

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Lekarski



Justyna Kwapisz

**„Wybrane parametry hemostazy i zapalenia
u pacjentów z objawem Raynauda”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Wojciech Witkiewicz

Promotor pomocniczy

Dr n. med. Anna Czarnecka

Poznań 2014

Rozprawa jest częścią projektu “Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo – Naczyniowej”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013 realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodku Badawczo-Rozwojowym.

Wyrazy wdzięczności

Promotorowi

*Panu prof. dr hab. n. med. Wojciechowi Witkiewiczowi
oraz Pani Promotor pomocniczej
Pani dr n. med. Annie Czarneckiej
dziękuję za poświęcony czas i pomoc merytoryczną.*

Serdecznie dziękuję

*Pani prof. dr hab. n. med. Marii Kotschy oraz
Panu doktorowi Danielowi Kotschy za cenne wskazówki.*

Rodzicom i przyjaciołom dziękuję za wyrozumiałość i wsparcie.

Spis treści

1. Wykaz skrótów	5
2. Wstęp	8
2.1. Rys historyczny	8
2.2. Definicja i charakterystyka objawu Raynauda	14
2.3. Pierwotny a wtórny RP	15
2.3.1. Mikroskopowa ocena wału paznokciowego	18
2.3.2. Stężenie przeciwciał przeciwwjądrowych	19
2.4. Epidemiologia	20
2.5. Mechanizm skurczu naczyń	21
2.6. Strukturalna i funkcjonalna organizacja przepływu krwi przez skórę	23
2.6.1. AVA	24
2.6.2. Receptory	25
2.7. Skurcz naczyń a płuć	25
2.8. Krzepnięcie i fibrynoliza	26
2.9. Czynniki zapalenia	33
3. Cele i założenia pracy	38
4. Materiał i metody	39
4.1. Badana populacja	39
4.2. Metody badań	41
4.3. Analizy statystyczne	48
5. Wyniki badań	50
6. Omówienie wyników i dyskusja	108
7. Wnioski	130
8. Streszczenie	131
9. Abstract	134
10. Piśmiennictwo	137
11. Załączniki	157
11.1. Załącznik 1.	157
11.2. Załącznik 2.	159
11.3. Załącznik 3.	162

1. Wykaz skrótów

ABPI – wskaźnik kostka-ramię (ang. ankle brachial pressure index)

ACA – przeciwciała przeciw centromerom (ang. anti-centromere antibodies)

ACR/EULAR – Amerykańskie Towarzystwo Reumatologiczne/Europejska Liga Przeciw Reumatyzmowi (ang. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism)

AECA – przeciwciała skierowane przeciwko komórkom śródbłónka (ang. anti-endothelial cell antibodies)

AlAT – aminotransferaza alaninowa

ALP – fosfataza alkaliczna (ang. alkaline phosphatase)

ANA – przeciwciała przeciwjądrowe (ang. antinuclear antibodies)

ASO – miażdżyca zarostowa (ang. arteriosclerosis obliterans)

AspAT – aminotransferaza asparaginianowa

AT – antytrombina

ATA – przeciwciała przeciwko topoizomerazie I (ang. anti-topoisomerase I antibodies)

AVA – anastomozy tętniczo-żylne (ang. arteriovenous anastomoses)

BAT – brunatna tkanka tłuszczowa (ang. brown adipose tissue)

bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor)

BMI – wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)

c-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ cytoplazmatyczny (ang. cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies)

ChNS – choroba niedokrwienności serca

CREST – dawna nazwa ograniczonej postaci twardziny stanowiąca akronim objawów ISSc (ang. Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasias)

CRP – białko C reaktywne (ang. C reactive protein)

CTD – choroba układowa tkanki łącznej (ang. connective tissue disease)

CTS – zespół cieśni nadgarstka (ang. carpal tunnel syndrome)

DIC – zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (ang. disseminated intravascular coagulation)

DM – zapalenie skórno-mięśniowe (łac. dermatomyositis)

dSSc – postać uogólniona twardziny układowej (ang. diffuse systemic sclerosis)

EGF – czynnik wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor*)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

EUSTAR – grupa ds. Badań Klinicznych i Naukowych Twardziny Układowej (ang. European Scleroderma Trial and Research)

HAVS – choroba wibracyjna (ang. hand-arm vibration syndrome)

HCT – hematokryt (ang. hematocrit)

HDL – lipoproteina wysokiej gęstości (ang. high-density lipoprotein)

HGB – hemoglobina

HHS – zespół młotkowy kłębika (ang. hypothernar hammer syndrome)

IL-6 – interleukina 6 (ang. interleukin 6)

IL-10 – interleukina 10 (ang. interleukin 10)

LDL – lipoproteina niskiej gęstości (ang. low-density lipoprotein)

ISSc – postać ograniczona twardziny układowej (CREST) (ang. limited systemic sclerosis)

MCTD – mieszana choroba tkanki łącznej (ang. mixed connective tissue disease)

NCEP ATP III – National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

NO – tlenek azotu (ang. nitric oxide)

OB – odczyn Biernackiego

p/p-value – istotność statystyczna

p-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ okołojądrowy (ang. perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies)

PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (ang. plasminogen activator inhibitor type 1)

PLT – płytki krwi (ang. blood platelets)

PM – zapalenie wielomięśniowe (łac. polymyositis)

PVAT – okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa (ang. perivascular adipose tissue)

RBC – czerwone krwinki (ang. red blood cells)

RF – czynnik reumatoidalny (ang. rheumatoid factor)

RNAP III – RNA polimeraza III (ang. RNA polymerase III)

RP – objaw Raynauda (ang. Raynaud's phenomenon)

RTG – rentgenogram

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

SLE – toczeń rumieniowaty układowy (ang. systemic lupus erythematosus)

SS – zespół Sjögrena (ang. Sjögren's syndrome)

SSc – twardzina układowa (ang. systemic sclerosis)

t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu (ang. tissue plasminogen activator)

TAFI – aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy (ang. thrombin activated fibrynolysis inhibitor)

TAO – zakrzepowo-zarostowe zapalenie naczyń, choroba Buergera (ang. thromboangiitis obliterans)

TAT – trombina-antytrombina (ang. thrombin-antithrombin)

TC – cholesterol całkowity (ang. total cholesterol)

TF – czynnik tkankowy (ang. tissue factor)

TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF (ang. tissue factor pathway inhibitor)

TG – triglicerydy (ang. triglyceride)

TGF- β 1 – transformujący czynnik wzrostu- β 1 (ang. transforming growth factor- β 1)

TM – trombomodulina (ang. thrombomodulin)

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

TSH – tyreotropina (ang. thyroid stimulating hormone)

UCTD – niezróżnicowana choroba tkanki łącznej (ang. undifferentiated connective tissue disease)

USG – ultrasonografia

WAT – biała tkanka tłuszczowa (zwana także żółtą) (ang. white adipose tissue)

WBC – białe krwinki (ang. white blood cells)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

VEDOSS – badanie nad kryteriami bardzo wczesnego rozpoznania twardziny układowej (ang. very early diagnosis of systemic sclerosis)

VRP – objaw Raynauda wywołany narażaniem na wibracje (vibration-induced Raynaud's Phenomenon)

vWF – czynnik von Willebranda (ang. von Willebrand factor)

2. Wstęp

2.1. Rys historyczny

Pod koniec lat pięćdziesiątych XIX wieku 27-letnia Francuzka zauważyła, że w sytuacji narażenia na działanie niskiej temperatury lub stresu, palce obu jej dłoni bledną. Po kilku tygodniach od pierwszego incydentu opuszki niektórych palców stały się pomarszczone i czarne. Towarzyszyła temu duża bolesność. Lekarzem, który zajmował się pacjentką, był młody francuski lekarz Auguste-Maurice Raynaud. Stan pacjentki bardzo go zainteresował, jednocześnie wprowadzając w zakłopotanie, gdyż nie znał przyczyny obserwowanej martwicy tkanek. Pacjentka poza zgłaszanymi objawami była zdrowa i miała zachowane prawidłowe tętno mierzone nad tętnicą promieniową, co gwarantowało prawidłowe ukrwienie rąk. Nie odnalazł żadnej ówczasnie znanej przyczyny, która mogłaby powodować prezentowane objawy. Stwierdził, że zmiana zabarwienia skóry palców dłoni musi mieć związek z czasową blokadą dopływu krwi i na tym tle rozwija się martwica opuszek palców [1].

Patomechanizm powstawania owrzodzeń skóry inny niż zamknięcie naczyń lub jego 'stwardnienie' od osiemnastego wieku był przedmiotem badań i naukowych dyskusji. Obserwowano coraz większą grupę przypadków martwicy, której przyczyn ówczesna medycyna nie potrafiła jednoznacznie określić.

W 1862 roku Auguste-Maurice Raynaud w swej rozprawie doktorskiej pt. „De l'asphyxie locale et de la gangrène symétrique des extrémités” („Local asphyxia and symmetrical gangrene of the extremities”) zawarł teorię napadowego przemijającego skurczu naczyń zależnego od nadreaktywności istoty szarej rdzenia kręgowego. Zaproponowany przez Raynauada patomechanizm zaobserwowanego objawu dał podwaliny „współczulnej teorii” jego postawiania. Doktorant dokładnie opisał 25 pacjentów, u których występowały wywołane niską temperaturą lub stresem odwracalne blednięcie lub zasinienie oraz następowe zaczerwienienie z towarzyszącym uczuciem gorąca, a nawet z bólem, głównie palców rąk i stóp. Dolegliwości te trwały różnie długo – od kilku minut do kilku godzin i mogły przebiegać łagodnie, kiedy to nie tworzyły się owrzodzenia, lecz w niektórych przypadkach dochodziło do suchej martwicy tkanek. Od 1889 roku opisany przez młodego doktora objaw odwracalnego skurczu naczyń kapilarnych został nazwany jego nazwiskiem. Trzydzieści lat później funkcjonował w nomenklaturze medycznej pod nazwą choroby Raynauada [2].

Dalsze badania nad objawem wprowadziły wiele zmian do jego pierwotnej charakterystyki. Przede wszystkim w 1901 roku Hutchinson zapoczątkował rozróżnianie objawu Raynauda (RP) na pierwotny i wtórny. Zauważył bowiem incydenty wazospastyczne u chorych na twardzinę lub kiłę i na podstawie tych obserwacji stwierdził, że właściwiej jest nazywać je objawem zamiast chorobą Raynauda, jeżeli są związane ze schorzeniami ogólnoustrojowymi [3]. W 1957 roku Gifford i Hines [4] jasno stwierdzili, że objaw Raynauda jako wtórny może nawet o wiele lat wyprzedzać chorobę podstawową. Zaczęto doskonalić narzędzia diagnostyczne pomocne w postawieniu właściwej diagnozy.

Kolejne zmiany dotyczyły patomechanizmu powstawania odwracalnego skurczu naczyń kapilarnych. Młody francuski lekarz w swej rozprawie doktorskiej skłaniał się ku „teorii współczulnej” opartej na badaniach na zwierzętach. Na 10 lat przed pierwszym opisem objawu Claude Bernard, poprzez resekcję części szyjnej króliczego pnia współczulnego, wywołał ipsilateralnie gwałtowny wzrost krążenia wraz ze wzrostem ciepłoty [5]. Na tej podstawie Auguste-Maurice Raynaud wysunął hipotezę nadreaktywności istoty szarej rdzenia kręgowego jako odpowiedzialnej za obserwowane przez niego niedokrwienie palców.

Dopiero na przełomie lat dwudziestych i trzydziestych XX wieku Sir Thomas Lewis przedstawił tzw. „teorię błędu miejscowego” (local fault), która stanęła w opozycji do poprzedniej, zakładając przyczynę nieprawidłowości przepływu krwi przez naczynia kapilarne nie na poziomie rdzenia kręgowego, czyli centralnego układu nerwowego (CUN), a na poziomie wspomnianych naczyń. Przeprowadził on eksperyment, podczas którego ręka pacjenta lub całe jego ciało było zanurzone w wodzie o temperaturze do 40⁰C, zaś jeden palec poddany został działaniu wody o temperaturze 10⁰C. Lewis zaobserwował, że palec narażony na niską temperaturę białiał, a następnie siniał. Dodatkowo stwierdził, że skurcz naczyń nie wystąpi, gdy ręka pacjenta jest ogrzana, a całe ciało poddane działaniu niskiej temperatury. Udowodnił również, że blokada związanego z układem współczulnym nerwu łokciowego nie ma wpływu na trwający już RP w piątym palcu dłoni. Ponadto wykazał, że mimo przeprowadzonej wcześniej sympatektomii, udaje się wywołać skurcz kapilar [6, 7]. Do podobnych wniosków, jak ten ostatni, w 1960 roku doszedł Halpern, a w 1989 roku Freedman, przychyłając się do „teorii błędu miejscowego” [8, 9].

Rok 1971 przyniósł niejako zespolenie dwóch głównych teorii. Jamieson, Ludbrook i Wilson założyli zwiększoną miejscową wrażliwość u pacjentów dotkniętych RP na przekąźnictwo adrenergiczne. Zauważyli spadek przepływu krwi w palcach dłoni po przyłożeniu kostki lodu w okolice karku. Działanie to powiązali z wyraźniejszą reakcją spastyczną kapilar podczas próby oziębienia, która polegała na schłodzeniu rąk poprzez zanurzenie ich w zimnej wodzie. Wynioskowali, że podczas tej próby zostają pobudzone receptory α -adrenergiczne mięśni gładkich naczyń, co prowadzi do skurczu tych naczyń i ostatecznie do zmniejszenia przepływu [10].

Centralną i obwodową koncepcję współczulną połączyli też Olsen, Petring i Rossing w 1987 roku. Jako część centralną opisali spadek przepływu krwi i jej ciśnienia w palcach dłoni na skutek skurczu naczyń u pacjentów z pierwotnym objawem Raynauda poprzez zmianę pozycji ciała z leżącej na wznak na siedzącą. Na część obwodową składała się możliwość cofnięcia skutków skurczu poprzez blokadę nerwu palca za pomocą lidokainy [11].

Freedman i wsp. w 1995 roku zajmowali się nadreaktywnością receptorów adrenergicznych u pacjentów z pierwotnym objawem Raynauda, stosując dotętnicze wlewy nieselektywnych inhibitorów receptorów α_2 -adrenergicznych. Zauważono korzystne skutki wpływające na skurcz naczyń powodowany zimnem, których to skutków nie dało się zauważyć w przypadku blokady receptorów α_1 -adrenergicznych. Rezultaty potwierdziły poprzednie koncepcje udziału nadreaktywności badanych receptorów w występowaniu epizodów spazmu naczyniowego u pacjentów dotkniętych pierwotnym objawem Raynauda [12].

Flavahan w 2000 roku wskazał na konsensus między „teorią współczulną” a „teorią błędu miejscowego”, uznając rolę układu współczulnego wraz z agonistami receptorów adrenergicznych jako głównych wazokonstryktorów, jednak kluczowym określił udział wrażliwości naczyń kapilarnych jako pośredników reakcji na zimno u pacjentów z objawem Raynauda. Odkrył, że podczas narażenia na zimno zazwyczaj nieme receptory α_{2c} -adrenergiczne migrują z aparatu Golgiego na powierzchnię komórki, uczestnicząc tym samym w przekazywaniu charakterystycznej, wygórowanej, naczyniospastycznej reakcji na niską temperaturę u pacjentów z objawem Raynauda [13].

Kamieniem milowym było określenie kryteriów diagnostycznych rozpoznania choroby Raynauda. Maurice w swej pracy doktorskiej określił, że jest to indukowana zimnem

lub stresem napadowa zmiana zabarwienia skóry o typie skurczu naczyniowego, która występuje obustronnie przy prawidłowo wyczuwalnym tętnie [2]. Brown i Allen w 1932 roku zebrali grupę 150 pacjentów, u których podejrzewali występowanie RP. Po dokładnym przebadaniu ich stanu neurologicznego, drożności obwodowych naczyń tętnicznych oraz określeniu możliwości ich dalszej obserwacji opisali pierwszorzędowe i drugorzędowe kryteria. Za niezbędne do rozpoznania RP uznali następujące:

- 1) przemijające napady zmiany zabarwienia kończyn spowodowane zimnem lub występujące pod wpływem emocji;
- 2) symetryczne lub obustronne występowanie napadu;
- 3) obecność prawidłowego tętna badanych tętnic;
- 4) jeżeli są obecne zmiany troficzne, to ograniczone do skóry i niezwiązane z infekcją bakteryjną;
- 5) nieobecność organicznej przeszkody w przepływie krwi tętniczej, np. żebra szyjnego;
- 6) minimum dwuletni okres trwania objawów.

Kryteria drugorzędowe stanowiły:

- 1) płeć żeńska;
- 2) nieobecność dolegliwości bólowych [14, 15].

Powyższe kryteria obowiązywały do roku 1992, kiedy to LeRoy and Medsger, dla rozróżnienia pierwotnego od wtórnego RP, zaproponowali prawidłowy obraz kapilaroskopowy, nieobecność przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) oraz prawidłowe OB jako cechy dodatkowe do już określonego symetrycznego występowania napadów skurczu naczyń, nieobecności owrzodzenia, czy martwicy oraz nieobecność oczywistych przyczyn wtórnego występowania objawu Raynauda w oparciu o historię choroby pacjenta [16].

Wraz z coraz lepszym poznaniem patomechanizmu skurczu naczyniowego w krążeniu włośniczkowym na początku XIX wieku pojawiały się nowe rozwiązania terapeutyczne. Początkowo przez wiele lat zalecano jedynie leczenie zachowawcze, które obejmowało poprawę stylu życia, nakładanie ciepłych ubrań oraz unikanie silnych emocjonalnych przeżyć [17, 18]. Od połowy XX wieku oczekiwano rezultatów po zastosowaniu sugestii [19], metody biologicznego sprzężenia zwrotnego [20] oraz terapii behawioralnej [21], a w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych zwracano uwagę na ewentualny wpływ ćwiczeń fizycznych [22] oraz proponowano elektrycznie podgrzewane rękawiczki oraz skarpetki lub chemiczne

ogrzewacze do rąk, które są znane i stosowane również dziś [23]. Jednak wszystkie powyższe metody nie przyczyniały się do długoterminowego i permanentnego polepszenia stanu pacjentów cierpiących na objaw Raynauda. W przeprowadzanych badaniach klinicznych nie zauważono skrócenia czasu powrotu prawidłowego przepływu krwi w naczyniach kapilarnych po prowokacyjnej próbie oziębienia, czyli zanurzeniu rąk w zimnej wodzie [24].

Stosowano również szereg środków, których skuteczność niejednokrotnie nie była udowodniona. Jako naczyniorozszerzające zalecano azotyn amylu, nitroglicerynę, czy chininę. Wśród przeciwbólowych znalazły się opium, fenacetyna i cannabis indica. Polecano także środki zwiększające wydalanie kwasu moczowego [25].

Chcąc poprawić krążenie, tłumiono przewodnictwo nerwowe, przykładając źródło napięcia elektrycznego do ciepłej wody, w której zanurzano albo tylko ręce pacjenta, albo całe jego ciało [25].

Bardzo ciekawą metodą posłużyli się Vasko i Evans, jednocześnie udowadniając na niewielkiej grupie ośmiu pacjentów, że dożylnie podanie 10% alkoholu etylowego przez 2 godziny (2ml/kg/h) u pięciu z badanych przywróciło pulsacyjny przepływ krwi w naczyniach palców dłoni [26].

Maurice Raynaud opisał terapię w swej pracy doktorskiej. By osiągnąć nieinwazyjną blokadę współczulną stosował wstępujący prąd elektryczny do rdzenia kręgowego [2].

Około 40 lat później Harvey Cushing zauważył podczas operacji, że zwolnienie ucisku opaski nałożonej na kończynę, powoduje jej przekrwienie i podwyższenie ciepłoty. Zastosował metodę ucisku przez 2 minuty gumową opaską u kobiety, która skarżyła się na duże dolegliwości bólowe. Odniósł przejściowy efekt w postaci ustąpienia bólu. Wywnioskował, że ucisk przerywa przewodnictwo współczulne [27].

Pierwsza operacja sympatektomii, która przyczyniła się do szerokiego stosowania tej metody leczenia w ciężkich, przebiegających z silnym bólem oraz owrzodzeniami przypadkach RP, została przeprowadzona w 1925 roku przez Adsona. Zainteresowały go skutki uboczne szyjnej sympatektomii, za pomocą której pod koniec XIX wieku próbowano leczyć epilepsję. Zauważono wtedy przekrwienie rąk u niektórych pacjentów [28, 29].

Kolejnym etapem był rozwój mikrochirurgii, by zyskać lepsze, bardziej zlokalizowane efekty, mniej liczne nawroty oraz mniejsze powikłania i skutki uboczne jak zespół Hornera, parestezje czy anhidroza, czyli znacznie zmniejszone lub całkowicie zanikłe wydzielanie potu [30].

Chemiczna sympatektomia, jako alternatywa dla chirurgii, była przeprowadzana w dwojaki sposób; podając do opróżnionych żył roztwór rezerpiny lub guanetydyny oraz wstrzykując bezpośrednio do zwojów lub w okolicę zajętych obszarów adrenolityki, takie jak kokaina, bupiwakaina, lidokaina, rezerpina [31, 32].

W 2001 roku na niewielkiej grupie badanych obserwowano wpływ fluoksetyny na stan kliniczny pacjentów. Mechanizm działania w tym przypadku opiera się na zmniejszeniu stężenia serotoniny w płytkach zablokowanych w naczyniach. Zauważono, że znacznie lepsze wyniki terapeutyczne osiągnięto w grupie kobiet z pierwotnym RP [33].

Od 2004 roku zaczęto badać skuteczność toksyny botulinowej typu A w przywracaniu przepływu krwi oraz w zmniejszaniu dolegliwości bólowych. Preparat wstrzykiwano w dłoń lub między palce, wokół każdej zajętej wiązki nerwowo naczyniowej [34, 35].

Od czasu gdy w 1957 roku poznano rolę receptorów α -adrenergicznych, zaczęto badać i stosować kolejne substancje zmieniające przekazywany sygnał współczulny. Początkowo odkryto działanie fenoksybenzaminy, nieselektywnego inhibitora wspomnianych receptorów. Następnie studiowano działanie rezerpiny oraz guanetydyny. Substancje te zmniejszają rezerwy norepinefryny oraz są inhibitorami kurczącego działania acetylocholinylu oraz nikotyny. Jednakże doniesienia o skuteczności tych związków nie były jednoznaczne [36, 37]. W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX wieku skuteczne w leczeniu RP okazały się nieselektywne inhibitory receptorów α -adrenergicznych, jak metyldopa [38], prazosyna [39], indoramina [40], czy fentolamina [41], które dziś są już przestarzałe ze względu na brak selektywności oraz istotne skutki uboczne w postaci hipotensji ortostatycznej. Obecnie, ze względu na odkrycie kluczowej roli receptorów α_{2c} -adrenergicznych w przekaźnictwie sygnałów naczyniokurczących pod wpływem zimna, gruntownie badane są nowe, wysoce selektywne modulatory, jak fasudil—inhibitor kinazy RhoA/Rho [42].

Nie można nie wspomnieć o naczyniorozkurczającym działaniu nitrogliceryny stosowanej w postaci tabletek podjęzykowych, żelu [43], maści, plastrów transdermalnych [44] u pacjentów z objawem Raynauda. Jednak ze względu na krótki okres półtrwania oraz systemowe efekty uboczne ograniczono jej stosowanie [45].

Bloker kanałów wapniowych—nifedypina weszła w krąg zainteresowań jako potencjalna forma terapii ze względu na powiązanie z RP innych nieprawidłowości naczyniowych, jak dławica Prinzmetala, czy migrena [46]. Liczne badania od lat osiemdziesiątych XX wieku potwierdzają pozytywny wpływ tego leku na długość i ciężkość objawu [47, 48].

Wlewy prostacykliny [49, 50] oraz prostaglandyny E1 [51, 52] okazały się wysoce skuteczne nie tylko w stosunku do ciężkości napadów naczynioskurczowych, ale wpływały również na poprawę perfuzji w naczyniach palców dłoni.

W latach dziewięćdziesiątych XX wieku wybitnym osiągnięciem stało się określenie niepodważalnej roli tlenku azotu (NO) jako substancji naczyniorozkurczającej. Po kilku latach od wprowadzenia na rynek inhibitora fosfodiesterazy 5 (PDE 5) jako leczenia zaburzeń erekcji, opisano jego znaczącą skuteczność u pacjentów z pierwotnym i wtórnym objawem Raynauda [53, 54].

2.2. Definicja i charakterystyka objawu Raynauda

Objaw Raynauda charakteryzuje się wywołanym narażeniem na niską temperaturę lub stres zmniejszeniem przepływu krwi przez małe naczynia obwodowe. Następuje kolejno zblednięcie, zasinienie oraz zaczerwienienie skóry. Skurcz naczyniowy jest odwracalny, nawracający i napadowy [55]. Najczęściej dotyczy palców rąk, często rąk i stóp, rzadziej samych stóp, a sporadycznie uszu, nosa, czy języka. Istnieją doniesienia o współwystępowaniu klinicznej manifestacji skurczu naczyń palców dłoni ze zmniejszonym przepływem krwi w naczyniach serca, mózgu, płuc i przełyku.

Podczas trwania objawu mogą klasycznie występować wszystkie trzy następujące po sobie fazy, jednak u części pacjentów można zaobserwować jedynie dwie—zblednięcie lub zasinienie z następowym zaczerwienieniem. Bardzo istotną cechą dla dwóch pierwszych z trzech faz jest ostre odgraniczenie zmienionego koloru skóry od jej prawidłowego wyglądu. Długo utrzymująca się faza bledności może skutkować znacznymi dolegliwościami bólowymi. Krytycznym niedokrwieniem nazywa się fazę zblednięcia w związku z tym, że uważa się ją za najbardziej niebezpieczną dla pacjenta i powodującą większe zniszczenia w tkankach niż faza zasinienia. Zasinienie świadczy o anoksji, a faza zaczerwienienia jest reakcją przekrwioną występującą w chwili ponownego otwarcia naczynia, czyli wskazuje na reperfuzję.

Objaw może obejmować jeden lub wszystkie palce. Kciuk zajęty jest bardzo rzadko, a jego udział najczęściej świadczy o istnieniu choroby podstawowej, np. układowej choroby tkanki łącznej (CTD) [56]. Zmiany zabarwienia skóry palców pojawiają się na różnych wysokościach i zazwyczaj rozpoczynają się od opuszki i postępują w kierunku podstawy [57]. RP trwa różnie długo—od kilku minut do kilku godzin. Część pacjentów nie potrafi określić górnej granicy czasu trwania dolegliwości, twierdząc, że gdyby nie zaczęli rozgrzewać palców rąk, to utrzymywałyby się one znacznie dłużej.

Rozpoznanie RP opiera się głównie na wywiadzie dotyczącym zmian zabarwienia skóry po narażeniu na niskie temperatury lub stres, zatem niejednokrotnie jest wyzwaniem. Powstało wiele kryteriów, ankiet skierowanych do pacjentów, które w założeniu miały pomóc w określeniu czy RP występuje, czy nie. Brennen i wsp. opisali trzy stopnie pewności rozpoznania:

1. Definitywny RP—powtarzalne napady dwufazowej zmiany zabarwienia skóry w odpowiedzi na działanie niskiej temperatury.
2. Prawdopodobny RP — jednofazowa zmiana zabarwienia skóry występująca z drętwieniem lub perestezją w odpowiedzi na działanie niskiej temperatury.
3. Brak RP—brak zmian zabarwienia skóry w odpowiedzi na działanie niskiej temperatury [58].

2.3. Pierwotny a wtórny RP

Rozróżnia się pierwotny i wtórny objaw Raynauda. W Europie pierwotny RP najczęściej określany jest jako choroba Raynauda, a wtórny jako zespół Raynauda. Uważa się, że pierwotny RP związany jest z zaburzeniami czynnościowymi, podczas gdy wtórny, który występuje w przebiegu innych schorzeń, najczęściej chorób układowych tkanki łącznej, dochodzi do nieprawidłowości strukturalnych mikrokrążenia, które najwyraźniej zaznaczają się u pacjentów z twardziną układową albo chorobą wibracyjną [59]. Kwestia stosunku częstości występowania pierwotnego RP do wtórnego nie jest jednoznacznie określona. Herrick w 2005 roku opisał odsetek występowania pierwotnego RP na poziomie 80-90% [59], jednak w 2012 roku wskazuje już znacznie niższą jego wartość, zwracając uwagę na zależność charakteru RP od wpływu różnych czynników, m.in. szerokości geograficznej, charakterystyki grupy pacjentów włączanych do badań, czy odmiennych definicji objawu pojawiających się w piśmiennictwie. Część badaczy, w tym Wigley w 2003 roku oraz Hirschl i wsp. w 2006 roku, ostrożnie odnosili się

do definitywnej diagnozy, zaznaczając możliwość przejścia pierwotnego RP we wtórny. Pope w 2010 roku oraz Prete i wsp. w 2014 roku wciąż wskazywali na znaczną przewagę w częstości występowania pierwotnego objawu Raynauda nad objawem wtórnym [55].

LeRoy i Medsger w 1992 roku ustanowili kryteria rozpoznania pierwotnego RP:

1. Okresowe napady błądności lub zasinienia.
2. Symetrycznie wyraźnie zaznaczone tętno obwodowe.
3. Brak blizn lub martwicy na opuszkach palców.
4. Prawidłowy obraz kapilaroskopowy.
5. Negatywne wyniki badań stężenia ANA (<1/100).
6. Prawidłowe OB.

Jednocześnie zaproponowali stosowane przez klinicystów do dziś kryteria diagnostyki wtórnego RP:

1. Nieprawidłowy obraz kapilaroskopowy.
2. Pozytywne wyniki badań stężenia ANA.
3. Obecność blizn lub martwicy na opuszkach palców.
4. Nieprawidłowości przełyku.
5. Nieprawidłowości jelita cienkiego, grubego, płuc, serca i nerek.
6. Zmniejszony przepływ krwi przez nerki lub zmniejszony klirens kreatyniny.

Ponadto przedstawili twierdzenie, że obecność jakiegokolwiek cechy niezróżnicowanej choroby układowej tkanki łącznej lub choroby ze spektrum schorzeń typu twardziny (scleroderma-like), kwalifikuje do rozpoznania wtórnego RP [16].

Czynniki będące przyczyną wtórnego objawu Raynauda:

Choroby reumatyczne:

- postać uogólniona twardziny układowej (dSSc),
- zespół CREST (ISSc),
- toczeń rumieniowaty układowy (SLE),
- mieszana choroba tkanki łącznej (MCTD),
- zapalenie wielomięśniowe (PM),
- zapalenie skórno-mięśniowe (DM),
- reumatoidalne zapalenie stawów (RZS),

- zespół Sjögrena (SS),
- niezróżnicowana choroba tkanki łącznej (UCTD).

Choroby naczyń:

- thrombangiitis obliterans (TAO),
- miażdżyca zarostowa (ASO),
- choroba zakrzepowo-zatorowa (zatory tętnicze),
- pierwotne nadciśnienie tętnicze (PPH),
- guzkowe zapalenie tętnic (PN),
- zapalenie tętnic Takayashu (TA),
- przetoki tętniczo-żylne (AFV).

Zespoły anatomiczne:

- zespół uciskowy górnego otworu klatki piersiowej (TDS),
- zespół cieśni nadgarstka (CTS),
- choroba krążka międzykręgowego.

Wpływy środowiska:

- wpływ zimna,
- choroba wibracyjna (HAVS),
- narażenie na chlorek winylu, metale ciężkie, sporysz,
- urazy mechaniczne: zespół młotkowy kłębika (HHS), odmrożenia.

Zespoły hematologiczne:

- policytomia,
- paraproteinemia,
- krioglobulinemia,
- choroba zimnych aglutynin,
- niedobory białka C, S, AT, czynnika V Leiden,
- zespół antyfosfolipidowy,
- nowotwory.

Choroby układu nerwowego:

- jamistość rdzenia kręgowego,
- guzy,

- zapalenia rdzenia kręgowego,
- stwardnienie rozsiane.

Choroby zakaźne:

- zapalenie wątroby typu B, C (krioglobulinemia),
- AIDS,
- infekcje mikoplazmy,
- parwowirus B19.

Leki:

- amfetamina, beta-blokery, bleomycyna, cisplatyna, cyklosporyna, ergotamina, interferon alfa, klonidyna, kokaina, nikotyna, winblastyna i inne.

Przebieg objawu jest nieporównywalnie cięższy u pacjentów cierpiących na wtórny RP [16]. Pacjenci odczuwają znacznie większy dyskomfort, napady występują częściej, są dłuższe i bardziej bolesne. Innymi cechami różniącymi pacjentów z pierwotnym od tych z wtórnym RP jest wiek pierwszego wystąpienia objawu, symetria zajęcia palców obu dłoni, obraz kapilaroskopowy, występowanie onycholizy lub „pterygium inversum unguis”, obecność blizn lub martwicy na opuszkach palców oraz stężenie autoprzeciwciał [60]. W pierwotnym RP pierwszy objaw może wystąpić bardzo wcześnie, nawet w wieku kilku lat, najczęściej kilkunastu, a najpewniej przed 30 rokiem życia, przeważnie jest symetryczny, czyli obejmuje te same palce obu rąk i przebiega łagodnie, często bez dolegliwości bólowych. U pacjentów cierpiących na wtórny RP pierwszy incydent naczynioskurczowy pojawia się w starszym wieku, wyraźnie częściej występuje onycholiza lub „pterygium inversum unguis” oraz blizny lub martwica na opuszkach palców, a miano ANA jest wysokie.

2.3.1. Mikroskopowa ocena wału paznokciowego

Rola mikroskopowej oceny wału paznokciowego nabrała dużego znaczenia, zwłaszcza gdy zaobserwowano, że badanie to jest niezwykle pomocne w odróżnieniu pierwotnego od wtórnego RP. Maricq i LeRoy jako pierwsi dostrzegli i opisali tę możliwość [61]. Drugą szkołą specjalizującą się w badaniu kapilaroskopowym jest szkoła włoska z Cutolo na czele. Szczegółowo podejmuje ona temat próby identyfikacji zmian predystynujących do przejścia pierwotnego RP we wtórny [62]. Normalny obraz kapilaroskopowy jest charakterystyczny dla pierwotnego RP. Oznacza równomierne rozłożenie pętli kapilarnych o prawidłowym

kształcie „spinki do włosów” w liczbie od 9 do 14 na milimetr [63, 64]. Jednak sformułowanie „normalny” ma dość szerokie znaczenie. W grupie kontrolnej zdrowych osób rzadko zdarzają się wszystkie idealne kapilary o prawidłowym kształcie i rozmieszczeniu. Jeżeli w przypadku RP są obecne pojedyncze anomalie, ale nie występują powszechnie i kilka ich typów nie znajduje się w obrębie wałów paznokciowych jednego pacjenta, nie świadczą jeszcze o wtórnym RP. Anrade i wsp. dzielą obraz kapilaroskopowy na trzy główne rodzaje:

1. Stereotypowa pętla – *hairpin shape* (kształt spinki do włosów)
2. Subtelne zmiany:
 - a) *Tortuous* – ramiona kapilar mają kręty przebieg, ale się nie krzyżują
 - b) *Crossed* – ramiona kapilar krzyżują się jedno- lub dwukrotnie
 - c) *Cuticulitis* – ramiona są niewidoczne, można zaobserwować jedynie małe czerwone punkty
3. Anomalie:
 - a) *Ectasia* – ramiona umiarkowanie poszerzone około 4 razy od prawidłowej szerokości lub o średnicy $>20\mu\text{m}$
 - b) *Megacapillary* – tętniakowato rozdęta pętla, której ramiona są poszerzone nawet dziesięciokrotnie
 - c) *Meandering* – ramiona kapilar są kilkakrotnie skrzyżowane
 - d) *Bushy* – ramiona pętli mają wiele odgałęzień
 - e) *Bizarre* – pętle o nietypowej morfologii, niepasujące jednak do żadnego z powyższych opisów.

Oprócz zmienionej morfologii naczyń kapilarnych nie może ująć uwagę zmniejszona ich ilość i tzw. obszary awaskularne, które są wysoce specyficzne dla rozpoznania choroby podstawowej we wtórnym RP. W obrazie kapilaroskopowym późnej twardziny można stwierdzić rozległe obszary pozbawione naczyń i kompensacyjną neoangiogenezę w postaci wielokrotnie rozgałęzionych pętli o intensywnej dezorganizacji architektonicznej [65].

2.3.2. Stężenie przeciwciał przeciwjądrowych

Niekwestionowanym i najważniejszym kryterium różnicującym pierwotny RP od wtórnego jest badanie stężenia ANA. Zdefiniowano rodzaj autoprzeciwciał charakterystyczny dla poszczególnych chorób układowych tkanki łącznej jak Sm, PCNA, dsDNA dla toczenia rumieniowatego układowego (SLE), Jo-1 dla zapalenia wielomięśniowego (PM) lub skórno-

mięśniowego (DM), SS-A, /SS-B dla zespołu Sjögrena (SS), a Scl-70 dla twardziny układowej (SSc). [66, 67] Określenie podwyższonego miana ANA u pacjentów z RP może wskazywać na jego wtórny charakter.

Badaniami pomocnymi w określeniu podłoża wtórnego RP innego niż choroby autoimmunologiczne jest laboratoryjne badanie krwi, badanie tętna obwodowego, próby kliniczne, np. próba Adsona, rentgenogram kręgosłupa szyjnego i rąk (RTG), ultrasonografia (USG), czy wskaźnik kostka-ramię (ABPI).

2.4. Epidemiologia

Na wstępie trzeba zaznaczyć znacznie większą predylekcję kobiet do RP. Częstość występowania RP jest przedstawiana w bardzo szerokich granicach od 6% do aż 20% dla kobiet oraz od 3% do 12,5% dla mężczyzn [68], jednak większość publikacji przedstawia wartości 3-5% dla obu płci. Badania w grupie nastolatków wykazały częstość występowania na poziomie 15% i ponowne stwierdzenie znacznej przewagi kobiet z RP [69].

Należy zwrócić uwagę, że mimo że aż czterokrotnie częściej kobiety są dotknięte RP [70, 71], to w pełni prawdziwie odnosi się ten stosunek do osób poniżej 40 roku życia, gdyż u kobiet częściej rozwija się RP w młodym wieku, a wraz z wiekiem mężczyzn rośnie częstość jego występowania przede wszystkim jako wtórnego objawu poprzez narażenie na czynniki zawodowe (choroba wibracyjna, zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa) oraz rozwój zmian miażdżycowych [72].

Czynniki ryzyka dla kobiet i mężczyzn są różne. Opisano silniejszy wpływ stresu oraz spożywania alkoholu na częstość ataków blednięcia palców tylko w przypadku kobiet. Z kolei palenie tytoniu zwiększa ryzyko rozwoju RP tylko u mężczyzn. Niskie BMI (body mass index) u obu płci podobnie wpływa na częstość występowania RP [72].

