD; Mediana (rozstęp kwartyłowy) lub odsetek populacji
Skóra	Stopień zajęcia skóry wg Rodnana (mRSS)	11,5 (7-15)
Układ krążenia	Zaburzenia przewodzenia	16,0%
	Zaburzenia czynności rozkurczowej serca	12,0%
	Frakcja wyrzutowa lewej komory serca [%]	60 (60-65)
	Obniżenie frakcji wyrzutowej lewej komory serca LVEF (<i>Left Ventricular Ejection Fraction</i>) < 55%	8,0%
	Zaburzenia kurczliwości	14,7%
	Nadciśnienie płucne wg echokardiografii	12,0%
	Nadciśnienie płucne potwierdzone cewnikowaniem prawostronnym serca (brak danych dla 56% chorych z SSc-PAH wg echo)	2,7%
	RVSP (<i>Right Ventricular Systolic Pressure</i>) [mmHg]	35 (25-42)
	Obecność typowych zmian naczyniowych w kapilaroskopii	96,0%
Układ oddechowy	Włóknienie śródmiąższowe płuc wg HRCT	69,3%
	Zaburzenia restrykcyjne (PFT)	13,3%
	TLC < 80 % wartości należnej	17,0%
	DLCOc (procent przewidywanej) Best/Predicted	54,4 (41,3-65,1)
Układ moczowy	Przewlekła Choroba Nerek stadium III	33,3%
	Białkomocz	20,0%
Układ pokarmowy	Pierwotna marskość żółciowa wątroby	2,7%

Dokonano analizy statystycznej, w której badano zależność występowania wybranych manifestacji klinicznych twardziny układowej lub podtypu choroby od obecności charakterystycznych przeciwciał. W hipotezie zerowej przyjęto, że nie stwierdza się różnic pomiędzy obecnością badanego przeciwciała i manifestacją choroby. Tam, gdzie grupy były odpowiednio liczne zastosowano test Chi kwadrat (χ^2). We wszystkich grupach zastosowano test dokładny Fishera. Ponieważ wartości uzyskane testem Chi kwadrat nie różniły się w sposób istotny od tych uzyskanych testem Fishera, dla przejrzystości w tabelach 11.-13. ujęto jedynie wartości p pochodzące z tego ostatniego. Kolorem szarym zaznaczono pary których istotność statystyczna wyniosła $p < 0,05$, natomiast kolorem czarnym te, w których istotność wyniosła $p < 0,01$.

Dla par przeciwciała-postać choroby oraz przeciwciała-manifestacja SSc, które osiągnęły znamienność statystyczną obliczono iloraz szans ich wystąpienia (OR) wraz z 95% przedziałami ufności (95%CI) w programie GraphPad InStat. Jeżeli w jakiegokolwiek komórce w tabelach kontyngencji pojawiało się zero, program dodawał wartość 0,5 do każdej komórki, aby umożliwić obliczenie OR. Pary, w których zastosowano niniejszą poprawkę zostały oznaczone symbolem „*”. Wyniki zaprezentowano w tabelach 14-15.

Tabela 11. Podsumowanie wartości p dla par przeciwciała-podtyp twardziny układowej w teście dokładnym Fishera. Na szaro zaznaczone zostały pary, które osiągnęły znamienność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, a na czarno $p < 0,01$.

Przeciwciała przeciw antygenowi	IcSSc	dcSSc	PM/SSc
Scl-70	0,033	<0,001	0,075
CENP-A	0,029	0,048	0,581
CENP-B	0,008	0,026	0,586
RNA Polimeraza III (11 kDa)	1,000	1,000	0,289
RNA Polimeraza III (155 kDa)	1,000	1,000	1,000
Fibrylaryna	0,699	0,688	1,000
NOR90	0,495	0,541	1,000
Th/To	0,699	1,000	0,094
PM-Scl 100	0,746	0,013	<0,001
PM-Scl 75	0,579	0,070	<0,001
Ku	0,467	1,000	0,080
PDGFR	0,097	0,039	1,000
Ro-52	0,427	0,054	0,166

Tabela 12. Podsumowanie wartości p dla par przeciwciało-manifestacja twardziny układowej w teście dokładnym Fishera. Na szaro zaznaczone zostały pary, które osiągnęły znamienność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, a na czarno $p < 0,01$.

Przeciwciało przeciw antygenowi	Naczynia		Układ mięśniowo-szkieletowy					Przewód pokarmowy		
	Objaw Raynauda	Owrzodzenia palców	Cechy zapalenia stawów (synovitis)	Przykurcze	Wzrost CK	Oslabienie siły mięśniowej	Zaniki mięśniowe	Przełyk (dysfagia, refluks)	Żołądek (uczucie wczesnej pełności, wymioty)	Jelitowe (biegunka, wzdęcia, zaparcia)
Scl-70	0,270	0,816	0,487	0,148	1,000	0,137	0,036	0,477	0,772	0,793
CENP-A	1,000	0,761	0,351	0,346	0,194	0,526	0,444	1,000	0,686	1,000
CENP-B	0,467	0,381	0,771	0,361	0,112	0,355	0,446	0,766	0,282	1,000
RNA Polimeraza III (11 kDa)	1,000	1,000	0,616	1,000	0,477	0,606	0,571	1,000	1,000	1,000
RNA Polimeraza III (155 kDa)	1,000	1,000	0,494	0,526	1,000	1,000	0,341	1,000	1,000	1,000
Fibrylaryna	1,000	1,000	0,250	0,706	1,000	0,227	0,020	0,692	0,116	1,000
NOR90	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,541	1,000	0,179	1,000	0,445
Th/To	1,000	0,446	0,004	0,706	0,060	0,006	0,116	0,129	1,000	1,000
PM-Scl 100	1,000	1,000	0,105	0,737	0,001	0,007	0,027	0,188	0,112	0,719
PM-Scl 75	1,000	0,775	0,150	1,000	0,001	0,033	0,028	0,776	0,276	1,000
Ku	1,000	0,453	1,000	0,373	0,147	0,347	1,000	0,427	1,000	1,000
PDGFR	1,000	0,246	0,605	0,289	0,383	1,000	0,467	0,256	0,467	1,000
Ro-52	0,567	0,435	0,184	0,596	1,000	0,788	0,743	0,602	0,015	0,366

Tabela 13. Podsumowanie wartości p dla par przeciwciało-manifestacja twardziny układowej w teście dokładnym Fishera. Na szaro zaznaczone zostały pary, które osiągnęły znamienność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, a na czarno $p < 0,01$.

Przeciwciało przeciw antygenowi	Układ krążenia							Układ oddechowy				Układ wydalniczy			
	Nadciśnienie tętnicze	Duszność (istotna)	Kołatania serca	Zaburzenia przewodzenia w sercu	Zaburzenia czynności rozkurczowej serca	Obniżenie frakcji wyrzutowej lewej komory serca $< 55\%$	Zaburzenia kurczliwości serca	Nadciśnienie płucne (echokardiografia)	Nadciśnienie płucne (cewnikowanie serca)	Zaburzenia restrykcyjne (PFT)	Włóknienie śródmiąższowe płuc w HRCT	Obniżenie DLCO $< 60\%$ wartości najeżnej	Przewlekła Choroba Nerek	Białkomocz	Twardzinowy przetłom nerkowy
Scl-70	0,813	0,236	0,334	0,203	1,000	0,210	0,330	0,469	0,514	0,731	1,000	0,301	0,144	0,139	1,000
CENP-A	0,195	0,752	0,349	0,677	0,339	0,581	1,000	0,161	0,296	1,000	0,170	1,000	1,000	0,697	1,000
CENP-B	0,137	1,000	0,546	1,000	0,195	1,000	0,420	0,360	0,341	1,000	0,110	0,427	1,000	0,722	1,000
RNA Polimeraza III (11 kDa)	0,020	0,131	0,638	1,000	1,000	1,000	0,477	1,000	1,000	0,443	1,000	1,000	1,000	1,000	0,053
RNA Polimeraza III (155 kDa)	0,146	0,504	0,519	1,000	1,000	1,000	0,274	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,027
Fibrylaryna	1,000	0,451	0,101	0,011	1,000	1,000	1,000	1,000	0,179	0,584	0,669	0,300	1,000	0,026	1,000
NOR90	0,519	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,485	0,550	0,362	1,000
Th/To	0,101	1,000	1,000	1,000	1,000	0,456	0,272	1,000	1,000	0,233	0,427	0,308	0,413	0,026	1,000
PM-Scl 100	0,186	0,046	0,513	0,194	0,340	1,000	1,000	0,338	1,000	0,635	0,015	0,325	0,318	0,683	1,000
PM-Scl 75	0,140	0,153	1,000	0,439	0,677	1,000	0,445	0,675	1,000	1,000	0,003	0,378	0,359	0,483	1,000
Ku	1,000	0,427	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
PDGFR	1,000	0,256	0,555	1,000	1,000	0,224	0,383	1,000	1,000	1,000	0,221	1,000	1,000	1,000	1,000
Ro-52	1,000	0,179	1,000	1,000	0,434	0,166	1,000	0,688	0,062	0,436	0,777	0,405	1,000	0,186	1,000

Tabela 14. Podsumowanie istotnych par przeciwciała-postać twardziny układowej w populacji badanej z ilorazem szans wystąpienia postaci choroby przy obecności danego przeciwciała. * zastosowano poprawkę OR (vide strona 57)