Bardzo duże znaczenie na powszechność występowania RP ma szerokość geograficzna, rodzaj badanej populacji oraz akuratność ankiet kierowanych do pacjentów. Maricq i wsp. porównali częstość występowania RP w pięciu regionach i wywnioskowali znacznie większe rozpowszechnienie RP w krajach o zimnym klimacie. Ponadto, zauważyli, że większość RP dodatknych pacjentów mieszkających obecnie w ciepłych regionach, przeprowadziła się do nich z chłodniejszych [73].

U około połowy pacjentów z pierwotnym RP choroba występuje rodzinnie. Najczęściej są to krewni pierwszego stopnia, kobiety, które pierwszy napad zauważyły w młodym wieku [74, 75]. Ta obserwacja wskazywać może na udział czynników genetycznych w patogenezie choroby.

Po wyeliminowaniu wpływu podobnych czynników środowiskowych mogących wpłynąć na wynik badania opisano większe podobieństwo względem wrażliwości na zimno, występowania RP i jego ciężkości u monozygotycznych bliźniąt niż u dwuzygotycznych [76]. Czynniki genetyczne mają również niezaprzeczalny udział w przypadku występowania wtórnego RP na podłożu chorób układowych tkanki łącznej—twardziny [77] oraz narażenia na wpływy środowiska—chlorek winylu [78].

Suter i wsp. opisali remisję z czasem u 64% kobiet i mężczyzn z pierwotnym RP. Dla pozostałych badanych objaw może być pierwszym sygnałem wskazującym na chorobę podstawową [79]. U 14%-37% pacjentów, u których początkowo rozpoznano pierwotny RP, ostatecznie ujawnia się przyczyna leżąca u podstawy objawu i wskazująca na jego wtórny charakter. Prawie 99% badanych z pierwotnym RP, u których stwierdzono jednak jego wtórność, rozwinęło chorobę autoimmunologiczną, najczęściej twardzinę [80]. Do czynników ryzyka mogących wskazywać na rozwój tej CTD należy pozytywny wynik ANA, specyficzne autoprzeciwciała, podwyższone OB i nieprawidłowy obraz kapilaroskopowy.

Hirsch i wsp. przez ponad 11 lat obserwowali grupę około 200 pacjentów z pierwotnym RP. Roczna częstotliwość kwalifikowania do grupy 'podejrzewanych' o wtórny charakter objawu wynosiła 2%, do potwierdzonych—1%. Średnio 5 lat trwało potwierdzenie podejrzanego podłoża występowania RP [81].

2.5. Mechanizm skurczu naczyń

Podczas narażenia na niską temperaturę organizm człowieka, poprzez mechanizmy termoregulacyjne, utrzymuje ciepło. Przede wszystkim dochodzi do wzrostu produkcji ciepła na drodze termogenezy drżeniowej i bezdrżeniowej oraz do ograniczenia jego utraty, co głównie dotyczy zmniejszenia przepływu krwi do skóry [82, 83]. Gdy konieczna jest utrata ciepła z organizmu, przepływ krwi przez naczynia skóry wzrasta nawet do ośmiu litrów na minutę, a wynosi zero, gdy ciepło należy zachować. Naczynia te są wyposażone w cechy zarówno strukturalne jak i funkcjonalne umożliwiające udział w termoregulacji [84, 85].

Rozpoczynająca się od serca sieć naczyń dystrybująca krew w organizmie przechodzi od dużych, sprężystych tętnic, poprzez mniejsze mięsiste tętnice, zmniejszające swe światło, do mniejszych tętnic i tętniczek, których przekrój nie przekracza 100 μm . Te ostatnie tworzą system decydujący o miejscowym przepływie krwi, posiadają zdolność działania na zasadzie zaworu. Cała struktura naczyniowa kończy się kapilarami, które mają najmniejszą średnicę,

jednak pokrywają i zaopatrują największy obszar. Odgrywają też najważniejszą rolę w wymianie substancji odżywczych w obrębie tkanek. System naczyń żylnych tworzy odwrotny układ i, w przeciwieństwie do naczyń tętniczych, jest systemem niskociśnieniowym i wysokopojemnościowym [86].

W mniejszych tętnicach i tętniczkach, w odróżnieniu od dużych naczyń tętniczych, istnieje reakcja skurczowa na spadek ciśnienia przepływającej krwi i jest charakterystyczna dla regulacji miogennej. Komórki mięśni gładkich w tętniczkach są mechanowrażliwe i kurczą się wraz ze wzrostem ciśnienia transmuralnego [87, 88]. Stałe napięcie podstawowe, czyli skurcz toniczny mięśni gładkich znajdujących się w ścianie naczynia tętniczego, jest dodatkowo modulowane, by regulować średnicę naczynia i przepływ krwi. Dzięki baroreceptorom umiejscowionym w dużych tętnicach możliwa jest aktywność zaopatrujących serce, małe tętnice, tętniczki i naczynia żyłne współczulnych włókien nerwowych. Informacje z baroreceptorów o wielkości ciśnienia są przesyłane do dna komory czwartej, gdzie znajduje się środek naczynioruchowy. Gdy ciśnienie tętnicze wzrasta, wzrasta i częstotliwość wysyłania sygnałów z baroreceptorów do ośrodka naczynioruchowego, który włóknami odśrodkowymi zmniejsza napięcie mięśni gładkich naczyń tętniczych. Gdy ciśnienie w tętnicach spada, obniża się też liczba przesyłanych sygnałów do ośrodka, co powoduje jego wzmożoną aktywność i w efekcie skurcz mięśni gładkich tętnic [89, 90].

Aktywacja nerwów współczulnych skutkuje uwalnianiem neuroprzekaźników, głównie norepinefryny, która aktywuje adrenoreceptory, w naczyniach krwionośnych głównie α_1 i α_2 , a w sercu receptory α -adrenergiczne. Jej uwolnienie działa na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, hamując dalsze uwalnianie neuroprzekaźników, a tym samym zmniejszając odpowiedź współczulną [91].

Właściwa regulacja krążenia miejscowego jest ostatecznie osiągnięta na poziomie lokalnym. W poszczególnych narządach tętniczki są wyposażone w możliwość bezpośredniego reagowania w zależności od sygnałów docierających z bliskiego otoczenia [92]. Najważniejszymi sygnałami są te wysyłane przez uboczne produkty metabolizmu komórkowego, jak chociażby zmniejszone stężenie tlenu, zwiększone stężenie dwutlenku węgla czy adenozyna, które krążą nieopodal tętniczek, aktywując wzmożony przepływ wedle potrzeb danej tkanki [93].

Powyższe zmiany metaboliczne mogą również oddziaływać na aktywność nerwów współczulnych, tłumiąc ją poprzez inhibicję wyrzutu norepinefryny. W ten sposób przeciwdziałają jakiegokolwiek ingerencji CUN i zmniejszeniu przepływu krwi. W rezultacie

odpowieź z rdzenia i stymulacja współczulna odnoszą najlepszy skutek w redukcji krążenia w tkankach o najmniejszym metabolizmie. Pod kątem fizjologii rywalizacja między odpowiedzią lokalną a tą z CUN tworzy wyjątkowo skuteczny system regulacyjny.

Kluczowym elementem w miejscowej regulacji naczyń krwionośnych, i w nich krążenia, jest śródbłonek składający się z jednej warstwy komórek i pokrywający cały układ sercowo-naczyniowy. W warunkach prawidłowych wywiera silny ochronny wpływ, przyczyniając się do efektu antytrombolitycznego, fibrynolitycznego, przeciwzapalnego oraz naczyniorozszerzającego [94, 95]. Procesy chorobowe są wyraźnie powiązane ze zmianami w funkcjonowaniu śródbłonna, co znacznie przyczynia się do patogenezy i progresji choroby [96, 97].

2.6. Strukturalna i funkcjonalna organizacja przepływu krwi przez skórę

Na układ naczyniowy zasilający skórę składa się różnorodny pod względem organizacji naczyń tętniczych, gęstości ich dystrybucji na danym obszarze oraz architektury mikrokrążenia złożony system [83]. Na poziomie mikrokrążenia tętniczki i żyłki tworzą dwa oddzielne, ale połączone ze sobą, zintegrowane zespoły: splot wyższy, położony płycej, w warstwie brodawkowatej skóry oraz niższy, ulokowany głębiej, na granicy skóry właściwej i tkanki podskórnej [82]. Powierzchnowa sieć charakteryzuje się większą gęstością i jest źródłem odżywczych pętli kapilarnych, które rozciągają się pionowo do brodawki skórnej. W rozmaitych rejonach ludzkiego ciała występują pod względem strukturalnym identyczne pętli, różniące się jedynie gęstością rozłożenia. Po dłoniowej stronie palców biegną wzdłuż linii papilarnych, po stronie grzbietowej jest ich mniej i są słabiej zorganizowane. Pod paznokciem ułożenie z pionowego zmienia się na równoległe do powierzchni skóry, dzięki czemu można bardzo dokładnie zbadać morfologię nawet pojedynczej pętli dzięki odpowiednim narzędziom do kapilaroskopii [98].

Różna struktura oraz regulacja przepływu krwi występuje w skórze owłosionej, która pokrywa znaczną większość ludzkiego ciała oraz w skórze gładkiej, jaka występuje na dłoniowych częściach palców, nosie, uszach, dłoniach oraz podeszwach stóp. Ta ostatnia jest bogata w anastomozy tętniczo-żyłne (AVA), które stanowią bezpośrednie połączenia między układem tętniczym a żylnym, omijające pętli kapilarne i niebiorące udziału w roli dystrybutora substancji odżywczych [99,100]. Stanowią istotne struktury termoregulacyjne, przez które, w razie potrzeby, szybko mogą przepłynąć znaczne ilości krwi do powierzchni skóry [101].

Gdy zachodzi konieczność utrzymania ciepła, anastomozy są w większości zamknięte, ale podczas jego eliminacji otwierają się i w pełni rozszerzają [102].

2.6.1. AVA

W odróżnieniu od innych organów, krążenie krwi w skórze jest zaopatrzone w oddzielne dwa rodzaje włókien współczulnych. Pierwszy rodzaj to tradycyjne unerwienie współczulne uwalniające norepinefrynę, by wywołać skurcz naczyń. Drugi to unerwienie cholinergiczne uwalniające acetylocholinę, by wywołać rozszerzenie naczyń. Skóra owłosiona dysponuje dwoma systemami, jednak skóra gładka, która zawiera anastomozy tętniczo-żyłne, jest pozbawiona aktywności tego systemu [100]. Współczulne unerwienie adrenergiczne utrzymuje stały tonus mięśni gładkich naczyń zwłaszcza kończyn, dołączając się do i tak już stosunkowo niskiego przepływu krwi nawet w neutralnej temperaturze otoczenia. Narażenie na niskie temperatury powoduje dalszą naczyniokurczącą aktywację współczulnego układu adrenergicznego, która zmniejsza przepływ krwi przez skórę [103]. AVA są bogato unerwione przez współczulny system adrenergiczny [101, 104]. Co kilka minut wykazują cykliczne ruchy kurczące i rozkurczające zależne od salwy aktywności układu współczulnego [100, 101]. Aktywność naczyniowa występuje synchronicznie, np. jednocześnie w dłoniach i stopach. Odruchowe działania współczulnej aktywności naczyniokurczącej w odpowiedzi na zmiany zachodzące w środowisku mają bardzo duży wpływ na przepływ krwi przez anastomozy tętniczo-żyłne. Ich fluktuacyjne ruchy zostają zniesione, gdy AVA są całkowicie otwarte i rozszerzone w przypadku ogrzania całego ciała oraz gdy są skurczone i zamknięte podczas ochłodzenia [99]. Odżywcze krążenie krwi w palcach rąk wydaje się być zupełnie niezależne od naczyniokurczącego działania współczulnego układu nerwowego. Jest to działanie oszczędzające naczynia kapilarne i zapewniające dowóz niezbędnych substancji na obwód [105].

Dodatkowo do ośrodkowego odruchu układu współczulnego na oziębienie całego ciała, miejscowa ekspozycja skóry na działanie niskiej temperatury powoduje bezpośrednio ograniczenie krążenia krwi w skórze. W palcach dłoni powodem jest nie tylko opisana wyżej reakcja AVA, ale również podobne odruchy w bardziej proksymalnych naczyniach zaopatrujących palce [102, 106]. Miejscowe chłodzenie wpływa bezpośrednio na AVA, przedłużając skurcz, ale silne i długie działanie zimna powoduje całkowite upośledzenie mechanizmu zmiany średnicy naczyń. Jest to miejscowy efekt chłodzenia, niezwiązany z CUN.

2.6.2. Receptory

Komórki mięśni gładkich występujące w naczyniach skóry wykazują zwiększoną ekspresję i aktywność receptorów α_2 -adrenergicznych w porównaniu do głębiej zlokalizowanych naczyń krwionośnych [107, 108].

W badaniach przedklinicznych stwierdzono, że działanie naczyniokurczące silnie wzrasta ku położonym bardziej obwodowo naczyniom tętnicznym, osiągając znaczną aktywność w małych tętnicach palców dłoni. Z kolei aktywność receptorów α_1 -adrenergicznych pozostaje niezmienną [109]. Podczas poddania całego ciała działaniu umiarkowanego ochłodzenia, zastosowano preferencyjny blok receptorów α_2 -adrenergicznych za pomocą johimbiny. Towarzyszące chłodzeniu zazwyczaj dramatyczne objawy naczynioskurczowe okazały się całkowicie zahamowane. Nie uzyskano podobnych rezultatów podczas bloku receptorów α_1 -adrenergicznych. Wywnioskowano, że komórki mięśni gładkich AVA zawierają liczne receptory α_2 -adrenergiczne, które być może wyłącznie biorą udział w skurczu naczyń indukowanym zimnem. Dodatkowo potwierdzono brak bezpośredniego wpływu na kapilarne krążenie odżywcze, czyli ochronę przed działaniem reakcji współczulnych [110].

2.7. Skurcz naczyń a płeć

Skórny układ naczyniowy u kobiet jest szczególnie wrażliwy na zmiany temperatury. Dawno udowodniono, że spoczynkowy przepływ krwi przez naczynia dłoni i palców jest znacznie większy u młodych mężczyzn niż u młodych kobiet [111, 112]. Do tego stopnia, że niskie wartości przepływu krwi u młodych kobiet odpowiadają przepływowi u pacjentów z pierwotnym RP. Po menopauzie różnica między mężczyznami a kobietami zaciera się – w warunkach neutralnej temperatury przepływ u kobiet się zwiększa.

Odpowiedź naczyń palców na miejscowe oziębienie lub ogrzanie jest największa u kobiet w wieku przedmenopauzalnym oraz stosujących środki antykoncepcyjne, najmniejsza u mężczyzn, a pośrednia u kobiet po menopauzie [113].

W zwiększonym skurczu naczyń indukowanym działaniem niskiej temperatury pośredniczy zależny od estrogenu wzrost aktywności układu adrenergicznego [114, 115]. 17β -estradiol zwiększa ekspresję wrażliwych na zimno receptorów α_{2c} -adrenergicznych w mięśniach gładkich naczyń skóry.

Poza wzrostem ekspresji receptorów adrenergicznych, estrogen powoduje również zwiększoną produkcję tlenu azotu poprzez dodatni wpływ na ekspresję syntazy śródbłonkowego NO [116].

Rola estrogenu w zwiększeniu kurczliwości naczyń oraz w syntezie substancji naczyniorozszerzających tłumaczy, dlaczego kobiety reagują silniejszym skurczem naczyń skóry na działanie niskiej temperatury oraz bardziej nasilonym ich rozszerzeniem podczas ogrzania.

2.8. Krzepnięcie i fibrynoliza

Prawdopodobnymi czynnikami odpowiedzialnymi za występowanie RP są między innymi nieprawidłowa regulacja napięcia ściany naczyniowej, zaburzenia neurohormonalne, upośledzenie funkcji śródbłonka, a wtórnie – hemostazy, które mogą prowadzić do martwicy lub zgorzeli dystalnych części palców [117]. Ze względu na nieliczne doniesienia naukowe opisujące zaburzenia w układzie hemostazy u pacjentów z objawem Raynauda, ważne staje się przedstawienie także tych danych w innych schorzeniach, w przebiegu których może wystąpić objaw Raynauda.

Proces hemostazy osoczowej obejmuje dwa przeciwstawne układy – krzepnięcia i fibrynolizy, których współdziałanie pozwala na zapewnienie płynności krwi krążącej w naczyniach.

Krzepnięcie krwi

Proces krzepnięcia rozpoczyna się fazą inicjacji. Główną w niej rolę odgrywa czynnik tkankowy (TF) poprzez swoją ekspresję w odpowiedzi na bodziec na powierzchni fibroblastów lub monocytów. Jego kontakt z krążącym czynnikiem VII rozpoczyna zewnątrzpochoдную drogę krzepnięcia. TF, tworząc kompleks ze wspomnianym czynnikiem VII -TF/VIIa, aktywuje czynnik IX oraz czynnik X. Ten ostatni po aktywacji, w kompleksie z jonami Ca^{2+} oraz czynnikiem V, przekształca nieaktywną protrombinę w aktywną trombinę, dzięki której dochodzi do dalszej aktywacji czynnika V, XI, płytek oraz powstania fibryny z fibrynogenu [118, 119]. Aktywowany przez TF czynnik IX rozpoczyna fazę wzmocnienia – wewnątrzpochoдную drogę krzepnięcia, w trakcie której powstaje więcej trombiny. Na powierzchni płytek, po ich aktywacji, czynnik IXa wraz z fosfolipidami błonowymi płytek, czynnikami VIIIa i X tworzy tenazę, w której dochodzi do przekształcenia czynnika X do postaci aktywnej – Xa. Ten, łącznie z protrombiną oraz czynnikiem Va, wchodzi w skład kolejnego zespołu – protrombinazy, gdzie powstaje

trombina, która, prócz przekształcenia fibrynogenu w fibrynę, stabilizuje ją na drodze aktywacji czynnika XIII [120].

Czynnik tkankowy

Czynnik tkankowy (TF) – znany pod również nazwą III czynnik krzepnięcia i tromboplastyna tkankowa – jest proteiną o masie cząsteczkowej 47 kDa, w której skład wchodzi trzy domeny. Pierwsza z nich to część pozakomórowa składająca się z 219 aminokwasów. Drugą stanowi zbudowana z 23 aminokwasów hydrofilna część przezbłonowa, która łączy pierwszą z cytoplazmatycznym 21 aminokwasowym ‘ogonem’ [121]. TF występuje głównie w płucach, mózgu, mikroosmkach trofoblastu oraz łożysku, a także w niektórych tkankach nowotworowych [122]. Broze i wsp. jako pierwsi wyekstrahowali TF z ludzkiego mózgowia [123]. Gen czynnika obejmuje 6 eksonów w chromosomie 1 [124].

TF stanowi komórkowy receptor VII osoczowego czynnika krzepnięcia i występuje w ścianie naczyń w komórkach należących do subendotelium i endotelium. W przypadku uszkodzenia komórek mięśni gładkich w naczyniu dochodzi do odsłonięcia TF. W warunkach fizjologicznych monocyty oraz komórki śródbłonka wykazują niewielką ekspresję czynnika lub nie wykazują jej wcale, ale po zadziałaniu bodźca w postaci endotoksyn, cytokin i lektyn, może dojść o jego ekspresji i w rezultacie rozpoczęcia drogi krzepnięcia [118, 119].

Inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF

Inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF (TFPI) jest syntetyzowany w komórkach wątroby i śródbłonka naczyń. Wyizolowano go z hodowli linii nowotworowej hepatocytów [125], a w 1988 roku opisano jego budowę [126]. TFPI jest połączony z glikoproteinami powierzchni endotelium, jako glikoproteina krąży w osoczu w trzech formach: 36,000 kD, 43,000 kD i krótszych postaciach, tworząc kompleksy z LDL, HDL i VLDL, a około 10% TFPI występuje w płytkach krwi, które uwalniają go po aktywacji trombiną. Również zaktywowane megakariocyty, monocyty oraz fibroblasty mogą syntetyzować TFPI [127, 128].

Gen TFPI-1 składa się z 9 eksonów i znajduje się w chromosomie 2q31–q32, a gen nazwany TFPI-2 w chromosomie 7q22. Jego produkt, prócz cech TFPI, pobudza wzrost komórek pigmentowych siatkówki oka. Poznano cztery polimorfizmy genu TFPI [129, 130].

Inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF posiada dwie funkcje inhibicyjne, co jest związane z istnieniem domen typu Kunitza. Domena pierwsza zależnie od obecności Ca^{2+} hamuje VIIa/TF, tworząc kompleks TF/VIIa/TFPI. Domena druga już niezależnie od Ca^{2+} hamuje czynnik Xa, tworząc Xa/TFPI. Domena trzecia bierze udział w wiązaniu TFPI z lipoproteinami osocza [126].

TFPI jest jedynym inhibitorem w fazie inicjacji krzepnięcia krwi, który nie dopuszcza do wytworzenia trombiny. Hamowanie to odbywa się dwuetapowo. TFPI początkowo odwracalnie inaktywuje czynnik Xa, dokonując zmiany konformacyjnej swojej cząsteczki i tworząc kompleks Xa/TFPI, który następnie hamuje kompleks TF/VIIa. U osób zdrowych stężenie TFPI we krwi wynosi 75–125 ng/ml. TFPI zapobiega zakrzepicy i restenozie inicjowanych przez czynnik tkankowy w przebiegu odrzucania przeszczepów, posocznicy oraz w chorobach zapalnych. Jego korzystne działanie udowodniono w zespole wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) [127, 128]. Hamuje proliferację komórek śródbłonna naczyń i może być markerem jego dysfunkcji. Zaobserwowano wzrost jego stężenia po posiłkach, a heparyna i.v. uwalnia TFPI ze ściany naczynia, czym nawet dziesięciokrotnie zwiększa jego stężenie we krwi [131].

Czynnik von Willebranda

Czynnik von Willebranda (vWF) jest dużym wielopodjednostkowym białkiem o ciężarze molekularnym 1,000 – 20,000 kD. Jest syntetyzowany przez komórki endotelium oraz megakariocyty i występuje w subendotelium, osoczu oraz w płytkach krwi. Okres półtrwania dla vWF w osoczu wynosi 20 godzin, a produkty degradacji są wydzielane z moczem [132, 133].

vWF pełni funkcję białka przekaźnikowego dla VIII czynnika krzepnięcia, z którym tworzy kompleks białkowy, działając jako jego ochrona przed proteolizą. Z fibronektyną i kolagenem łączy się za pomocą błonowych glikoprotein GPIa i GPIb i w ten sposób aktywuje fosfolipazę C, co prowadzi do hydrolizy fosfolipidów błony komórkowej płytek krwi. Zaktywowane w ten sposób płytki wydzielają substancje powodujące skurcz naczynia i dalszą agregację płytek, co w efekcie utrzymuje integralność ściany naczyniowej.

W związku z tym, że vWF jest produkowany przez komórki śródbłonna, pełni on rolę markera uszkodzenia endotelium, a pomiary stężenia vWF są stosowane dla oceny funkcji śródbłonna. U pacjentów z ciężkimi zaburzeniami syntezy tego czynnika nie wykrywa się go ani

we krwi, ani w moczu i klasyfikuje jako III najwyższy stopień tego zaburzenia. Pacjenci z obniżonym stężeniem czynnika są klasyfikowani jako typy I, IIa i IIb [133, 134]. Typ I jest częstym zaburzeniem [135].

Doniesienia dotyczące stężenia czynnika von Willebranda pojawiające się w publikacjach różnią się od siebie. Niekiedy opisuje się wzrost stężenia vWF w przypadku rozległych uszkodzeń śródbłonna, jakie występują w miażdżycy tętnic, a niektórzy badacze nie obserwują takich zmian [136]. Zwiększone stężenie kompleksów vWF/VIII zostało opisane u pacjentów po zabiegach operacyjnych oraz u pacjentów, u których stwierdzono obecność zakrzepów [137]. Oznaczenia osoczonego poziomu vWF:Ag ma dużą wartość w diagnostyce, prognozie oraz monitorowaniu leczenia w zapaleniach naczyń oraz w wykrywaniu utajonych waskulopatii [138]. Poza tym, wysokie stężenie vWF wskazuje na złą prognozę u pacjentów z posocznicą i jest uważane za wartościowy wyznacznik odległych uszkodzeń organów u pacjentów z rozległymi poparzeniami skóry [139]. Stężenie vWF w osoczu i w moczu zostało zmierzone u pacjentów cierpiących na cukrzycę insulinozależną, którzy mieli objawy mikroangiopatii i u tych, którzy nie prezentowali tych objawów. Osoczowe stężenie było istotnie wyższe u obu grup w porównaniu do grupy kontrolnej, a stężenie w moczu było istotnie wyższe u pacjentów z objawami mikroangiopatii. Różnice jakościowe w wydzielanych formach zaznaczały się jedynie wśród pacjentów z objawową nefropatią, u których obserwowano przewagę fragmentów o większym ciężarze molekularnym [136].

Trombomodulina

Trombomodulina (TM) syntetyzowana w komórkach śródbłonna jest receptorem trombiny, który pozbawia ją jej działania prokoagulacyjnego. Stężenie TM jest jednym ze wskaźników uszkodzenia endotelium [140].

Trombomodulina jest integralnym białkiem błonowym, ekspresjonowanym głównie na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego. Obok śródbłonna tętnic, żył, naczyń włosowatych i limfatycznych, opisano również występowanie TM w ludzkich syncytiotrofoblastach łożyska, płytkach krwi, megakariocytach, neutrofilach, monocytach, makrofagach i komórkach płaskonabłonkowych płuc. Ludzkie cDNA dla TM koduje produkt złożony z 557 aminokwasów, łącznie z 18-aminokwasowym peptydem sygnałowym, usuwanym w trakcie syntezy. W budowie dojrzałej cząsteczki TM można wyróżnić 5 domen: N-końcową domenę lektynopodobną złożoną z 226 aminokwasów, następnie 236-aminokwasowy fragment

zawierający sześć powtarzających się motywów o budowie podobnej do czynnika wzrostu naskórka (EGF), 34-aminokwasową część bogatą w reszty serynowe i treoninowe, a także domenę transmembranalną zbudowaną z 23-aminokwasów i 38-aminokwasową część wewnątrzkomórkową [141].

Trombomodulina odgrywa ważną rolę w regulacji hemostazy krwi. Jest, występującym na powierzchni komórek śródbłonna, receptorem dla trombiny o silnym powinowactwie. Utworzenie kompleksu TM/trombina powoduje aktywację białka C, które w obecności białka S powoduje wybiórczą proteolizę czynników Va, VIIa i PAI, powodując działanie antykoagulacyjne. Jednocześnie trombina połączona z TM traci zdolność do aktywacji fibrynogenu [142]. Związanie trombiny z TM przyspiesza także około 1000-krotnie aktywację inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI), który bierze udział w proteolizie fibryny, co obniża jej aktywność jako kofaktora plazminogenu, obniżając tym samym jej aktywność fibrynolityczną [143].

Poza rolę w regulacji układu krzepnięcia krwi, TM bierze także udział w modulowaniu reakcji zapalnej. Przekazywanie sygnałów w szlakach regulacji reakcji zapalnej może odbywać się poprzez lektynopodobną domenę TM [144]. Prowadzone są badania nad stosowaniem rekombinowanej TM w leczeniu chorób przebiegających z reakcją zapalną takich jak kłębuszkowe zapalenie nerek, reumatoidalne zapalenie stawów, czy sepsa [145].

Rozpuszczalna forma TM, nazywana sTM (*soluble* TM), stanowi produkt degradacji zewnątrzłonowej części formy transmembranalnej. Jej fizjologiczne i patofizjologiczne funkcje nie zostały jeszcze dokładnie poznane, a w literaturze jest opisywana głównie jako marker uszkodzenia komórek śródbłonna [146].

Kompleksy trombina-antytrombina

Jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w proces krzepnięcia krwi jest trombina, która bierze udział w aktywacji fibrynogenu do fibryny, aktywacji V, VIII, XI i XIII czynnika krzepnięcia, a także agregacji płytek krwi. Oprócz udziału w licznych procesach związanych ze stanem i funkcjonowaniem naczyń krwionośnych, trombina odgrywa także rolę w regulacji procesów zapalnych, chorobach nowotworowych, czy neurodegeneracyjnych [147, 148].

Aktywna cząsteczka ludzkiej α -trombiny ma masę około 38 kDa i jest zbudowana z dwóch łańcuchów polipeptydowych (A i B), złożonych odpowiednio z 36 i 259 aminokwasów,

połączonych mostkiem disiarczkowym. Centrum aktywne tej proteazy serynowej znajduje się w C-końcu i utworzone jest przez triadę katalityczną, która składa się z reszt aminokwasowych w sekwencji: His 57, Asp 102 i Ser 195 [149].

Trombina produkowana jest z nieaktywnego zymogenu – protrombiny w obecności zaktywowanego czynnika Xa, Va, jonów wapnia Ca^{2+} i fosfolipidów błonowych płytek krwi, głównie w odpowiedzi na uwolnienie czynnika tkankowego TF z miejsca uszkodzenia tkanki lub, w mniejszym stopniu, w wyniku kontaktu z ujemnie naładowaną powierzchnią, np. kolagenem. Proces ten jest kontrolowany przez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego. W warunkach fizjologicznych kontrola stężenia trombiny we krwi odbywa się także poprzez oddziaływanie inhibitorów, spośród których najważniejszym jest osoczowa serpina – antytrombina (AT), dawniej zwana antytrombiną III (ATIII), która reguluje zarówno powstawanie jak i aktywność trombiny [150].

Antytrombina jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 58 kDa, syntetyzowaną w wątrobie, komórkach śródbłonna naczyń i megakariocytach. Występuje w dwóch formach: 90% to forma α , glikozylowana we wszystkich pozycjach, a pozostałe 10% to forma β , nieglikozylowana w pozycji Asn 135. Tak jak inne serpiny, AT zbudowana jest z 9 helis alfa i 3 harmonijek beta. Jest najważniejszym inhibitorem układu krzepnięcia, głównie dzięki tworzeniu nieaktywnego stabilnego kompleksu z trombiną – trombina-antytrombina (TAT) oraz z aktywnymi czynnikami X, XII, XI, IX przy współudziale heparyny jako kofaktora, który zwiększa wydajność reakcji tysiąckrotnie. AT nazywana bywa „negatywnym białkiem ostrej fazy”. Powstały kompleks trombina-antytrombina (TAT) ma masę cząsteczkową 88 kDa i okres półtrwania wynoszący około 15 minut. Jest on nieaktywny biologicznie i powoduje zahamowanie właściwości proteolitycznych trombiny. Kompleksy TAT są usuwane z krwi przez makrofagi. Stężenie kompleksów TAT jest czułym wskaźnikiem stanów wzmożonej trombinogenezy *in vivo* i jest wykorzystywane w diagnostyce powikłań zakrzepowych [140]. Ze względu na miejscowe powiązanie ze stężeniem trombiny, jest to bardzo czuły wskaźnik nadkrzepliwości [151].

Fibrynoliza

Najważniejszym enzymem procesu fibrynolizy jest plazmina działająca bezpośrednio na zakrzep, a szczególnie na zawartą w nim fibrynę – końcowy produkt krzepnięcia, który powstaje z fibrynogeny. Plazmina powoduje rozpad tych dwóch składników na tzw. produkty

degradacji fibrynogenu i fibryny. Powstaje ona z obecnego we krwi nieaktywnego białka – plazminogenu pod wpływem jego aktywatorów: egzogennych – tkankowego i urokinazowego aktywatora plazminogenu (t-PA i u-PA), występujących najpierw w formie jednołańcuchowej (sct-PA, scu-PA), a następnie aktywnej dwułańcuchowej (tct-PA, tcu-PA) i endogennych – kalikreiny powstałej z prekalikreiny, czynnika XII i wysokocząsteczkowego kininogenu. Proces fibrynolizy jest kontrolowany przez liczne białka działające jako inhibitory aktywatora plazminogenu typu 1, 2 (PAI-1, PAI-2), proteazę neksynę I oraz alfa-2-antyplazminę, alfa-2-makroglobulinę, alfa-1-antytrypsynę, C1-inhibitor, antytrombinę, inhibitor fibrynolizy aktywowany przez trombinę, modulatory (nasilające ten proces – białko C i S, trombomodulina, tetranektyna i osłabiające ten proces – trombospondyna, witronektyna, glikoproteina bogata w histydynę) oraz poprzez swoiste receptory komórkowe (anneksyna II, amfoteryna, GPIIb/IIIa, alfa-enolaza, LRP) [140].

Tkankowy aktywator plazminogenu

Komórki śródbłonna naczyń krwionośnych syntetyzują i wydzielają tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) w dwóch formach. Forma aktywna jest wolna i wysoce specyficzna względem plazminogenu. Forma nieaktywna jest związana z PAI-1 w kompleksie t-PA/PAI-1. t-PA jest wydzielany w sposób ciągły, jednak jego wydzielanie może znacznie się zwiększyć poprzez wysiłek fizyczny, stres psychiczny czy przyjmowanie leków [140]. Dobrym przykładem zachowania się aktywności i stężenia t-PA w chorobach naczyń jest jego wyraźny wzrost w miarę pogarszania się ukrwienia kończyn u chorych z miażdżycą zarostową [140, 152]. Jednak stwierdzany spadek aktywności t-PA w skrajnie zaawansowanym stadium miażdżycy zarostowej – w IV okresie według Fontaine'a (przy obecności martwicy czy owrzodzeń), był związany z tworzeniem się dużej ilości nieaktywnych kompleksów t-PA/PAI-1, równoległe do wzrostu aktywności PAI-1 [140]. Stąd nie dziwi zachowanie się t-PA w innych schorzeniach mogących potencjalnie zajmować naczynia krwionośne.

Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1

Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1) syntetyzowany jest głównie przez aktywowane komórki śródbłonna i mięśni gładkich naczyń krwionośnych, hepatocyty oraz fibroblasty. Magazynowany jest także w alfa ziarnistościach płytek krwi i uwalniany do osocza w czasie ich aktywacji. Także znaczna część aktywnego PAI-1 osocza jest

zmagazynowana w śródbłonku poprzez odwracalne połączenie z białkiem – witronektyną, co przeciwdziała jej inaktywacji. Mechanizm syntezy i uwalniania PAI-1 nie jest do końca znany. Wiadomo, iż stymulujący wpływ na te procesy wywierają między innymi glikokortykoidy, cytokiny – jak interleukina 1 (IL-1), czynnik martwicy nowotworów (TNF), transformujący czynnik wzrostu- β 1 (TGF- β 1), endogenna insulina, insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF), czy bakteryjne liposacharydy. PAI-1 jest białkiem ostrej fazy oraz uznanym markerem ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Należy pamiętać, iż aktywność fibrynolityczna krwi jest wypadkową aktywności t-PA i PAI-1. t-PA wydzielany przez śródbłonek pod wpływem różnych bodźców łączy się z PAI-1, tworząc nieaktywne kompleksy t-PA/PAI-1. PAI-1 w warunkach fizjologicznych jest wytwarzany w stężeniu około 10 razy większym niż t-PA [140].

D-dimery

Produkty degradacji fibryny i fibrynogenu powstają pod wpływem działania plazminy na fibrynę i fibrynogen. Powstałe fragmenty są różnej wielkości, a najmniejsze z nich to d-dimery. Osoczowy wzrost stężenia d-dimerów wskazuje na aktywację krzepnięcia, ale również na wtórną do niej aktywację fibrynolizy. Dziesięciokrotnie podwyższone ich stężenie opisali Kopeikin i wsp. w RZS. Wraz z postępem choroby wartości obniżały się [153]. Nieznacznie wyższe stężenie d-dimerów oraz t-PA obserwowano u chorych z obecnością antykoagulantu toczeniowego [154] oraz w miażdżycy zarostowej kończyn dolnych (ASO) [140].

2.9. Czynniki zapalenia

Substancjami białkowymi mediującymi reakcje zapalne oraz immunologiczne są cytokiny. Opisano ich do tej pory ponad 100 i wciąż odkrywane są nowe. Tworzą bogatą, skomplikowaną sieć, która zapewnia bardzo czuły i skuteczny system komunikacji. Cząsteczki te są nośnikami informacji, dzięki nim poszczególne komórki komunikują się z innymi, wpływają na nie, przekazując sygnały, regulując ich czynności, jak proliferacja i stany, jak zachowanie prawidłowych funkcji albo apoptoza. Charakteryzuje je plejotropizm, czyli zdolność pojedynczej cytokiny do stanowienia innej informacji dla różnych komórek, oddziaływanie na nie w inny sposób, a zatem wywieranie innego wpływu. Ponadto odznaczają się redundancją, co oznacza, że różne cytokiny mogą wysyłać tę samą informację, a zatem osiągać ten sam rezultat w danej populacji komórek. Potrafią działać na zasadzie synergizmu addycyjnego, sumując swe oddziaływanie w tkankach, osiągając lepsze wyniki, niż działając osobno. Mogą jednak

zachowywać się antagonistycznie, znosząc wzajemnie swoje działanie, a ostateczna reakcja zależy od przewagi stężenia którejś z cytokin. Kolejnymi cechami jest oddziaływanie zwrotne zarówno dodatnie, jak i ujemne. Dodatnie polega na wydzielaniu przez komórkę cytokiny pobudzającej wydzielanie przez inną komórkę innej cytokiny, która zwiększa wydzielanie tej pierwszej. Ujemne z kolei oznacza, że wydzielana przez komórkę cytokina aktywuje wydzielanie innej, która wpływa hamująco na uwalnianie pierwszej. Działają autokrynnie, czyli na komórkę, przez którą są wytwarzane, parakrynnie, czyli na sąsiednie komórki oraz endokrynnie, docierając układem krwionośnym do dalej zlokalizowanych tkanek. Sposób ich oddziaływania jest dwojaki. Może odbywać się bezpośrednio poprzez oddziaływanie na swoiste lub mniej swoiste receptory znajdujące się na powierzchni komórek oraz pośrednio przez pobudzanie produkcji innych cytokin lub syntezę dla nich receptorów.

Cytokiny mogą oddziaływać na wiele różnych komórek rozproszonych w organizmie. Ich najsilniejsze działanie dotyczy układu immunologicznego i procesów zapalenia. Mają zdolność wpływania na odpowiedź humoralną i komórkową, regulując poszczególne fazy reakcji immunologicznej [155]. Potwierdzono również ich udział w waskulopatiach [156].

Fibrynogen

Fibrynogen jest syntetyzowaną głównie w wątrobie dimeryczną glikoproteiną, która, poza udziałem w procesie krzepnięcia, należy do białek ostrej fazy. Jej prawidłowe stężenie znacznie przewyższa stężenie pozostałych osoczowych czynników krzepnięcia (200–400 mg/dl) [140]. Zarówno synteza, jak i wzrost stężenia fibrynogenu są stymulowane przez różne bodźce, jak stan zapalny, nowotwory, niektóre leki, czy urazy.

Przy udziale trombiny fibrynogen przekształca się w fibrynę, która tworzy zrąb zakrzepu. Proces jest złożony, a w pierwszym jego etapie odłączane są od N-końca każdego z łańcuchów α fibrynogenu – tzw. fibrynopeptydy A (FPA), a od łańcuchów β – fibrynopeptydy B (FPB). Podwyższone ich poziomy występowały u więcej niż połowy pacjentów z SSc [157], a także u pacjentów ze SLE skojarzonym z obecnością antykoagulantu toczniowego [158] i z RZS [159]. Powyższe obserwacje wskazują na wzrost aktywacji krzepnięcia – szczególnie trombinogenezy. Po odłączeniu fibrynopeptydów fibrynogen staje się w monomerem fibryny. Ulega on polimeryzacji w sieć fibryny albo tworzy rozpuszczalny kompleks z cząsteczką fibrynogenu bądź z produktami jej trawienia, dając rozpuszczalne kompleksy monomerów fibryny.

Białko C-reaktywne

Białko C-reaktywne (CRP) jest zbudowaną z pięciu identycznych nieglikozylowanych polipeptydowych jednostek, z których każda zawiera 206 aminokwasów. Protomery są połączone niekowalentnie, tworząc pierścień. Jego gen znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 1 i zawiera jeden intron rozdzielający dwa kodujące regiony [160].

Należy do tzw. białek ostrej fazy, jest syntetyzowane przede wszystkim w wątrobie i regulowane na poziomie transkrypcji głównie przez interleukinę 6 (IL-6) [161]. Synteza poza wątrobą została potwierdzona w monocytach, limfocytach neuronach oraz blaszkach miażdżycowych [162].

Wiele dotychczasowych badań udowodniło związek między CRP a procesami odbywającymi się w naczyniach krwionośnych. Osoczowe stężenie CRP okazało się być jednym z najmocniejszych predyktorów wieńcowej choroby serca [163], ale są również podwyższone u otyłych pacjentów, dodatnio korelując z otyłością brzuszną i BMI, cukrzycą typu 2 oraz opornością na insulinę. Stężenie CRP oraz IL-6 mogą wskazywać na rozwój cukrzycy u otyłych kobiet oraz mężczyzn, co pozwala uważać CRP za prawdopodobne powiązanie między otyłością a rozwojem cukrzycy [164].

CRP bezpośrednio uczestniczy w procesie miażdżycowym, modulując funkcje śródbłonna naczyń. W stężeniu wskazującym na możliwość wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych pobudza ekspresję cząstek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1), selektyn i MCP-1 w komórkach endotelium poprzez zwiększone wydzielanie naczyniokurczącej ET-1 oraz IL-6 [165, 166]. Zmniejsza również podstawową i stymulowaną produkcję wytwarzanego przez śródbłonek NO, poprzez hamowanie ekspresji syntazy NO, co w rezultacie osłabia powstałą w odpowiedzi na przewlekłe niedotlenienie angiogenezę [167].

Zwiększa z kolei ekspresję oraz aktywność w komórkach endotelium PAI-1, prozakrzepowego białka tłumiącego fibrynolizę poprzez inhibicję aktywacji plazminogenu i przez to przyczyniającego się do rozwoju miażdżycy [168].

Interleukina 6

Interleukina 6 jest plejotropową, α -helikalną, fosforylowaną i różnorodnie glikozylowaną cytokiną o masie 22-28 kDA, która składa się z 183 aminokwasów. Odgrywa znaczącą rolę w procesach zapalnych, hematopoezie, metabolizmie kostnym oraz progresji nowotworów

[169]. Prawidłowe stężenie IL-6 oscyluje wokół wartości 1 pg/mL z niewielkimi odchyleniami w zależności od cyklu menstruacyjnego, większymi w niektórych chorobach nowotworowych oraz dużym wzrostem u pacjentów po zabiegach operacyjnych [170]. Wiele komórek wydziela IL-6, m.in. komórki śródbłonna, fibroblasty, megakariocyty, neurony współczulne, keratynocyty, komórki Langerhansa, monocyty, neutrofile, eozynofile. Produkcja IL-6 koreluje z aktywacją komórek i w warunkach prawidłowych kontrolowana przez katecholaminy i drugorzędowe hormony płciowe. Najbardziej wydzielanie IL-6 stymuluje IL-1, czynnik martwicy nowotworu α (TNF α), interferony, lipopolisacharydy oraz cząstki wirusów [171].

IL-6 w połączeniu z innymi cytokinami jak TNF α i IL-1 przeprowadza ostrą reakcję zapalną, ale głównie na niej spoczywa odpowiedzialność za gorączkę i ostrą fazę przebiegającą w komórkach wątroby oraz odgrywa dużą rolę w przejściu z ostrej reakcji zapalnej do przewlekłej. Bierze udział w przewlekłych zapaleniach występujących w chorobach jak otyłość, insulinooporność, zapalenia jelit, zapalenia stawów i sepsa. Przyczynia się do powstania i destabilizacji blaszki miażdżycowej [172, 173]. Wykryto też działanie przeciwzapalne IL-6 w mięśniach szkieletowych jako odpowiedź na wysiłek fizyczny [171]. Stymuluje hematopoezę, będąc czynnikiem wzrostu dla komórek pnia oraz wpływając na dojrzewanie komórek B [174].

Interleukina 10

Interleukina 10 (IL-10), inaczej czynnik hamujący syntezę cytokin, o masie cząsteczkowej 35kD jest również syntetyzowana przez monocyty, makrofagi i limfocyty T, lecz ma działanie przeciwzapalne. Hamuje syntezę czynnika tkankowego w ścianie tętnic, zmniejszając nasilenie zewnątrzpochodnego krzepnięcia krwi, a pośrednio proces miażdżycy tętnic [175].

Transformujący czynnik wzrostu - β 1

Transformujący czynnik wzrostu - β 1 to polipeptyd należący do nadrodziny transformujących czynników wzrostu beta. Pełni wiele różnych funkcji, kontrolując wzrost komórek, ich proliferację, różnicowanie i apoptozę. Został zidentyfikowany na trombocytach. Udowodniono, że powstaje z dużego białka prekursorowego, zawierającego 390 aminokwasów. W procesie proteolizy powstaje z niego mniejsze, dojrzałe białko, zawierające 112 aminokwasów. Jest wytwarzany przez większość komórek jądrzastych, włączając fibroblasty,

makrofagi, limfocyty i komórki śródbłonna. Ma masę cząsteczkową wynoszącą 25kD i strukturę homodimeryczną. Jest aktywowany przez plazminę [176]. TGF- β 1 pełni ważną rolę w kontroli układu immunologicznego. Wykazuje inną aktywność w zależności od typu komórek, na które działa, albo od stopnia ich rozwoju. Większość komórek odpornościowych wydziela TGF- β 1 [177]. TGF- β 1 promuje in vitro transformację fibroblastów w komórki nowotworopodobne, jest chemoatraktantem dla fibroblastów, stymuluje ich proliferację, a także syntezę fibronektyny i kolagenu. Badania Taniguchi i wsp. wykazały, że ta cytokina powoduje zgrubienie ściany tętnicy i zmniejszenie na niej ekspresji trombomoduliny [178].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) był jednym z pierwszych wykrytych czynników proangiogennych i jest uważany za jeden z najsilniejszych stymulatorów angiogenezy [179]. Bierze udział w wielu innych prawidłowych procesach, jak gojenie ran, różnicowanie i naprawa tkanek. Odpowiedź śródbłonna na działanie bFGF odbywa się za pośrednictwem przezbłonowych receptorów kinazy tyrozyny. Jego poziom koreluje ze stopniem unaczynienia tkanek [180]. Mimo wielu badań doświadczalnych i klinicznych, działanie tych cytokin u ludzi w rozmaitych chorobach, szczególnie w miażdżycy tętnic kończyn dolnych, nie jest w pełni poznane.

3. Cele i założenia pracy

- 1) Oznaczenie stężenia 6 parametrów czynności śródbłonna: czynnika tkankowego, inhibitora zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia, czynnika von Willebranda, trombomoduliny, tkankowego aktywatora plazminogenu, inhibitora aktywatorów plazminogenu – 1 oraz innych parametrów hemostazy, jak kompleksy trombina – antytrombina, fibrynogen i d-dimery w pierwotnym objawie Raynauda oraz we wtórnym w przebiegu innych chorób.
- 2) Przeprowadzenie badań wybranych parametrów zapalenia: stężenie białka C-reaktywnego, interleukiny 6, interleukiny 10, transformującego czynnika wzrostu- β 1, zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów w celu uwzględnienia udziału stanu zapalnego w przebiegu pierwotnego i wtórnego objawu Raynauda.
- 3) Ocena wpływu wysokiego dodatniego miana autoprzeciwciał na stężenie czynników hemostazy i zapalenia.
- 4) Porównanie udziału czynników hemostazy i zapalenia w patogenezie objawu Raynauda.
- 5) Ocena wpływu lokalnego narażenia na niską temperaturę na stężenie badanych czynników.
- 6) Ocena zależności stężenia czynników hemostazy i zapalenia od stopnia zmian w obrazie kapilaroskopowym.

4. Materiał i metody

Na przeprowadzenie badań stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej uzyskano zgodę o numerze KB/nr11/2014 wydaną przez Komisję Bioetyczną przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodka Badawczo-Rozwojowym.

4.1. Badana populacja

Badaniem objęto 78 pacjentów (68 kobiet, 10 mężczyzn) w wieku od 22 lat do 84 lat ($M= 53$ lata, $Me= 57$, $SD= 14$) pozostających pod opieką Poradni Angiologicznej lub przyjętych na Oddział Angiologiczny Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu Ośrodka Badawczo-Rozwojowego, którzy w wywiadzie podali występowanie objawu Raynauda. Badania te nie były przeprowadzane u osób poniżej 18 roku życia, kobiet w ciąży, żołnierzy służby zasadniczej, osób pozbawionych wolności ani pozostających w zależności służbowej. Określono kryteria włączenia do badania oraz kryteria wyłączenia z badania, które stanowią załącznik nr 1 do rozprawy.

Pacjenci spełniający kryteria włączenia do badania oraz niespełniający kryteriów wyłączenia z badania, zostali poinformowani o założeniach i celach prowadzonych badań, metodach ich przeprowadzania oraz procedurach, jakim zostaną poddani. Pacjenci zapoznali się z pisemną informacją dla pacjenta i mieli możliwość zadawania pytań, jeżeli nie wszystkie kwestie były w pełni zrozumiałe. Po otrzymaniu satysfakcjonujących odpowiedzi podpisali formularz świadomej zgody na udział w badaniu.

Wśród włączonych do badań 78 pacjentów z objawem Raynauda zastosowano kilka podziałów:

1. Podział względem charakteru objawu Raynauda:

Grupę I stanowiło 29 pacjentów z pierwotnym objawem Raynauda.

Grupę II stanowiło 49 pacjentów z wtórnym objawem Raynauda.

2. Podział względem wyniku prowokacyjnej próby oziębienia:

Grupę I stanowiło 19 pacjentów z objawem Raynauda, u których udało się uzyskać dodatni wynik próby oziębienia.

Grupę II stanowiło 59 pacjentów z objawem Raynauda, u których wynik tej próby był ujemny.

3. Podział względem obecności autoprzeciwciał:

Grupę I stanowiło 39 pacjentów z objawem Raynauda, u których występowało dodatkowo miano ANA.

Grupę II stanowiło 39 pacjentów z objawem Raynauda, u których miano ANA było ujemne.

Analizowano dane pacjentów uzyskane z wywiadu medycznego, badania przedmiotowego oraz wyniki oznaczeń laboratoryjnych.

Podczas prowadzenia badań nie wystąpiły świeże zmiany troficzne – owrzodzenie lub martwica opuszek palców u pacjentów z objawem Raynauda. Za incydent powstania zmian troficznych – owrzodzenia lub martwicy opuszek palców, uznany został ubytek skóry niespowodowany wyraźnym mechanicznym urazem i niegojący się w ciągu 2 tygodni. Nie odnotowano także innych incydentów naczyniowo-sercowych potencjalnie związanych z powstaniem niedokrwienia także w innych obszarach naczyniowych, tj.:

- powstałego na nowo i innego niż dotychczas ciężkiego – o znacznym stopniu niedokrwienia lub długotrwałego napadu obwodowego niedokrwienia palców dłoni lub stóp,
- ostrych zespołów wieńcowych – nagłej śmierci naczyniowo-sercowej, dławicy piersiowej niestabilnej, zawału mięśnia sercowego [NSTEMI, STEMI],
- udaru mózgu,
- dotychczas niewystępującego schorzenia – krytycznego niedokrwienia kończyny, ostrego lub podostrego niedokrwienia kończyny, bezobjawowego lub skąpoobjawowego niedokrwienia kończyny lub stwierdzenia w badaniach obrazowych niedrożności naczynia tętniczego,
- zgonu pacjenta.

4.2. Metody badań

Zgromadzono następujące dane do analizy:

a) Badanie podmiotowe – wywiad medyczny (w tym wywiad angiologiczny): płeć, wiek, choroby współistniejące i ich leczenie (choroby układowe tkanki łącznej (CTD): twardzina układowa (SSc), w tym postać uogólniona i zespół CREST, zespół Sjögrena (SS), toczeń rumieniowaty układowy (SLE), zapalenia skórno-mięśniowe (DM) i wielomięśniowe (PM), zespół Sharpa czyli mieszana choroba tkanki łącznej (MCTD), reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), niezróżnicowana choroba tkanki łącznej (UCTD), nadciśnienie tętnicze wg WHO, cukrzyca, miażdżyca tętnic kończyn dolnych, choroba niedokrwienna serca, przebyty zawał serca, przebyty udar mózgowy, jaskra, niedoczynność tarczycy, choroby psychiatryczne) oraz występowanie czynników ryzyka (wywiad dotyczący stylu życia – nikotynizm – ilość lat palenia i liczba papierosów wypalanych dziennie w przeliczeniu na paczkę (na tej podstawie obliczano tzw. paczkołata, czyli ilość wypalanych paczek dziennie x ilość lat palenia/20), spożycie alkoholu, aktywność fizyczna, występowanie zaburzeń lipidowych, określanych dalej mianem dyslipidemia – hipercholesterolemia, hipertriglicydemia oraz zaburzenia mieszane wg norm NCEP ATP III. Wywiad uwzględniał również obecne dolegliwości oraz dotychczasowy przebieg objawu z dokładnym określeniem momentu jego pojawienia się, czynników i sytuacji powodujących wystąpienie objawu, częstości jego występowania w zależności od pory roku, symetryczności zajęcia palców dłoni, fazowości wraz z próbą określenia czasu trwania poszczególnych faz, obecności bólu, ilości i wysokości zajęcia palców dłoni i/lub stóp, progresji dolegliwości oraz towarzyszących objawów, mogących wskazywać na wtórne podłoże.

b) Badanie przedmiotowe – fizykalne, w tym angiologiczne, z oceną stanu skóry, obecności ewentualnych ognisk martwicy lub owrzodzeń, oceną tętna kończyn górnych i dolnych, obecności szmerów naczyniowych, masa ciała, wzrost, BMI.

c) Badania dodatkowe – wykonanie segmentarnego pomiaru ciśnień z obliczeniem wskaźnika kostka/ramię według schematu TASC II, badanie USG duplex dopplerowskie – naczyń szyjnych, podobojczykowych oraz kończyn górnych lub dolnych, badanie radiologiczne, jeżeli dotychczas nie były wykonywane, a są wskazane w celu ustalenia rozpoznania podłoża objawu Raynauda, np. RTG klatki piersiowej, RTG pogranicza szyjno-piersiowego, RTG dłoni lub stóp, badanie kapilaroskopowe – videokapilaroskopowe oraz przeprowadzenie próby oziębienia.

d) Badania laboratoryjne – OB, CRP ilościowo, morfologia, fibrynogen, d-dimery, Na, K, Cl, kreatynina, kwas moczowy, AspAT, AlAT, fosfataza alkaliczna, glukoza, gospodarka lipidowa

(cholesterol całkowity, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol-wyliczany, TG – jeżeli nie była wcześniej zdiagnozowana, stwierdzano dyslipidemię na podstawie stężenia przekraczającego normę), TSH, czynnik reumatoidalny (RF), ANA-screening, c-ANCA, p-ANCA, ANA profil 3. Oznaczono także stężenie określonych czynników układu hemostazy: czynnika tkankowego (TF Ag), inhibitora zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (TFPI Ag), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA Ag), inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1 Ag), kompleksów trombina-antytrombina (TAT Ag), trombomoduliny (TM Ag), czynnika von Willebranda (vWF Ag), d-dimerów oraz parametrów zapalenia: fibrynogenu, białka C-reaktywnego (CRP), interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 10 (IL-10), transformującego czynnika wzrostu - β 1 (TGF- β 1), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF).

Po podpisaniu przez pacjenta formularza świadomej zgody następowało:

- nadanie indywidualnego numeru pacjenta,
- uzyskanie danych demograficznych pacjenta,
- przeprowadzenie badania podmiotowego,
- przeprowadzenie badania przedmiotowego,
- przeprowadzenie badań dodatkowych,
- pobranie krwi na czczo w celu wykonania standardowych badań laboratoryjnych,
- dwukrotne pobranie krwi do dwóch probówek:
 - 1) 8,2 ml na 3,2 % cytrynian sodu (S-Monovette 2,9 ml, Sarstedt),
 - 2) 4 ml na EDTA (S-Monovette 2,9 ml, Sarstedt)

przed przeprowadzeniem próby oziębienia oraz do 30 minut po jej przeprowadzeniu w celu badania stężenia określonych czynników układu hemostazy oraz parametrów zapalenia.

Pobrana od pacjentów z żyły odłokciowej krew obwodowa była niezwłocznie przekazywana do laboratorium Dolnośląskiego Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej we Wrocławiu przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym Ośrodku Badawczo Rozwojowym, gdzie były wykonywane odpowiednie oznaczenia laboratoryjne. Próbkę krwi wirowano przez 15 minut przy 2500 rpm. Uzyskane w ten sposób osocze porcjowano i przechowywano w temperaturze -80 °C w Laboratorium Naukowym WroVasc Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego Ośrodku Badawczo-Rozwojowego we Wrocławiu, gdzie sukcesywnie zostały wykonane poszczególne badania immunoenzymatyczne.

Przeprowadzona próba oziębienia polegała na zanurzeniu na pięć minut rąk pacjenta w naczyniu wypełnionym wodą oraz lodem, w celu wywołania objawu Raynauda poprzez miejscową reakcję na zimno.

Segmentarny pomiar ciśnień z obliczeniem wskaźnika kostka/ramię oraz badanie USG duplex dopplerowskie zostały przeprowadzone w Pracowni Nieinwazyjnych Badań Naczyniowych na Oddziale Angiologicznym z Pododdziałem Diabetologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu Ośrodka Badawczo-Rozwojowego.

- Segmentarny pomiar ciśnień badano przy użyciu przepływomierza fali ciągłej Doppler SmartDop 45 produkcji Hadeco.
- Badanie USG duplex dopplerowskie naczyń szyjnych, podobojczykowych oraz kończyn górnych lub dolnych był przeprowadzany za pomocą aparatu USG LOGIQ 7 GE, przy użyciu szerokopasmowej sondy liniowej 7L (2,5 – 7MHz).

Badania radiologiczne były wykonywane w Pracowni RTG w Dolnośląskim Ośrodku Diagnostyki Laboratoryjnej we Wrocławiu przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym Ośrodka Badawczo-Rozwojowym.

Badanie wideokapilaroskopowe przeprowadzono w Gabinetcie Badań WroVasc na Oddziale Angiologicznym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego Ośrodka Badawczo-Rozwojowego we Wrocławiu za pomocą zestawu do wideokapilaroskopii gwarantującego różne powiększenia oraz zapis danych, na który to zestaw składają się dwa urządzenia. Jest to mikroskop z kamerą Toupcam firmy Touptek Photonics oraz aparat CapillaryScope MEDL4N Dino-Lite Digital Microscope.

Kapilaroskopia jest bezpieczną, prostą, nieinwazyjną metodą diagnostyczną pozwalającą przyżyciowo obrazować zaburzenia mikrokrążenia w obrębie skóry i błon śluzowych. W praktyce klinicznej najszersze zastosowanie znalazła kapilaroskopia naczyń wału paznokciowego wykonywana techniką mikroskopową. Wykorzystywany jest fakt, iż w tej okolicy naczynia włosowate mają przebieg równoległy do powierzchni skóry, co umożliwia oglądanie ich na całej długości. Ocenie są poddawane cztery palce (od II do V) obu dłoni. Badanie kapilaroskopowe wykorzystywane jest w diagnostyce różnicowej pomiędzy pierwotnym objawem Raynauda a zaburzeniami mikrokrążenia towarzyszącymi układowym chorobom tkanki łącznej, określanym mianem wtórnego objawu Raynauda. LeRoy i Medsger,

ze względu na stwierdzone patognomoniczne zmiany w mikrokrążeniu w przebiegu twardziny układowej, zaproponowali uznanie kapilaroskopii, obok badań serologicznych, jako kryterium klasyfikacyjnego rozpoznawania twardziny. W 2013 roku badanie zostało włączone jako kryterium rozpoznania twardziny w klasyfikacji ACR/EULAR.

Standardowo w ocenie kapilaroskopowej uwzględnia się: przejrzystość skóry, układ pętli naczyń, ilość kapilar/mm liniowy, ewentualną obecność obszarów awaskularnych, morfologię poszczególnych pętli naczyń, obecność elementów dodatkowych, takich jak wybroczyny, cechy obrzęku podścieliska, charakter przepływu krwi w naczyniach włosowatych, widoczność podbrodawkowego splotu żylnego.

W rozprawie zmiany w obrazie kapilaroskopowym podzielono na trzy stopnie wg ustalonego przez Anrade i wsp. schematu. Za stopień 1. uznawano obraz prawidłowy z rzadko występującymi niewielkiego stopnia nieprawidłowościami. Na stopień 2. składały się bardziej nasilone, ale jednak subtelne zmiany, jak brak widoczności ramion kapilar, a jedynie czerwone punkty oraz najwyżej dwukrotnie skrzyżowany kręty przebieg ramion kapilar. 3. stopień stanowiły anomalie, jak czterokrotne poszerzenie ramion kapilar lub poszerzenie $>20 \mu\text{m}$, występowanie megakapilar, czyli pętli z dziesięciokrotnie poszerzonymi ramionami, kilkukrotne skrzyżowanie ramion pętli, występowanie licznych odgałęzień, czy obecność nietypowych zmian, które jednak nie wpisują się w powyższy opis.

Badania laboratoryjne były wykonywane w laboratorium Dolnośląskiego Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej we Wrocławiu przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym Ośrodku Badawczo-Rozwojowym. Kierownik: mgr Beata Gorzkowska, dane teleadresowe: ul. H. M. Kamieńskiego 73a, 51-124 Wrocław, laboratorium@dcdl.pl.

- OB, norma $< 12 \text{ mm po } 1 \text{ godz.}$ [mm/h],
- Białko CRP (C - reactive protein) – metoda lateksowa wzmocniona immunoturbidymetrycznie, analizator chemiczny ADVIA 1200, norma $< 5,0 \text{ mg/l}$,
- Morfologia – metoda fluoroscencyjnej cytometrii przepływowej z wykorzystaniem lasera półprzewodnikowego (WBC i retikulocyty), metoda ogniskowania hydrodynamicznego (detektor RBC i płytek krwi), metoda z użyciem laurylosiarczanu sodu (SLS) (HGB), urządzenie Sysmex XT-400i – automatyczny analizator hematologiczny, analizuje i podaje wyniki 39 parametrów, normy: WBC 4,00 – 10,00

K/ μ L , RBC 4,00 – 5,10 M/ μ L, HGB 12,0 – 15,0 g/dl, HCT 37 – 47 %, PLT 150 – 440 K/ μ L,

- Fibrynogen – koagulometryczna, zmodyfikowana metoda Claussa, odczynnik Multifibren U firmy Siemens, aparat BCS XP firmy Siemens, norma 2,0 – 3,5 g/l,
- d-dimery – odczynnik INNOVANCE d-dimer, aparat BCS XP firmy Siemens, norma <500 μ g/l,
- Na, K, Cl–bezpośrednia elektroda jonoselektywna, normy: Na 136,0 – 146,0 mmol/l, K 3,6 – 4,9 mmol/l, Cl 99 – 109 mmol/l,
- Kreatynina– metoda Jaffe’go, z kwasem pikrynowym w środowisku zasadowym, kinetyczna z korekcją, analizator chemiczny ADVIA 1200, norma 0,80 – 1,10 mg/dl,
- Kwas moczowy – metoda dwuskładnikowa: z użyciem urykazy oraz absorbanca, analizator Architect 4100 i firmy Abbott, norma 2,6 – 6,0 mg/dl,
- AspAT – metoda NADH (bez fosforanu-5’-pirydoksalu), dwuodczynnikowy płynny zestaw 7D81 AST, analizator Architect 4100 i firmy Abbott, norma < 31,0 U/l,
- AlAT – metoda NADH (z fosforanem-5’-pirydoksalu), jednoodczynnikowy zestaw Aktywowana ALT 8D36, analizator Architect 4100 i firmy Abbott, norma < 34,0 U/l,
- Fosfataza alkaliczna–metoda pomiarowa; fosforan para-nitrofenolu, udoskonalona metoda Bessey’a i wsp., absorbanca, dwuodczynnikowy płynny zestaw Alkaline Phosphatase 7D55-21, 7D55-31, analizator Architect 4100 i firmy Abbott, norma 25 – 100 U/l,
- Glukoza – metoda heksokinazowa, odczynnik heksokinaza/G-6-PDH firmy Abbott, analizator Architect 4100 i firmy Abbott, norma 60,0 – 99,0 mg/dl,
- Cholesterol całkowity – TC (ang. total cholesterol) – metoda enzymatyczna, analizator chemiczny ADVIA 1200, norma < 190 mg/dl,
- Cholesterol HDL – HDL C (ang. high density lipoprotein cholesterol) – metoda eliminacji z katalazą, analizator chemiczny ADVIA 1200, czynnik ryzyka < 40 mg/dl,
- Cholesterol LDL – LDL C (ang. low density lipoprotein cholesterol) – wyliczono w oparciu o regułę Friedewalda, norma < 130 mg/dl,
- Triglicerydy – TG (ang. triglyceride) – metoda pomiarowa: GPO, reakcja Trindera bez próby ślepej surowicy, analizator chemiczny ADVIA 1200, norma < 150 mg/dl,
- TSH – dwustopniowa metoda immunochemiczna, odczynnik–ARCHITECT TSH Reagent Kit, analizator Architect 4100 i firmy Abbott, norma 0,350 – 4,940 mIU/l,

- czynnik reumatoidalny – analizator Architect 4100 i firmy Abbott, norma < 30,0 IU/ml,
- ANA-screening – test immunofluorescencji pośredniej, płytki reakcyjne BIOCHIP firmy Euroimmun, ocena fluorescencji pod mikroskopem,
- c-ANCA, p-ANCA – zestaw testów EUROLINE do jakościowego oznaczania in vitro ludzkich anty-MPO i anty-PR3 firmy Euroimmun,
- ANA-3 profil – test EUROLINE do jakościowego oznaczania in vitro ludzkich przeciwciał klasy IgG przeciwko 14 antygenom: ANA Profile 3 Kit (RNP/Sm, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nukleosomom, histonom, rybosomalnemu białku P, AMA-M2).

Stężenie czynników układu hemostazy oraz cytokin zostały oznaczone w Laboratorium Naukowym WroVasc, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Ośrodek Badawczo-Rozwojowy. Kierownik: dr Joanna Dubis, dane teleadresowe: ul. H. M. Kamieńskiego 73a, 51-124 Wrocław. Zastosowano metody immunoenzymatyczne (ELISA), przy pomocy gotowych zestawów komercyjnych:

- TF Ag – IMUBIND Tissue Factor ELISA, jednostka – pg/ml,
- TFPI Ag – IMUBIND Total TFPI ELISA, jednostka – ng/ml,
- vWF Ag – IMUBIND vWF ELISA, jednostka – mU/ml,
- TM Ag – IMUBIND Thrombomodulin ELISA, jednostka – ng/ml,
- TAT Ag – ENZYGOST TAT Micro Test, jednostka – µg/ml,
- t-PA Ag – IMUBIND t-PA ELISA, jednostka – ng/ml,
- PAI-1 Ag – IMUBIND Plasma PAI-1 ELISA, jednostka – ng/ml,
- IL 6 – Human IL 6 Quantikine ELISA, R&D Systems, jednostka – pg/ml,
- IL 10 – Human IL 10 Quantikine ELISA, R&D Systems, jednostka – pg/ml,
- TGF-β1 – Human TGF-β1 Quantikine ELISA, R&D Systems, jednostka – µg/ml,
- bFGF – Human bFGF Quantikine ELISA, R&D Systems, jednostka – pg/ml.

ELISA to test immunoenzymatyczny lub immunoenzymosorpcyjny, który należy do tzw. testów fazy stałej, a wywodzi się z testu radioimmunologicznego, gdzie przeciwciała były znakowane radioizotopem, a za wynalezienie którego przyznano w 1977 roku Nagrodę Nobla. Metoda zaczęła rozwijać się już w latach sześćdziesiątych, a obecnie jest najczęściej stosowaną biomedyczną metodą pomiaru w badaniach diagnostycznych i naukowych.

Wykorzystuje się ją do wykrywania białek oraz szacowania ich stężenia w określonym materiale z użyciem skoniugowanych z odpowiednim enzymem przeciwciał monoklonalnych lub poliklonalnych, a jej podstawą jest tworzenie kompleksów antygen-przeciwciało, których wykrycie umożliwia sprzężona reakcja enzymatyczna. Technika została po raz pierwszy opisana przez Petera Perlmana i Eve Engvall z Uniwersytetu w Sztokholmie w 1971 roku.

Dotychczas ELISA doczekała się licznych modyfikacji, ale wszystkie testy użyte do przeprowadzenia opisanych oznaczeń były wykonywane metodą kanapkową – sandwich ELISA, w której antygen wiązany jest pomiędzy dwoma przeciwciałami. Pierwszym etapem jest nałożenie przeciwciał – w przypadku metody sandwich oraz bardziej złożonych odmian – na powierzchni fazy stałej, czyli na polistyrenowych lub pleksyglasowych płytkach, które składają się z 96 dołków. Po wypłukaniu tych przeciwciał, które nie uległy związaniu z płytką, dodaje się badany materiał, w którym bada się obecność antygeny – białka. Jeżeli będzie ono obecne w próbce, zwiąże się z nałożonym uprzednio specyficznym przeciwciałem. Następuje kolejne płukanie, po którym należy dodać kolejne przeciwciało – tym razem znakowane enzymem, by móc odczytać wyniki procedury i stwierdzić obecność antygeny. Przeciwciało to również jest specyficzne względem poszukiwanego antygeny, jednak rozpoznaje inny element struktury białkowej – dzięki temu przeciwciała nie blokują wzajemnego przyłączania. Po ponownym przepłukaniu środowiska reakcji i dodaniu odpowiedniego substratu, enzym zawarty w koniugacie katalizuje reakcję, której barwny produkt można ocenić ilościowo metodą spektrofotometryczną, służącą do pomiaru intensywności barwy. Zatem ELISA jest także metodą kolorymetryczną. Na wielkość stężenia produktu reakcji enzymatycznej wskazuje intensywność barwy i jest ona proporcjonalna do stężenia przeciwciał w próbce. Równoległe do próbek badanych, przeprowadza się analogiczne etapy reakcji dla tzw. surowic kalibracyjnych o znanym stężeniu badanego przeciwciała. Wyniki uzyskane dla kalibratorów pozwalają wykreślić krzywą kalibracyjną, stanowiącą wykres zależności intensywności barwy od stężenia przeciwciał w próbce. Z równania krzywej kalibracyjnej oblicza się stężenie przeciwciał w próbkach badanych. Stosując spektrofotometr, można precyzyjnie określić natężenie barwy po sprecyzowanym czasie trwania reakcji, dzięki czemu można również ustalić stężenie antygeny w materiale użytym do badań.

4.3. Analizy statystyczne

Normalność danych została zweryfikowana przy pomocy testu D'agostino-Pearsona. Dane ilościowe z racji braku normalności danych wyniki zostały przedstawione przy pomocy mediany (Me) i przedziału kwartylowego (Q1 – Q3), natomiast dane jakościowe jako liczebności (n) oraz frakcja procentowa (%).

Analiza badająca różnice w ilościowych cechach klinicznych, parametrach krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przy podziale względem charakteru objawu Raynauda, wyniku próby zimna oraz obecności przeciwciał ANA została wykonana przy pomocy testu Manna-Whitney'a. Do analizy zależności pomiędzy jakościowymi cechami klinicznymi a objawem Raynauda, wynikiem próby zimna lub obecnością ANA zastosowano dokładny test Fishera ze względu na niskie liczebności niektórych podkategorii.

Analiza zmian w parametrach krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia pod wpływem próby oziębienia została zbadana za pomocą testu Wilcoxon dla danych sparowanych.

Różnice w poziomie parametrów krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przy podziale względem wyniku badania kapilaroskopii została wykonana przy pomocy testu Kruskala-Wallisa z analizą post-hoc wielokrotnych powtórzeń z poprawką Holma.

Analiza niezależnego wpływu parametrów klinicznych i laboratoryjnych na wynik próby oziębienia oraz rodzaj objawu Raynauda została wykonana przy pomocy wieloczynnikowej analizy regresji logistycznej. Do obliczeń wykorzystano parametry, które w jednoczynnikowej analizie wykazały istotność, bądź były bliskie istotności ($p < 0,1$). Przedstawione zostały zarówno modele pełne, jak i te z wykluczonymi redundantnymi zmiennymi przy pomocy eliminacji wstecznej.

Analiza statystyczna została wykonana w pakiecie R for Windows (wersja 3.1.2). Wykresy zostały wykonane przy pomocy biblioteki ggplot2 dla programu R. Za poziom istotności wszystkich testów ustalono $p < 0,05$.

Praca ta stanowi fragment podprojektu „ANGIO-RAY” Zadania 13 Projektu „WroVasc” pt. „Ocena czynników procesu krzepnięcia i fibrynolizy u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn–z objawem Raynauda.” Badania te mają pomóc w określeniu, które z czynników układu hemostazy mogą służyć jako predykatory zagrożenia wystąpieniem incydentu zakrzepicy tętniczej u pacjentów z objawem Raynauda. Kierownikiem zadania jest prof. dr hab. n. med. Maria Kotschy, głównym badaczem–lek. med. Daniel Kotschy. Zadanie jest realizowane w ramach Projektu „WroVasc” Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013 [POIG.01.01.02.-02-001].

5. Wyniki badań

W tym rozdziale przedstawiono zgromadzone informacje na temat włączonych do badania pacjentów. Uporządkowano zebrane zmienne w kilku aspektach:

- Tabele I – IV dotyczą całej grupy badanej, czyli wszystkich pacjentów z objawem Raynauda (n=78) i zawierają dane odnośnie cech klinicznych, czynników ryzyka i chorób towarzyszących, wyników standardowych badań laboratoryjnych oraz badania na obecność autoprzeciwciał, a także porównania stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przed i po przeprowadzeniu prowokacyjnej próby oziębienia.
- Tabele V – IX prezentują wyżej wymienione zmienne z zastosowaniem podziału na pacjentów z pierwotnym (n=29) i z wtórnym RP (n=49).
- Tabele X – XIV zawierają uzyskane wyniki po wprowadzeniu podziału badanej grupy względem ujemnego (n=59) i dodatniego (n=19) wyniku próby oziębienia.
- W tabelach XV – XVIII zostały umieszczone obserwacje dotyczące stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przed i po przeprowadzeniu próby oziębienia w grupie pacjentów z ujemnym (n=39) i dodatnim (n=39) mianem ANA.
- W tabelach XIX – XX zostały umieszczone wyżej wymienione obserwacje po wprowadzeniu podziału pacjentów względem ujemnego (n=59) i dodatniego (n=19) wyniku prowokacyjnej próby oziębienia.
- W tabelach XXI – XXII zostały umieszczone wyżej wymienione obserwacje, po zastosowaniu podziału badanych na grupę z pierwotnym (n=29) i wtórnym (n=49) RP.
- Tabele XXIII – XXV ukazują zależność występowania stopnia zmian w obrazie kapilaroskopowym od danych klinicznych oraz stężenia wspomnianych czynników hemostazy i zapalenia zarówno przed, jak i po przeprowadzeniu prowokacyjnej próby oziębienia wśród wszystkich pacjentów z objawem Raynauda, u których możliwe było przeprowadzenie badania wideokapilaroskopowego.

Istotne różnice oraz ciekawsze obserwacje zostały podkreślone poprzez przedstawienie ich za pomocą wykresów.

Stężenie bFGF i RF u większości pacjentów nie osiągały poziomu wykrywalności, dlatego w tabelach przedstawiona jest liczba i procent pacjentów z wykrywalnym stężeniem tych czynników.

Tabela I Charakterystyka ogólna badanej grupy pacjentów z objawem Raynauda (n=78)

dane kliniczne	n (%) * Me (Q1 - Q3)
płeć kobiety	68 (87,2%)
mężczyźni	10 (12,8%)
wiek *	57 (47 - 62)
wiek pojawienia się RP *	35 (23 - 43)
zajęcie dłoni	78 (100%)
zajęcie stóp	33 (42,3%)
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	13 (16,9%)
ABPI_{dex} *	1,10 (1,04 - 1,15)
ABPI_{sin} *	1,12 (1,05 - 1,16)
choroby układowe tkanki łącznej	30 (38,5%)
postać uogólniona twardziny układowej	10 (12,8%)
CREST	3 (3,8%)
zespół Sjögrena	4 (5,1%)
MCTD zespół Sharpa	8 (10,3%)
UCTD	5 (6,4%)
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa (całość):	45 (57,7%)
szyjnego	33 (42,3%)
piersiowego	16 (20,5%)
lędźwiowego	33 (42,3%)
żebro szyjne	1 (1,3%)
zmiany zwyrodnieniowe drobnych stawów rąk	16 (20,5%)
choroba wibracyjna	6 (7,7%)
zespół cieśni nadgarstka	5 (6,4%)

RP – objaw Raynauda, ABPI – wskaźnik kostka-ramię, CREST – dawna nazwa ograniczonej postaci twardziny stanowiąca akronim objawów ISSc, MCTD – mieszana choroba tkanki łącznej, UCTD – nieodróżniona choroba tkanki łącznej, Me – mediana, Q – kwartył, n – liczba.