Przeciwciała przeciw antygenowi	Postać choroby	OR	95% CI	p
Scl-70	dcSSc	9,4	3,1-28,1	<0,001
	lcSSc	0,3	0,1-0,8	0,033
CENP-A	dcSSc	0,1	0-1,1	0,048
	lcSSc	5,5	1,1-27,2	0,029
CENP-B	dcSSc	0,1	0-0,9	0,026
	lcSSc	7,1	1,5-34,3	0,008
PM-Scl 100	dcSSc	0,1 *	0-1,2	0,013
	PM/SSc	152,5 *	7,5-3080,7	<0,001
PM-Scl 75	PM/SSc	77,2 *	4,0-1489,3	<0,001
PDGFR	dcSSc	14,7 *	0,7-297,4	0,039

Tabela 15. Podsumowanie istotnych par przeciwciała-manifestacja twardziny układowej w populacji badanej z ilorazem szans wystąpienia objawu przy obecności danego przeciwciała. * zastosowano poprawkę OR (vide strona 57)

Przeciwciała przeciw antygenowi	Manifestacja SSc	OR	95% CI	p
Scl-70	Zaniki mięśniowe	0,2	0-0,9	0,036
RNA Polimeraza III (11 kDa)	Nadciśnienie tętnicze	16,4*	0,85-317,4	0,019
RNA Polimeraza III (155 kDa)	Twardzinowy przełom nerkowy	147 *	4,1-5308,2	0,027
Fibrylaryna	Białkomocz	6,9	1,4-35,3	0,026
	Zaburzenia przewodzenia w sercu	10	1,9-53,1	0,01
	Zaniki mięśniowe	7,7	1,5-39,9	0,02
Th/To	Białkomocz	6,9	1,4-35,3	0,026
	Cechy zapalenia stawów	20,1	1,1-366,1	0,004
	Osłabienie siły mięśniowej	14,4	1,6-127,5	0,006
PM-Scl 100	Duszność NYHA $\geq$ II	0,22	0,1-0,9	0,046
	Osłabienie siły mięśniowej	6,8	1,6-28,6	0,007
	Włóknienie śródmiąższowe płuc	13 *	0,7-231,3	0,015
	Wzrost CK	14,2	14,2-63,3	<0,001
	Zaniki mięśniowe	5,1	1,3-20,3	0,027
PM-Scl 75	Osłabienie siły mięśniowej	3,8	1,2-12,3	0,033
	Włóknienie śródmiąższowe płuc	19,4	1,1-340,5	0,003
	Wzrost CK	12,3	2,9-51,4	<0,001
	Zaniki mięśniowe	4,3	1,2-15,5	0,028
Ro-52	Zaburzenia czynności żołądka	0,1*	0-1,3	0,015

Przeprowadzono następnie analizę, w której badano czy zastosowanie Systemic Sclerosis Profil (SSP) poszerza zakres diagnostyczny w stosunku do podstawowego panelu przeciwciał szeroko stosowanego w diagnostyce układowych chorób tkanki łącznej, czyli ANA Profil 3 (ANAP). W tym celu utworzono tabelę kontyngencji (tabela 16.), w której podzielono chorych na grupy z lub bez obecności co najmniej jednego przeciwciała charakterystycznego dla twardziny układowej. W przypadku ANAP uwzględniono obecność przeciwciał przeciw Scl-70, CENP-B oraz PM-Scl, a w SSP oceniano przeciwciała przeciw antygenom: Scl-70, CENP-A, CENP-B, RNA Polimerazie III 11 i 155 kDa, fibrylarynie, NOR90, Th/To, PM-Scl-100, PM-Scl-75, Ku i PDGFR.

Pytanie badawcze: Czy zastosowanie SSP istotnie zwiększa czułość metody laboratoryjnego wykrywania autoprzeciwciał w twardzinie układowej względem ANAP?

Tabela 16. Tabela kontyngencji przedstawiająca liczebność bezwzględną i względną chorych w populacji badanej z lub bez obecności przeciwciał charakterystycznych dla twardziny układowej w ANAP i SSP.

Tab. 1. Wyniki badań przeciwciał charakterystycznych dla twardziny układowej w ANA-1331.				
	ANA Profil 3 +		ANA Profil 3 -	
	51 (68,0%)	9 (12,0%)	60 (80,0%)	
Systemic Sclerosis Profil +				
Systemic Sclerosis Profil -	0 (0%)	15 (20,0%)	15 (20,0%)	
	51 (68,0%)	24 (32,0%)	75 (100,0%)	

W hipotezie zerowej przyjęto, że nie stwierdza się istotnej różnicy pomiędzy liczebnością chorych z przeciwciałami charakterystycznymi dla twardziny układowej w ANAP i SSP. W celu weryfikacji tej hipotezy zastosowano test McNemary, w którym stwierdzono istotną różnicę między liczebnością chorych wykrywanych ANAP, a SSP (Chi kwadrat McNemary B/C= 7,11, p=0,008).

Czułość testu ANAP względem wykrywania przeciwciał charakterystycznych dla twardziny układowej wynosi 68,0% (51/75), a SSP wynosi 80,0% (60/75).

Rozdział V - Dyskusja

Wartością niniejszego badania jest jego prospektywność, rozumiana nie tylko jako zaplanowana obserwacja, ale także podporządkowanie metodologii w celu weryfikacji hipotezy badawczej, a nie odwrotnie. Większość badań poszukujących związków przeciwciał z objawami narządowymi twardziny układowej ma charakter retrospektywny, a co za tym idzie niepełną dokumentację zmian narządowych pochodzącą z historii chorób.

W badaniu tym oparto się na wystandaryzowanym i bardzo szczegółowym schemacie MEDS, stosowanym przez grupę EUSTAR prowadzącą największy na świecie rejestr chorych na twardzinę układową. Jest to o tyle innowacyjne, że w większości badań tego typu stosowano albo mniej szczegółową skalę aktywności choroby Medsgera [123], bądź też arbitralnie ustalano definicje zmian narządowych.

Zaletą jest również uniknięcie różnic między badaczami poprzez przeprowadzanie badania podmiotowego i przedmiotowego wyłącznie przez autora pracy oraz zastosowanie sprawdzonego zestawu serologicznego LIA (*Line ImmunoAssay*) immunoblot (Systemic Sclerosis Profil), używanego w innych badaniach [72, 73, 124, 125], co zapewnia porównywalność wyników i wspiera jednolitość metody badawczej.

Badania dostępne w literaturze opisujące związki autoprzeciwciał charakterystycznych dla SSc z objawami klinicznymi różnią się znacząco pod względem metod oceny zmian narządowych i oznaczania przeciwciał, ale także różnych kryteriów włączenia: ACR i/lub LeRoy Medsger [59, 62]. Niewątpliwie utrudnia to porównanie wyników badań i może być odpowiedzialne za część rozbieżności pomiędzy nimi, co należy mieć na uwadze przy ich interpretacji.

Przeciwciała przeciw ATA (Scl-70)

Zaobserwowana częstość występowania ATA w niniejszym badaniu wynosiła 40,0% i mieściła się w podawanym w literaturze przedziale 18-48% [69, 72, 73, 124-127], choć należała raczej do wyższych niż przeciętnie [128]. Można to wytłumaczyć dużą proporcją chorych z dcSSc, którzy mają większą liczbę powikłań i dlatego są częściej pacjentami Kliniki Reumatologii niż chorzy z lcSSc.

U 4,0% (3/75) chorych zaobserwowano niezwykle rzadkie współistnienie ATA i ACA. Analizując poszczególne ACA stwierdzono, że 1 pacjent posiadał przeciwciała przeciw CENP-A i CENP-B, a dwoje posiadało jedynie przeciwciała CENP-B. Do niedawna uważano,

że obecność ACA i ATA wzajemnie się wykluczały. W ostatnich latach współwystępowanie ATA i ACA oceniono w dwóch badaniach na 0,5-0,6% populacji chorych na twardzinę układową [129, 130]. Heijnen i wsp. stwierdzili, że fenotyp pacjentów „podwójnie dodatnich” bliższy jest temu związanemu z ATA niż ACA, czyli postacią dcSSc.

W grupie chorych z obecnością ATA zaobserwowano silny związek z postacią dcSSc, które stwierdzono u 63,3% chorych (OR=9,4, 95%CI 3,1-28,1, $p<0,001$), a słabszy z postacią lcSSc u 36,7% (OR= 0,3, 95%CI 0,1-0,8, $p=0,033$), co jest zgodne z dotychczasową literaturą [69, 70, 97, 124, 131].

Co ciekawe, jedynym zaobserwowanym związkiem z objawami narządowymi u chorych ATA dodatnich było rzadsze występowanie zaników mięśniowych w tej grupie chorych (OR=0,2, 95%CI 0-0,9, $p=0,036$), czego wcześniej nie opisywano. Trudno jednoznacznie odpowiedzieć dlaczego mimo względnie dużej grupy chorych ATA dodatnich (30/75) nie zaobserwowano zmian dotąd opisywanych jak np.: częstszych owrzodzeń skóry czy też rzadszego występowania tętniczego nadciśnienia płucnego. Wydaje się, że można to tłumaczyć faktem dotychczas stosowanej metodologii porównań: ACA vs. ATA bądź dcSSc vs. lcSSc, a nie jak w tutejszym badaniu chorzy ATA dodatni vs. ATA ujemni. Wiadomo, że fenotyp ACA i ATA są w wielu aspektach istotnie różne, co może powodować jaskrawe różnice dotąd opisywane w literaturze [2, 97, 124].