W tabeli I, w której zostały zebrane cechy kliniczne charakteryzujące całą grupę 78 pacjentów, którzy zostali włączeni do badania, zaznacza się przewaga kobiet. Uwagę zwraca zajęcie dłoni u wszystkich pacjentów oraz wysoki odsetek występowania chorób układowych tkanki łącznej. Wśród CTD wyodrębniono w tabeli te, które zostały zdiagnozowane u pacjentów w trakcie pobytu na Oddziale Angiologicznym w ramach prowadzenia programu lub w czasie wcześniejszych hospitalizacji. Widoczna jest znaczna przewaga występowania uogólnionej postaci twardziny układowej oraz postaci ograniczonej, dawniej zwanej zespołem CREST, oraz zespołu Sharpa, czyli mieszanej choroby tkanki łącznej (MCTD).

Tabela I zawiera również informacje, jaki jest rozkład innych chorób, pod kątem których obserwowani byli włączeni do badania pacjenci, jak choroba zwyrodnieniowa kręgosłupa z podziałem na poszczególne jego odcinki: szyjny, piersiowy, lędźwiowy; a także zmiany zwyrodnieniowe drobnych stawów rąk, zespół cieśni nadgarstka, czy choroba wibracyjna.

Tabela II Czynniki ryzyka i choroby towarzyszące u pacjentów z objawem Raynauda (n=78)

czynniki ryzyka i choroby towarzyszące	n (%) * Me (Q1 - Q3)
wiek *	57 (47 - 62)
dyslipidemia	54 (69,2%)
nadciśnienie tętnicze	35 (44,9%)
cukrzyca	27 (34,6%)
miażdżycy tętnic kończyn dolnych	13 (16,7%)
choroba niedokrwienna serca plus zawał	15 (19,2%)
udar	4 (5,1%)
palenie dawne	26 (33,3%)
palenie obecne	19 (24,4%)
paczkolata *	2,50 (0 - 19,25)
jaskra	5 (6,4%)
niedoczynność tarczycy	13 (18,6%)
BMI *	25,19 (21,20 - 29,38)
choroby psychiatryczne	11 (16,9%)

BMI – wskaźnik masy ciała, Me – mediana, Q – kwartył, n – liczba.

W tabeli II, która zawiera analizę czynników ryzyka oraz chorób współistniejących u 78 pacjentów z RP, zwraca uwagę wysoki odsetek występowania dyslipidemii oraz tendencja badanych do nadwagi (BMI Me=25,19). Wielu pacjentów cierpiało na nadciśnienie tętnicze (n=35), cukrzycę (n=27) oraz podało, że w przeszłości paliło papierosy (n=26). Blisko ¼ pacjentów (n=19) pali również obecnie.

W tabeli III zebrano hematologiczne, biochemiczne, serologiczne wyniki laboratoryjne wszystkich włączonych do badania pacjentów oraz podano liczbę i procentowy udział tych, u których wykryto dodatnie miano przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) oraz przeciw cytoplazmie neutrofilów w typie okołojądrowym (p-ANCA) i cytoplazmatycznym (c-ANCA). U połowy badanych pacjentów wykryto podwyższone miano ANA. Pozostałe wyniki utrzymywały się w granicach prawidłowych wartości.

Tabela III Standardowe badania laboratoryjne oraz badania na obecność autoprzeciwciał u pacjentów z objawem Raynauda (n=78)

badania standardowe	Me (Q1 - Q3)
OB	14 (8 - 20)
WBC	5,55 (4,36 - 6,61)
RBC	4,51 (4,32 - 47,00)
HGB	13,4 (13,0 - 14,2)
HCT	40,6 (39,0 - 42,1)
PLT	223 (186, - 270,)
glukoza	95 (87 - 105)
kreatynina	0,77 (0,72 - 0,83)
kwas moczowy	4,7 (4,0 - 5,3)
sód	140 (139 - 141)
potas	4,3 (4,1 - 4,5)
chlorki	105 (104 - 107)
cholesterol całkowity	193 (169 - 226)
HDL	59 (49 - 73)
TG	86,5 (69 - 108)
LDL	114 (90 - 142)
AspAT	21 (17 - 26)
AlAT	20 (14 - 26)
ALP	65 (48 - 81)
TSH	1,29 (0,91 - 1,81)
RF	8 (10,4%)
autoprzeciwciała	n (%)
ANA	39 (50%)
p-ANCA	5 (6,5%)
c-ANCA	7 (9,1%)

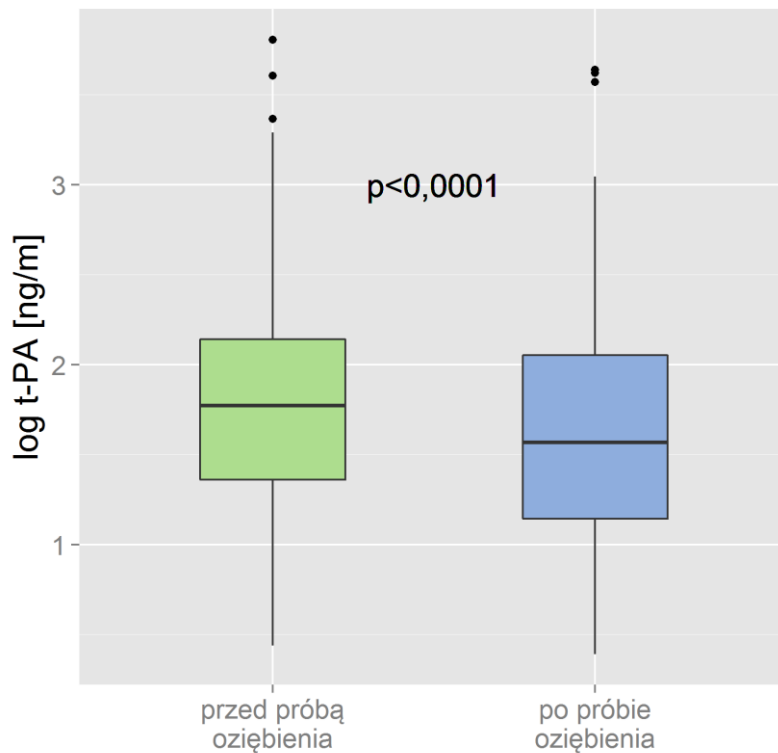
OB – odczyn Biernackiego, WBC – białe krwinki, RBC – czerwone krwinki, HGB – hemoglobina, HCT – hematokryt, PLT – płytki krwi, HDL – lipoproteina wysokiej gęstości, TG – triglicerydy, LDL – lipoproteina niskiej gęstości, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, AlAT – aminotransferaza alaninowa, ALP – fosfataza alkaliczna, TSH – tyreotropina, RF – czynnik reumatoidalny, ANA – przeciwciała przeciwjądrowe, p-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ okołojądrowy, c-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ cytoplazmatyczny, BMI – wskaźnik masy ciała, Me – mediana, Q – kwartył, n - liczba.

Tabela IV Porównanie stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u pacjentów z objawem Raynauda przed przeprowadzeniem próby oziębienia oraz po jej przeprowadzeniu

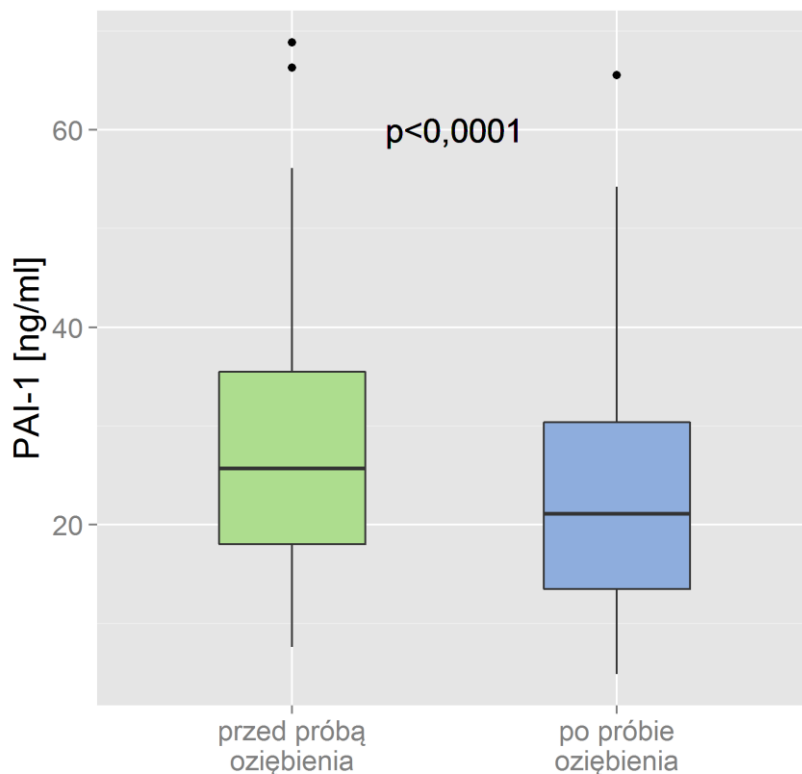
czynniki krzepnięcia	przed oziębieniem Me (Q1 - Q3)	po oziębieniu Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	249,5 (215,2 – 326,0)	257,5 (219,0 - 328,9)	0,95
TFPI	32,05 (22,90 - 41,80)	32,35 (24,10 - 42,40)	0,51
vWF	1600,5 (1097,5 – 1917,0)	1520,0 (1074,4 - 1993,1)	0,72
TM	3,00 (1,88 - 3,72)	2,98 (2,05 - 3,77)	0,97
TAT	2,93 (2,28 - 4,72)	2,91 (2,18 - 5,13)	0,84
czynniki fibrynolizy			
t-PA	5,89 (3,90 - 8,53)	4,80 (3,11 - 7,82)	0,0001
PAI-1	25,68 (17,99 - 35,48)	21,11 (13,47 - 30,44)	0,0001
d-dimery	295 (199 - 541)	242 (170 - 466)	0,013
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,3 (3,0 - 3,7)	3,3 (3,0 - 3,6)	0,43
CRP	1,51 (0,60 – 3,00)	1,32 (0,60 – 3,00)	0,003
IL-6	1,61 (0,50 - 3,06)	1,60 (0,61 - 2,75)	0,77
IL-10	5,81 (1,00 - 7,27)	5,72 (1,48 - 7,61)	0,22
TGF-β1	8019,42 (6498,09 - 10423,86)	7795,85 (5120,96 - 10411,48)	0,43
bFGF >1	4 (5,1%)	6 (7,7%)	0,75

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartyl, p-value – istotność statystyczna.

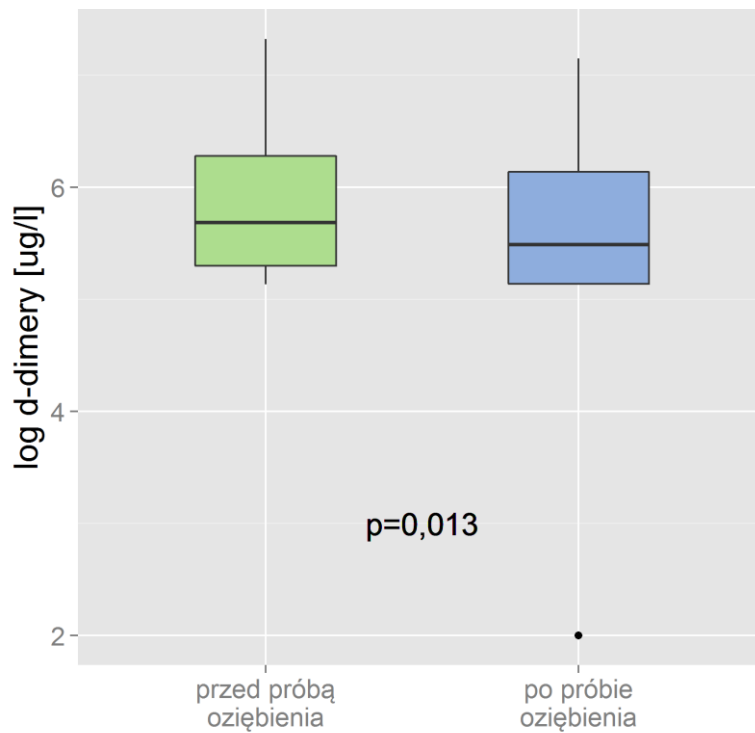
Przedstawione w tabeli IV porównanie wyników pomiaru stężenia badanych czynników przed przeprowadzeniem próby oziębienia i po jej przeprowadzeniu jednoznacznie wskazują na istotnie niższe stężenie t-PA ($p < 0,0001$), PAI-1 ($p < 0,0001$) oraz d-dimerów ($p = 0,013$) wśród czynników fibrynolizy oraz CRP ($p = 0,003$) wśród czynników zapalenia po poddaniu pacjentów działaniu niskiej temperatury.



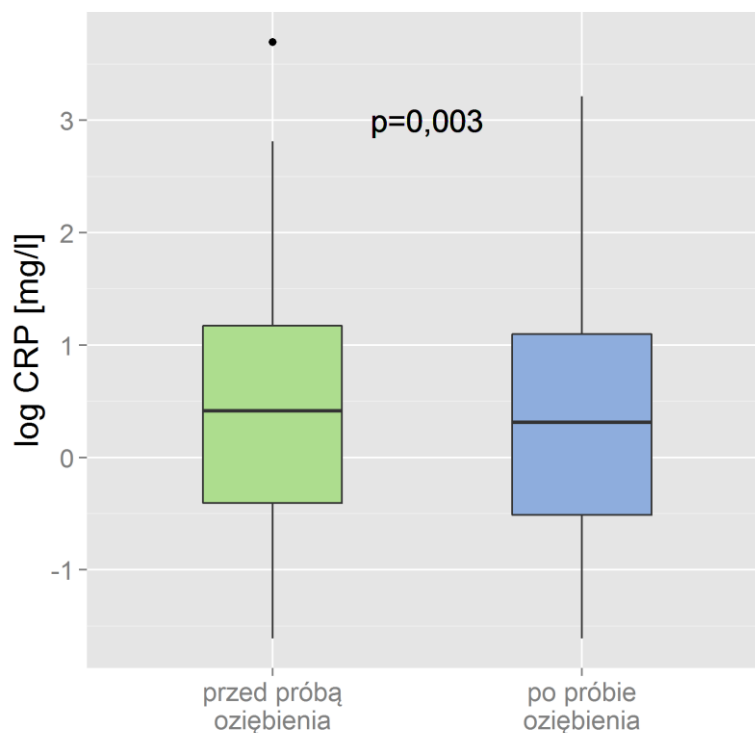
Wykres 1. Porównanie zlogarytmizowanego stężenia t-PA u pacjentów z RP przed przeprowadzeniem i po przeprowadzeniu próby oziębienia. Wykres prezentuje istotnie niższe stężenie t-PA po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p < 0,0001$).



Wykres 2. Porównanie stężenia PAI-1 u pacjentów z RP przed przeprowadzeniem i po przeprowadzeniu próby oziębienia. Wykres prezentuje istotnie niższe stężenie PAI-1 po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p < 0,0001$).



Wykres 3. Porównanie zlogarytmizowanego stężenia d-dimerów u pacjentów z RP przed przeprowadzeniem i po przeprowadzeniu próby oziębienia. Wykres prezentuje istotnie niższe stężenie d-dimerów po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p < 0,013$).



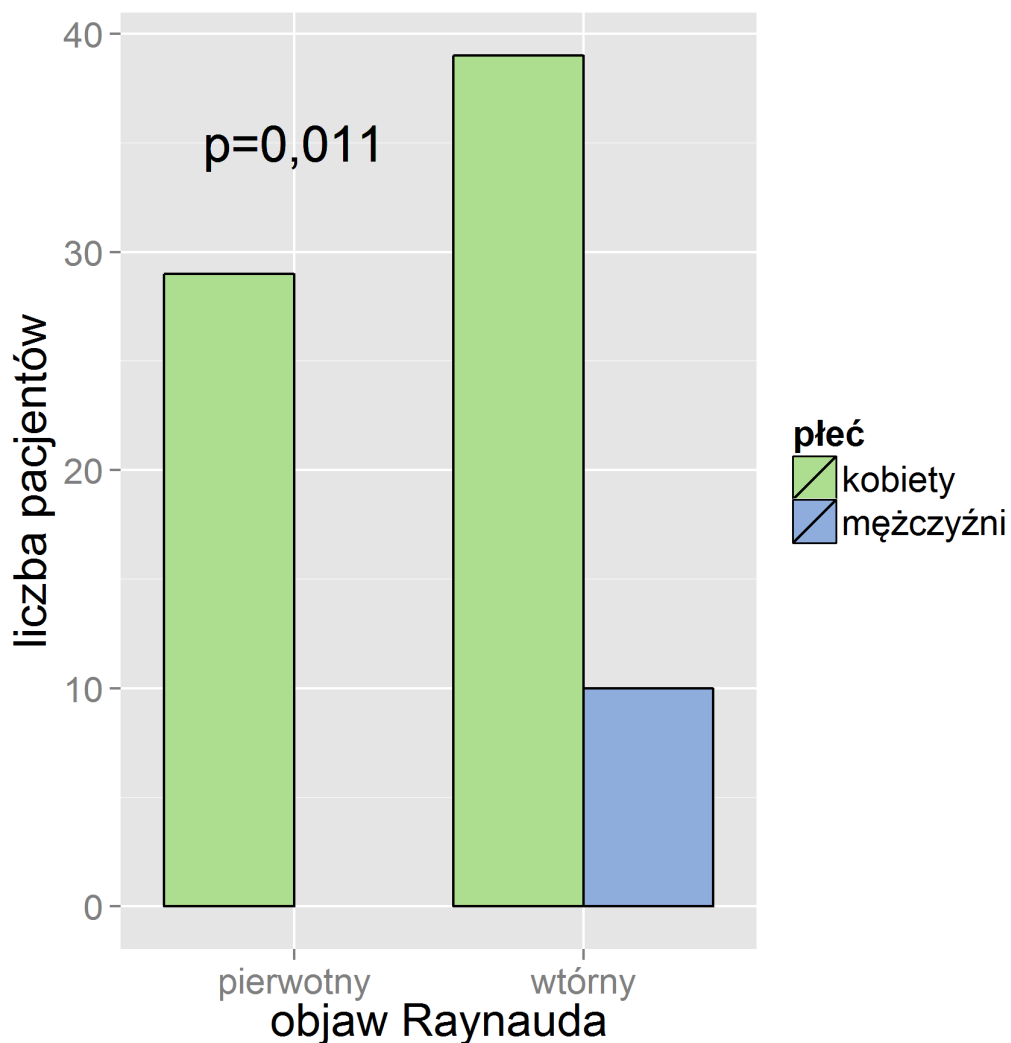
Wykres 4. Porównanie zlogarytmizowanego stężenia CRP u pacjentów z RP przed przeprowadzeniem i po przeprowadzeniu próby oziębienia. Wykres prezentuje istotnie niższe stężenie CRP po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p < 0,003$).

Tabela V Charakterystyka ogólna badanej grupy pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na jego pierwotny i wtórny charakter

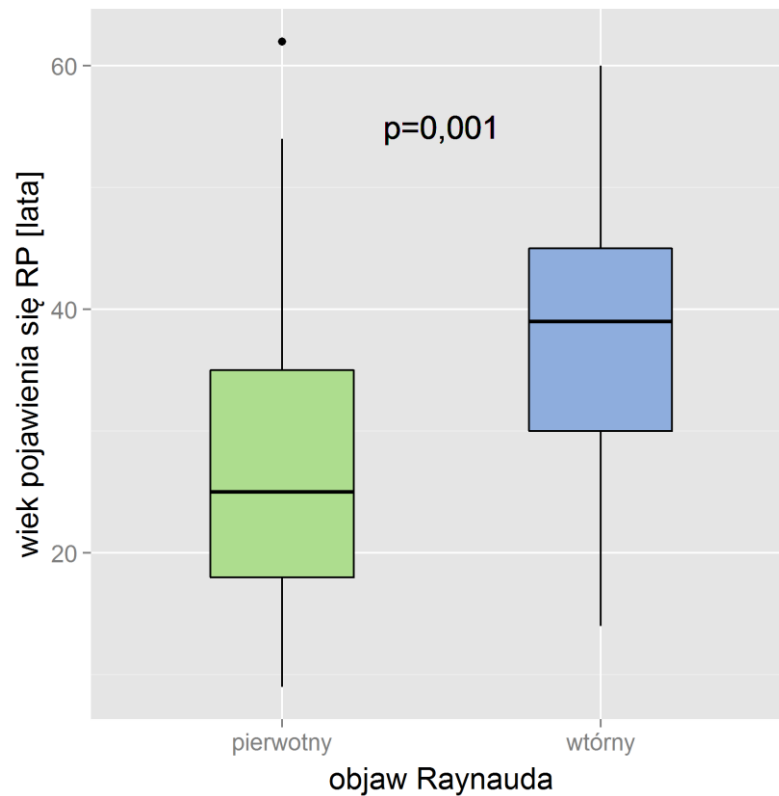
dane kliniczne	pierwotny RP n=29 * Me (Q1 - Q3)	wtórny RP n=49 * Me (Q1 - Q3)	p-value
płeć kobiety	29 (100%)	39 (79,6%)	0,011
mężczyźni	0 (0%)	10 (20,4%)	
wiek *	58 (37,75 - 62,25)	57 (49,75 - 62,25)	0,55
wiek pojawienia się RP *	25 (17,75 - 36,00)	39 (29,25 - 45,00)	0,001
zajęcie dłoni	29 (100%)	49 (100%)	-
zajęcie stóp	13 (44,8%)	20 (40,8%)	0,81
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	2 (7,1%)	11 (22,4%)	0,12
ABPI_{dex} *	1,14 (1,10 - 1,18)	1,08 (1,00 - 1,13)	1
ABPI_{sin} *	1,14 (1,08 - 1,20)	1,09 (1,05 - 1,14)	0,067
choroby układowe tkanki łącznej	0 (0%)	30 (61,2%)	0,0001
postać uogólniona twardziny układowej	0 (0%)	10 (20,4%)	0,0011
CREST	0 (0%)	3 (6,1%)	0,29
zespół Sjögrena	0 (0%)	4 (8,2%)	0,29
MCTD zespół Sharpa	0 (0%)	8 (16,3%)	0,023
UCTD	0 (0%)	5 (10,2%)	0,15
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa (całość):	12 (41,4%)	33 (67,3%)	0,033
szyjnego	9 (31%)	24 (49%)	0,16
piersiowego	5 (17,2%)	11 (22,4%)	0,77
lędźwiowego	7 (24,1%)	26 (53,1%)	0,018
żebro szyjne	0 (0%)	1 (2%)	1
zmiany zwyrodnieniowe drobnych stawów rąk	4 (13,8%)	12 (24,5%)	0,39
choroba wibracyjna	0 (0%)	6 (12,2%)	0,079
zespół cieśni nadgarstka	0 (0%)	5 (10,2%)	0,15

RP – objaw Raynauda, ABPI – wskaźnik kostka-ramię, CREST – dawna nazwa ograniczonej postaci twardziny stanowiąca akronim objawów ISSc, MCTD – mieszana choroba tkanki łącznej, UCTD – nieodróżnicowana choroba tkanki łącznej, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

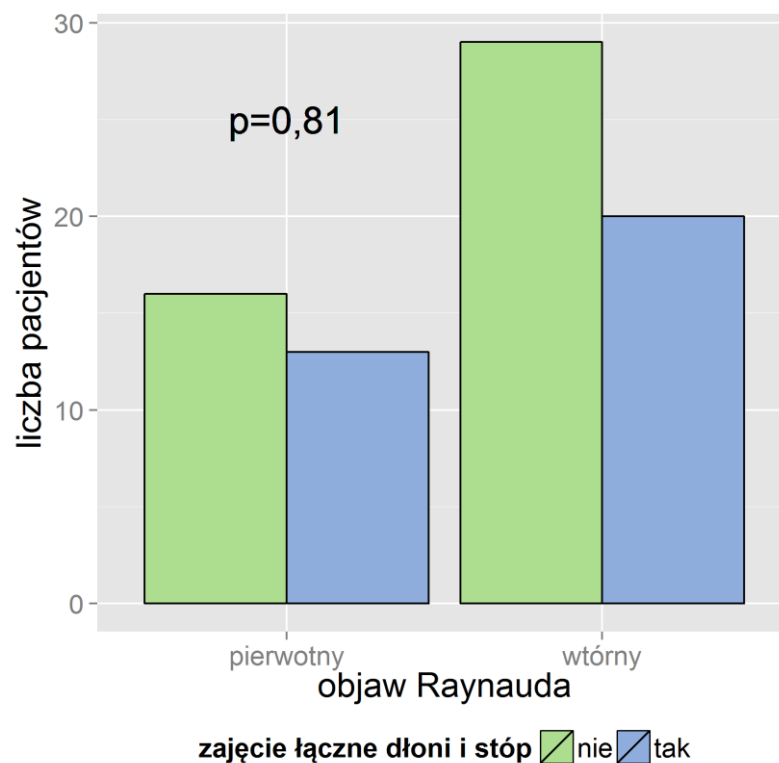
W tabeli V przedstawiono charakterystykę badanych pacjentów względem podziału na pierwotny i wtórny charakter RP. Istotność dotyczyła płci ($p=0,011$), wieku pojawienia się pierwszego epizodu blednięcia palców ($p=0,001$), występowania chorób układowych tkanki łącznej ($p<0,0001$) i zmian zwyrodnieniowych kręgosłupa ($p=0,033$) jako przyczyn wtórnego RP. Wśród chorób zwyrodnieniowych kręgosłupa istotnie częściej w grupie pacjentów z wtórnym RP występowało zwyrodnienie kręgosłupa lędźwiowego ($p=0,018$). Zauważono również tendencję do istotności w aspekcie choroby wibracyjnej, jednak dla potwierdzenia konieczne byłoby zgromadzenie większej liczby obserwacji.



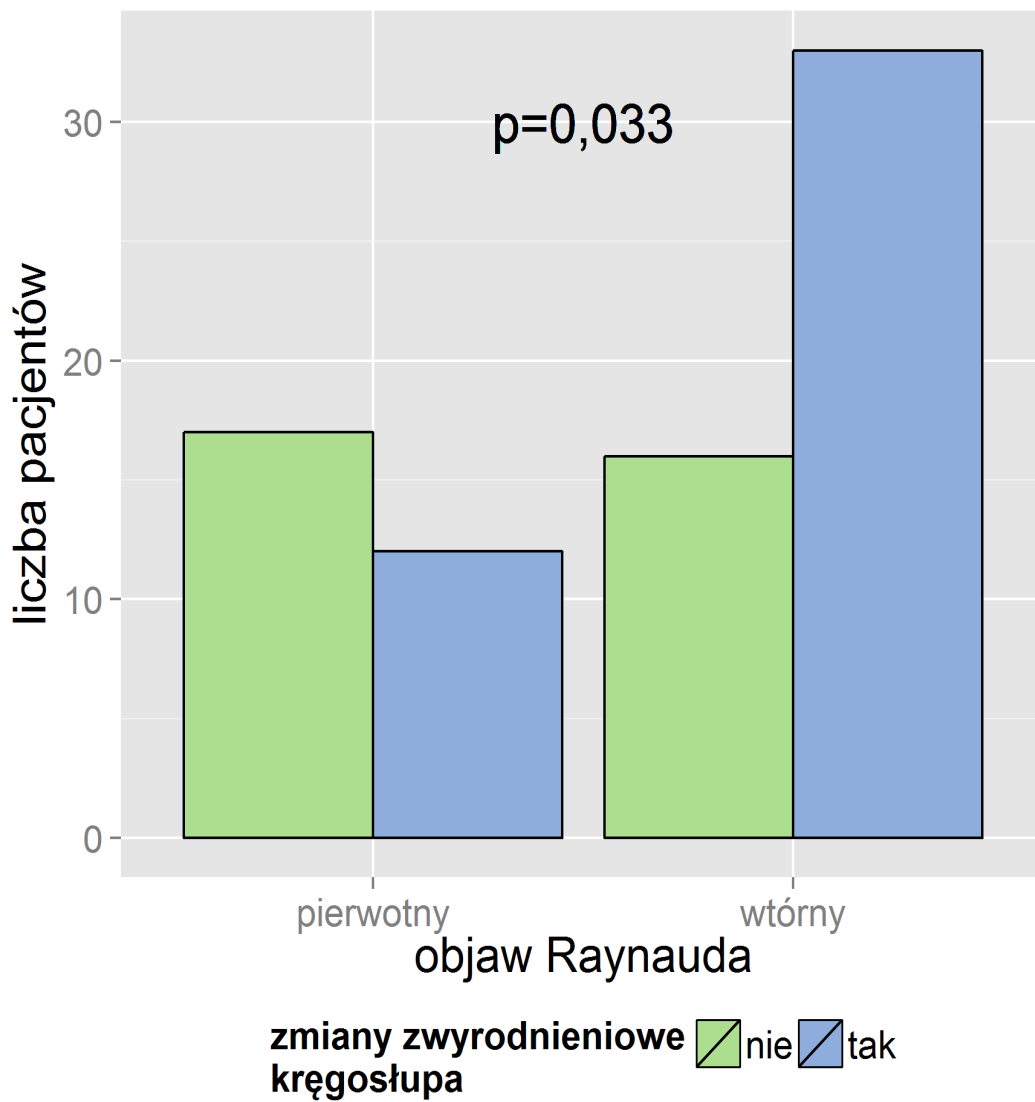
Wykres 5. Zestawienie płci względem charakteru RP. Zarówno pierwotny jak i wtórny RP istotnie częściej występował u kobiet ($p=0,011$).



Wykres 6. Zestawienie wieku pierwszego pojawienia się RP względem jego charakteru. U osób z pierwotnym RP pierwszy epizod blednięcia palców występował istotnie wcześniej niż u pacjentów z wtórnym RP ($p=0,001$).



Wykres 7. Zestawienie charakteru RP względem zajęcia dłoni i stóp. Nie występowała istotna różnica. Wobec zajęcia rąk u wszystkich pacjentów, zajęcie stóp nie było znamienne dla charakteru RP.



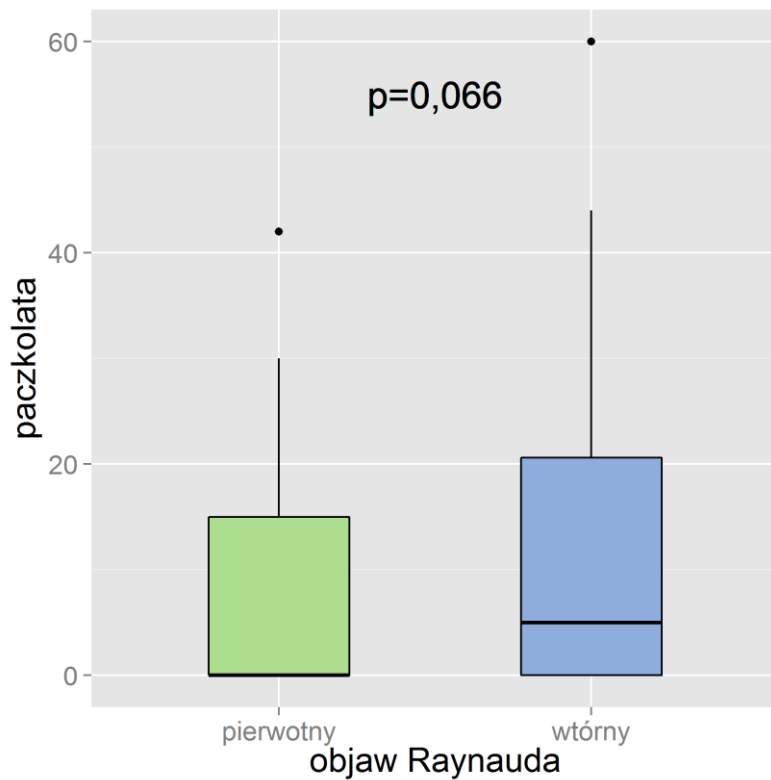
Wykres 8. Występowanie zmian zwyrodnieniowych kręgosłupa względem charakteru RP. W grupie pacjentów z wtórnym RP istotnie częściej występowały zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa niż u pacjentów z pierwotnym RP (p=0,033).

Tabela VI Czynniki ryzyka i choroby towarzyszące u pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na jego pierwotny i wtórny charakter

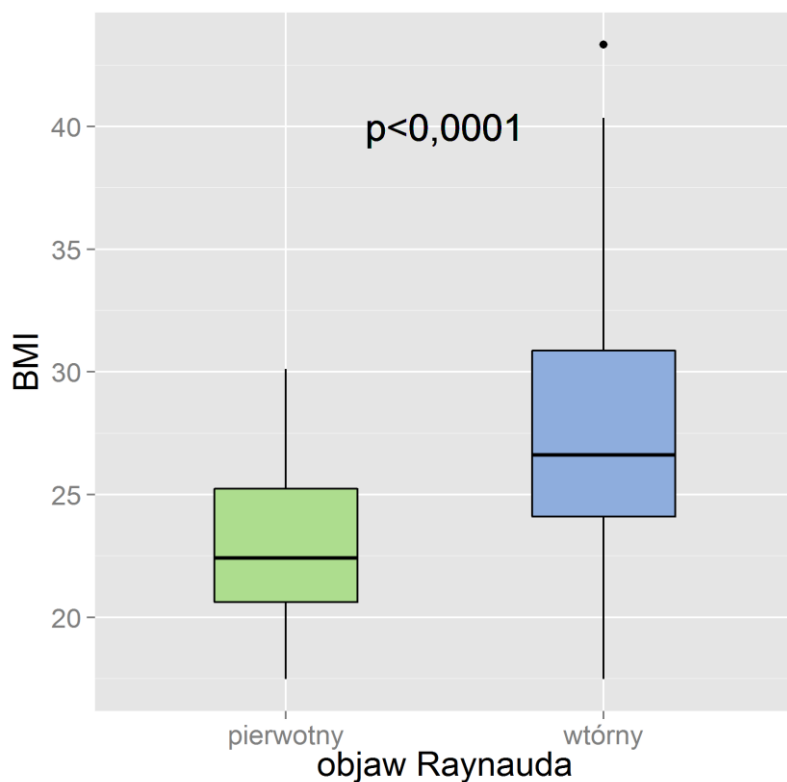
czynniki ryzyka i choroby towarzyszące	pierwotny RP n=29 n (%) * Me (Q1 - Q3)	wtórny RP n=49 n (%) * Me (Q1 - Q3)	p-value
wiek *	58 (37,75 - 62,25)	57 (49,75 - 62,25)	0,55
dyslipidemia	19 (65,5%)	35 (71,4%)	0,69
nadciśnienie tętnicze	9 (31%)	26 (53,1%)	0,065
cukrzyca	6 (20,7%)	21 (42,9%)	0,081
miażdżycy tętnic kończyn dolnych	3 (10,3%)	10 (20,4%)	0,35
choroba niedokrwienności serca plus zawał	5 (17,2%)	10 (20,4%)	1
udar	2 (6,9%)	2 (4,1%)	0,63
palenie dawne	10 (34,5%)	16 (32,7%)	0,057
palenie obecne	3 (10,3%)	16 (32,7%)	
paczkolata *	0 (0 - 15,00)	5,00 (0 - 21,25)	0,0656
jaskra	2 (6,9%)	3 (6,1%)	1
niedoczynność tarczycy	6 (23,1%)	7 (15,9%)	0,53
BMI *	22,41 (20,52 - 25,37)	26,62 (24,05 - 30,86)	0,0001
choroby psychiatryczne	1 (4,2%)	10 (24,4%)	0,043

BMI – wskaźnik masy ciała, Me – mediana, Q – kwartyl, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

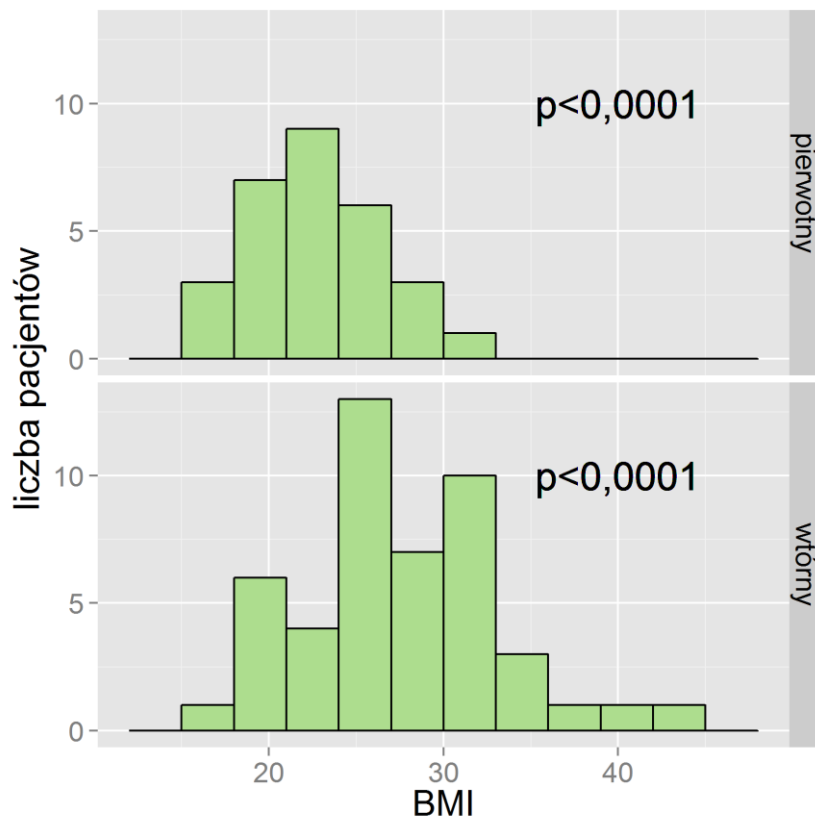
Tabela VI przedstawia czynniki ryzyka i choroby towarzyszące w aspekcie podziału na pierwotny i wtórny charakter RP. Najwyraźniej zarysowuje się istotna różnica w BMI ($p < 0,0001$). Wśród pacjentów z wtórnym RP istotnie częściej wartość BMI wskazywała na nadwagę i otyłość. Poza tym, mimo braku istotności, można zaobserwować tendencję do częstszego występowania nadciśnienia tętniczego i nikotynizmu wyrażonego w paczkolatach u pacjentów z wtórnym RP. Istotność pojawia się w kontekście chorób psychiatrycznych ($p = 0,043$), które istotnie częściej dotykały pacjentów z wtórnym RP.