Nie potwierdził się również związek z większą częstością zajęcia płuc u chorych z obecnością ATA. Jest to o tyle zastanawiające, że jak dotąd ten związek był niekwestionowany. Może to wynikać z przyjętej radiograficznej definicji SSc-ILD wykrywanej na podstawie bardzo czułego badania jakim jest HRCT [31, 132]. W większości badań uznawano obraz RTG jako definiujący włóknienie, a jak wiadomo zmiany śródmiąższowe na klasycznym radiogramie widoczne są dopiero przy zaawansowanej chorobie śródmiąższowej płuc. Duża liczba chorych ma zmiany ograniczone do średnio 13% miąższu płucnego, które są wykrywane w badaniu HRCT, ale nie na kliszy rentgenowskiej [31].

Przeciwciała przeciw Centromerom

Całkowita liczba pacjentów z obecnością przeciwciał przeciw centromerom wyniosła w niniejszym badaniu 20,0%. Więcej chorych miało przeciwciała przeciw CENP-B 18,7%, a mniej przeciw CENP-A 16,0%. Według różnych doniesień literaturowych odsetek chorych z ACA kształtował się w przedziale 20,0-42,6% [124-127, 133]. W badaniu Bonroy oraz Villalby i wsp., używających tej samej metodologii wykrywania przeciwciał, stwierdzono częstość anty-CENP-B w zakresie 30,5-44,0% i anty-CENP-A 29,5-46,0% [72, 73]. Nie ulega wątpliwości, że w porównaniu do doniesień literaturowych badana populacja ma małą liczbę chorych z przeciwciałami przeciw centromerom. Najprawdopodobniej można to wytłumaczyć podobnie jak w przypadku ATA dominującą grupą chorych z dcSSc, gdyż część pacjentów z lcSSc nie jest hospitalizowana, a raczej leczy się ambulatoryjnie.

Obecność ACA wiązała się w tym badaniu z występowaniem postaci lcSSc u chorych z anty-CENP-A (OR=5,5, 95%CI 1,1-27,2, p=0,029) i tych z anty-CENP-B (OR=7,1, 95%CI 1,5-34,3, p=0,008), natomiast z rzadszym występowaniem dcSSc wśród chorych z anty-CENP-A (OR=0,1, 95%CI 0-1,1, p=0,048) oraz tych z anty-CENP-B (OR=0,1, 95%CI 0-0,9, p=0,026), co jest zgodne z dotychczasową literaturą [66, 68, 134].

Nie stwierdzono w populacji badanej z obecnością ACA żadnych związków z objawami narządowymi SSs, być może z powodów podobnych jak przedstawione w analogicznej sytuacji w przypadku ATA.

Przeciwciała przeciw RNA Polimerazie III (anty-RNAP)

W niniejszym badaniu stwierdzona częstość występowania przeciwciał anty-RNAP wyniosła sumarycznie 5,3% (4/75), a w zależności od podjednostki: o masie 155 kDa 2,7% (2/75), a podjednostce 11 kDa 5,3% (4/75), co mieści się w przedziale podawanym w literaturze od 1,4% do 15,3% [73, 76, 98, 99, 101, 127]. Badania te wykorzystywały różne metody wykrywania przeciwciał od immunoprecypitacji, aż po paskowe testy immunoblot.

Obecność przeciwciał przeciw RNA Polimerazie III wiązała się u chorych z występowaniem nadciśnienia tętniczego (anty-RNAP-11, OR=16,4, 95%CI 0,85-317,4, p=0,020) oraz twardzinowego przełomu nerkowego (anty-RNAP-155, OR=147, 95%CI 4,1-5308,2, p=0,027), a w przypadku anty-RNAP-11 (p=0,053), czyli bardzo blisko progu istotności statystycznej, co pokrywa się z wnioskami z badań Bunna, Meyera, Nikpoura,

Satoha i wsp. [76, 98, 99, 101]. Nie stwierdzono związku z jakąkolwiek postacią choroby, lecz można to tłumaczyć krótkim czasem od rozpoznania (1-3 lat), gdyż postać uogólniona choroby może początkowo spełniać kryteria lcSSc [62].

Przeciwciała przeciw Th/To

Częstość występowania przeciwciał przeciw Th/To w niniejszej grupie badanej wyniosła 9,3% i jest większa od wszystkich jak dotąd opublikowanych w literaturze, mieszczących się według Nihtyanovej i wsp. w przedziale 1-7% [77]. Poszczególni autorzy oszacowali częstość występowania anty-Th/To na: Mierau 0,2%, Bonroy 2,1%, Mehra 2,8%, Villalta 3,3%, Hamaguchi 3,4%, Ceribelli 3,7% i Graf 6% [72, 73, 77, 80, 124-126, 135].

Niewiele jest badań oceniających zajęcie narządów u chorych na SSc z obecnością przeciwciał anty-Th/To. Mitri i wsp. porównywali chorych z obecnością ACA i przeciwciał przeciw Th/To; stwierdzili związek tych ostatnich z SSc-ILD, tętniczym nadciśnieniem płucnym (SSc-PAH), twardzinowym przełomem nerkowym i skróconym czasem przeżycia [79]. Z kolei Ceribelli i wsp. oprócz związku z SSc-ILD stwierdzili u chorych z obecnością anty-Th/To łagodne zajęcie skóry i zapalenie osierdzia. W badaniu autora niniejszej pracy stwierdzono związek z występowaniem: białkomoczu (OR=6,9, 95%CI 1,4-35,3, p=0,026), zapalenia stawów (OR=20,1, 1,1-366,1, p=0,004) i osłabienia siły mięśniowej (OR=14,4, 95%CI 1,6-127,5, p=0,006). W dostępnej literaturze nie ma danych na temat ww. związków, co może wynikać z przyjętej metodologii – zazwyczaj nie oceniano poszczególnych parametrów kliniczno-laboratoryjnych według schematu MEDS grupy EUSTAR. W niniejszej pracy nie stwierdzono związku z występowaniem SSc-ILD i SSc-PAH, co potwierdza analogiczne obserwacje grupy Villalty i Gliddona [73, 136].

Pomimo doniesień literaturowych o częstym występowaniu postaci lcSSc u chorych z anty-Th/To [73, 79, 80, 136], podobnie jak w badaniu Hamaguchi i wsp. [135] nie zaobserwowano istotnego związku z jakąkolwiek postacią choroby, chociaż taki trend jest zauważalny. W badanej grupie były 3 osoby z lcSSc, 2 z dcSSc ze współistniejącymi ATA oraz 2 osoby z zespołem nakładania twardziny układowej i zapalenia wielomięśniowego, spełniające również kryteria lcSSc.

Przeciwciała przeciw fibrylarynie (AFA, anty-U3RNP)

Podobnie jak w przypadku anty-Th/To, częstość występowania AFA w niniejszym badaniu wyniosła 9,3% i była jedną z najwyższych dotąd stwierdzonych wśród chorych rasy białej. Mehra i wsp. podają zakres częstości na 4,0-10,0% wśród chorych na SSc, przy czym inni badacze ocenili częstość w przedziale 0,0%-4,1% wśród chorych pochodzenia kaukaskiego i azjatyckiego [72, 73, 82, 125, 135]. Wśród Afro-Amerykanów Sharif i wsp. stwierdzili istotnie większe występowanie tego przeciwciała wynoszące aż 18,5%. Co ciekawe, w badaniach Villalta, Bonroy'a, Mehry i Grafa [72, 73, 124, 125], które używały tego samego zestawu immunoblot (SSP) w celu wykrywania przeciwciał, czułość AFA wynosiła od 0,0-1,4%, stąd nie można tłumaczyć tych różnic odmiennością metody oznaczania.

Niewielu autorów podjęło próbę poszukiwania związków objawów narządowych z obecnością AFA, najprawdopodobniej z uwagi na zbyt mało liczne podgrupy chorych. Hamaguchi i wsp. opisali związek AFA z postacią dcSSc, jednak bez różnic w zajęciu narządów w stosunku do chorych z innymi przeciwciałami [135]. Mehra i wsp. zwrócili uwagę na niepublikowane doniesienia o zajęciu mięśni wśród chorych z AFA, co potwierdza się w stwierdzonym w niniejszym badaniu związku z częstszym występowaniem zaników mięśniowych (OR=7,7, 95%CI 1,5-39,9, p=0,020). Tormey i wsp. odnotowali związek z zajęciem nerek, co potwierdzałoby obserwację o związku białkomoczu (OR=6,9, 95%CI 1,4-35,3, p=0,026) z tą grupą chorych w badaniu autora tej rozprawy.

Trudno odnieść się do stwierdzonego w niniejszej pracy związku AFA z zaburzeniami przewodzenia w sercu (OR=10, 95%CI=1,9-53,1, p=0,011), bowiem w cytowanych badaniach nie było to oceniane. Jedyną wzmianką o zajęciu serca była praca Sharifa i wsp., którzy udokumentowali większą częstość zapalenia osierdzia w populacji Afro-Amerykanów z AFA, jednak nie było to przedmiotem oceny niniejszego badania.

AFA często współistnieją z innymi swoistymi dla twardziny układowej [124]. W niniejszej pracy 6/7 chorych z AFA posiadało przeciwciała towarzyszące.

Silny związek AFA z postacią dcSSc, dość często opisywany w literaturze [81, 126, 135], nie potwierdził się w niniejszym badaniu podobnie jak i u Tormeya i wsp. [82], choć może to wynikać z obecności przeciwciał towarzyszących.

Przeciwciała przeciw PM-Scl (anty-PM-Scl-75 i anty-PM-Scl-100)

Przeciwciała anty-PM-Scl były obecne w grupie badanej aż u 20,0% chorych, przy czym anty-PM-Scl-75 u 20,0%, a anty-PM-Scl-100 u 14,7%. Jest to o tyle zaskakujące, że w dostępnej literaturze całkowity odsetek osób z przeciwciałami przeciw PM-Scl w tej jednostce chorobowej wahał się od 0,0-12,5% [77, 85, 125-127]. Wśród badań oceniających występowanie anty-PM-Scl-75 i anty-PM-Scl-100 tą samą metodą paskową immunoblot firmy EUROIMMUN, jak niniejsze badanie, stwierdzono zakres częstości występowania odpowiednio 9,0-12,5% i 4,9-10,3% [72, 73, 85, 124]. Rodriguez oraz Villalta i wsp. nie wspominają o włączeniu pacjentów z zespołami nakładania, a Mierau i wsp. także włączali osoby z niezróżnicowaną chorobą tkanki łącznej. Trudno udzielić jednoznacznej odpowiedzi, czy częstość tych przeciwciał w populacji polskiej jest rzeczywiście większa, czy jest to skutkiem włączenia podgrupy z zespołem nakładania PM/SSc do badania. Warto jednak podkreślić, że wszyscy chorzy spełniali kryteria klasyfikacyjne ACR dla SSc.

Zarówno przeciwciała anty-PM-Scl-75 jak i anty-PM-Scl-100 silnie wiązały się w niniejszym badaniu z zespołem nakładania PM/SSc odpowiednio (OR=77,2, 95%CI 4-1489,3, $p<0,001$ i OR=152,5, 95%CI 7,5-3080,7, $p<0,001$), co jest szeroko udokumentowane w literaturze [67]. W przypadku anty-PM-Scl-100 zaobserwowano również związek z rzadszym występowaniem postaci dcSSc (OR=0,1, 95%CI 0-1,2, $p=0,046$). Jest to o tyle zaskakujące, gdyż jak dotąd związek z postacią dcSSc opisywano, ale wyłącznie wobec anty-PM-Scl-75 [85].

W przedstawionym badaniu stwierdzono związek obu przeciwciał anty-PM-Scl z występowaniem cech zapalenia mięśni: wzrostu CK odpowiednio anty-PM-Scl-75 i anty-PM-Scl-100 (OR=12,3, 95%CI 2,9-51,4, $p=0,001$ i OR=14,2, 95%CI 14,2-63,3, $p=0,001$), osłabieniem siły mięśniowej (OR=3,8, 95%CI 1,2-12,3, $p=0,033$ i OR=6,8, 95%CI 1,6-28,6, $p=0,007$), zanikami mięśniowymi (OR=4,3, 95%CI 1,2-15,5, $p=0,028$ i OR=5,1, 95%CI 1,3-20,3, $p=0,027$).

Ponadto wykazano związek anty-PM-Scl-75 i anty-PM-Scl-100 z włóknieniem śródmiąższowym płuc odpowiednio (OR=19,4, 95%CI 1,1-340,5, $p=0,003$ i OR=13, 95%CI 0,7-231,3, $p=0,015$). Występowanie anty-PM-Scl-100 wiązało się z rzadziej zgłaszaną przez chorych dusznością NYHA $\geq$ II (OR=0,22, 95%CI 0,1-0,9, $p=0,046$). Jest to zgodne z dotychczasową literaturą, w której często stwierdzano zajęcie procesem chorobowym

mięśni oraz płuc [85]. Trudno wyjaśnić rzadziej występującą duszność mimo częstszej obecności SSc-ILD, ale można podejrzewać, że przebieg choroby śródmiąższowej płuc jest łagodniejszy w tej grupie pacjentów. Hipoteza ta wymaga weryfikacji w dalszych badaniach.

Przeciwciała przeciw Ku

Stwierdzona częstość występowania anty-Ku wyniosła 1,3% (1/75), co jest wartością niewiele niższą od podawanej w literaturze 2-4,7% [73, 88, 124, 125]. Przeciwciała to stwierdzono u chorej z zespołem nakładania twardziny układowej i zapalenia wielomięśniowego, przy czym współwystępowało ono z przeciwciałami przeciw PM/Scl 100 i PM/Scl75. Jest to o tyle interesujące, że w grupie 14 chorych z anty-Ku Rozman i wsp. pisali o uderzającym braku takiego związku [88].

W największej jak dotąd kohorcie 73 pacjentów z obecnością anty-Ku, w tym 21 chorych na twardzinę układową, stwierdzono związek przeciwciał z zajęciem układu mięśniowo-szkieletowego, niezależnie od płci i rozpoznania [87].

W prezentowanym badaniu nie stwierdzono związku anty-Ku z występowaniem zmian narządowych. Warto jednak zauważyć, że najniższe wartości p sugerujące najsilniejszy związek (choć nadal nieistotny statystycznie) występowały w szeroko opisywanym w literaturze zajęciu układu mięśniowo-szkieletowego. Naturalnie przy analizie jednej chorej nie można wyciągać daleko idących wniosków.

Przeciwciała przeciw NOR 90 (anty-hUBF)

W niniejszym badaniu częstość występowania anty-hUBF wyniosła 2,7% (2/75) i oboje chorzy mieli postać lcSSc, jednak nie stwierdzono związku z postacią choroby i występowaniem powikłań narządowych. Literatura dotycząca tych przeciwciał jest bardzo ograniczona. W badaniu Villalby i wsp. w populacji włoskiej częstość występowania wyniosła 4,8%, a Mehry i wsp. na populacji australijskiej 2,8%, czyli zbliżone do populacji badanej [73, 124]. Warto odnotować, że oba badania stosowały ten sam zestaw do oznaczania przeciwciał, jaki zastosowano w tej pracy.

W badaniu Mierau i wsp. stwierdzono niższą częstość anty-hUBF (0,7%) wśród chorych na twardzinę układową w populacji niemieckiej. Należy podkreślić, że zastosowana w nim metoda oznaczania przeciwciał techniką immunoprecypitacji wykonywana była

jedynie u chorych ze stwierdzonym jąderkowym typem świecenia w immunofluorescencji. Autorzy przyznali, że liczba chorych z obecnością anty-hUBF może być w konsekwencji zaniżona, gdyż przeciwciała te często współwystępują z innymi, co zaburza obraz IF [126].

Anty-hUBF zazwyczaj występują w postaci lcSSc choroby [73, 90, 126], choć w badaniu Fujii i wsp. spośród trzech chorych z twardziną układową 2 miało postać uogólnioną i 1 ograniczoną [89].

Brakuje dużych badań oceniających związek przeciwciał anty-hUBF z objawami narządowymi twardziny układowej, co wynika z bardzo niewielkiej liczby chorych serologicznie dodatnich w ich kierunku. Mierau i wsp. wśród 6 chorych nie stwierdzili żadnych związków z objawami narządowymi [126], jednak podobnie jak i w tym badaniu z uwagi na niską liczebność nie można wysuwać daleko idących wniosków i potrzeba dalszych badań w tym zakresie na większej populacji.

Przeciwciała przeciw receptorowi dla PDGF (anty-PDGFR)

Częstość występowania anty-PDGFR w niniejszym badaniu wyniosła 4,0%, czyli istotnie więcej niż w dotychczasowych pracach Mehry i Villalty odpowiednio 0,4% i 0,95%, oceniających surowice chorych tą samą metodą [73, 124]. W porównaniu jednak do doniesień wcześniejszych Baroniego Loizosa i wsp. (odpowiednio 100,0% i 32,7%) jest to zdecydowanie mniej [91, 92]. Warto jednak zauważyć, że w cytowanych badaniach stosowano rozbieżne metody oznaczania tych przeciwciał. Na chwilę obecną metody wykrywania anty-PDGFR budzą liczne kontrowersje wśród badaczy i panuje zgoda co do tego, że wymagają one dalszych badań i standaryzacji.

W przedstawianej pracy nie stwierdzono związku obecności anty-PDGFR z występowaniem objawów narządowych twardziny układowej, jednak podobnie jak Bonroy, Villalta i Graf [72, 73, 125] autor pracy podchodzi ostrożnie do ich interpretacji z uwagi na małą liczbę chorych. Warto zauważyć, że stwierdzono istotny związek anty-PDGFR z postacią dcSSc (OR=14,7, 95%CI 0,7-297,4, p=0,039), jednak we wszystkich 3 przypadkach obecne było także przeciwciało towarzyszące ATA lub AFA, które niezależnie wiążą się z tym podtypem choroby.