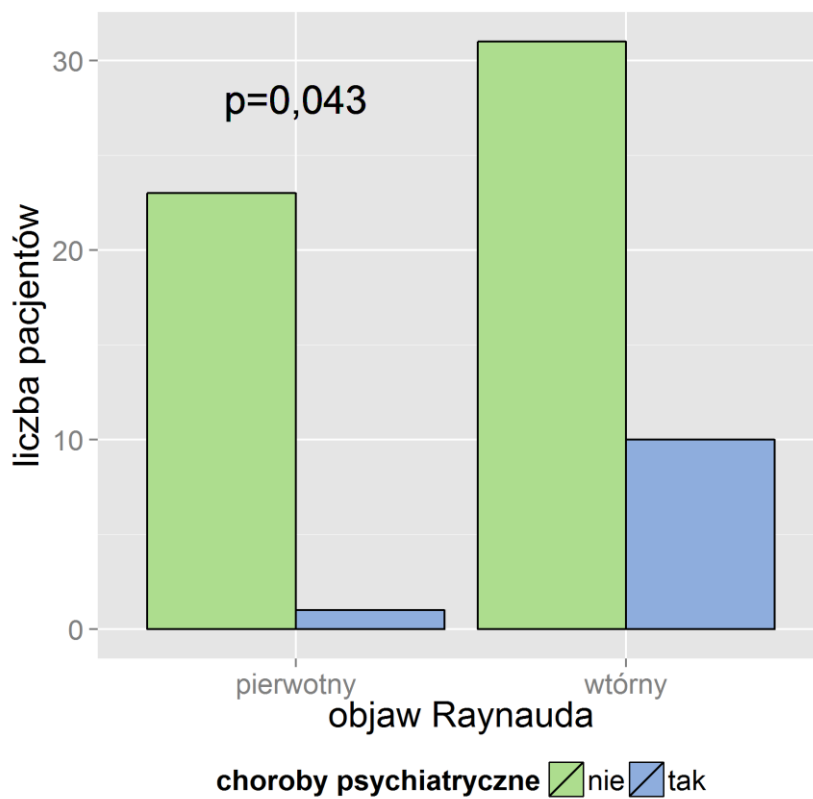
Wykres 9. Przedstawienie trendu bliskiego istotności zależności nikotynizmu wyrażonego w paczkiolatach od charakteru RP. Pacjenci z wtórnym RP częściej palili papierosy.



Wykres 10. Przedstawienie istotnej statystycznie zależności BMI od charakteru RP. Pacjenci z pierwotnym RP istotnie rzadziej przekraczali górną granicę normy BMI ($p < 0,0001$).



Wykres 11. Porównanie rozkładu wartości BMI u pacjentów z pierwotnym i wtórnym RP.



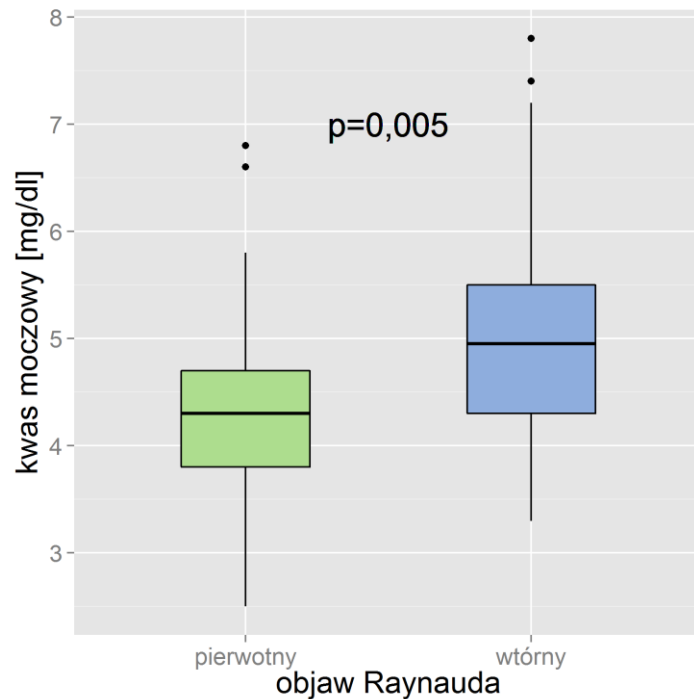
Wykres 12. Przedstawienie istotnej różnicy między charakterem RP a występowaniem chorób psychiatrycznych. Istotnie rzadziej zapadali na nie pacjenci z pierwotnym RP ($p = 0,043$).

Tabela VII Standardowe badania laboratoryjne oraz badania na obecność autoprzeciwciał u pacjentów z RP z uwzględnieniem podziału na jego pierwotny i wtórny charakter

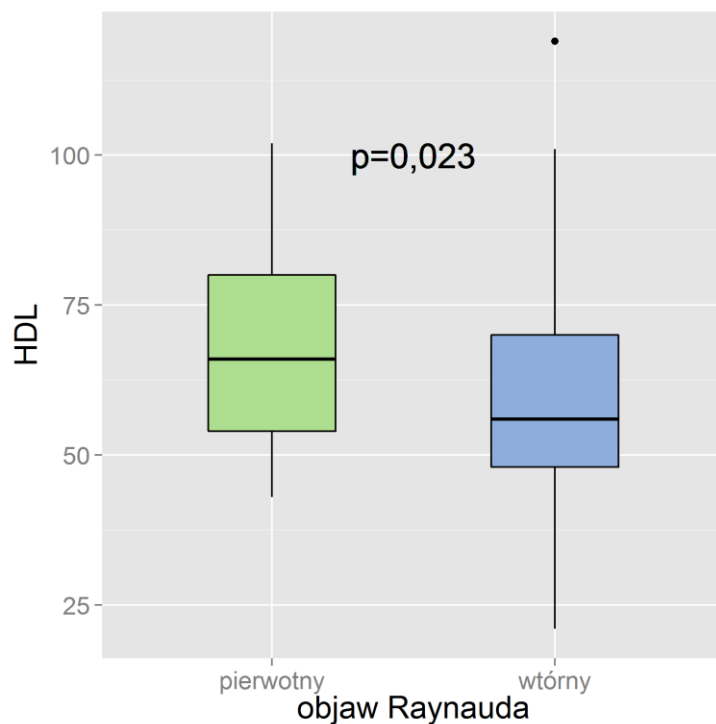
badania standardowe	pierwotny RP n=29 Me (Q1 - Q3)	wtórny RP n=49 Me (Q1 - Q3)	p-value
OB	17 (7 - 25)	14 (8 - 20)	0,54
WBC	5,67 (4,35 - 6,65)	5,46 (4,38 - 6,77)	0,98
RBC	4,50 (4,31 - 4,66)	4,54 (4,31 - 4,73)	0,41
HGB	13,4 (13,0 - 13,9)	13,4 (12,8 - 14,4)	0,39
HCT	40,3 (38,9 - 41,0)	41,0 (39,0 - 43,0)	0,072
PLT	253 (191 - 273)	217 (183 - 259)	0,18
glukoza	93 (86 - 100)	41 (39 - 43)	0,1
kreatynina	0,77 (0,72 - 0,82)	0,77 (0,71 - 0,84)	0,48
kwasic moczowy	4,3 (3,7 - 4,7)	4,9 (4,3 - 5,6)	0,005
sód	140 (139 - 141)	140 (139 - 141)	0,6
potas	4,2 (4,0 - 4,4)	4,3 (4,1 - 4,5)	0,063
chlorki	105 (104 - 107)	106 (104 - 107)	0,55
cholesterol całkowity	206 (176 - 236)	185 (164 - 220)	0,15
HDL	66 (54 - 80)	56 (48 - 70)	0,023
TG	91 (62 - 102)	83 (74 - 110)	0,68
LDL	115 (105 - 134)	107 (88 - 145)	0,54
AspAT	21 (17 - 25)	21 (18 - 27)	0,63
AIAT	17 (14 - 22)	21 (15 - 30)	0,19
ALP	59 (45 - 78)	68 (55 - 86)	0,085
TSH	1,29 (1,06 - 1,77)	1,32 (0,87 - 1,91)	0,79
RF	1 (3,4%)	7 (14,3%)	0,25
autoprzeciwciała			
ANA	0 (0%)	39 (79,6%)	0,0001
p-ANCA	3 (10,3%)	2 (4,2%)	0,36
c-ANCA	3 (10,3%)	4 (8,3%)	1

OB – odczyn Biernackiego, WBC – białe krwinki, RBC – czerwone krwinki, HGB – hemoglobina, HCT – hematokryt, PLT – płytki krwi, HDL – lipoproteina wysokiej gęstości, TG – triglicerydy, LDL – lipoproteina niskiej gęstości, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, AIAT – aminotransferaza alaninowa, ALP – fosfataza alkaliczna, TSH – tyreotropina, RF – czynnik reumatoidalny, ANA – przeciwciała przeciwjądrowe, p-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ okołojądrowy, c-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ cytoplazmatyczny, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

Z tabeli VII wynika, że u pacjentów z wtórnym RP występowało istotnie wyższe stężenie kwasu moczowego ($p=0,005$) oraz istotnie niższe stężenie HDL ($p=0,023$). Istotnie wyższe miano ANA ($p<0,0001$) wynikało ze specyfiki podziału na pierwotny i wtórny RP, gdyż dodatnie stężenie ANA wskazuje na występowanie CTD, która jest najczęstszą przyczyną wtórnego RP.



Wykres 13. Istotnie wyższe stężenie kwasu moczowego ($p=0,005$) u pacjentów z wtórnym RP.



Wykres 14. Istotnie niższe stężenie HDL ($p=0,023$) u pacjentów z wtórnym RP.

Tabela VIII Porównanie czynników hemostazy oraz czynników zapalenia u pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na jego pierwotny i wtórny charakter przed przeprowadzeniem próby oziębienia

czynniki krzepnięcia	pierwotny RP n=29 Me (Q1 - Q3)	wtórny RP n=49 Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	263,9 (222,8 – 377,0)	240,2 (213,0 - 299,8)	0,26
TFPI	32,00 (19,12 - 38,17)	32,10 (24,60 - 43,26)	0,33
vWF	1358,8 (855,0 - 1661,5)	1708 (1270,1 – 2158,0)	0,002
TM	2,90 (1,55 - 3,49)	3,05 (2,23 - 3,95)	0,37
TAT	3,48 (2,29 - 4,89)	2,76 (2,27 - 3,99)	0,34
czynniki fibrynolizy			
t-PA	3,90 (2,85 - 5,90)	7,55 (5,44 - 9,72)	0,0001
PAI-1	20,31 (16,09 - 29,71)	31,90 (21,67 - 41,80)	0,002
d-dimery	298 (201 - 437)	293 (199 - 568)	0,86
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,3 (2,9 - 3,6)	3,4 (3,0 - 3,8)	0,38
CRP	1,35 (0,43 - 3,81)	1,55 (0,87 - 3,04)	0,37
IL-6	1,021 (0,500 - 1,960)	2,065 (0,810 - 3,130)	0,036
IL-10	5,168 (1,000 - 6,160)	6,584 (1,050 - 8,380)	0,019
TGF-β1	8206,56 (6087,42 - 9531,19)	7851,57 (6511,96 - 10429,02)	0,64
bFGF >1	3 (10,3%)	1 (2%1)	0,14

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

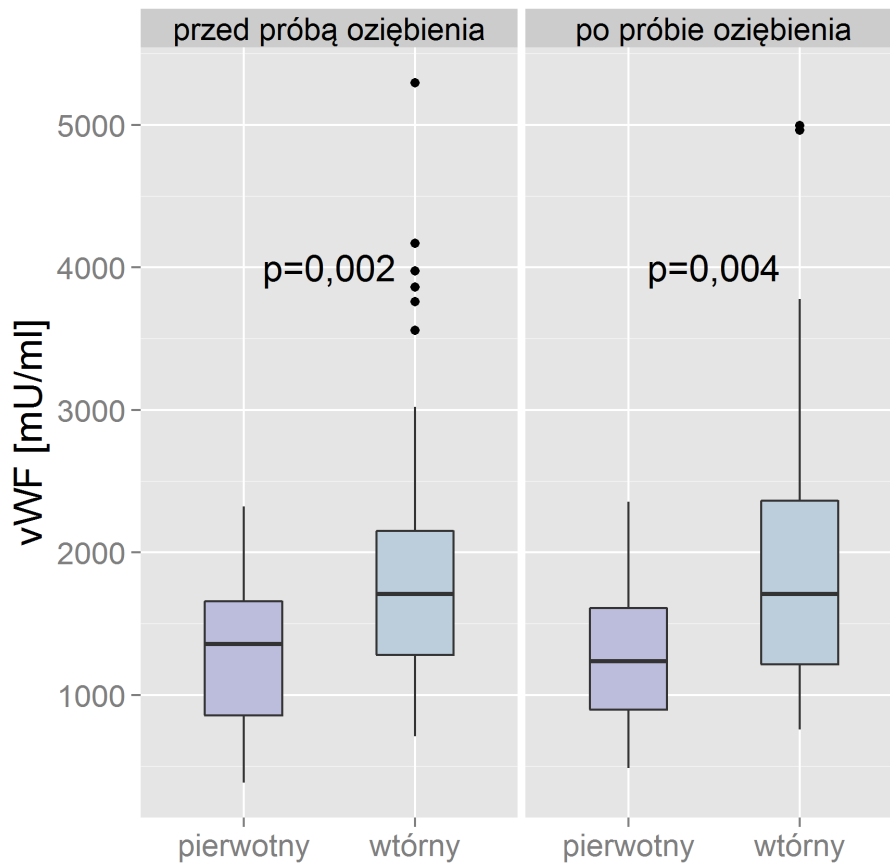
W tabeli VIII zestawiono wyniki pomiaru stężenia czynników hemostazy i zapalenia przed przeprowadzeniem próby oziębienia i dokonano podziału na pacjentów z pierwotnym i wtórnym RP. W grupie pacjentów z wtórnym RP istotnie wyższe stężenie prezentował vWF ($p=0,002$), t-PA ($p<0,0001$) i PAI-1 ($p=0,002$), a wśród czynników zapalenia IL-6 ($p=0,036$) i IL-10 ($p=0,019$) również osiągały istotnie wyższe stężenie w tej grupie pacjentów. Zwraca uwagę brak istotnej różnicy w stężeniu CRP ($p=0,37$) między pacjentami z pierwotnym i wtórnym RP.

Tabela IX Porównanie czynników hemostazy oraz czynników zapalenia u pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na jego pierwotny i wtórny charakter po przeprowadzeniu próby oziębienia

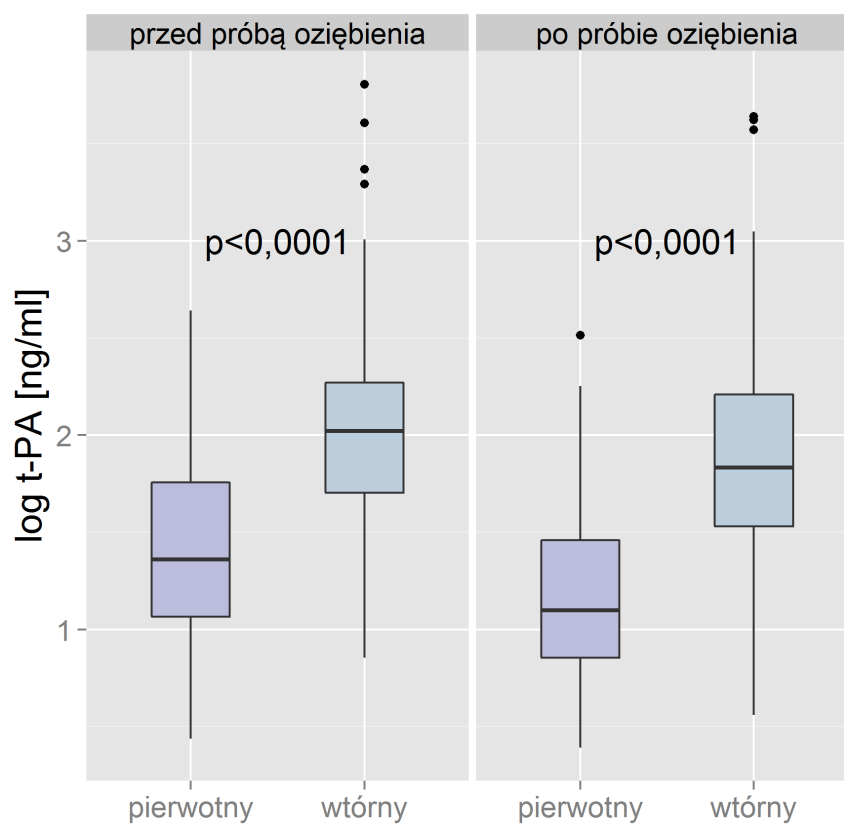
czynniki krzepnięcia	pierwotny RP n=29 Me (Q1 - Q3)	wtórny RP n=49 Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	243,0 (219,2 – 316,0)	260,0 (217,8 - 329,6)	0,55
TFPI	33,05 (21,30 - 39,85)	31,04 (24,78 - 43,29)	0,75
vWF	1237,9 (885,5 - 1692,3)	1709,0 (1215,6 - 2374,0)	0,004
TM	2,90 (1,50 - 3,51)	3,18 (2,50 - 3,89)	0,23
TAT	2,62 (2,04 - 3,79)	3,28 (2,31 - 5,87)	0,25
czynniki fibrynolizy			
t-PA	3,00 (2,33 - 4,30)	6,25 (4,62 - 9,20)	0,0001
PAI-1	16,72 (11,02 - 25,19)	27,36 (16,33 - 34,49)	0,0001
d-dimery	242 (173 - 503)	241 (170 - 469)	0,72
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,2 (2,9 - 3,5)	3,4 (3,0 - 3,8)	0,15
CRP	1,25 (0,40 - 2,59)	1,43 (0,64 - 3,04)	0,42
IL-6	1,200 (0,500 - 2,330)	1,777 (0,770 - 2,880)	0,27
IL-10	5,422 (1,000 - 6,56)	6,308 (2,200 - 8,180)	0,019
TGF-β1	8793,21 (6943,26 - 10361,21)	7145,46 (4669,81 - 10338,12)	0,22
bFGF >1	2 (6,9%)	4 (8,2%)	1

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartyl, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

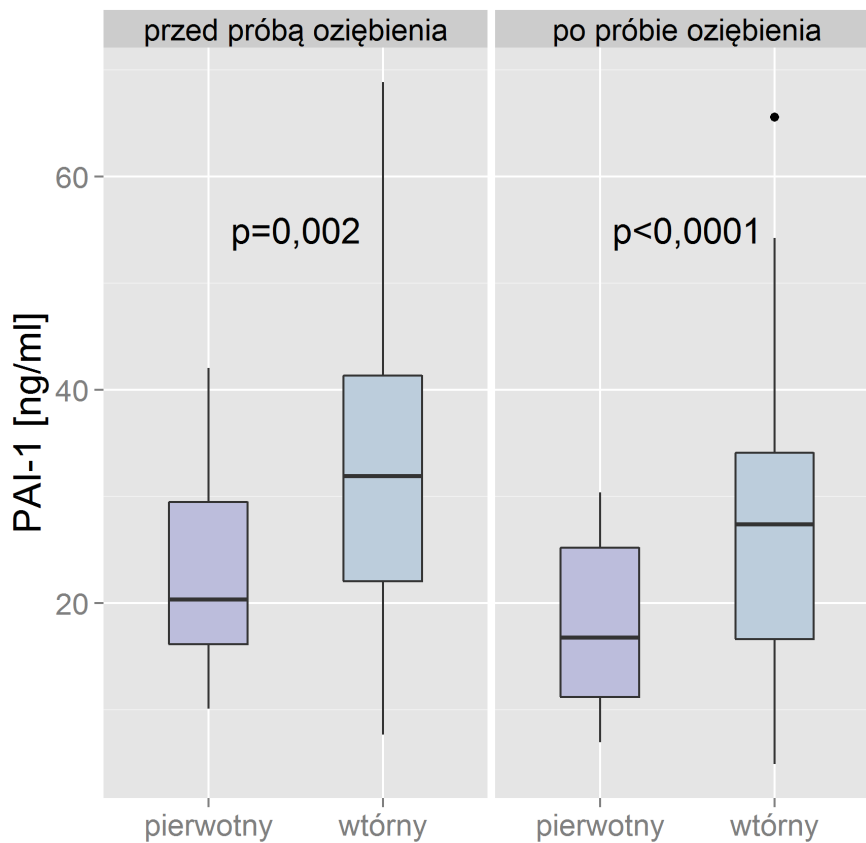
W tabeli IX zestawiono wyniki pomiaru stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia z materiału pobranego do kilkunastu minut po przeprowadzeniu próby oziębienia i dokonano podziału na pacjentów z pierwotnym i wtórnym RP. W grupie pacjentów z wtórnym RP wśród czynników krzepnięcia istotnie wyższe stężenie prezentował vWF (p=0,004), wśród czynników fibrynolizy istotnie wyższe stężenie osiągały, podobnie jak przed oziębieniem, t-PA (p<0,0001) i PAI-1 (p<0,001), a wśród czynników zapalenia istotnie wyższe pozostało stężenie IL-10 (p=0,019).



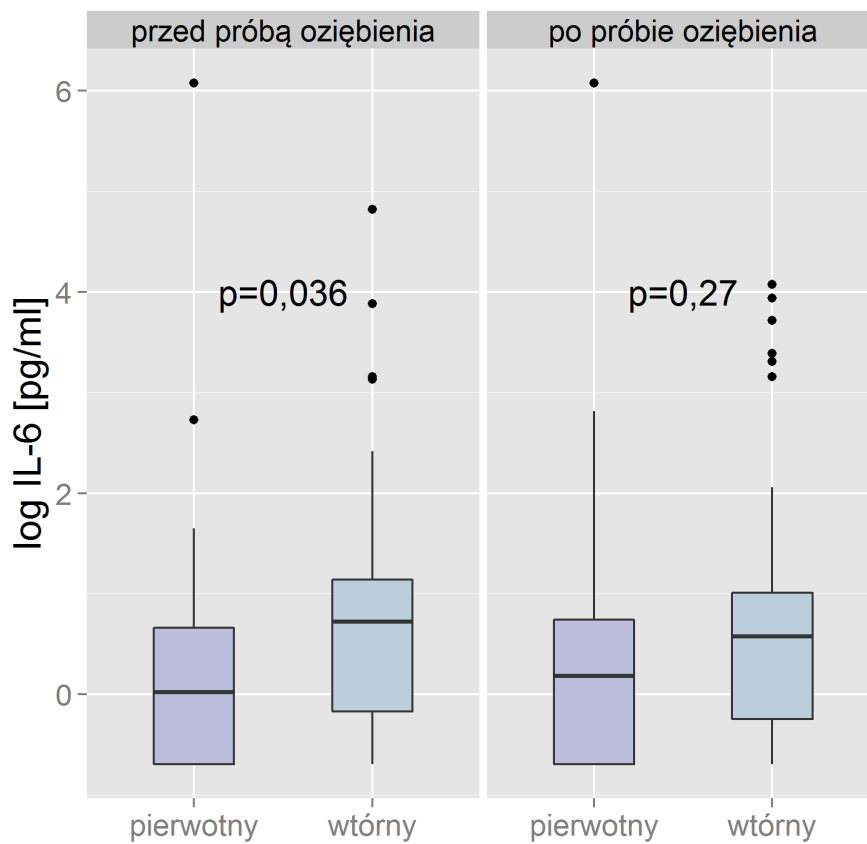
Wykres 15. Istotnie wyższe stężenie czynnika krzepnięcia vWF u pacjentów z wtórnym RP zarówno przed ($p=0,002$) jak i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,004$).



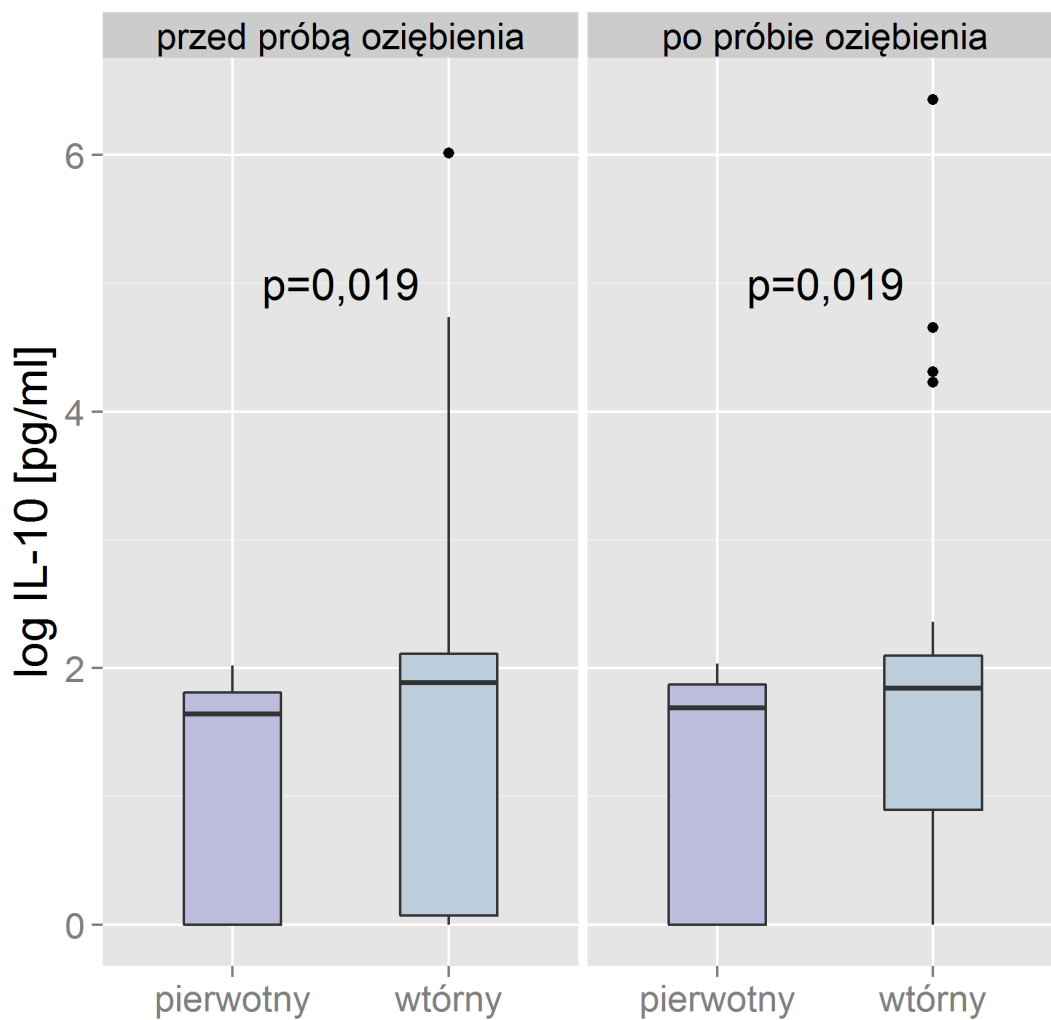
Wykres 16. Istotnie wyższe zlogarytmizowane stężenie czynnika fibrylizacji t-PA u pacjentów z wtórnym RP zarówno przed ($p<0,0001$) jak i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p<0,0001$).



Wykres 17. Istotnie wyższe stężenie czynnika fibrynolizy PAI-1 u pacjentów z wtórnym RP zarówno przed ($p=0,002$) jak i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p<0,0001$).



Wykres 18. Istotnie wyższe zlogarytmizowane stężenie IL-6 przed przeprowadzeniem próby oziębienia ($p=0,036$) i brak istotnej różnicy po jej przeprowadzeniu ($p=0,27$).



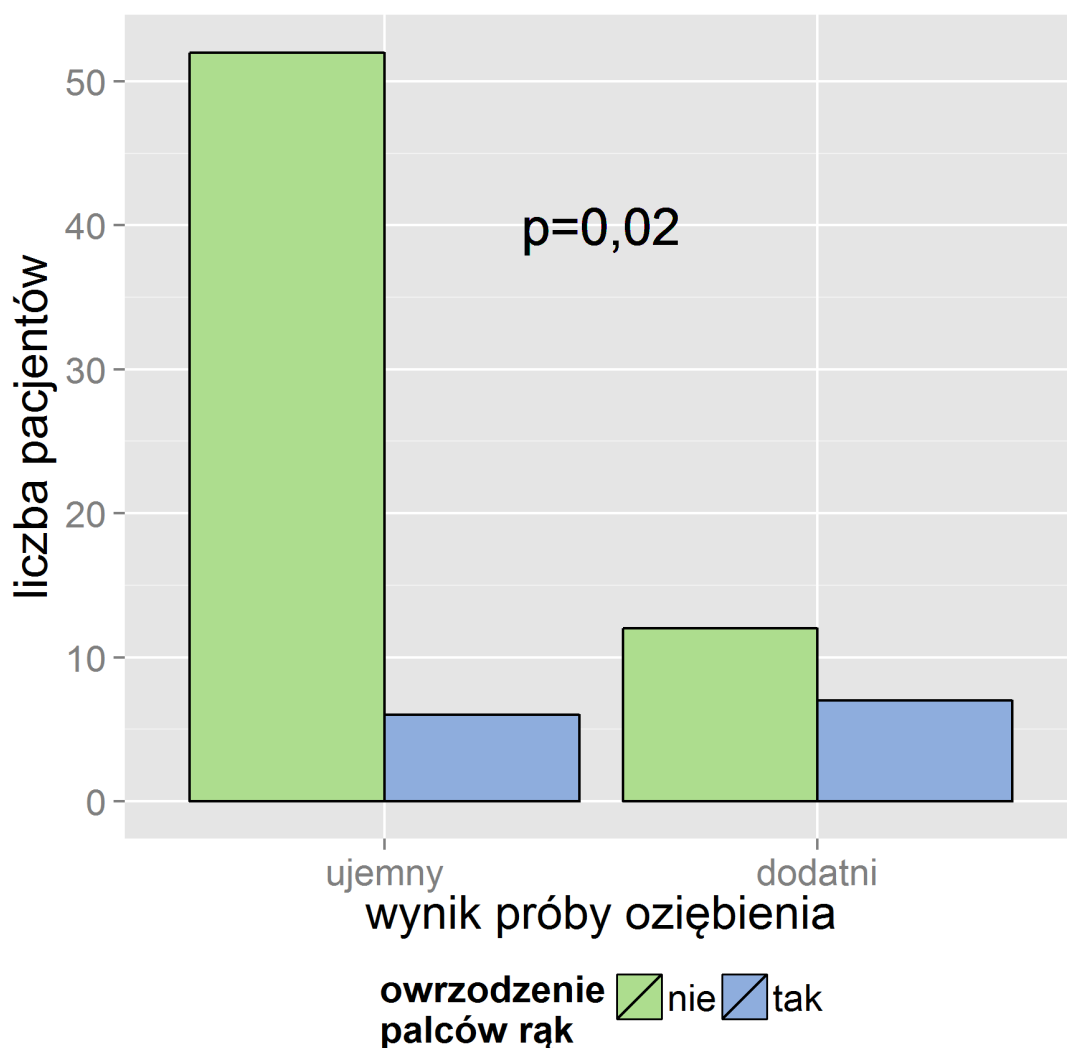
Wykres 19. Istotnie wyższe zlogarytmizowane stężenie czynnika zapalenia IL-10 u pacjentów z wtórnym RP zarówno przed ($p=0,019$) jak i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,019$).

Tabela X Charakterystyka ogólna badanej grupy pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na ujemny i dodatni wynik próby oziębienia

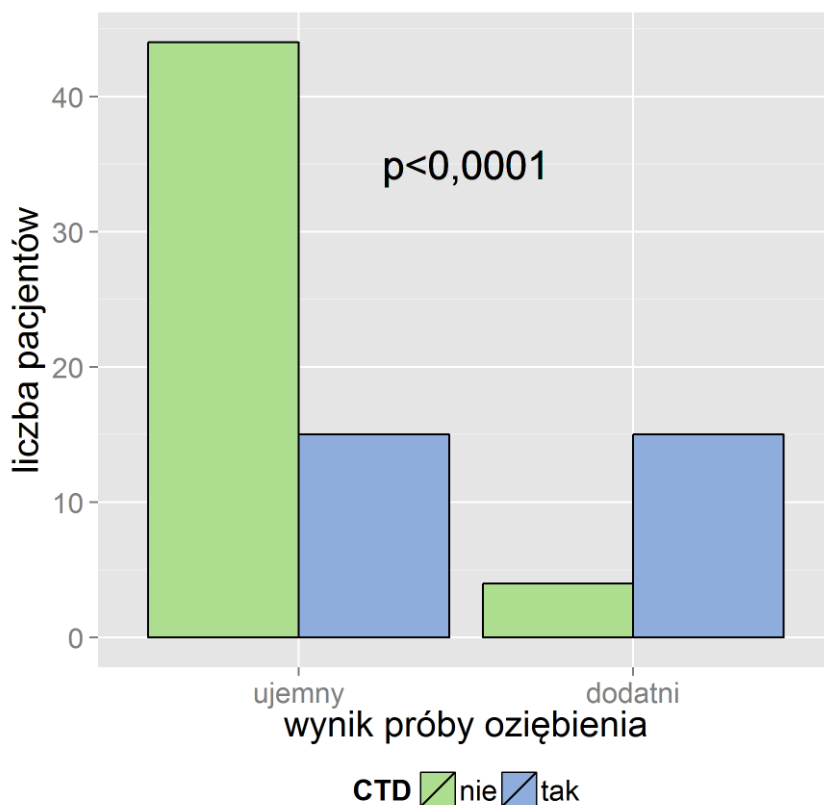
dane kliniczne	ujemny wynik próby n=59 * Me (Q1 - Q3)	dodatni wynik próby n=19 * Me (Q1 - Q3)	p-value
płeć kobiety	53 (89,8%)	15 (78,9%)	0,25
mężczyźni	6 (10,2%)	4 (21,1%)	
wiek *	57 (46,25 – 62,00)	57 (48,75 - 62,75)	0,71
wiek pojawienia się RP *	35 (21,00 – 40,00)	39 (30,00 - 45,75)	0,071
zajęcie dłoni	59 (100%)	19 (100%)	-
zajęcie stóp	22 (37,3%)	11 (57,9%)	0,19
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	6 (10,3%)	7 (36,8%)	0,02
ABPI_{dex} *	1,10 (1,05 - 1,16)	1,09 (1,00 - 1,14)	0,51
ABPI_{sin} *	1,13 (1,06 - 1,19)	1,09 (1,05 - 1,14)	0,17
choroby układowe tkanki łącznej	15 (25,4%)	15 (78,9%)	0,0001
postać uogólniona twardziny układowej	2 (3,4%)	8 (42,1%)	0,0001
CREST	2 (3,4%)	1 (5,3%)	1
zespół Sjögrena	2 (3,4%)	2 (10,5%)	0,25
MCTD zespół Sharpa	5 (8,5%)	3 (15,8%)	0,39
UCTD	4 (6,8%)	1 (5,3%)	1
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa (całość):	37 (62,7%)	8 (42,1%)	0,18
szyjnego	29 (49,2%)	4 (21,1%)	0,036
piersiowego	13 (22%)	3 (15,8%)	0,75
lędźwiowego	27 (45,8%)	6 (31,6%)	0,3
żebro szyjne	1 (1,7%)	0 (0%)	1
zmiany zwyrodnieniowe drobnych stawów rąk	10 (16,9%)	6 (31,6%)	0,2
choroba wibracyjna	6 (10,2%)	0 (0%)	0,33
zespół cieśni nadgarstka	5 (8,5%)	0 (0%)	0,33

RP – objaw Raynauda, ABPI – wskaźnik kostka-ramię, CREST – dawna nazwa ograniczonej postaci twardziny stanowiąca akronim objawów ISSc, MCTD – mieszana choroba tkanki łącznej, UCTD – niezróżnicowana choroba tkanki łącznej, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

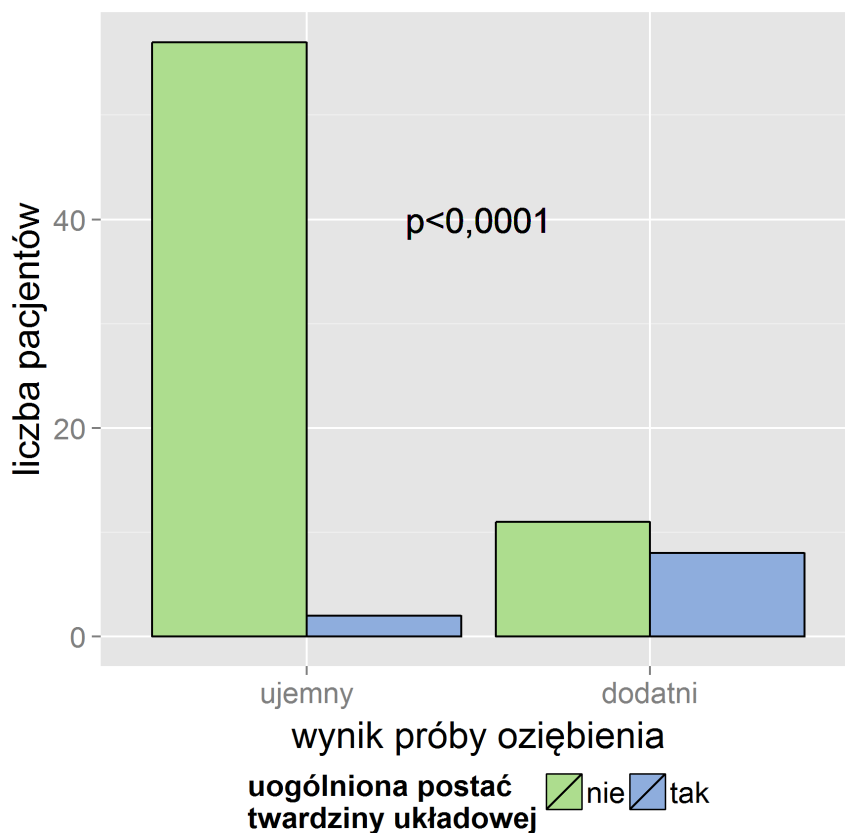
Powyższa tabela zawiera cechy charakterystyczne pacjentów włączonych do badania, biorąc pod uwagę wynik próby oziębienia. Wynika z niej, że istotnie częściej wynik próby był dodatni, gdy w wywiadzie pacjent zgłaszał występowanie owrzodzeń skóry na zajętych objawem palcach ($p=0,02$). Również cierpiący na CTD ($p<0,0001$), a szczególnie na postać uogólnioną twardziny układowej ($p<0,0001$) istotnie częściej mieli dodatni wynik próby oziębienia. Istotnie rzadziej udawało się wywołać objaw u dotkniętych zwyrodnieniem odcinka szyjnego kręgosłupa ($p=0,036$). Nie zaobserwowano istotnych różnic w zakresie wieku pojawienia się pierwszego napadu RP.



Wykres 20. Istotnie częstsze występowanie dodatniego wyniku próby oziębienia u pacjentów zgłaszających w wywiadzie występowanie owrzodzenia zajętych RP palców rąk ($p=0,02$).



Wykres 21. Istotnie częstsze występowanie dodatniego wyniku próby osiędzenia u pacjentów z chorobami układowymi tkanki łącznej ($p < 0,0001$).



Wykres 22. Istotnie częstsze występowanie dodatniego wyniku próby osiędzenia u pacjentów z uogólnioną postacią twardziny układowej ($p < 0,0001$).