Przeciwciała przeciw Ro-52

Przeciwciała te nie są swoiste dla twardziny układowej, gdyż mogą występować w wielu układowych chorobach tkanki łącznej [124]. Bardzo często jednak u chorych na twardzinę układową współwystępują z bardziej swoistymi przeciwciałami. W niniejszej pracy stwierdzono całkowitą częstość występowania anty-Ro-52 na 25,3%, a w 2 przypadkach były to jedyne autoprzeciwciała (2,7%). Potwierdza to doniesienia literaturowe co do całkowitej częstości występowania przeciwciał przeciw Ro-52 w zakresie 18,1%-35,0% [73, 96, 124, 126, 137] oraz jako izolowanego autoprzeciwciała w zakresie 0,2%-5,9% [124, 126].

Nie ma wielu badań analizujących związki objawów narządowych z anty-Ro52, gdyż nie jest to przeciwciało swoiste dla twardziny układowej. W niniejszej kohorcie stwierdzono związek obecności anty-Ro-52 z rzadszym występowaniem zaburzeń czynności żołądka ($OR=0,1$, 95%CI 0-1,3, $p=0,015$), co jak dotąd nie było stwierdzane. Hudson i wsp. w swoim badaniu nie odnotowali takiego związku, jednak może to wynikać z przyjętej definicji zaburzeń przewodu pokarmowego nierozróżniającej objawów pochodzących z poszczególnych jego odcinków [137].

Fujimoto i wsp. a następnie Mierau stwierdzili związek anty-Ro-52 z częstszym występowaniem wtórnego zespołu Sjögrena [104, 126], co znalazło również potwierdzenie w tym badaniu ($OR=7,2$, 95%CI 1,2-43,2, $p=0,033$). Nie potwierdził się natomiast związek z śródmiąższowym włóknieniem płuc oraz zespołami nakładania zapalenia mięśni [137].

Czułość Systemic Sclerosis Profil

Czułość testu SSP w identyfikowaniu pacjentów z postawionym klinicznie rozpoznaniem twardziny układowej wynosiła 80,0% (60/75), a ANA Profil 3 68,0% (51/75). W teście McNemary wykazano większą czułość SSP względem ANA Profil 3 ($p=0,008$). Analiza literatury przedmiotu potwierdziła, że jest to pierwsze porównanie czułości SSP i ANA Profil 3. Czułość SSP obliczona na podstawie zebranych danych jest zgodna z wcześniejszymi obserwacjami innych autorów, w których zawierała się ona w przedziale 71,4-85,0% [72, 73, 125].

Bonroy i wsp. porównywali zgodność wykrywania przeciwciał konwencjonalnymi metodami oraz SSP. W tym celu oznaczyli przeciwciała metodami immunofluorescencji (ANA), Western Blot, radioimmunoprecypitacji białkowej i RNA oraz podwójnej immunodyszufji vs. paskowym testem immunoblot (SSP). Badacze stwierdzili wysoki poziom zgodności wyników badań pomiędzy metodami całościowo ($\kappa=0.787$, zgodność 92,4%) oraz wysoki współczynnik zgodności $\kappa>0,80$ Cohena dla przeciwciał ACA, ATA, anty-RNA Polimerazy III i anty-PM/Scl wykrywanych obiema metodami [72].

Dobry poziom zgodności z metodami referencyjnymi, prostota wykonania i niski koszt są argumentami przemawiającymi za rutynowym wykorzystywaniem SSP w oznaczaniu autoprzeciwciał w SSc w praktyce klinicznej.

Ograniczenia badania

Ponieważ chorzy rekrutowani do badania stanowili w dużej mierze pacjenci Kliniki Reumatologii i Chorób Wewnętrznych UMP toteż ich populacja może nie być zupełnie reprezentatywna dla wszystkich chorych na twardzinę układową w Polsce. Mając na uwadze ograniczenie wynikające z faktu jednośrodkowości badania, autor podjął starania by je ograniczyć poprzez współpracę w kierowaniu chorych do ośrodka badawczego z Poradniami Reumatologicznymi, Dermatologiczną, Pulmonologiczną i Kardiologiczną (ostatnie trzy są ośrodkami przykliniknymi więc najwyższej referencji). Dzięki temu liczba chorych zwiększyła się o ponad połowę.

Warto podkreślić, że należy zachować ostrożność w ekstrapolacji wyników badań na całą populację chorych na twardzinę układową. Grupa badana liczyła 75 osób, co nie jest małą populacją zważywszy na rzadkie występowanie choroby, ale jest to o tyle problematyczne, że przedmiotem badania były rzadko występujące przeciwciała. Dlatego liczność osób z ich obecnością wahała się od 15 w przypadku przeciwciał przeciw PM-Scl-75 do 1 osoby z anty-Ku.

Badanie podmiotowe i przedmiotowe przeprowadzał jeden badacz, co z jednej strony eliminowało niezgodność między różnymi badaczami, ale też mogło potencjalnie prowadzić do błędu systematycznego.

W pracy przyjęto progi odcięcia wyników dodatnich i ujemnych obecności przeciwciał zgodnie z rekomendacjami producenta Systemic Sclerosis Profil. Pominięto w analizie wyniki graniczne, zgodnie z metodologią stosowaną w większości badań. Trudno jednoznacznie rozstrzygnąć, czy punkty odcięcia ustalone przez producenta zapewniają optymalne czułości i swoistości.

Z uwagi na konstrukcję badania niezawierającą grupy kontrolnej można było obliczyć jedynie czułość przeciwciał z pominięciem ich swoistości w zakresie wykrywania chorych z SSc.

Sugerowane kierunki dalszych badań

Niewątpliwie istnieje potrzeba dalszych badań nad autoprzeciwciałami nieklasycznymi w twardzinie układowej, zwłaszcza tymi najrzadziej występującymi jak: AFA, Th/To, NOR90, Ku, PDGFR, gdyż wiedza o nich jest nadal niedostateczna.

W kontekście badań podstawowych za mało wiemy o faktycznej roli przeciwciał przeciwjądrowych w twardzinie układowej: czy są one jedynie markerem choroby, czy też ogrywają rolę patogenetyczną [77] ?

Przeciwciała przeciwjądrowe wykryto u 96,0% (72/75) chorych, natomiast w najbardziej czułej metodzie identyfikacji przeciwciał SSP czułość wyniosła jedynie 80,0%, a zatem u 16,0% chorych nie udało się zidentyfikować przeciwciała charakterystycznego dla twardziny układowej, odpowiadającego za dodatni wynik immunofluorescencji pośredniej. W tej ostatniej grupie 2 chorych (2,7%) miało izolowane przeciwciała anty-Ro52, ale u 9 (12,0%) nie można było wykryć jakichkolwiek przeciwciał przeciwjądrowych zarówno ANAP jak i SSP. Można z tego wyciągnąć wniosek, że istnieją jak dotąd niezidentyfikowane przeciwciała przeciwjądrowe, których wyizolowanie i charakteryzacja z powodzeniem może być przedmiotem dalszych badań naukowych.

Rozdział VI - Wnioski

1. W badanej populacji chorych na twardzinę układową stwierdzono następującą częstość występowania autoprzeciwciał przeciw antygenom w kolejności malejącej: Scl-70 (40,0%), Ro-52 (25,3%), PM-Scl 75 (20,0%), CENP-B (18,7%), CENP-A (16,0%), PM-Scl 100 (14,7%), fibrylaryna (9,3%), Th/To (9,3%), RNA Polimeraza III 11 kDa (5,3%), PDGFR (4,0%), NOR90 (2,7%), RNA Polimeraza III 155 kDa (2,7%), Ku (1,3%).
2. Stwierdzono istotne statystycznie związki między obecnością badanych autoprzeciwciał, a wybranymi objawami klinicznymi twardziny układowej. Identyfikowanie badanych autoprzeciwciał w SSc wskazuje podgrupy pacjentów o określonym przebiegu klinicznym, co jest pomocne w prognozowaniu zmian narządowych.
3. Identyfikowanie badanych autoprzeciwciał testem Systemic Sclerosis Profil w znaczącym stopniu poprawia czułość diagnostyki serologicznej w stosunku do testu ANA Profil 3, co może odgrywać pomocniczą rolę we wczesnej fazie choroby, gdy chorzy nie spełniają kryteriów klasyfikacyjnych.

Streszczenie

WSTĘP: Twardzina układowa jest rzadką układową chorobą tkanki łącznej, w wyniku której dochodzi do postępującego włóknienia wielu narządów. Charakterystyczne jest występowanie w jej przebiegu dwóch klasycznych przeciwciał przeciwjądrowych: przeciw topoizomerazie I (Scl-70) i przeciwcentromerowych. W ostatnich latach stwierdzono obecność przeciwciał przeciw szerszej grupie antygenów m.in. RNA Polimerazie III, Fibrylarynie, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, jednak ich znaczenie kliniczne jest stosunkowo mało poznane.

CEL PRACY: Celem niniejszego badania była ocena częstości występowania wybranych autoprzeciwciał w populacji polskich pacjentów z twardziną układową oraz poszukiwanie zależności między ich występowaniem, a wybranymi objawami klinicznymi choroby. Celem drugorzędowym było porównanie czułości dwóch testów: ANA Profil 3 i Systemic Sclerosis Profil.