Tabela XI Czynniki ryzyka i choroby towarzyszące u pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na ujemny i dodatni wynik próby oziębienia

czynniki ryzyka i choroby towarzyszące	ujemny wynik próby n=59 * Me (Q1 - Q3)	dodatni wynik próby n=19 * Me (Q1 - Q3)	p-value
wiek *	57 (46,25 – 62,00)	57 (48,75 - 62,75)	0,71
dyslipidemia	42 (71,2%)	12 (63,2%)	0,71
nadciśnienie tętnicze	27 (45,8%)	8 (42,1%)	0,99
cukrzyca	20 (33,9%)	7 (36,8%)	0,97
miażdżycy tętnic kończyn dolnych	10 (16,9%)	3 (15,8%)	1
choroba niedokrwienności serca plus zawał	12 (20,3%)	3 (15,8%)	0,75
udar	3 (5,1%)	1 (5,3%)	1
palenie dawne	21 (35,6%)	5 (26,3%)	0,63
palenie obecne	13 (22%)	6 (31,6%)	
paczkolata *	2,50 (0,00 - 18,75)	3,5 (0,00 - 28,50)	0,64
jaskra	5 (8,5%)	0 (0%)	0,33
niedoczynność tarczycy	11 (20,4%)	2 (12,5%)	0,72
BMI *	25,84 (21,14 - 29,69)	24,68 (22 - 26,48)	0,38
choroby psychiatryczne	7 (14,3%)	4 (25%)	0,44

BMI – wskaźnik masy ciała, Me – mediana, Q – kwartyl, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

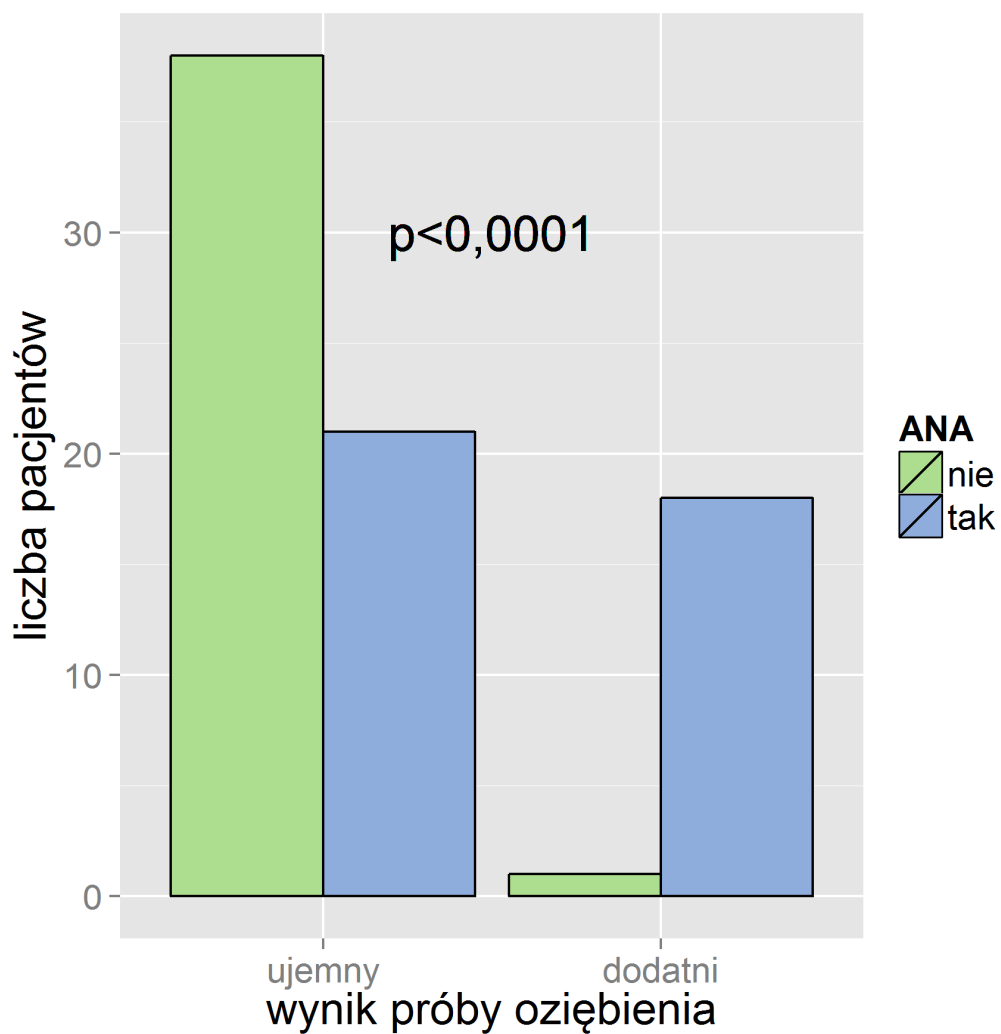
Tabela XI przedstawia czynniki ryzyka i choroby towarzyszące występujące u pacjentów z RP, uwzględniając podział na wynik próby oziębienia. Nie znaleziono żadnych istotnych różnic między grupą, w której wynik próby był ujemny a grupą, w której udało się wywołać RP.

W tabeli XII zawierającej standardowe wyniki laboratoryjne oraz badania na obecność ANA, p-ANCA, c-ANCA u pacjentów z RP w zależności od wyniku próby oziębienia jest widoczna istotna różnica między stężeniem sodu ($p=0,024$) z istotnie wyższym stężeniem u pacjentów, u których wynik próby był dodatni. W tej samej grupie istotnie częściej występowało dodatnie miano ANA ($p<0,0001$).

Tabela XII Standardowe badania laboratoryjne oraz badania na obecność autoprzeciwciał u pacjentów z RP z uwzględnieniem podziału na ujemny i dodatni wynik próby oziębienia

badania standardowe	ujemny wynik próby n=59 Me (Q1 - Q3)	dodatni wynik próby n=19 Me (Q1 - Q3)	p-value
OB	15 (7 - 22)	14 (8 - 20)	0,78
WBC	5,63 (4,39 - 6,61)	5,39 (4,35 - 6,77)	0,88
RBC	4,51 (4,33 - 4,70)	4,48 (4,21 - 4,77)	0,63
HGB	13,4 (13,0 - 14,0)	14 (12,7 - 14,4)	0,55
HCT	40,6 (39,0 - 41,1)	41,8 (38,4 - 43,5)	0,45
PLT	228 (187 - 270)	217 (187 - 286)	0,94
glukoza	95 (87 - 104)	95 (89 - 107)	0,81
kreatynina	0,77 (0,72 - 0,83)	0,77 (0,71 - 0,85)	0,94
kwas moczowy	4,5 (4 - 5,3)	5 (4,3 - 5,4)	0,37
sód	140 (139 - 141)	141 (140 - 142)	0,024
potas	4,3 (4,1 - 4,5)	4,1 (3,9 - 4,5)	0,51
chlorki	105 (104 - 107)	106 (103 - 107)	0,99
cholesterol całkowity	197 (173 - 234)	184 (155 - 205)	0,15
HDL	58 (50 - 74)	59 (42 - 73)	0,27
TG	89 (72 - 111)	83 (62 - 101)	0,36
LDL	114 (94 - 143)	102 (87 - 140)	0,39
AspAT	21 (18 - 25)	23 (17 - 29)	0,42
AIAT	20 (15 - 25)	22 (14 - 32)	0,74
ALP	68 (50 - 81)	61 (47 - 76)	0,32
TSH	1,30 (0,88 - 1,84)	1,38 (0,99 - 1,79)	0,42
RF	5 (8,5%)	3 (15,8%)	0,63
autoprzeciwciała			
ANA	21 (35,6%)	18 (94,7%)	0,0001
p-ANCA	4 (6,8%)	1 (5,6%)	1
c-ANCA	4 (6,8%)	3 (16,7%)	0,34

OB – odczyn Biernackiego, WBC – białe krwinki, RBC – czerwone krwinki, HGB – hemoglobina, HCT – hematokryt, PLT – płytki krwi, HDL – lipoproteina wysokiej gęstości, TG – triglicerydy, LDL – lipoproteina niskiej gęstości, AspAT – aminotransferaza asparaginianowa, AIAT – aminotransferaza alaninowa, ALP – fosfataza alkaliczna, TSH – tyreotropina, RF – czynnik reumatoidalny, ANA – przeciwciała przeciwjądrowe, p-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ okołojądrowy, c-ANCA – przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ cytoplazmatyczny, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.



Wykres 23. Istotnie częstsze występowanie dodatniego wyniku próby oziębienia u pacjentów z dodatnim mianem ANA ($p < 0,0001$).

Tabela XIII Porównanie czynników hemostazy oraz czynników zapalenia u pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na ujemny i dodatni wynik próby oziębienia przed jej przeprowadzeniem

czynniki krzepnięcia	ujemny wynik próby n=59 Me (Q1 - Q3)	dodatni wynik próby n=19 Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	248,4 (214,4 - 331,3)	250,5 (228,7 - 294,8)	0,83
TFPI	32,50 (22,30 - 41,78)	31,82 (24,43 - 53,62)	0,99
vWF	1618,9 (1067,9 - 1927,5)	1375,1 (1153,8 - 1793,5)	0,88
TM	3,00 (2,22 - 3,79)	2,25 (1,50 - 3,50)	0,25
TAT	3,41 (2,31 - 4,85)	2,42 (1,91 - 3,60)	0,046
czynniki fibrynolizy			
t-PA	5,76 (3,37 - 8,35)	7,75 (5,00 - 9,63)	0,16
PAI-1	27,79 (17,97 - 39,33)	25,175 (18,71 - 32,75)	0,44
d-dimery	304 (206 - 563)	291 (199 - 474)	0,58
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,3 (3,1 - 3,7)	3,4 (2,8 - 3,8)	0,82
CRP	1,52 (0,65 - 3,76)	1,45 (0,63 - 2,67)	0,68
IL-6	1,601 (0,750 - 3,050)	1,645 (0,500 - 3,083)	0,51
IL-10	5,126 (1,000 - 6,720)	6,935 (6,132 - 8,699)	0,002
TGF-β1	8288,43 (6370,91 - 10804,15)	7909,91 (6797,36 - 8615,34)	0,82
bFGF >1	3 (5,1%)	1 (5,3%)	1

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

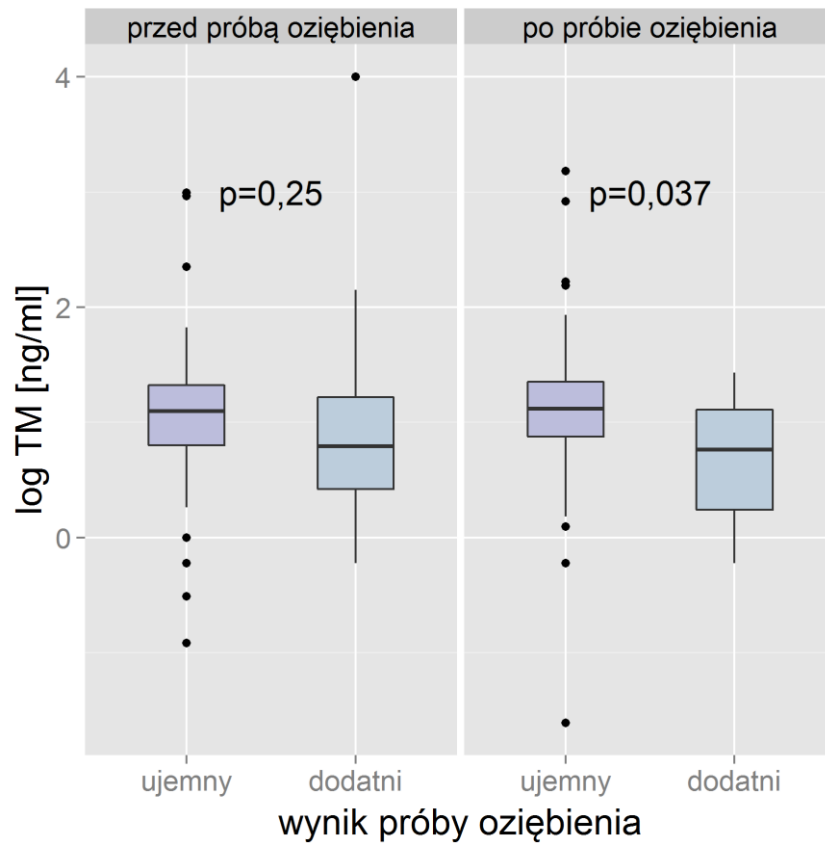
W tabeli XIII zestawiono wyniki pomiaru stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia z materiału pobranego przed przeprowadzeniem próby oziębienia i dokonano podziału na pacjentów, u których wynik próby oziębienia był dodatni albo ujemny. W grupie pacjentów z pozytywnym wynikiem próby oziębienia wśród czynników krzepnięcia istotnie niższe stężenie prezentuje TAT (p=0,046), a wśród czynników zapalenia istotnie wyższe stężenie dotyczyło IL-10 (p=0,002).

Tabela XIV Porównanie czynników hemostazy oraz czynników zapalenia u pacjentów z objawem Raynauda z uwzględnieniem podziału na ujemny i dodatni wynik próby oziębienia po jej przeprowadzeniu

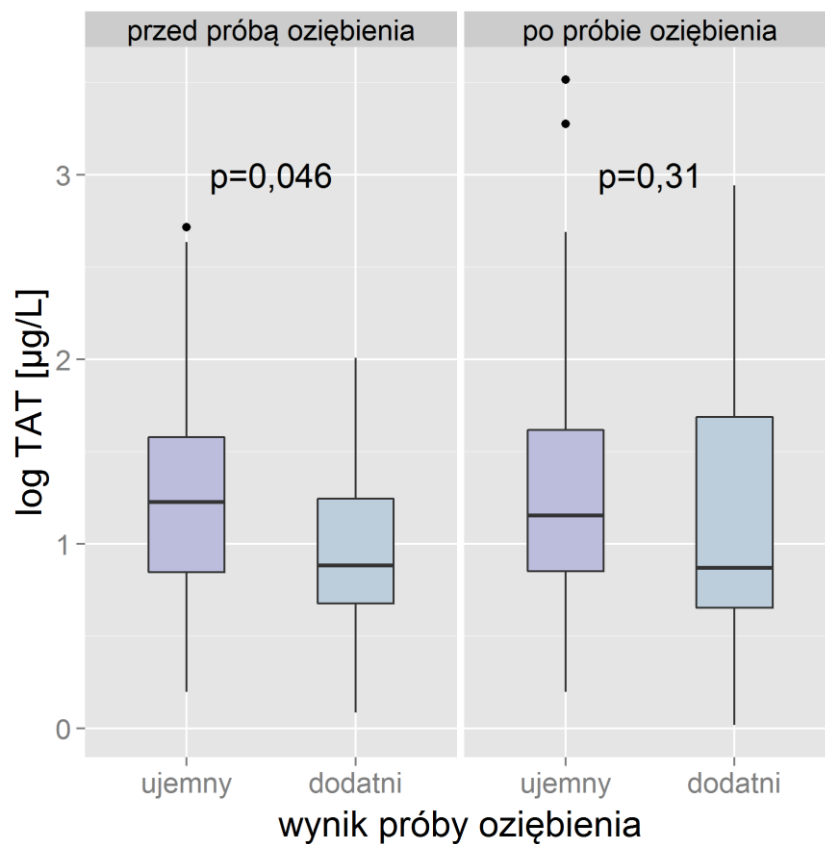
czynniki krzepnięcia	ujemny wynik próby n=59 Me (Q1 - Q3)	dodatni wynik próby n=19 Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	245,0 (219,1 – 314,0)	288,8 (224,6 - 342,6)	0,27
TFPI	32,93 (24,15 - 41,65)	31,04 (22,53 - 45,38)	0,92
vWF	1580,1 (1020,9 - 1990,8)	1358,0 (1094,9 - 2269,5)	0,91
TM	3,06 (2,36 - 3,88)	2,15 (1,25 - 3,09)	0,037
TAT	3,17 (2,35 - 5,08)	2,39 (1,92 - 5,60)	0,31
czynniki fibrynolizy			
t-PA	4,56 (2,96 - 7,48)	6,70 (5,30 - 9,40)	0,038
PAI-1	22,04 (13,23 - 30,14)	20,315 (15,07 - 30,65)	0,9
d-dimery	317 (198 - 543)	228 (171 - 301)	0,42
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,3 (3,0 - 3,6)	3,4 (3,0 - 3,9)	0,75
CRP	1,45 (0,58 – 3,00)	1,20 (0,61 - 2,53)	0,79
IL-6	1,569 (0,740 - 2,720)	1,921 (0,500 - 3,260)	0,96
IL-10	5,309 (1,000 - 7,100)	7,082 (6,170 - 9,570)	0,001
TGF-β1	8393,74 (5629,67 - 10709,44)	5663,11 (4634,58 - 9713,23)	0,076
bFGF >1	4 (6,8%)	2 (10,5%)	0,63

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

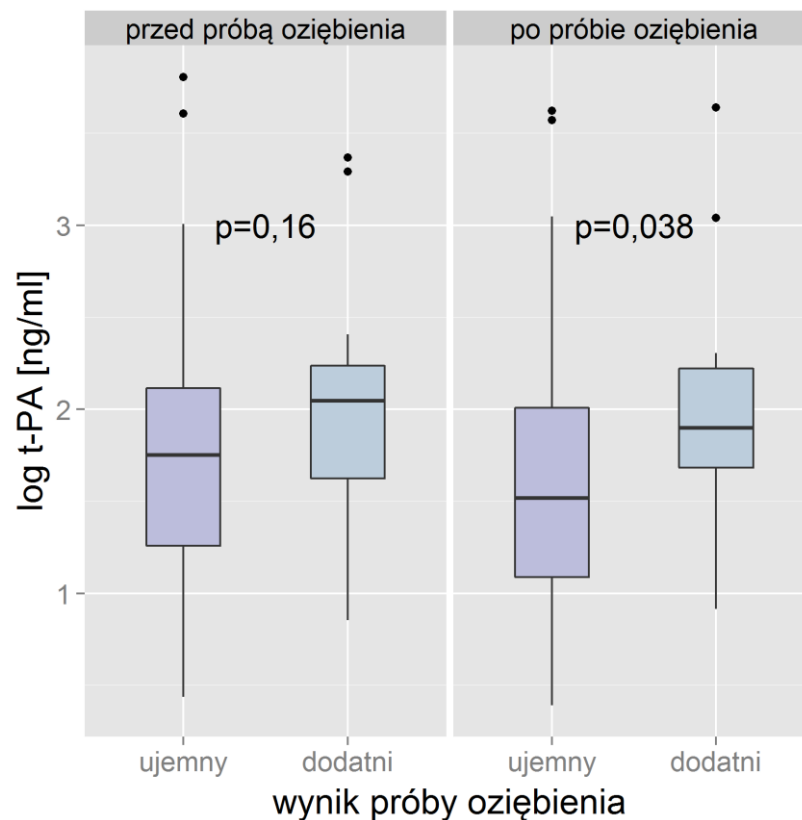
W tabeli XIV zestawiono wyniki pomiaru stężenia czynników hemostazy i zapalenia po przeprowadzeniu próby oziębienia i dokonano podziału na pacjentów, u których wynik tej próby był dodatni albo ujemny. W grupie pacjentów z pozytywnym wynikiem próby oziębienia istotnie wyższe stężenie wykazywało TM ($p=0,037$). t-PA prezentowało istotnie wyższe stężenie u pacjentów, u których próba miała wynik negatywny ($p=0,038$). Istotnie wyższe stężenie osiągnęła IL-10 ($p=0,001$) w grupie pacjentów z dodatnim wynikiem próby. Na uwagę zasługuje tendencja TGF-β1 ($p=0,076$) do istotnie niższego stężenia u pacjentów z pozytywnym wynikiem próby oziębienia po jej przeprowadzeniu.



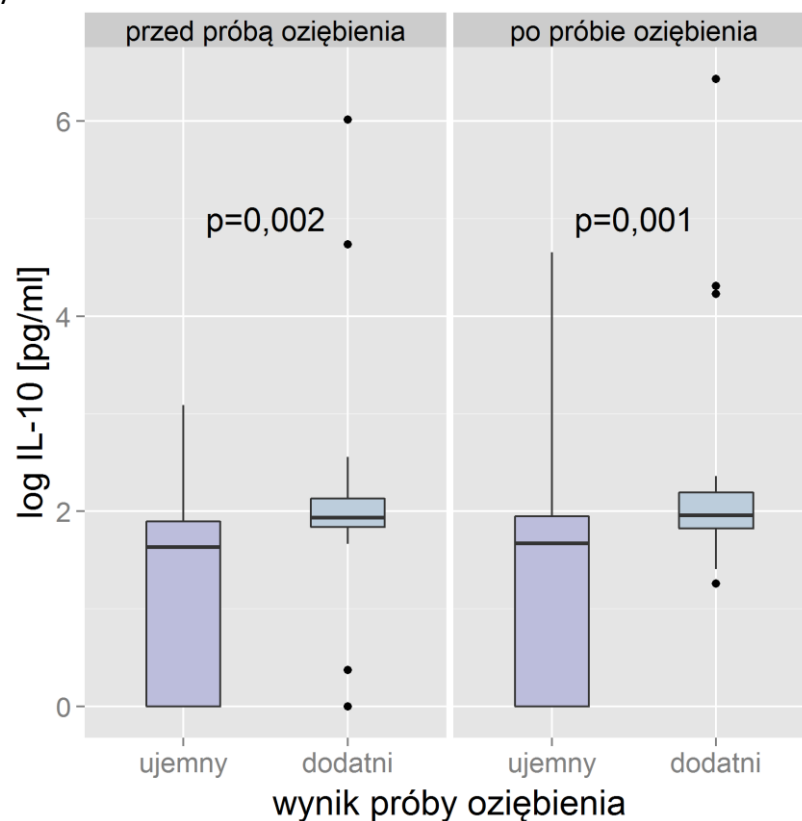
Wykres 24. Zlogarytmizowane stężenie TM istotnie niższe u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia po jej przeprowadzeniu ($p=0,037$).



Wykres 25. Zlogarytmizowane stężenie TAT istotnie wyższe u pacjentów z ujemnym wynikiem próby oziębienia przed jej przeprowadzeniem ($p=0,046$).



Wykres 26. Zlogarytmizowane stężenie t-PA istotnie wyższe u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia po jej przeprowadzeniu ($p=0,038$) w zestawieniu z brakiem istotności przed wykonaniem próby.



Wykres 27. Zlogarytmizowane stężenie IL-10 istotnie wyższe u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia zarówno przed ($p=0,002$) jak i po jej przeprowadzeniu ($p=0,001$).

Tabela XV Zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia przed przeprowadzeniem próby oziębienia od występowania przeciwciał przeciwjądrowych ANA

czynniki krzepnięcia	ANA ujemne n= 39 Me (Q1 - Q3)	ANA dodatnie n= 39 Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	248,0 (216,1 - 333,5)	259,5 (212,8 - 307,9)	0,91
TFPI	30,93 (20,06 - 38,30)	33,19 (26,70 - 45,02)	0,18
vWF	1375,1 (969,2 - 1689,5)	1753,0 (1299,8 - 2220,2)	0,002
TM	2,94 (1,83 - 3,50)	3,10 (2,20 - 4,17)	0,16
TAT	3,48 (2,38 - 5,07)	2,72 (2,20 - 3,83)	0,062
czynniki fibrylizy			
t-PA	4,40 (3,11 - 6,52)	8,20 (5,55 - 10,70)	0,0001
PAI-1	25,19 (16,94 - 33,31)	27,43 (20,8 - 42,77)	0,17
d-dimery	298 (206 - 414)	293 (185 - 591)	0,74
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,2 (2,8 - 3,6)	3,5 (3,1 - 3,8)	0,033
CRP	1,25 (0,41 - 2,32)	1,56 (0,98 - 4,28)	0,11
IL-6	1,199 (0,500 - 2,150)	2,252 (0,760 - 3,470)	0,051
IL-10	3,530 (1,000 - 6,140)	6,861 (3,460 - 8,590)	0,001
TGF-β1	8370,29 (6528,85 - 10937,80)	7851,57 (6350,50 - 9953,23)	0,43
bFGF >1	3 (7,7%)	1 (2,6%)	0,62

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

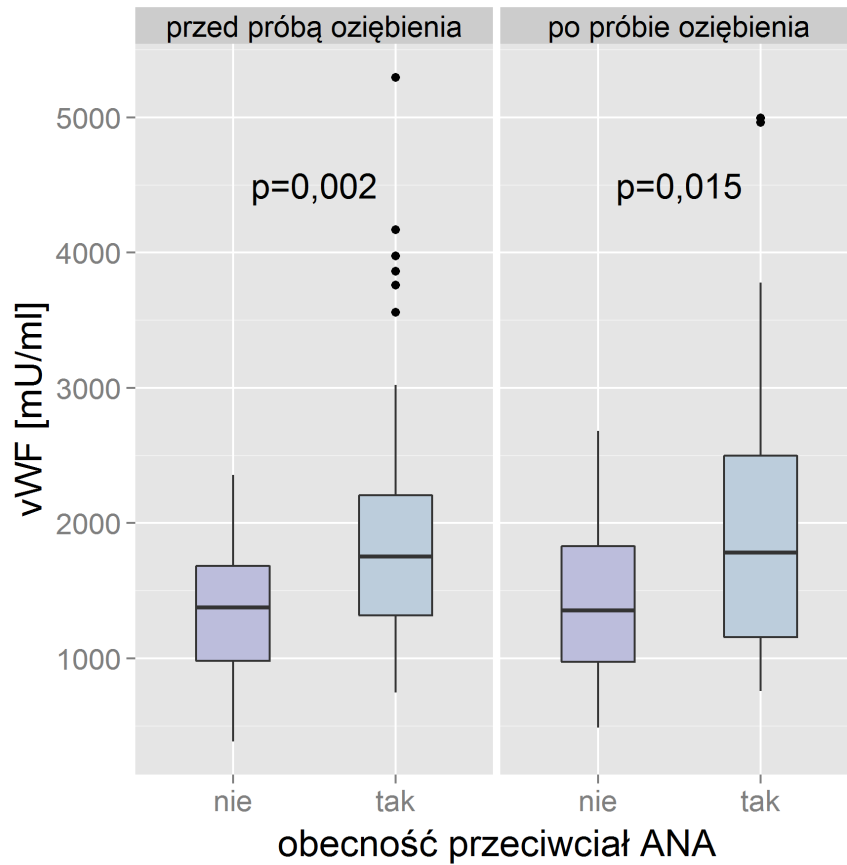
Powyższa tabela zawiera zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia przed przeprowadzeniem próby oziębienia od występowania przeciwciał przeciwjądrowych ANA. U pacjentów z dodatnim ANA wśród czynników krzepnięcia występowało istotnie wyższe stężenie vWF (p=0,002), wśród czynników fibrylizy istotnie wyższe wartości przedstawiał t-PA (p<0,0001), a wśród czynników zapalenia- fibrynogen (p=0,033) i IL-10 (p=0,001). Na granicy istotnej różnicy lokowało się również stężenie IL-6 (p=0,051), co wskazuje na trend IL-6 w kierunku istotnie wyższych wartości u pacjentów z dodatnim mianem ANA przed przeprowadzeniem próby oziębienia.

Tabela XVI Zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia po przeprowadzeniu próby oziębienia od występowania przeciwciał przeciwjądrowych ANA

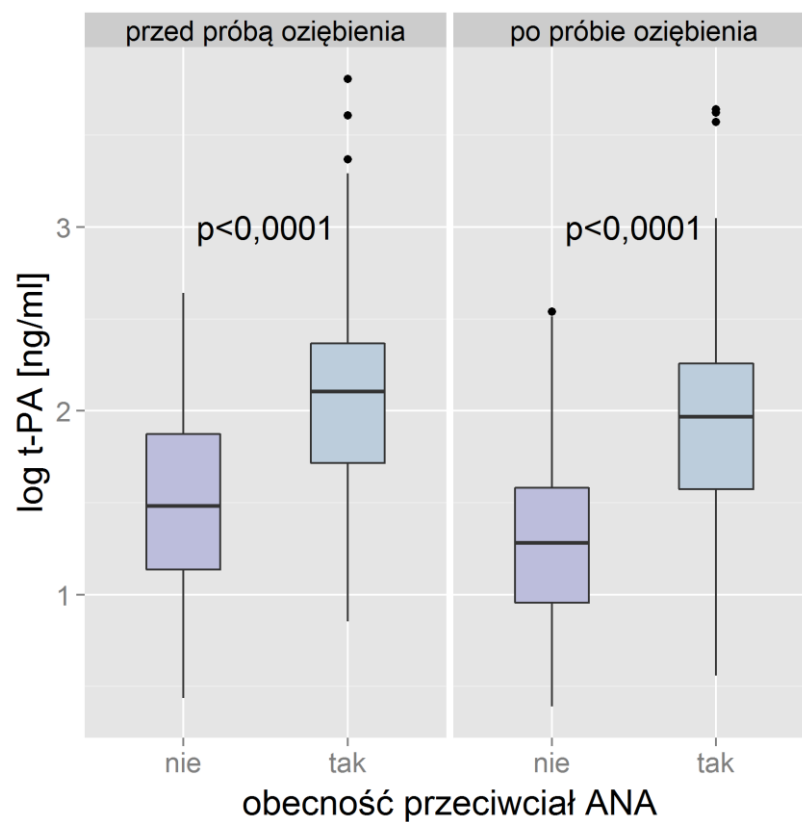
czynniki krzepnięcia	ANA ujemne n= 39 Me (Q1 - Q3)	ANA dodatnie n= 39 Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	241,0 (212,8 - 291,3)	287,1 (228,4 - 334,2)	0,085
TFPI	32,93 (20,43 - 41,55)	31,04 (25,41 - 43,11)	0,57
vWF	1353,0 (959,9 - 1884,8)	1783,7 (1129,0 - 2542,7)	0,015
TM	2,98 (1,82 - 3,54)	3,07 (2,15 - 3,92)	0,18
TAT	3,00 (2,22 - 4,96)	2,9 (2,07 - 5,60)	0,77
czynniki fibrynolizy			
t-PA	3,60 (2,55 - 4,99)	7,16 (4,80 - 9,62)	0,0001
PAI-1	19,12 (12,88 - 26,67)	27,25 (15,07 - 32,87)	0,032
d-dimery	242 (172 - 441)	259 (170 - 478)	0,93
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,2 (2,9 - 3,5)	3,4 (3,1 - 3,8)	0,031
CRP	1,10 (0,40 - 2,53)	1,60 (0,75 - 4,31)	0,061
IL-6	1,206 (0,530 - 2,500)	1,880 (0,750 - 3,340)	0,19
IL-10	2,980 (1,000 - 6,340)	7,080 (4,420 - 8,610)	0,0001
TGF-β1	9030,57 (7030,51 - 10951,98)	5781,42 (4532,6 - 9756,36)	0,048
bFGF >1	3 (7,7%)	3 (7,7%)	1

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartyl, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

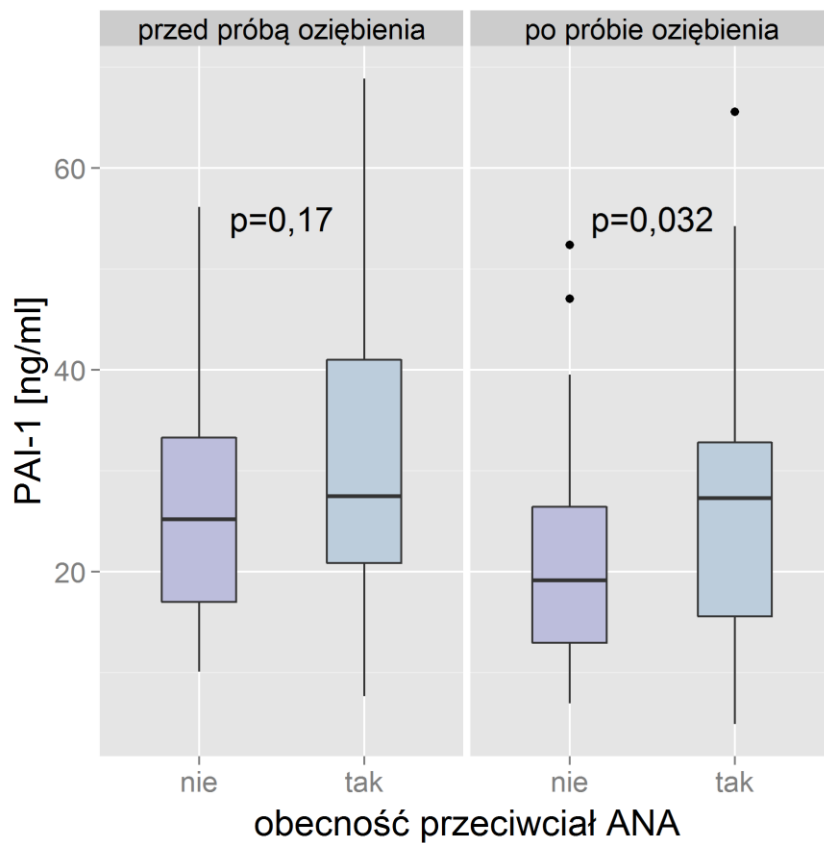
Powyższa tabela zawiera zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia po przeprowadzeniu próby oziębienia od występowania znamienego miana ANA. U pacjentów z dodatnim ANA wśród czynników krzepnięcia występowało istotnie wyższe stężenie vWF ($p=0,015$). Wśród czynników fibrynolizy istotnie wyższe wartości przedstawiał t-PA ($p<0,0001$) i PAI-1 ($p=0,032$). Wśród czynników zapalenia fibrynogen ($p=0,031$), IL-10 ($p<0,0001$) i TGF-β1 ($p=0,048$) były istotnie wyższe w grupie pacjentów z dodatnim mianem ANA.



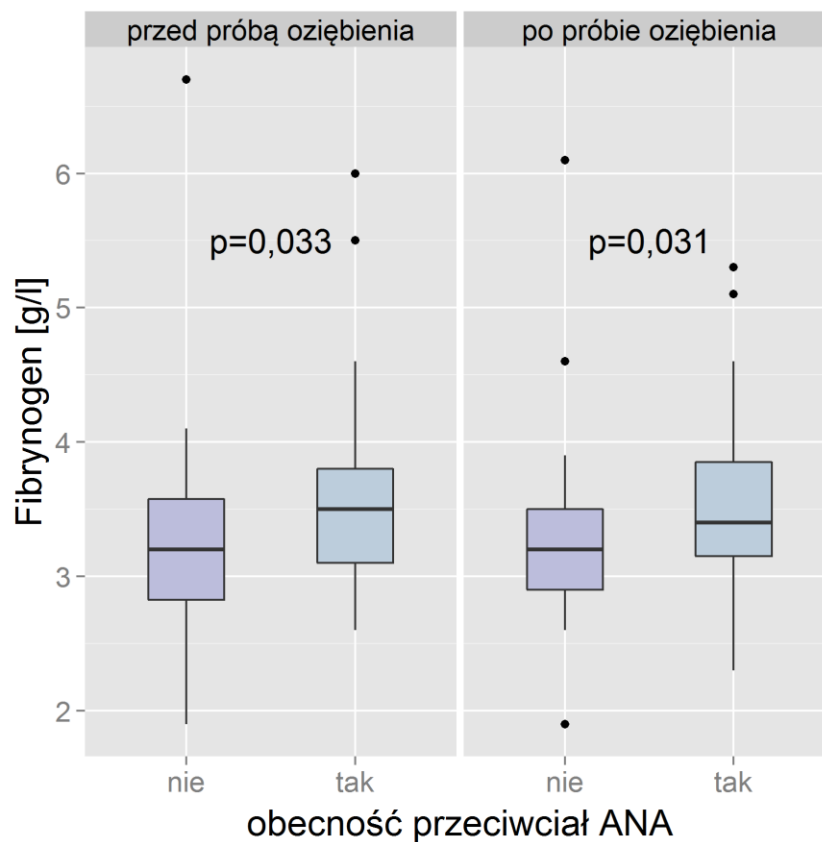
Wykres 28. Stężenie vWF istotnie wyższe u pacjentów z dodatnim mianem ANA przed ($p=0,002$) i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,015$).



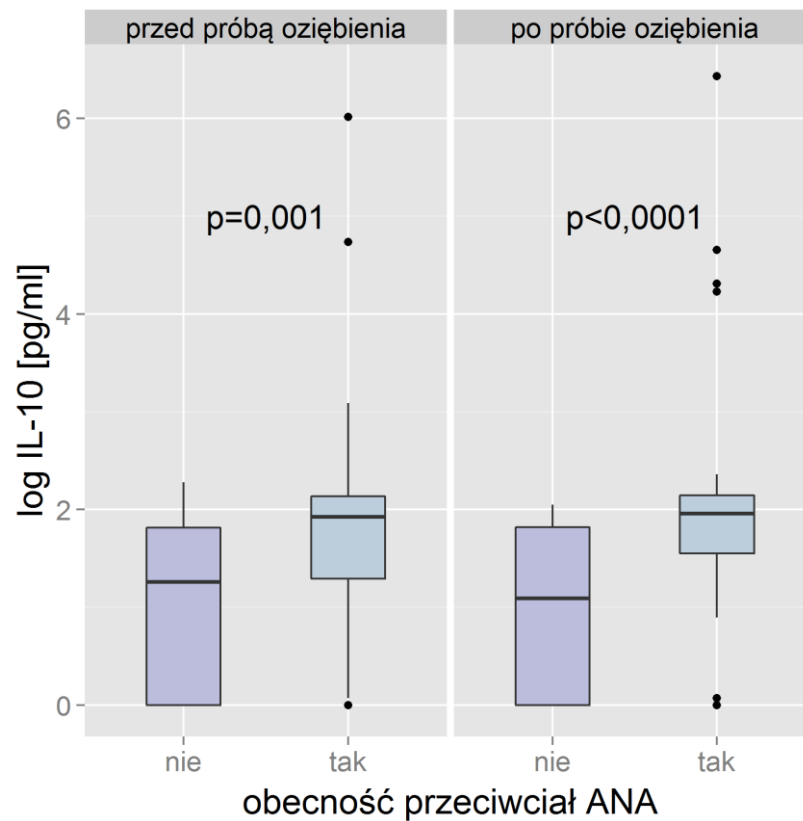
Wykres 29. Zlogarytmizowane stężenie t-PA istotnie wyższe u pacjentów z dodatnim mianem ANA przed i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p<0,0001$).