MATERIAŁ I METODY: Badanie miało charakter prospektywny i przekrojowy. Grupa badana liczyła 75 osób. Surowice pacjentów z rozpoznaniem twardziny układowej (kryteria ACR) zostały zabezpieczone i oznaczono w nich przeciwciała metodą immunofluorescencji pośredniej (HEp-2 i wątroba mały) oraz EUROLINE (immunoblot) ANA Profil 3 oraz Systemic Sclerosis Profil firmy EUROIMMUN (Niemcy). Zajęcie narządów zostało ocenione zgodnie z Minimal Essential Data Set używanym przez EUSTAR. Dokonana została analiza statystyczna uzyskanych wyników przy użyciu testu dokładnego Fishera i McNemary, za istotne statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI: W badanej populacji chorych na twardzinę układową zaobserwowano następujące częstości występowania autoprzeciwciał przeciw antygenom: Scl-70 (40,0%), Ro-52 (25,3%), PM-Scl 75 (20,0%), CENP-B (18,7%), CENP-A (16,0%), PM-Scl 100 (14,7%), Fibrylarynie (9,3%), Th/To (9,3%), RNA Polimerazie III 11 kDa (5,3%), PDGFR (4,0%), NOR90 (2,7%), RNA Polimerazie III 155 kDa (2,7%), Ku (1,3%). Stwierdzono także występowanie istotnych związków między obecnością autoprzeciwciał a objawami narządowymi: Scl-70 (dcSSc > lcSSc i mniejsza częstość zaników mięśniowych), Ro-52 (rzadkie zaburzenia czynności żołądka), CENP-B i A (lcSSc > dcSSc), PM-Scl 100 i 75 (zespół nakładania PM/SSc, wzrost CK, osłabienie

siły mięśniowej, zaniki mięśniowe i włóknienie śródmiąższowe płuc), PM-Scl-100 (dcSSc i duszność NYHA $\geq$ II), Fibrylaryna (zaniki mięśniowe, białkomocz, zaburzenia przewodzenia w sercu), Th/To (białkomocz, zapalenie stawów i osłabienie siły mięśniowej), RNA Polimeraza III 11 kDa (nadciśnienie tętnicze), RNA Polimeraza III 155 kDa (twardzinowy przełom nerkowy), PDGFR (dcSSc). Ponadto wykazano, że Systemic Sclerosis Profil jest istotnie bardziej czuły w identyfikowaniu autoprzeciwciał charakterystycznych dla twardziny układowej niż ANA Profil 3 (czułość odpowiednio: 80,0% i 68,0%, $p=0,008$).

WNIOSKI: Identyfikowanie badanych autoprzeciwciał w twardzinie układowej wskazuje podgrupy pacjentów o określonym przebiegu klinicznym i poprawia czułość diagnostyki serologicznej.

“Prevalence and clinical significance of selected autoantibodies in systemic sclerosis”

Abstract

INTRODUCTION: Systemic sclerosis (SSc) is a rare connective tissue disorder, which leads to progressive fibrosis of many organs. Its course is characterised by the presence of two classical autoantibodies: anti-topoisomerase I (ATA, Scl-70) and anti-centromere (ACA). In recent years, the presence of antibodies against a wider range of antigens was demonstrated, namely: RNA polymerase III, Fibrillarin, NOR90, Th/To, PM-Scl-100, PM-Scl-75, Ku, PDGFR, but their clinical significance is relatively little known.

OBJECTIVES: To evaluate the prevalence of selected autoantibodies in the population of Polish patients with systemic sclerosis and to examine associations between their presence and selected clinical signs and symptoms of the disease. A secondary objective was to compare the sensitivity of the two line immunoblot assays: ANA Profile 3 and Systemic Sclerosis Profile.

MATERIAL AND METHODS: The study was prospective and cross-sectional in design. The study group consisted of 75 patients. Sera of patients diagnosed with systemic sclerosis (ACR criteria) were secured and assessed for the presence of antibodies by indirect immunofluorescence (HEp-2 and monkey liver) and line immunoblot assays (LIAs): ANA Profile 3 and Systemic Sclerosis Profile by EUROIMMUN (Germany). The organ involvement was evaluated in accordance with the Minimal Essential Data Set used by EUSTAR. The results were subject to statistical analysis using the Fisher exact and McNemara Chi-square tests and $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS: In the population studied the following prevalence of autoantibodies against antigens was observed: Scl-70 (40.0%), Ro -52 (25.3%), PM-Scl-75 (20.0%), CENP-B (18.7 %), CENP-A (16.0%), PM-Scl-100 (14.7%), Fibrillarin (9.3%), Th/To (9.3%), RNA polymerase III 11 kDa (5.3%), PDGFR (4.0%), NOR-90 (2.7%), RNA polymerase III 155 kDa (2.7%), Ku (1.3%). Significant associations between the presence of autoantibodies and organ involvement were found: ATA (dcSSc > lcSSc, rare muscle atrophy), Ro -52 (rare stomach symptoms), CENP-B and A (lcSSc > dcSSc), PM-Scl-100 and 75 (PM/SSc overlap, CK increase, muscle

weakness, muscle atrophy and interstitial lung disease, PM-Scl-100 (dcSSc and dyspnea of NYHA $\geq$ II), Fibrillarin (muscle atrophy, proteinuria, conduction abnormalities in the heart), Th/To (proteinuria, arthritis and muscle weakness), RNA Polymerase III 11 kDa (systemic hypertension), RNA polymerase III 155 kDa (scleroderma renal crisis), PDGFR (dcSSc). In addition, Systemic Sclerosis Profile was significantly more sensitive in detecting SSc-related autoantibodies than ANA Profile 3 (sensitivity: 80.0 % and 68.0% respectively, McNemar's Chi-square $p = 0.008$).

CONCLUSIONS: Assessment of autoantibodies in systemic sclerosis allows identification of serological subgroups of patients with a specific clinical course and improves the sensitivity of serological diagnosis.

Załącznik 1 – Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 988/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2003, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo Farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 01 grudnia 2011 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawili:

Pan dr hab. Mariusz Puszczewicz oraz Pan lek. med. Paweł Żebryk

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze i Klinice Reumatologii i Chorób Wewnętrznych UM w
Poznaniu**

Główny badacz: lek. med. Paweł Żebryk

Temat

**badania: "Ocena występowania i znaczenia klinicznego wybranych
przeciwciał nieklasycznych w twardzinie układowej".**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Spis rycin

Rycina 1. Objaw Raynauda u chorego na twardzinę układową (faza skurczu naczyń). Fot. ze zbiorów własnych autora.....	16
Rycina 2. Objaw Raynauda u chorej na twardzinę układową (faza zasinienia). Fot. ze zbiorów własnych autora.....	16
Rycina 3. Zanik opuszków palców (strzałki) u chorej na twardzinę układową. Fot. ze zbiorów własnych autora.....	17
Rycina 4. RTG rąk w projekcji a-p chorej ze zdjęcia powyżej (rycina 3.). Widoczna akroosteoliza paliczka II ręki prawej oraz II i III ręki lewej, zwapnienia zaznaczono strzałkami. Radiogram ze zbiorów własnych autora.....	17
Rycina 5. Owrzodzenie paliczka w wyniku niedokrwienia (strzałka) z powodu wtórnego objawu Raynauda u chorej na twardzinę układową. Fot. ze zbiorów własnych autora.	18
Rycina 6. Ogniska hiper- i hipopigmentacji skóry u pacjentki u chorej na twardzinę układową. Fot. ze zbiorów własnych autora.	18
Rycina 7. Włóknienie śródmiąższowe płuc uwidocznione w badaniu HRCT w przebiegu twardziny układowej (po lewej zmiany wczesne, po prawej zaawansowane). Ze zbiorów autora pracy.....	21
Rycina 8. Centromerowy typ świecenia przeciwciał w immunofluorescencji pośredniej. Fot. ze zbiorów dr hab. n. med. Mariusza J. Puszczewicza, prof. UM.	32
Rycina 9. Odsetek chorych z obecnością przeciwciał dla antygenów charakterystycznych dla twardziny układowej w populacji badanej.	51
Rycina 10. Odsetek chorych z obecnością przeciwciał dla antygenów w ANA Profil 3.	52
Rycina 11. Diagram Venna obrazujący liczbę pacjentów z obecnością przeciwciał przeciw poszczególnym antygenom oraz współistniejących w Systemic Sclerosis Profil.....	53
Rycina 12. Częstość występowania manifestacji charakterystycznych dla twardziny układowej w populacji badanej uszeregowana w kolejności malejącej.	55

Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja układowych chorób tkanki łącznej według <i>American Rheumatism Association</i> , 1983 [1].....	9
Tabela 2. Kryteria klasyfikacyjne twardziny układowej wg Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego [59] w tłumaczeniu [60].	29
Tabela 3. Kryteria klasyfikacyjne wczesnej twardziny układowej wg LeRoy i Medsger, 2001 [62] w tłumaczeniu [60].	30
Tabela 4. Podsumowanie opisywanych w literaturze związków między obecnością przeciwciał przeciw antygenom a wybranymi manifestacjami twardziny układowej.	37
Tabela 5. Charakterystyka ogólna populacji badanej.	50
Tabela 6. Charakterystyka laboratoryjna populacji badanej.	50
Tabela 7. Liczba chorych z obecnością charakterystycznych dla twardziny układowej przeciwciał przeciw antygenom.....	51
Tabela 8. Liczba chorych z obecnością przeciwciał przeciw antygenom w ANA Profil 3.	52
Tabela 9. Częstość występowania objawów i powikłań charakterystycznych dla twardziny układowej w populacji badanej uszeregowane w kolejności malejącej.	54
Tabela 10. Zajęcie skóry oraz układów krążenia, oddechowego, moczowego i pokarmowego w populacji badanej.	56
Tabela 11. Podsumowanie wartości p dla par przeciwciało-podtyp twardziny układowej w teście dokładnym Fishera. Na szaro zaznaczone zostały pary, które osiągnęły znamienność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, a na czarno $p < 0,01$	57
Tabela 12. Podsumowanie wartości p dla par przeciwciało-manifestacja twardziny układowej w teście dokładnym Fishera. Na szaro zaznaczone zostały pary, które osiągnęły znamienność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, a na czarno $p < 0,01$	58
Tabela 13. Podsumowanie wartości p dla par przeciwciało-manifestacja twardziny układowej w teście dokładnym Fishera. Na szaro zaznaczone zostały pary, które osiągnęły znamienność statystyczną na poziomie $p < 0,05$, a na czarno $p < 0,01$	59
Tabela 14. Podsumowanie istotnych par przeciwciało-postać twardziny układowej w populacji badanej z ilorazem szans wystąpienia postaci choroby przy obecności danego przeciwciała. * zastosowano poprawkę OR (vide strona 57)	60

Tabela 15. Podsumowanie istotnych par przeciwciało-manifestacja twardziny układowej w populacji badanej z ilorazem szans wystąpienia objawu przy obecności danego przeciwciała. * zastosowano poprawkę OR (vide strona 57)	60
Tabela 16. Tabela kontyngencji przedstawiająca liczebność bezwzględną i względną chorych w populacji badanej z lub bez obecności przeciwciał charakterystycznych dla twardziny układowej w ANAP i SSP.	61

Rozdział VI – Piśmiennictwo

1. Decker JL. American Rheumatism Association nomenclature and classification of arthritis and rheumatism (1983). *Arthritis Rheum.* 1983;26(8):1029-32.
2. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med.* 2009;360(19):1989-2003.
3. Rodnan GP, Benedek TG. An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma). *Ann Intern Med.* 1962;57:305-19.
4. Roberts-Thomson PJ, Walker JG. Scleroderma: it has been a long hard journey. *Intern Med J.* 2006;36(8):519-23.
5. Benedek TG, Rodnan GP. The early history and nomenclature of scleroderma and of its differentiation from sclerema neonatorum and scleroedema. *Semin Arthritis Rheum.* 1982;12(1):52-67.
6. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(2):165-70.
7. Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A311-8.
8. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(8):468-76.
9. Herrick AL, Worthington J. Genetic epidemiology: systemic sclerosis. *Arthritis research.* 2002;4(3):165-8.
10. Zhou X, Tan FK, Wang N, et al. Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence. *Arthritis Rheum.* 2003;48(9):2585-92.
11. Arnett FC, Gourh P, Shete S, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic

sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(5):822-7.

12. Lipworth L, Holmich LR, McLaughlin JK. Silicone breast implants and connective tissue disease: no association. *Semin Immunopathol*. 2011;33(3):287-94.

13. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(10):1809-15.

14. Hissaria P, Lester S, Hakendorf P, et al. Survival in scleroderma: results from the population-based South Australian Register. *Intern Med J*. 2011;41(5):381-90.

15. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol*. 2010;37(1):42-53.

16. Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, et al. Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):300-4.

17. Fett N. Scleroderma: nomenclature, etiology, pathogenesis, prognosis, and treatments: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013;31(4):432-7.

18. Herrick AL. The pathogenesis, diagnosis and treatment of Raynaud phenomenon. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(8):469-79.

19. Wigley FM. Clinical practice. Raynaud's Phenomenon. *N Engl J Med*. 2002;347(13):1001-8.

20. Cutolo M, Sulli A, Smith V. How to perform and interpret capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2013;27(2):237-48.

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

22. Cutolo M, Sulli A, Smith V. Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(10):578-87.

23. Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3902-12.
24. Czirjak L, Foeldvari I, Muller-Ladner U. Skin involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47 Suppl 5:v44-5.
25. Chung L, Lin J, Furst DE, et al. Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol.* 2006;24(5):374-92.
26. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007;117(3):557-67.
27. Castellino FV, Varga J. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):213.
28. Moore OA, Goh N, Corte T, et al. Extent of disease on high-resolution computed tomography lung is a predictor of decline and mortality in systemic sclerosis-related interstitial lung disease. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(1):155-60.
29. Goldin JG, Lynch DA, Strollo DC, et al. High-resolution CT scan findings in patients with symptomatic scleroderma-related interstitial lung disease. *Chest.* 2008;134(2):358-67.
30. Bellia M, Cannizzaro F, Scichilone N, et al. HRCT and scleroderma: semiquantitative evaluation of lung damage and functional abnormalities. *Radiol Med.* 2009;114(2):190-203.
31. Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, et al. Scleroderma lung disease. *Eur Respir Rev.* 2013;22(127):6-19.
32. Meier FM, Frommer KW, Dinser R, et al. Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(8):1355-60.
33. Desai CS, Lee DC, Shah SJ. Systemic sclerosis and the heart: current diagnosis and management. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23(6):545-54.

34. York M, Farber HW. Pulmonary hypertension: screening and evaluation in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(6):536-44.
35. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association Developed in Collaboration With the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(17):1573-619.
36. Lambova S, Muller-Ladner U. Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2010;9(11):761-70.
37. Mathai SC, Hassoun PM. Pulmonary arterial hypertension in connective tissue diseases. *Heart Fail Clin*. 2012;8(3):413-25.
38. Dimitroulas T, Mavrogeni S, Kitas GD. Imaging modalities for the diagnosis of pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(4):203-13.
39. Kahan A, Coghlan G, McLaughlin V. Cardiac complications of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48 Suppl 3:iii45-8.
40. Allanore Y, Meune C, Vonk MC, et al. Prevalence and factors associated with left ventricular dysfunction in the EULAR Scleroderma Trial and Research group (EUSTAR) database of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):218-21.
41. Sallam H, McNearney TA, Chen JD. Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis (scleroderma). *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(6):691-712.
42. Jaovisidha K, Csuka ME, Almagro UA, et al. Severe gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: Report of five cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum*. 2005;34(4):689-702.
43. Gyger G, Baron M. Gastrointestinal manifestations of scleroderma: recent progress in evaluation, pathogenesis, and management. *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14(1):22-9.

44. Savarino E, Mei F, Parodi A, et al. Gastrointestinal motility disorder assessment in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(6):1095-100.
45. Murtaugh MA, Frech TM. Nutritional status and gastrointestinal symptoms in systemic sclerosis patients. *Clin Nutr*. 2013;32(1):130-5.
46. Marie I, Ducrotte P, Denis P, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(10):1314-9.
47. Cavazzana I, Ceribelli A, Taraborelli M, et al. Primary biliary cirrhosis-related autoantibodies in a large cohort of italian patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2011;38(10):2180-5.
48. Kumagi T, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:1.
49. Avouac J, Clements PJ, Khanna D, et al. Articular involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(8):1347-56.
50. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):339-50.
51. Avouac J, Walker U, Tyndall A, et al. Characteristics of joint involvement and relationships with systemic inflammation in systemic sclerosis: results from the EULAR Scleroderma Trial and Research Group (EUSTAR) database. *J Rheumatol*. 2010;37(7):1488-501.
52. Clements PJ, Allanore Y, Khanna D, et al. Arthritis in systemic sclerosis: systematic review of the literature and suggestions for the performance of future clinical trials in systemic sclerosis arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2012;41(6):801-14.
53. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1975;292(7):344-7.
54. Pakozdi A, Nihtyanova S, Moinzadeh P, et al. Clinical and serological hallmarks of systemic sclerosis overlap syndromes. *J Rheumatol*. 2011;38(11):2406-9.

55. Bussone G, Berezne A, Pestre V, et al. The scleroderma kidney: progress in risk factors, therapy, and prevention. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13(1):37-43.
56. Hesselstrand R, Scheja A, Wuttge DM. Scleroderma renal crisis in a Swedish systemic sclerosis cohort: survival, renal outcome, and RNA polymerase III antibodies as a risk factor. *Scand J Rheumatol*. 2012;41(1):39-43.
57. Scheja A, Bartosik I, Wuttge DM, et al. Renal function is mostly preserved in patients with systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol*. 2009;38(4):295-8.
58. Elhai M, Avouac J, Kahan A, et al. Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013.
59. Masi AT. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum*. 1980;23(5):581-90.
60. Kowal-Bielecka O, Kuryliszyn-Moskal A. Systemic sclerosis. *Reumatologia*. 2012;50(2):124-9.
61. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15(2):202-5.
62. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28(7):1573-6.
63. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(1):71-81.
64. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol*. 2009;4:1.
65. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1601-11.

66. Hudson M, Mahler M, Pope J, et al. Clinical correlates of CENP-A and CENP-B antibodies in a large cohort of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2012;39(4):787-94.
67. Reveille JD, Solomon DH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003;49(3):399-412.
68. Russo K, Hoch S, Dima C, et al. Circulating anticentromere CENP-A and CENP-B antibodies in patients with diffuse and limited systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2000;27(1):142-8.
69. Hanke K, Dahnrich C, Bruckner CS, et al. Diagnostic value of anti-topoisomerase I antibodies in a large monocentric cohort. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R28.
70. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med*. 1997;103(3):242-8.
71. Villalta D, Morozzi G, Tampoia M, et al. Antibodies to fibrillarin, PM-Scl and RNA polymerase III detected by ELISA assays in patients with systemic sclerosis. *Clin Chim Acta*. 2010;411(9-10):710-3.
72. Bonroy C, Van Praet J, Smith V, et al. Optimization and diagnostic performance of a single multiparameter lineblot in the serological workup of systemic sclerosis. *J Immunol Methods*. 2012;379(1-2):53-60.
73. Villalta D, Imbustaro T, Di Giovanni S, et al. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):114-20.
74. Puszczewicz M. Antinuclear antibodies - What to do with them? *Reumatologia*. 2013;51(3):172-8.
75. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, et al. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1399-404.