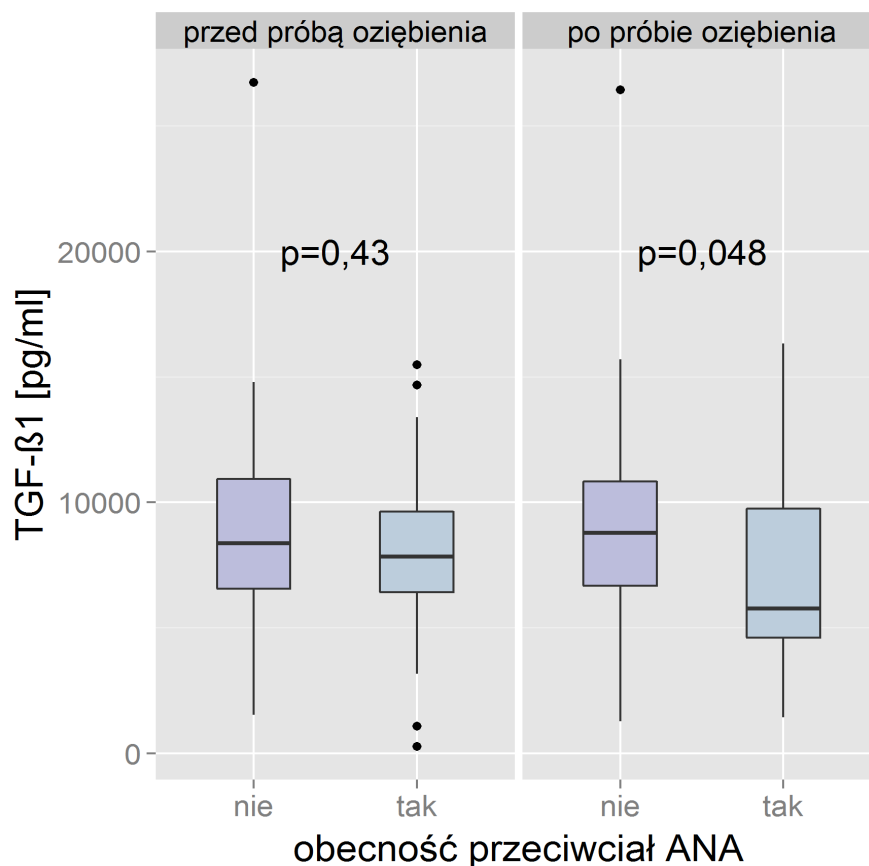
Wykres 30. Stężenie PAI-1 istotnie wyższe u pacjentów z dodatnim mianem ANA po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,032$) i brak statystycznie istotnych różnic przed jej przeprowadzeniem.



Wykres 31. Stężenie fibrynogenu istotnie wyższe u pacjentów z dodatnim mianem ANA przed ($p=0,033$) i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,031$).



Wykres 32. Zlogarytmizowane stężenie IL-10 istotnie wyższe u pacjentów z dodatnim mianem ANA przed ($p=0,001$) i po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p<0,0001$).



Wykres 33. Stężenie TGF- β 1 istotnie niższe u pacjentów z dodatnim mianem ANA po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,048$) i brak statystycznie istotnych różnic przed jej przeprowadzeniem.

Tabela XVII Zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia u pacjentów, u których nie wykryto ANA przed i po przeprowadzeniu próby oziębienia

czynniki krzepnięcia	ANA ujemne n=39		
	przed próbą oziębienia	po próbie oziębienia	p-value
TF	248,0 (216,2 - 333,5)	241,0 (212,8 - 291,3)	0,43
TFPI	30,93 (20,06 - 38,30)	32,93 (20,43 - 41,55)	0,14
vWF	1375,1 (969,2 - 1689,5)	1353,0 (959,9 - 1884,8)	0,19
TM	2,94 (1,83 - 3,50)	2,98 (1,82 - 3,54)	0,58
TAT	3,48 (2,38 - 5,07)	2,99 (2,22 - 4,96)	0,56
czynniki fibrynolizy			
t-PA	4,40 (3,11 - 6,52)	3,60 (2,55 - 4,99)	0,0001
PAI-1	25,19 (16,94 - 33,31)	19,12 (12,88 - 26,67)	0,0001
d-dimery	298 (206 - 414)	242 (172 - 441)	0,14
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,2 (2,8 - 3,6)	3,2 (2,9 - 3,5)	0,59
CRP	1,25 (0,41 - 2,32)	1,10 (0,40 - 2,53)	0,0023
IL-6	1,200 (0,500 - 2,150)	1,206 (0,530 - 2,500)	0,77
IL-10	3,530 (1,00 - 6,140)	2,980 (1,000 - 6,340)	0,36
TGF-β1	8370,29 (6528,85 - 10937,80)	9030,57 (7030,51 - 10951,98)	0,58
bFGF >1	3 (7,7%)	3 (7,7%)	1

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

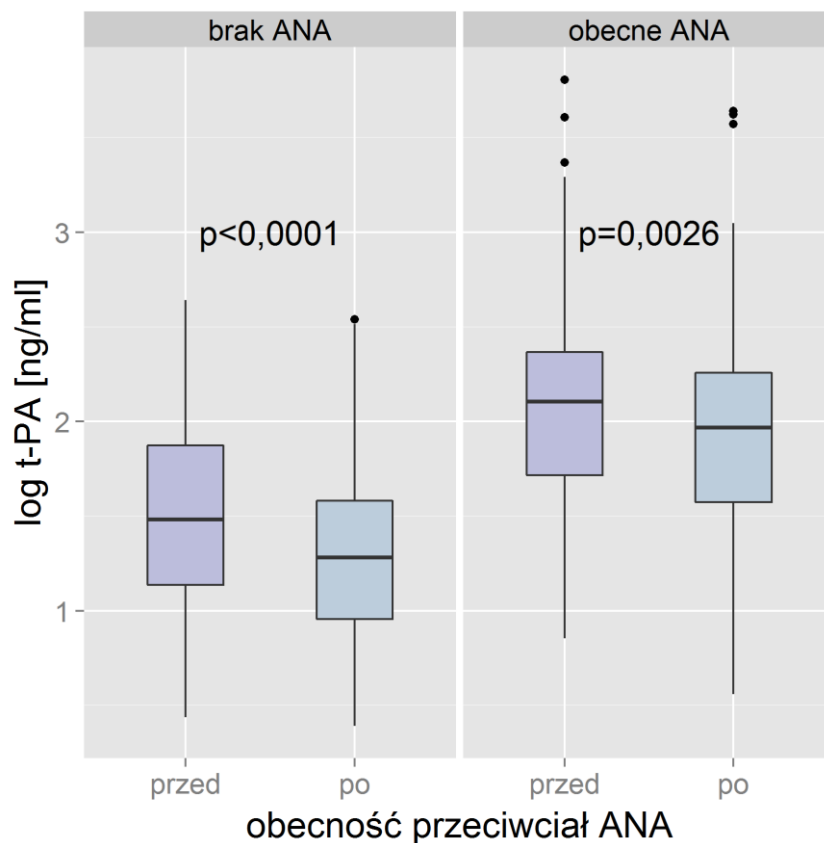
W tabeli prezentowane są wyniki porównania stężenia badanych czynników oznaczonego przed i po przeprowadzeniu próby oziębienia u pacjentów, u których nie wykryto dodatniego miana ANA. Istotnie niższe wartości po przeprowadzeniu próby oziębienia występowały w przypadku t-PA oraz PAI-1 ($p < 0,0001$).

Tabela XVIII Zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia u pacjentów, u których wykryto ANA przed i po przeprowadzeniu próby oziębienia

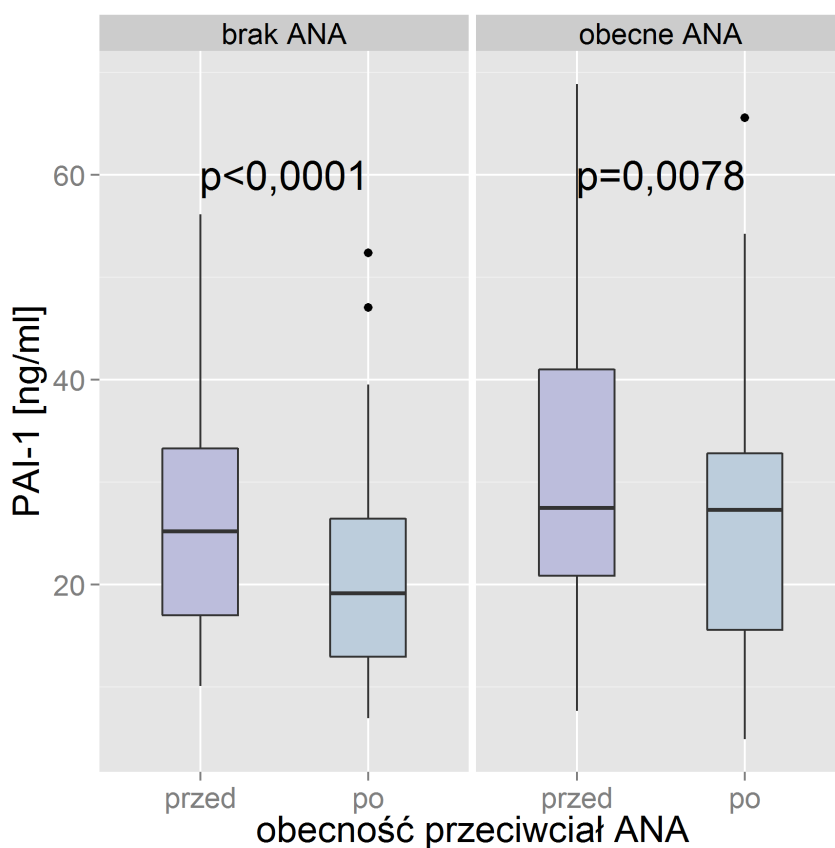
czynniki krzepnięcia	ANA dodatnie n=39		
	przed próbą oziębienia	po próbie oziębienia	p-value
TF	259,5 (212,8 - 307,938)	287,1 (228,4 - 334,2)	0,34
TFPI	33,19 (26,70 - 45,02)	31,04 (25,41 - 43,11)	0,63
vWF	1753,0 (1299,8 - 2220,2)	1783,7 (1129,0 - 2542,7)	0,5
TM	3,10 (2,20 - 4,17)	3,07 (2,15 - 3,92)	0,35
TAT	2,72 (2,20 - 3,83)	2,90 (2,07 - 5,60)	0,36
czynniki fibrynolizy			
t-PA	8,20 (5,55 - 10,70)	7,155 (4,80 - 9,62)	0,0026
PAI-1	27,43 (20,80 - 42,77)	27,25 (15,07 - 32,87)	0,0078
d-dimery	293 (185 - 591)	259 (170 - 478)	0,06
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,5 (3,1 - 3,8)	3,4 (3,1 - 3,8)	0,17
CRP	1,56 (0,98 - 4,28)	1,60 (0,75 - 4,31)	0,23
IL-6	2,252 (0,760 - 3,470)	1,877 (0,750 - 3,340)	0,5
IL-10	6,860 (3,460 - 8,590)	7,082 (4,420 - 8,610)	0,4
TGF-β1	7851,57 (6350,50 - 9953,23)	5781,42 (4532,60 - 9756,36)	0,11
bFGF >1	1 (2,6%)	3 (7,7%)	0,63

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

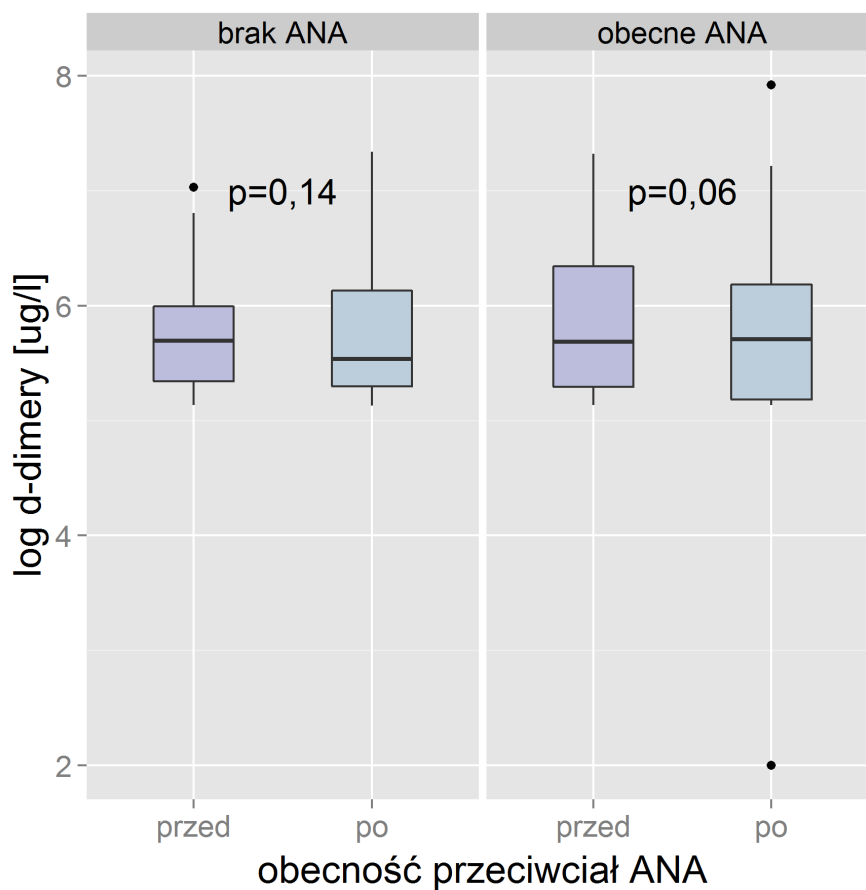
Tabela przedstawia zależność stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia od przeprowadzenia próby oziębienia u pacjentów z dodatnim mianem ANA. Zaobserwowano, że istotnie niższe wartości po przeprowadzeniu próby oziębienia występowały w przypadku t-PA ($p=0,0026$) oraz PAI-1 ($p<0,0078$). Można zauważyć także tendencję d-dimerów do istotnie niższego stężenia po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,06$).



Wykres 34. Zlogarytmizowane stężenie t-PA istotnie niższe po próbie oziębienia za równo u pacjentów z obecnymi ($p=0,0026$) jak i nieobecnymi ANA ($p<0,0001$).



Wykres 35. Stężenie PAI-1 istotnie niższe po próbie oziębienia zarówno u pacjentów z obecnymi ($p=0,0078$) jak i nieobecnymi ANA ($p<0,0001$).



Wykres 36. Zlogarytmizowane stężenie d-dimerów wykazywało tendencję do istotnie niższych wartości po przeprowadzeniu próby oziębienia u pacjentów z obecnym ANA. Takiego trendu nie zaobserwowano u pacjentów z nieobecnymi ANA.

Tabela XIX Zależność stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przed i po próbie oziębienia u pacjentów z objawem Raynauada, u których wynik próby był ujemny

	ujemny wynik próby oziębienia n= 59		
czynniki krzepnięcia	przed próbą Me (Q1 - Q3)	po próbie Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	248,4 (214,4 - 331,3)	245,0 (219,1 - 314,0)	0,65
TFPI	32,50 (22,30 - 41,78)	32,93 (24,15 - 41,65)	0,28
vWF	1618,9 (1067,9 - 1927,5)	1580 (1020,9 - 1990,8)	0,42
TM	3,00 (2,22 - 3,79)	3,06 (2,36 - 3,88)	0,75
TAT	3,41 (2,31 - 4,85)	3,17 (2,35 - 5,08)	0,77
czynniki fibrynolizy			
t-PA	5,76 (3,37 - 8,35)	4,56 (2,96 - 7,48)	0,0001
PAI-1	27,79 (17,97 - 39,33)	22,04 (13,23 - 30,14)	0,0001
d-dimery	304 (206 - 563)	244 (170 - 601)	0,14
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,3 (3,1 - 3,7)	3,3 (3,0 - 3,6)	0,68
CRP	1,51 (0,58 - 3,06)	1,40 (0,55 - 3,00)	0,011
IL-6	1,600 (0,750 - 3,050)	1,569 (0,740 - 2,720)	0,55
IL-10	5,130 (1,00 - 6,720)	5,310 (1,00 - 7,100)	0,48
TGF-β1	8288,43 (6370,91 - 10804,15)	8433,32 (5488,58 - 10775,05)	0,81
bFGF >1	1 (5,3%)	2 (10,5%)	1

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartyl, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

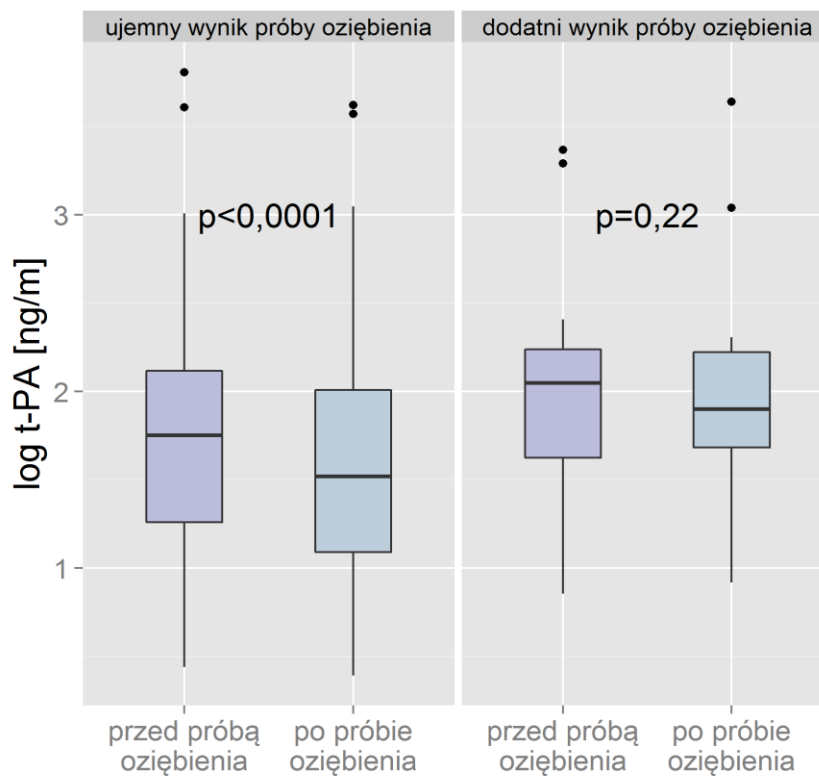
Porównując stężenie czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u pacjentów z ujemnym wynikiem próby oziębienia przed przeprowadzeniem próby oziębienia i po jej przeprowadzeniu, uzyskano kilka istotnych różnic. Wśród czynników fibrynolizy stężenie t-PA ($p < 0,0001$) i PAI-1 ($p < 0,0001$) było istotnie niższe po przeprowadzeniu próby oziębienia. Wśród czynników zapalenia stężenie CRP było istotnie niższe po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p = 0,011$).

Tabela XX Zależność stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przed i po próbie oziębienia u pacjentów z objawem Raynauda, u których wynik próby był dodatni

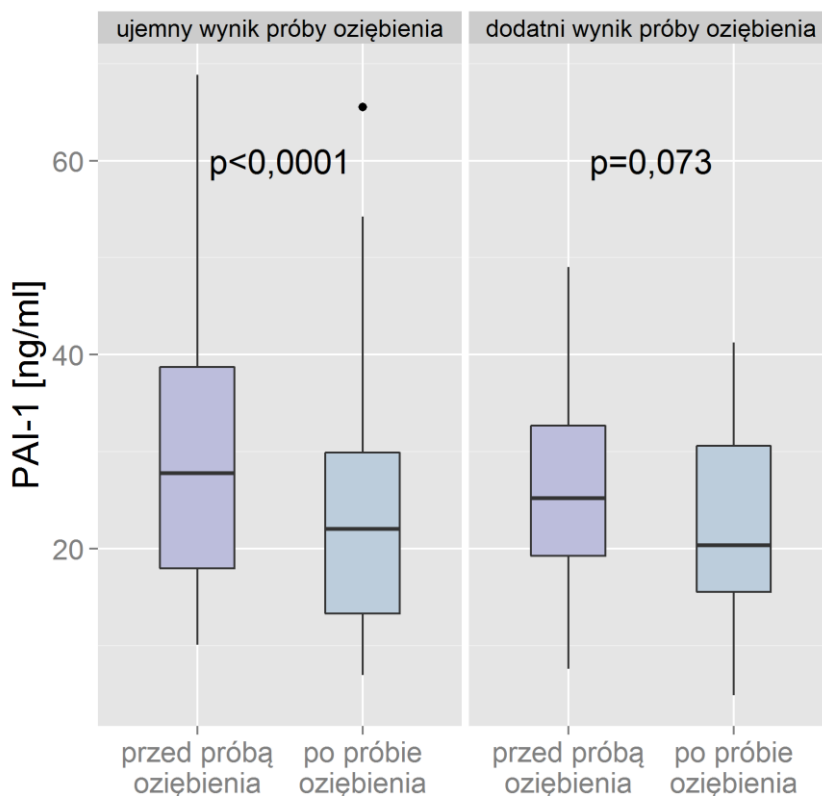
	 dodatni wynik próby oziębienia n= 19		
czynniki krzepnięcia	przed próbą Me (Q1 - Q3)	po próbie Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	250,5 (228,7 - 294,8)	288,8 (224,6 - 342,6)	0,42
TFPI	31,82 (24,43 - 53,62)	31,04 (22,53 - 45,38)	0,59
vWF	1375,1 (1153,8 - 1793,5)	1358,0 (1094,9 - 2269,5)	0,49
TM	2,25 (1,50 - 3,50)	2,15 (1,25 - 3,09)	0,57
TAT	2,42 (1,91 - 3,60)	2,39 (1,92 - 5,60)	0,31
czynniki fibrynolizy			
t-PA	7,75 (5,00 - 9,63)	6,70 (5,30 - 9,40)	0,22
PAI-1	25,18 (18,71 - 32,75)	20,32 (15,07 - 30,65)	0,073
d-dimery	280 (198 - 431)	228 (171 - 301)	0,029
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,4 (2,8 - 3,9)	3,4 (3,0 - 3,9)	0,4
CRP	1,45 (0,63 - 2,67)	1,20 (0,61 - 2,53)	0,14
IL-6	1,645 (0,500 - 3,080)	1,920 (0,500 - 3,260)	0,73
IL-10	6,940 (6,130 - 8,700)	7,080 (6,170 - 9,570)	0,27
TGF-β1	7909,91 (6797,36 - 8615,34)	5631,27 (4464,00 - 9806,39)	0,074
bFGF >1	3 (5,1%)	4 (6,8%)	1

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

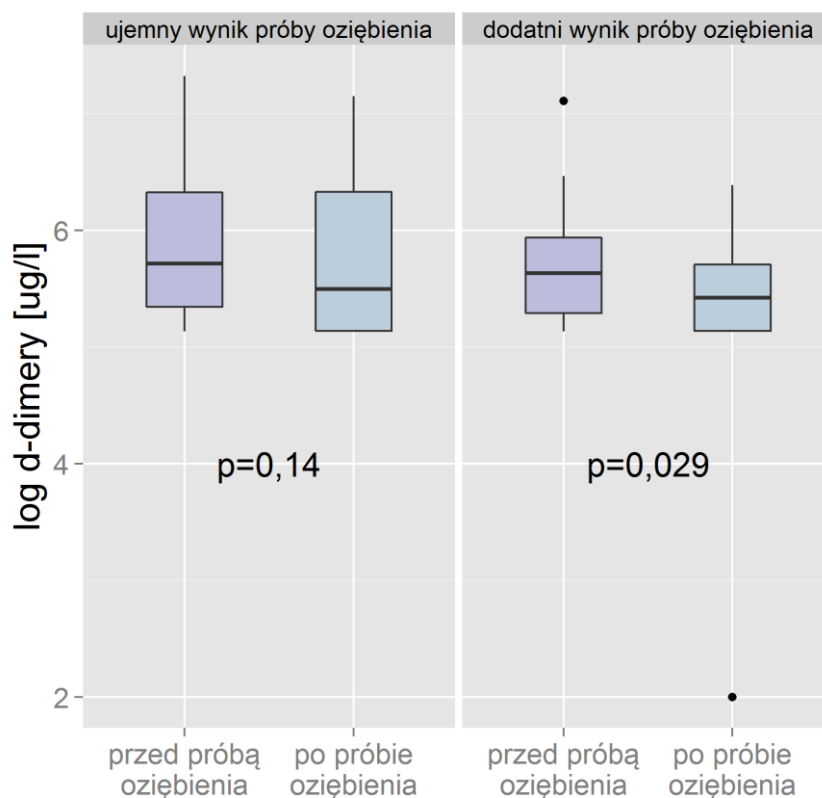
Porównując stężenie czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia przed jej przeprowadzeniem i po jej przeprowadzeniu, uzyskano jedną istotną różnicę. Stężenie d-dimerów było istotnie niższe po przeprowadzeniu próby oziębienia (p=0,029). Rezultaty bliskie istotności – niższe po przeprowadzeniu próby – prezentowało stężenie PAI-1 (p=0,073) oraz TGF-β1 (p=0,074).



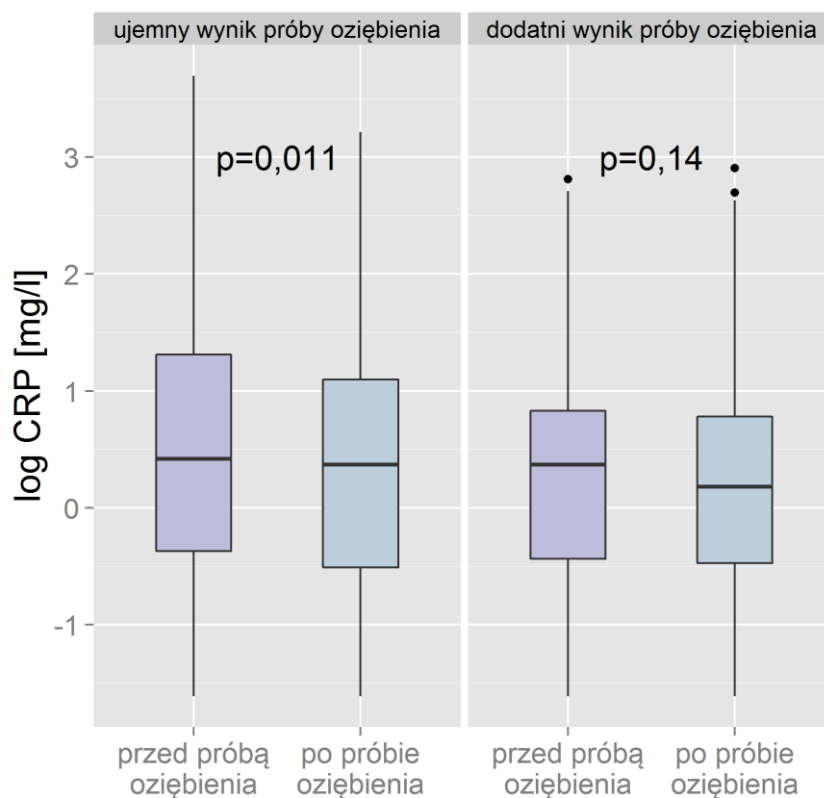
Wykres 37. Zlogarytmizowane stężenie t-PA istotnie niższe u pacjentów z ujemnym wynikiem próby oziębienia po jej przeprowadzeniu ($p < 0,0001$) i brak statystycznie istotnych różnic u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia.



Wykres 38. Stężenie PAI-1 istotnie niższe ($p < 0,0001$) u pacjentów z ujemnym oraz bliskie istotności z dodatnim wynikiem próby oziębienia po jej przeprowadzeniu



Wykres 39. Zlogarytmizowane stężenie d-dimerów istotnie niższe u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia po jej przeprowadzeniu ($p=0,029$) i brak statystycznie istotnych różnic u pacjentów z ujemnym wynikiem próby.



Wykres 40. Zlogarytmizowane stężenie CRP istotnie niższe u pacjentów z ujemnym wynikiem próby oziębienia po jej przeprowadzeniu ($p=0,011$) i brak statystycznie istotnych różnic u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia.

Tabela XXI Zależność stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przed i po próbie oziębienia u pacjentów z pierwotnym objawem Raynauda

	pacjenci z pierwotnym objawem Raynauda n= 29		
czynniki krzepnięcia	przed próbą Me (Q1 - Q3)	po próbie Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	263,9 (222,8 – 377,0)	243,0 (219,2 – 316,0)	0,39
TFPI	32,00 (19,12 - 38,17)	33,05 (21,30 - 39,85)	0,18
vWF	1358,8 (855,0 - 1661,5)	1237,9 (885,5 - 1692,3)	0,71
TM	2,90 (1,55 - 3,49)	2,90 (1,50 - 3,51)	0,39
TAT	3,48 (2,29 - 4,89)	2,62 (2,04 - 3,79)	0,39
czynniki fibrynolizy			
t-PA	3,90 (2,85 - 5,90)	3,00 (2,33 - 4,32)	0,0001
PAI-1	20,31 (16,09 - 29,71)	16,72 (11,02 - 25,19)	0,0001
d-dimery	298 (200 - 436)	242 (173 - 503)	0,32
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,3 (2,9 - 3,6)	3,2 (3,0 - 3,5)	0,56
CRP	1,25 (0,42 - 3,35)	1,20 (0,40 - 2,63)	0,0006
IL-6	1,021 (0,500 - 1,959)	1,200 (0,500 - 2,330)	0,38
IL-10	5,168 (1,000 - 6,160)	5,42 (1,000 - 6,560)	0,24
TGF-β1	8370,29 (6478,19 - 10145,24)	9030,57 (7343,83 - 10462,14)	0,25
bFGF >1	3 (10,3%)	2 (6,9%)	1

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

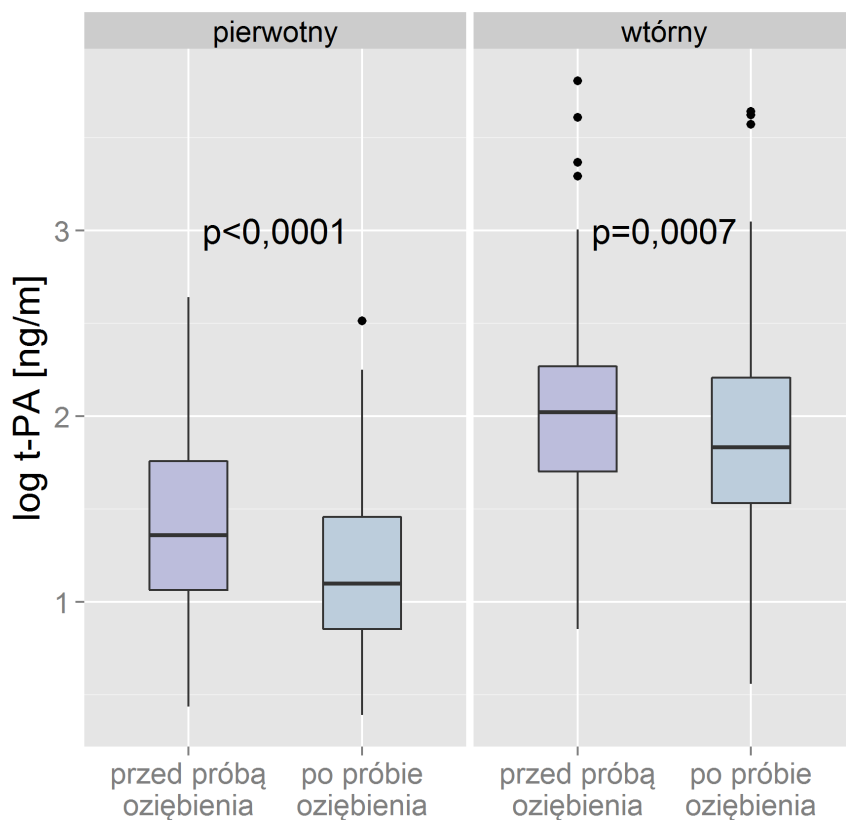
Porównując stężenie czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u pacjentów z pierwotnym objawem Raynauda przed przeprowadzeniem próby oziębienia i po jej przeprowadzeniu, uzyskano kilka istotnych różnic. Wśród czynników fibrynolizy stężenie t-PA ($p < 0,0001$) i PAI-1 ($p < 0,0001$) było istotnie niższe po przeprowadzeniu próby oziębienia. Wśród czynników zapalenia stężenie CRP było istotnie niższe po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p = 0,0006$).

Tabela XXII Zależność stężenia czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia przed i po próbie oziębienia u pacjentów z wtórnym objawem Raynauda

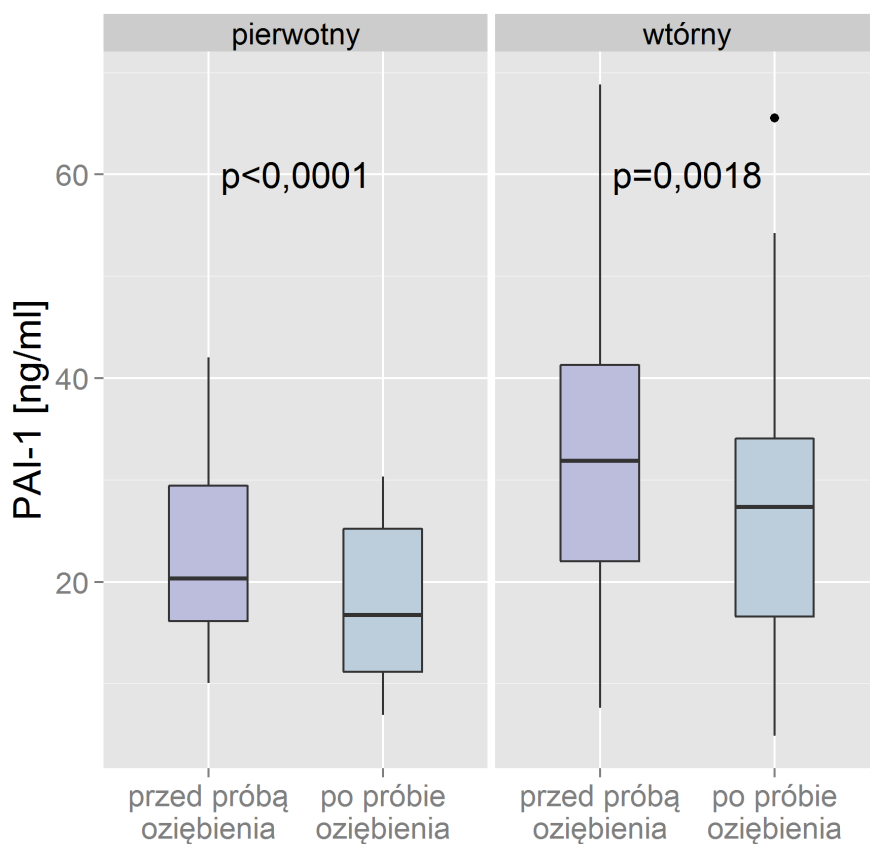
	pacjenci z wtórnym objawem Raynauda n= 49		
czynniki krzepnięcia	przed próbą Me (Q1 - Q3)	po próbie Me (Q1 - Q3)	p-value
TF	240,2 (213,0 - 299,8)	260,0 (217,8 - 329,6)	0,43
TFPI	32,10 (24,60 - 43,26)	31,04 (24,78 - 43,29)	0,88
vWF	1708,0 (1270,1 – 2158,0)	1709,0 (1215,6 - 2374,0)	0,89
TM	3,05 (2,23 – 4,00)	3,18 (2,50 - 3,89)	0,53
TAT	2,76 (2,27 - 3,99)	3,28 (2,31 - 5,87)	0,37
czynniki fibrynolizy			
t-PA	7,55 (5,45 - 9,72)	6,25 (4,62 - 9,20)	0,0007
PAI-1	31,90 (21,67 - 41,80)	27,36 (16,33 - 34,49)	0,0018
d-dimery	293 (199 - 568)	241 (170 - 469)	0,03
czynniki zapalenia			
fibrynogen	3,4 (3,0 - 3,8)	3,4 (3,0 - 3,8)	0,65
CRP	1,53 (0,85 - 2,99)	1,40 (0,62 – 3,00)	0,1
IL-6	2,070 (0,810 - 3,130)	1,780 (0,770 - 2,880)	0,3
IL-10	6,580 (1,050 - 8,380)	6,310 (2,200 - 8,180)	0,48
TGF-β1	7851,57 (6511,96 - 10429,02)	7145,46 (4669,81 - 10338,12)	0,081
bFGF >1	1 (2,1%)	4 (8,2%)	0,38

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, Me – mediana, Q – kwartył, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

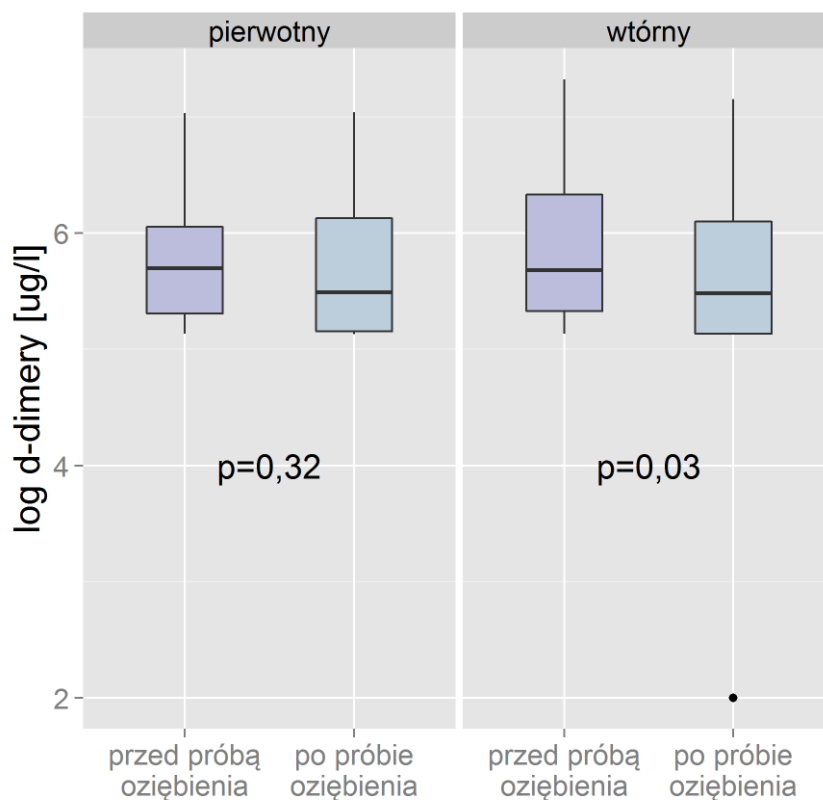
Porównując stężenie czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u pacjentów z wtórnym objawem Raynauda przed przeprowadzeniem próby oziębienia i po jej przeprowadzeniu, uzyskano kilka istotnych różnic wśród czynników fibrynolizy. Stężenie t-PA ($p=0,0007$), PAI-1 ($p=0,0018$) oraz d-dimerów ($p=0,03$) było istotnie niższe po przeprowadzeniu próby oziębienia.