76. Satoh T, Ishikawa O, Ihn H, et al. Clinical usefulness of anti-RNA polymerase III antibody measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(12):1570-4.
77. Nihtyanova SI, Denton CP. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(2):112-6.
78. Mahler M, Gascon C, Patel S, et al. Rpp25 is a major target of autoantibodies to the Th/To complex as measured by a novel chemiluminescent assay. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(2):R50.
79. Mitri GM, Lucas M, Fertig N, et al. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum*. 2003;48(1):203-9.
80. Ceribelli A, Cavazzana I, Franceschini F, et al. Anti-Th/To are common antinucleolar autoantibodies in Italian patients with scleroderma. *J Rheumatol*. 2010;37(10):2071-5.
81. Sharif R, Fritzler MJ, Mayes MD, et al. Anti-fibrillarin antibody in African American patients with systemic sclerosis: immunogenetics, clinical features, and survival analysis. *J Rheumatol*. 2011;38(8):1622-30.
82. Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, et al. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(10):1157-62.
83. Mahler M, Raijmakers R. Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev*. 2007;6(7):432-7.
84. Maes L, Blockmans D, Verschueren P, et al. Anti-PM/Scl-100 and anti-RNA-polymerase III antibodies in scleroderma. *Clin Chim Acta*. 2010;411(13-14):965-71.
85. Hanke K, Bruckner CS, Dahnrich C, et al. Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R22.

86. Belizna C, Henrion D, Beucher A, et al. Anti-Ku antibodies: Clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev.* 2010;9(10):691-4.
87. Lakota K, Thallinger GG, Sodin-Semrl S, et al. International cohort study of 73 anti-Ku-positive patients: association of p70/p80 anti-Ku antibodies with joint/bone features and differentiation of disease populations by using principal-components analysis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(1):R2.
88. Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, et al. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(9):1282-6.
89. Fujii T, Mimori T, Akizuki M. Detection of autoantibodies to nucleolar transcription factor NOR 90/hUBF in sera of patients with rheumatic diseases, by recombinant autoantigen-based assays. *Arthritis Rheum.* 1996;39(8):1313-8.
90. Dagher JH, Scheer U, Voit R, et al. Autoantibodies to NOR 90/hUBF: longterm clinical and serological followup in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. *J Rheumatol.* 2002;29(7):1543-7.
91. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(25):2667-76.
92. Loizos N, Lariccia L, Weiner J, et al. Lack of detection of agonist activity by antibodies to platelet-derived growth factor receptor alpha in a subset of normal and systemic sclerosis patient sera. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1145-51.
93. Classen JF, Henrohn D, Rorsman F, et al. Lack of evidence of stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptor in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1137-44.
94. Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, et al. Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev.* 2011;10(3):150-4.
95. Frank MB, McCubbin V, Trieu E, et al. The association of anti-Ro52 autoantibodies with myositis and scleroderma autoantibodies. *J Autoimmun.* 1999;12(2):137-42.

96. Parker JC, Burlingame RW, Bunn CC. Prevalence of antibodies to Ro-52 in a serologically defined population of patients with systemic sclerosis. *J Autoimmune Dis.* 2009;6:2.
97. Weiner ES, Earnshaw WC, Senecal JL, et al. Clinical associations of anticentromere antibodies and antibodies to topoisomerase I. A study of 355 patients. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):378-85.
98. Bunn CC, Denton CP, Shi-Wen X, et al. Anti-RNA polymerases and other autoantibody specificities in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol.* 1998;37(1):15-20.
99. Meyer O, De Chaisemartin L, Nicaise-Roland P, et al. Anti-RNA polymerase III antibody prevalence and associated clinical manifestations in a large series of French patients with systemic sclerosis: a cross-sectional study. *J Rheumatol.* 2010;37(1):125-30.
100. Nihtyanova SI, Parker JC, Black CM, et al. A longitudinal study of anti-RNA polymerase III antibody levels in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(10):1218-21.
101. Nikpour M, Hissaria P, Byron J, et al. Prevalence, correlates and clinical usefulness of antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis: a cross-sectional analysis of data from an Australian cohort. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(6):R211.
102. Koschik RW, 2nd, Fertig N, Lucas MR, et al. Anti-PM-Scl antibody in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30(2 Suppl 71):S12-6.
103. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets. *Autoimmun Rev.* 2007;7(2):121-6.
104. Fujimoto M, Shimoizuma M, Yazawa N, et al. Prevalence and clinical relevance of 52-kDa and 60-kDa Ro/SS-A autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1997;56(11):667-70.
105. Hervier B, Rimbert M, Colonna F, et al. Clinical significance of anti-Ro/SSA-52 kDa antibodies: a retrospective monocentric study. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(8):964-7.

106. Derk CT. Disease-modifying drugs for systemic sclerosis: why have we not found them yet? *Expert Rev Clin Immunol*. 2011;7(4):399-401.
107. Kahaleh B. Progress in research into systemic sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9434):561-2.
108. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med*. 2006;354(25):2655-66.
109. Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(6):754-63.
110. Verrecchia F, Laboureau J, Verola O, et al. Skin involvement in scleroderma--where histological and clinical scores meet. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(5):833-41.
111. Brennan P, Silman A, Black C, et al. Reliability of skin involvement measures in scleroderma. The UK Scleroderma Study Group. *Br J Rheumatol*. 1992;31(7):457-60.
112. Kowal-Bielecka O, Avouac J, Pittrow D, et al. Echocardiography as an outcome measure in scleroderma-related pulmonary arterial hypertension: a systematic literature analysis by the EPOSS group. *J Rheumatol*. 2010;37(1):105-15.
113. Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J*. 2005;26(4):720-35.
114. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319-38.
115. Wanger J, Clausen JL, Coates A, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J*. 2005;26(3):511-22.
116. Piorunek T, Kuznar-Kaminska B, Cofta S, et al. Lung impairment in scleroderma. *Adv Exp Med Biol*. 2013;755:149-54.

117. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med.* 1999;130(6):461-70.
118. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* 2011;80(1):17-28.
119. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005;67(6):2089-100.
120. Cutolo M, Sulli A, Secchi ME, et al. Nailfold capillaroscopy is useful for the diagnosis and follow-up of autoimmune rheumatic diseases. A future tool for the analysis of microvascular heart involvement? *Rheumatology (Oxford).* 2006;45 Suppl 4:iv43-6.
121. Cutolo M, Pizzorni C, Secchi ME, et al. Capillaroscopy. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(6):1093-108.
122. Ustawa z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych. *Sect. Dz.U.* 1997 nr 133 poz. 883 (1997).
123. Medsger TA, Jr., Bombardieri S, Czirjak L, et al. Assessment of disease severity and prognosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21(3 Suppl 29):S42-6.
124. Mehra S, Walker J, Patterson K, et al. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2013;12(3):340-54.
125. Graf SW, Hakendorf P, Lester S, et al. South Australian Scleroderma Register: autoantibodies as predictive biomarkers of phenotype and outcome. *Int J Rheum Dis.* 2012;15(1):102-9.
126. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German Network for Systemic Scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R172.

127. Rodriguez-Reyna TS, Hinojosa-Azaola A, Martinez-Reyes C, et al. Distinctive autoantibody profile in Mexican Mestizo systemic sclerosis patients. *Autoimmunity*. 2011;44(7):576-84.
128. Basu D, Reveille JD. Anti-scl-70. *Autoimmunity*. 2005;38(1):65-72.
129. Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, et al. Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(2):121-7.
130. Heijnen IA, Foocharoen C, Bannert B, et al. Clinical significance of coexisting antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis: a EUSTAR group-based study. *Clin Exp Rheumatol*. 2012.
131. Czompoly T, Simon D, Czirjak L, et al. Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2009;8(8):692-6.
132. Wells AU. High-resolution computed tomography and scleroderma lung disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47 Suppl 5:v59-61.
133. Mahler M, You D, Baron M, et al. Anti-centromere antibodies in a large cohort of systemic sclerosis patients: comparison between immunofluorescence, CENP-A and CENP-B ELISA. *Clin Chim Acta*. 2011;412:1937-43.
134. Miyawaki S, Asanuma H, Nishiyama S, et al. Clinical and serological heterogeneity in patients with anticentromere antibodies. *J Rheumatol*. 2005;32(8):1488-94.
135. Hamaguchi Y, Hasegawa M, Fujimoto M, et al. The clinical relevance of serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol*. 2008;158(3):487-95.
136. Gliddon AE, Dore CJ, Dunphy J, et al. Antinuclear antibodies and clinical associations in a british cohort with limited cutaneous systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2011;38(4):702-5.
137. Hudson M, Pope J, Mahler M, et al. Clinical significance of antibodies to Ro52/TRIM21 in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(2):R50.