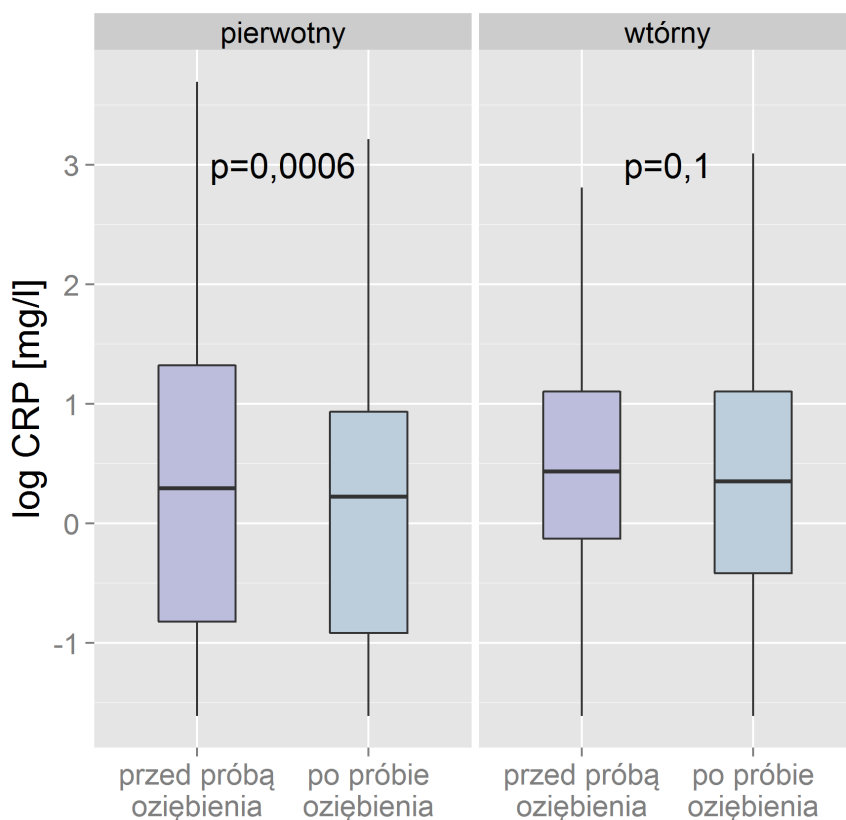
Wykres 41. Istotnie niższe zlogarytmizowane stężenie t-PA u pacjentów z pierwotnym ($p < 0,0001$) jak i wtórnym RP ($p = 0,0007$) po przeprowadzeniu próby oziębienia.



Wykres 42. Istotnie niższe stężenie PAI-1 u pacjentów z pierwotnym ($p < 0,0001$) jak i wtórnym RP ($p = 0,018$) po przeprowadzeniu próby oziębienia.



Wykres 43. Zlogarytmizowane stężenie d-dimerów istotnie niższe u pacjentów wtórnym RP ($p=0,03$) po przeprowadzeniu próby oziębienia i brak istotnych różnic u pacjentów z pierwotnym RP.



Wykres 44. Istotnie niższe zlogarytmizowane stężenie CRP u pacjentów pierwotnym RP po przeprowadzeniu próby oziębienia ($p=0,0006$) i brak istotnych różnic u pacjentów z wtórnym RP.

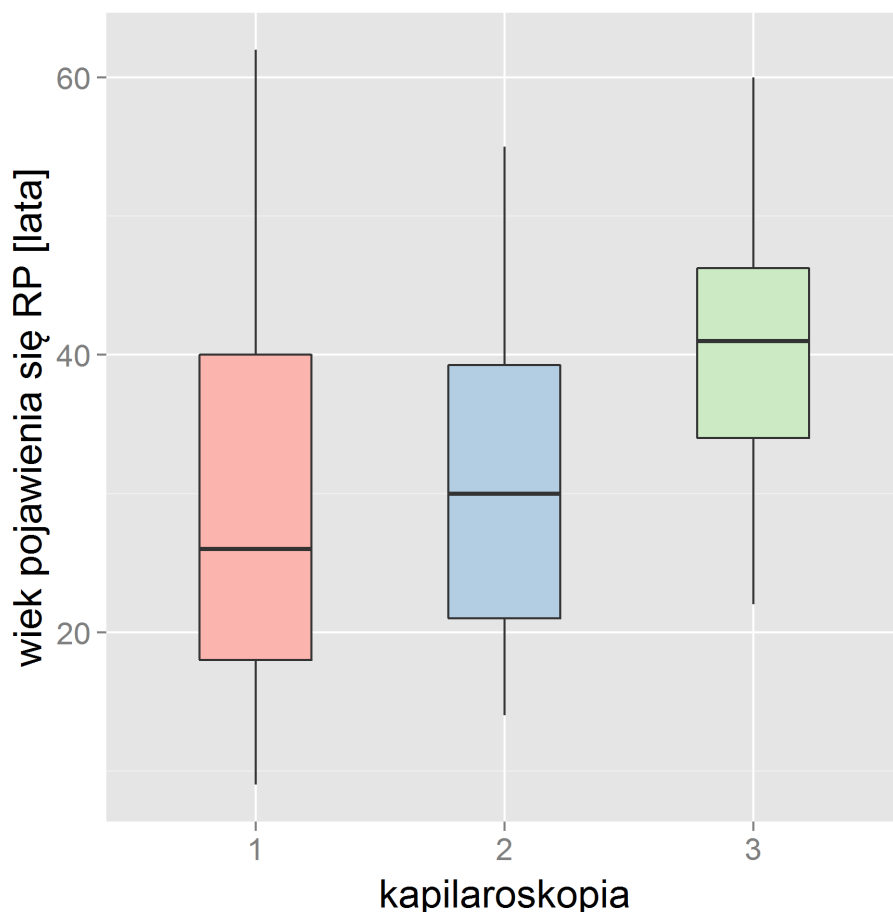
Tabela XXIII Zależność stopnia zmian w obrazie kapilaroskopowym od danych klinicznych

dane kliniczne	stopień zmian w obrazie kapilaroskopowym			p-value
	1 ^o n=17	2 ^o n=36	3 ^o n=20	
płeć kobiety	16 (94,1%)	32 (88,9%)	16 (80%)	0,42
mężczyźni	1 (5,9%)	4 (11,1%)	4 (20%)	
wiek	58 (53 - 63,5)	54,5 (39 - 62)	56,5 (48 - 62,5)	0,57
wiek pojawienia się RP	26 (17,5-41,25)	30 (21 - 39,5)	41 (33 - 46,5)	1 vs 3 p=0,061 2 vs 3 p=0,008
wtórny RP	1 (5,9%)	24 (66,7%)	20 (100%)	1 vs 2 p<0,0001 2 vs 3 p=0,012 1 vs 3 p<0,0001
 dodatni wynik próby oziębienia	1 (5,9%)	6 (16,7%)	12 (60%)	1 vs 3 p=0,0012 2 vs 3 p=0,006
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	1 (5,9%)	3 (8,3%)	8 (40%)	2 vs 3 p=0,003
choroby układowe tkanki łącznej	0 (0%)	12 (33,3%)	17 (85%)	1 vs 2 p=0,0015 1 vs 3 p<0,0001 2 vs 3 p=0,0006
postać uogólniona twardziny układowej	0 (0%)	1 (2,8%)	9 (45%)	1 vs 3 p=0,003 2 vs 3 p=0,0003
CREST	0 (0%)	0 (0%)	3 (15%)	2 vs 3 p=0,04
zespół Sjögrena	0 (0%)	4 (11,1%)	0 (0%)	0,17
MCTD zespół Sharpa	0 (0%)	4 (11,1%)	3 (15%)	0,29
UCTD	0 (0%)	3 (8,3%)	2 (10%)	0,59
ANA dodatnie	0 (0%)	19 (52,8%)	19 (95%)	0,0001
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa (całość):	9 (52,9%)	23 (63,9%)	10 (50%)	0,55
szyjnego	7 (41,2%)	16 (44,4%)	7 (35%)	0,78
piersiowego	3 (17,6%)	9 (25%)	4 (20%)	0,87
łędźwiowego	4 (23,5%)	19 (52,8%)	9 (45%)	0,14
żebro szyjne	0 (0%)	1 (2,8%)	0 (0%)	1
zmiany zwyrodnieniowe drobnych stawów rąk	4 (23,5%)	8 (22,2%)	4 (20%)	1
zespół cieśni nadgarstka	0 (0%)	3 (8,3%)	2 (10%)	0,59
choroba wibracyjna	1 (5,9%)	3 (8,3%)	0 (0%)	0,67

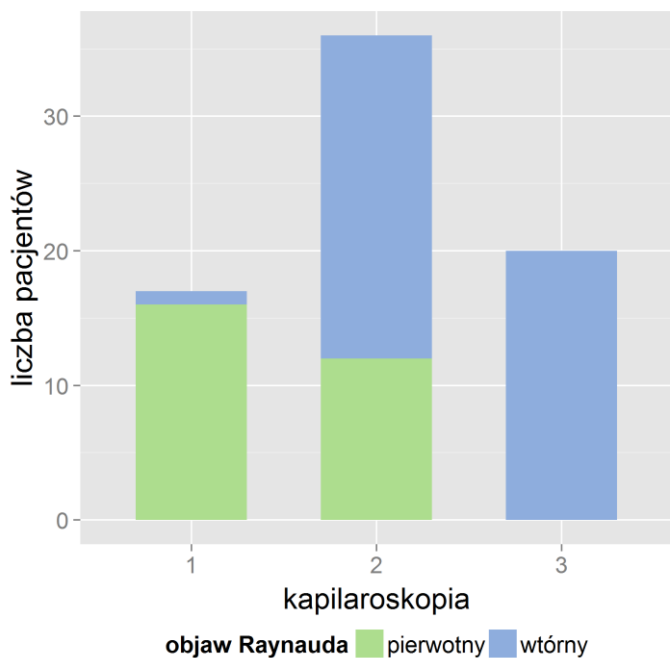
RP – objaw Raynauda, ABPI – wskaźnik kostka-ramię, CREST – dawna nazwa ograniczonej postaci twardziny stanowiąca akronim objawów ISSc, MCTD – mieszana choroba tkanki łącznej, UCTD – niezróżnicowana choroba tkanki łącznej, ANA – przeciwciała przeciwjądrowe, p-value – istotność statystyczna, n – liczba.

Tabela XXIII ukazuje zależność stopnia zmian w obrazie kapilaroskopowym od danych klinicznych pacjentów z RP. Stopień 3 zmian był określany istotnie częściej w grupie pacjentów, u których pierwszy epizod RP wystąpił w późnym wieku, u pacjentów z wtórnym RP, u których wynik próby oziębienia był dodatni, którzy w wywiadzie podali występowanie owrzodzeń na zajętych objawem palcach oraz u chorych cierpiących na CTD. Przeprowadzając test trendu chi-kwadrat, otrzymano poziom istotności $p < 0,0001$, co oznacza, że występował istotnie rosnący trend częstości występowania ANA wraz ze stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym.

Nie uwzględniono w tabeli pięciu pacjentów, u których albo obraz kapilaroskopowy nie był możliwy do oceny ze względu na nasilony obrzęk tkanek, albo nie można było przeprowadzić badania ze względu na drżenie rąk badanego.

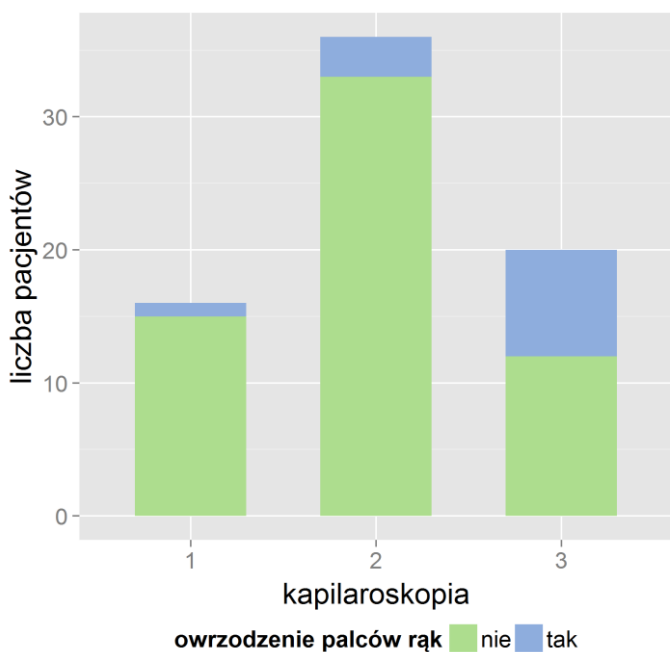
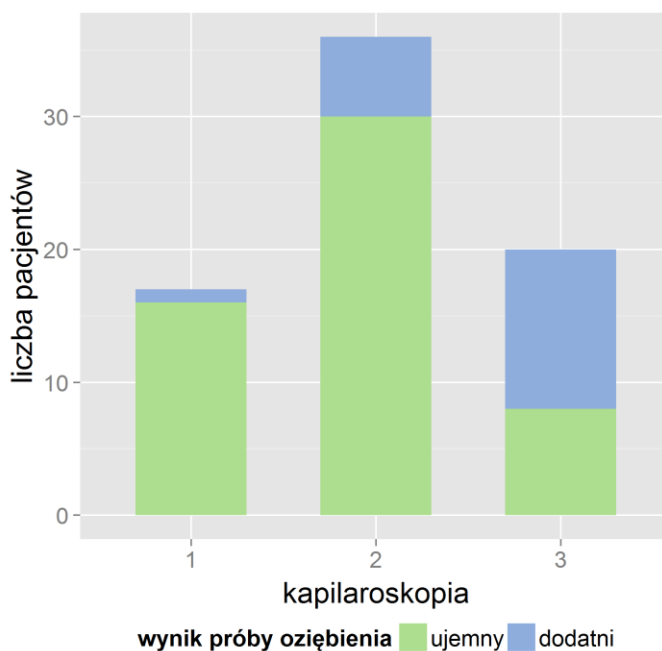


Wykres 45. Stopień 3 zmian w obrazie kapilaroskopowym opisywano istotnie częściej w grupie pacjentów, u których pierwszy epizod RP wystąpił w późnym wieku (1 vs 3 $p=0,061$, 3 vs 3 $p=0,008$).

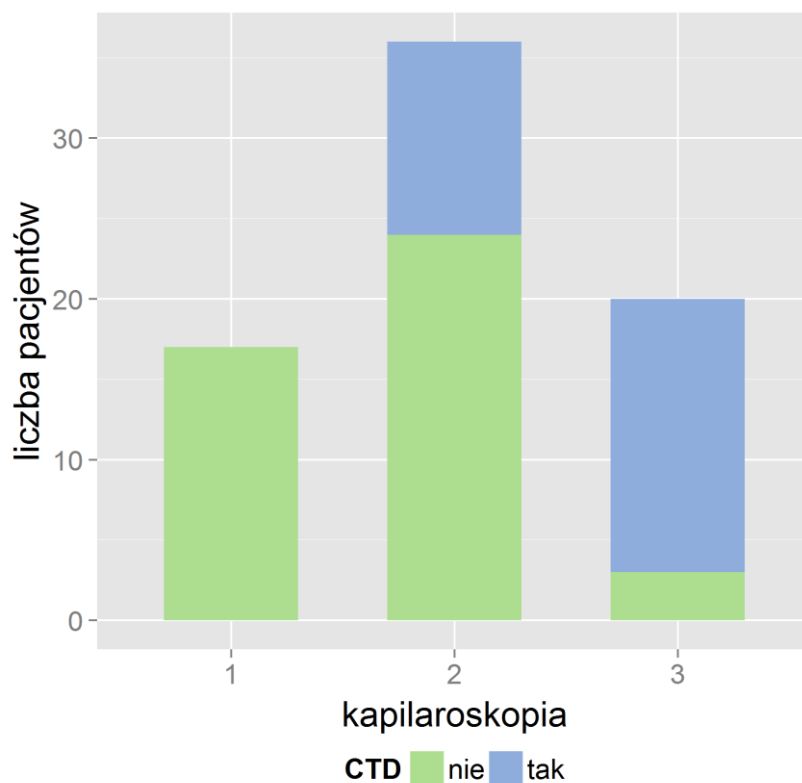


Wykres 46. Stopień 3 zmian w obrazie kapilaroskopowym występował istotnie częściej u pacjentów z wtórnym RP niż z pierwotnym RP (1 vs 2 $p=0,0001$, 2 vs 3 $p=0,012$, 1 vs 3 $p<0,0001$).

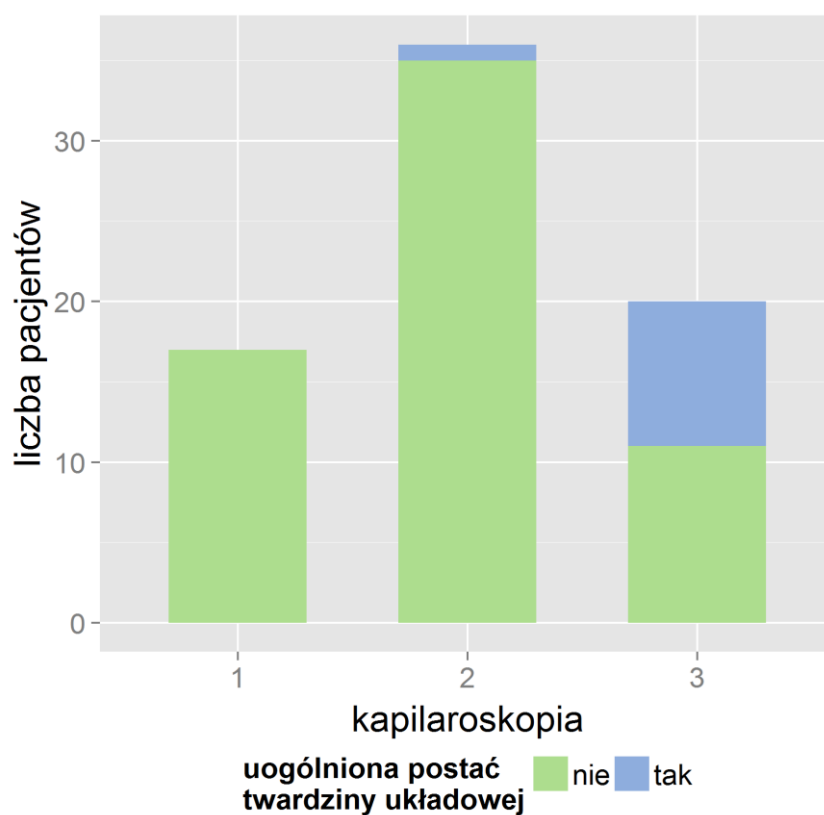
Wykres 47. Stopień 3 zmian w obrazie kapilaroskopowym występował istotnie częściej u pacjentów z dodatnim wynikiem próby oziębienia (1 vs 3 $p=0,0012$, 2 vs 3 $p=0,006$).



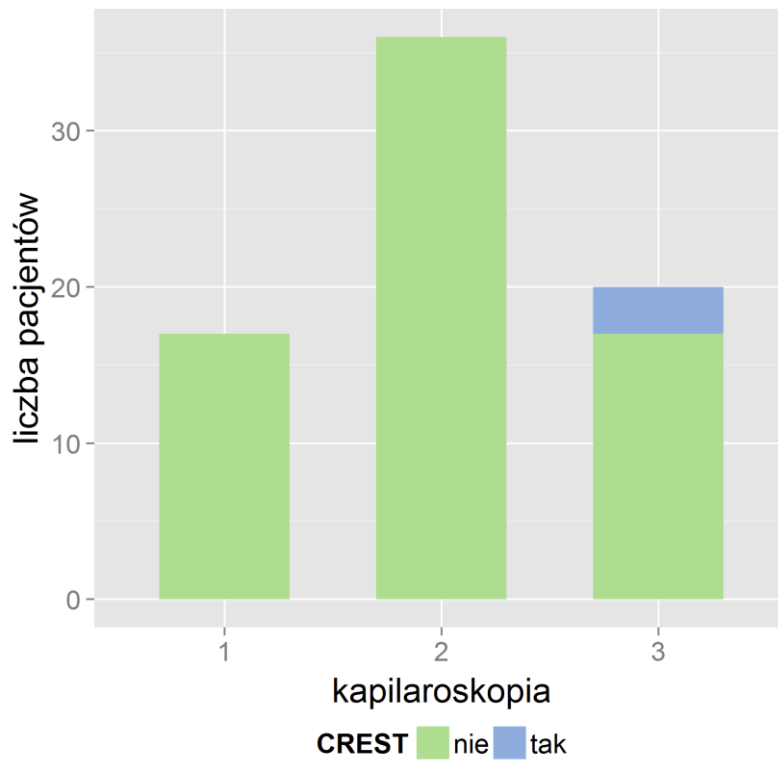
Wykres 48. Stopień 3 zmian w obrazie kapilaroskopowym występował istotnie częściej u pacjentów, którzy w wywiadzie podali występowanie owrzodzeń na zajętych objawem palcach (2 vs 3 $p=0,003$).



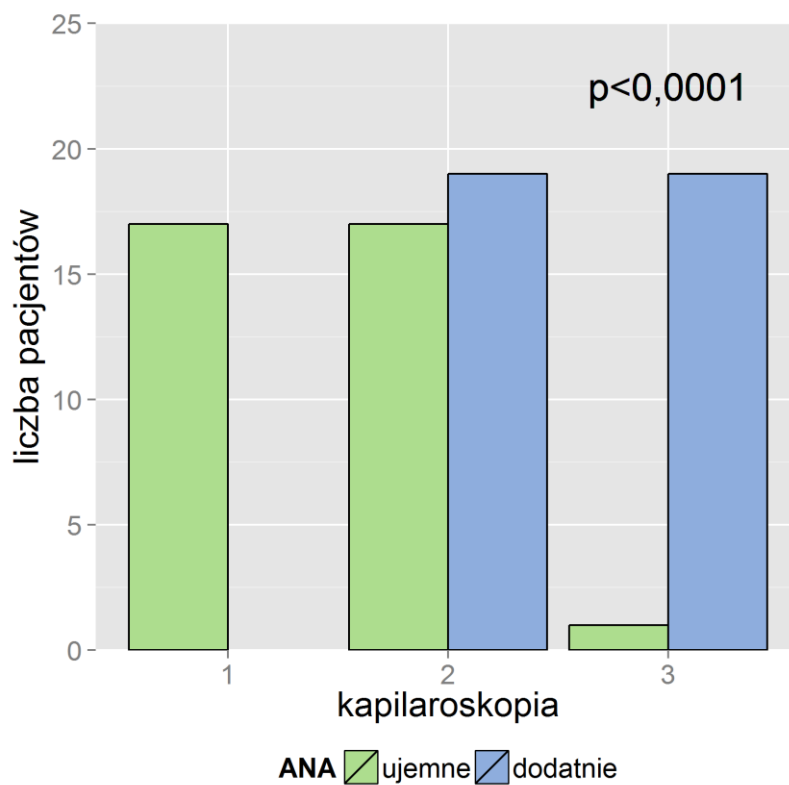
Wykres 49. Stopień 3 zmian w obrazie kapilaroskopowym występował istotnie częściej w grupie pacjentów cierpiących na choroby układowe tkanki łącznej (1 vs 2 $p=0,0015$, 1 vs 3 $p<0,0001$, 2 vs 3 $p=0,0006$).



Wykres 50. Stopień 3 zmian w obrazie kapilaroskopowym występował istotnie częściej w grupie pacjentów z uogólnioną postacią twardziny układowej (1 vs 3 $p=0,003$, 2 vs 3 $p=0,0003$).



Wykres 51. Stopień 3 zmian w obrazie kapilaroskopowym występował istotnie częściej w grupie pacjentów z zespołem CREST (2 vs 3 $p=0,04$).



Wykres 52. Istotnie rosnący trend częstości występowania ANA wraz ze stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym ($p<0,0001$).

Tabela XXIV Zależność czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u wszystkich pacjentów przed przeprowadzeniem próby oziębienia a stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym

	stopień zmian w obrazie kapilaroskopowym			p-value
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	
krzepnięcie				
TF	256,5 (212,08 - 376,95)	264,45 (227,15 - 311,3)	242,7 (211,5 - 296,95)	0,65
TFPI	30,93 (18,53 - 35,83)	32,85 (21,9 - 43,29)	32,47 (26,06 - 42,08)	0,62
vWF	1452 (1073,4 - 1908,15)	1640,45 (1139 - 1924)	1553,25 (1100 - 2042,9)	0,86
TM	2,94 (1,7 - 3,16)	3,16 (2,61 - 3,9)	2,48 (1,55 - 5,01)	0,54
TAT	4,2 (2,92 - 5,05)	2,71 (2,21 - 3,84)	2,62 (1,98 - 4,27)	0,058
fibrynoliza				
t-PA	4,4 (3,7 - 6,98)	5,58 (3,16 - 7,96)	8,2 (5,95 - 11)	1 vs 3 p=0,024, 2 vs 3 p=0,016
PAI-1	21,08 (15,52 - 30,38)	24,79 (16,78 - 35,49)	31,29 (24,95 - 33,56)	0,075
d-dimery	310 (219,25 - 686)	231 (170,75 - 401,25)	293 (248 - 643)	0,27
czynniki zapalenia				
fibrynogen	3,3 (3,1 - 3,65)	3,3 (2,73 - 3,58)	3,7 (3,1 - 4)	0,052
CRP	1,51 (0,64 - 3,49)	1,31 (0,4 - 2,73)	1,75 (1 - 5,84)	0,25
IL-6	1,62 (0,5 - 3,65)	1,33 (0,55 - 2,63)	2,26 (0,5 - 4,46)	0,46
IL-10	5,95 (1 - 6,65)	3,39 (1 - 7,08)	6,9 (5,65 - 8,83)	1 vs 3 p=0,049
TGF-β1	7931,18 (6478,19 - 10304,1)	7820,71 (6328,77 - 10628,21)	8327,26 (6618,66 - 10370,28)	0,94
bFGF >1	1 (5,9%)	2 (5,6%)	1 (5%)	0,95

TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, p-value – istotność statystyczna.

Z tabeli wynika, że w materiale pobranym przed przeprowadzeniem próby oziębienia u pacjentów z 3^o zmian w obrazie kapilaroskopowym stężenie t-PA jest istotnie wyższe niż u pacjentów z 1^o (p=0,024) oraz z 2^o (p=0,016) zmian w obrazie kapilaroskopowym, a stężenie IL-10 u tych pacjentów jest istotnie wyższe niż u pacjentów z 1^o zmian w obrazie kapilaroskopowym (p=0,049).

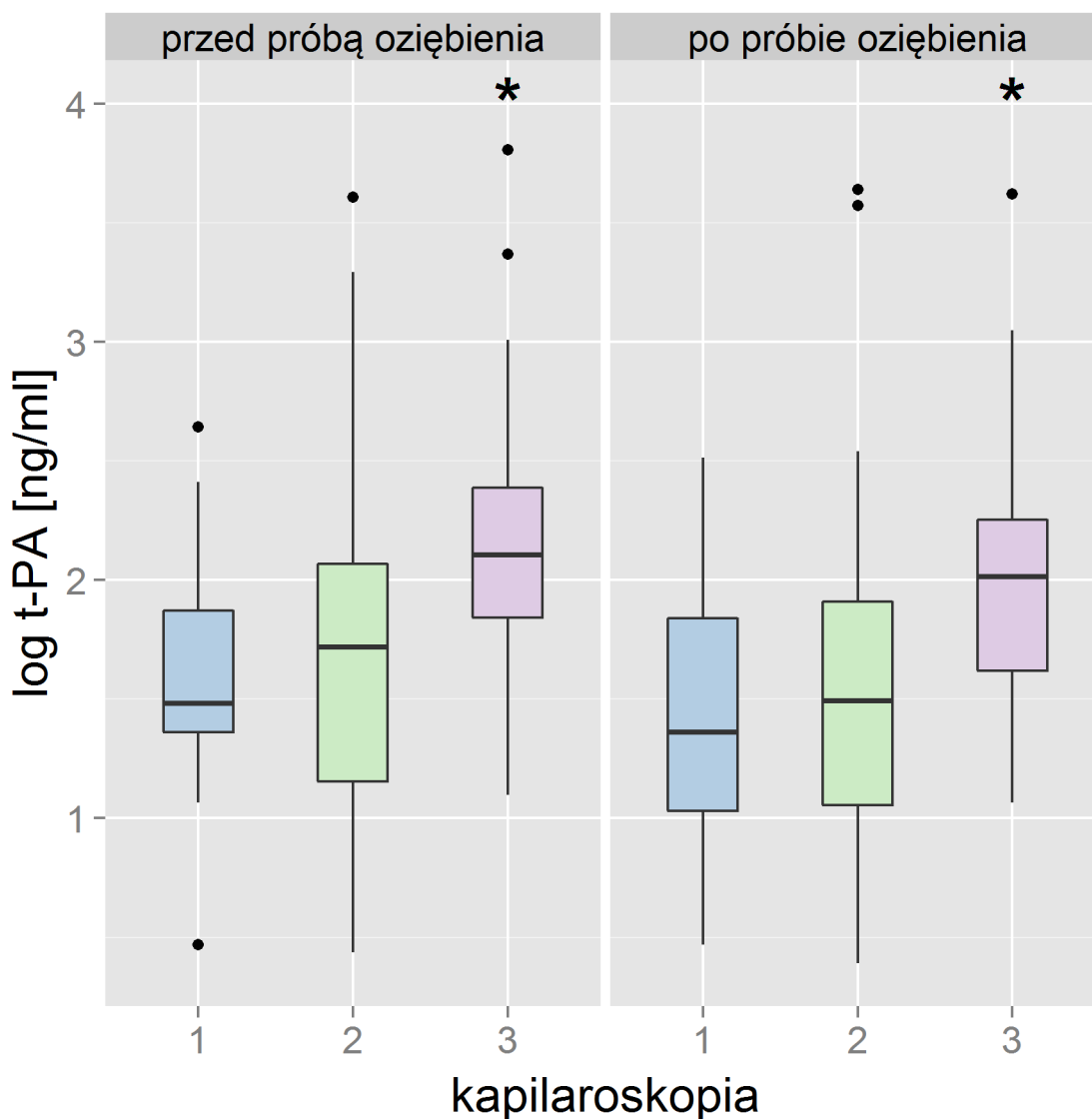
Tabela XXV Zależność czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u wszystkich pacjentów po przeprowadzeniu próby oziębienia a stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym

	stopień zmian w obrazie kapilaroskopowym			p-value
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	
krzepnięcie				
TF	241 (214,5 - 395,58)	246 (214,5 - 302)	310 (238,15 - 360,55)	0,14
TFPI	32,93 (24,65 - 39,85)	34,03 (20,9 - 44,67)	30,98 (25,65 - 35,05)	0,94
vWF	1580 (1089,55 - 2013,18)	1540 (1040,3 - 1990,8)	1432,35 (1031,9 - 2497,3)	0,99
TM	2,98 (1,5 - 3,51)	3,05 (2,5 - 3,58)	2,7 (1,33 - 3,84)	0,79
TAT	2,63 (2,04 - 5,32)	2,62 (2,2 - 4,48)	2,98 (2,22 - 6,21)	0,74
fibrynoliza				
t-PA	3,9 (2,73 - 6,58)	4,46 (2,85 - 6,91)	7,5 (4,93 - 9,57)	1 vs 3 p=0,015, 2 vs 3 p=0,013
PAI-1	19,12 (12,75 - 26,31)	17,95 (11,59 - 30,06)	27,78 (20,13 - 32,97)	1 vs 3 p=0,013
d-dimery	244 (188,25 - 667)	173 (170 - 461,5)	258,5 (171 - 380)	0,39
czynniki zapalenia				
fibrynogen	3,3 (3,1 - 3,65)	3,2 (2,93 - 3,4)	3,6 (3,05 - 3,85)	0,2
CRP	1,2 (0,54 - 2,38)	1,2 (0,4 - 2,58)	2,2 (0,78 - 5,45)	0,22
IL-6	1,2 (0,5 - 3,32)	1,354 (0,81 - 2)	2,25 (0,5 - 3,31)	0,83
IL-10	5,705 (1 - 6,73)	4,25 (1 - 7,85)	6,93 (5,78 - 8,62)	1 vs 3 p=0,02, 2 vs 3 p=0,048
TGF-β1	9309,87 (7279,83 - 10752)	7494,15 (4601,21 - 10036,62)	8023,68 (4945,6 - 10464,09)	0,53
bFGF >1	2 (11,8%)	1 (2,8%)	2 (10%)	0,39

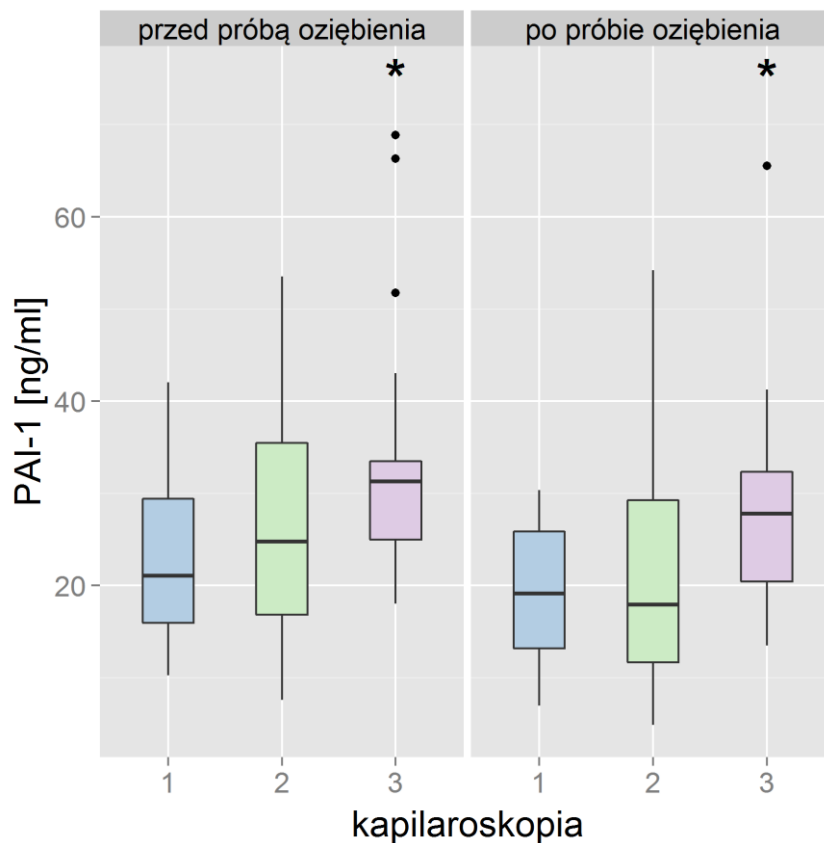
TF – czynnik tkankowy, TFPI – inhibitor drogi krzepnięcia inicjowanej przez TF, vWF – czynnik von Willebranda, TM – trombomodulina, TAT – trombina-antytrombina, t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, CRP – białko C reaktywne, IL-6 – interleukina 6, IL-10 – interleukina 10, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu-β1, bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, p-value – istotność statystyczna.

Z tabeli wynika, że w materiale pobranym po przeprowadzeniu próby oziębienia u pacjentów z 3^o zmian w obrazie kapilaroskopowym stężenie t-PA jest istotnie wyższe niż u pacjentów z 1^o (p=0,015) oraz z 2^o (p=0,013) zmian w obrazie kapilaroskopowym, a stężenie PAI-1 istotnie wyższe niż u pacjentów z 1^o zmian w obrazie kapilaroskopowym (p=0,013).

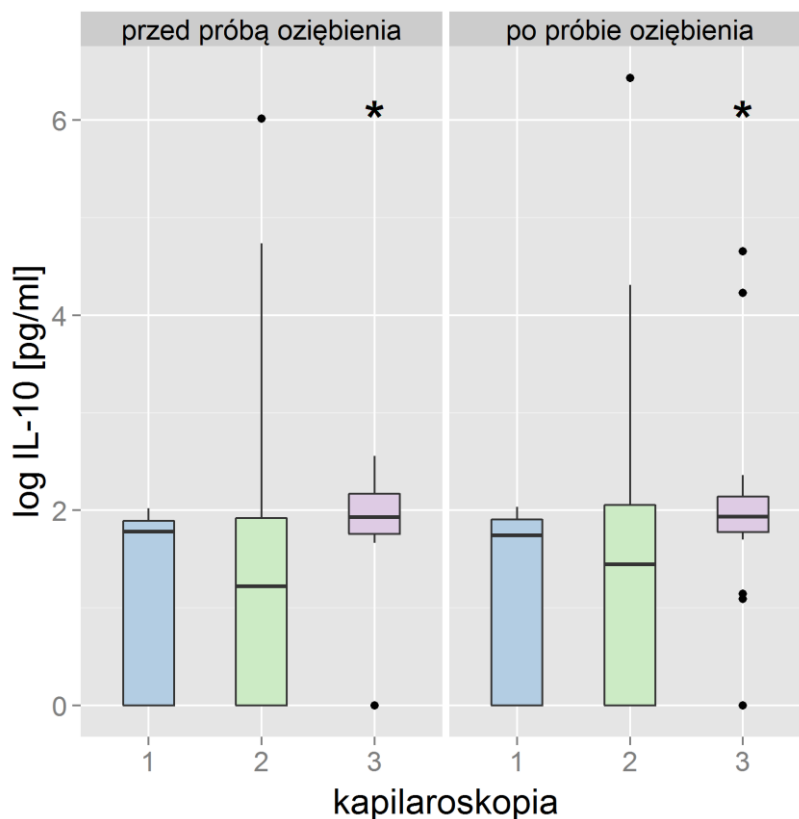
Stężenie IL-10 u pacjentów z 3^o zmian w obrazie kapilaroskopowym jest istotnie wyższe niż u pacjentów z 1^o (p=0,02) oraz z 2^o (p=0,048).



Wykres 53. Istotnie wyższe zlogarytmizowane stężenie t-PA zarówno przed, jak i po przeprowadzeniu próby oziębienia u pacjentów z 3 stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym niż w pozostałych dwóch grupach.



Wykres 54. Istotnie wyższe stężenie PAI-1 po przeprowadzeniu próby oziębienia u pacjentów z 3 stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym niż u pacjentów ze stopniem 1.



Wykres 55. Istotnie wyższe zlogarytmizowane stężenie IL-10 przed przeprowadzeniem próby oziębienia u pacjentów z 3 stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym niż w pacjentów ze stopniem 1, a po przeprowadzeniu próby- niż ze stopniem 1 i 2.

6. Omówienie wyników i dyskusja

Objaw Raynauda to wzmożona reakcja układu krążenia na spadek temperatury otoczenia oraz na stres. Obniżenie temperatury nie musi być duże ani długotrwałe, by obserwować u pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby bardzo silne epizody skurczu naczyń. Występuje napadowe, odwracalne blednięcie i zasinienie skóry palców jako dwie następujące po sobie fazy lub jedna zmiana koloru skóry jako faza pierwsza, po czym dochodzi do przekrwienia, któremu towarzyszy niekiedy silny ból. Pacjenci z pierwotnym RP mają mniej nasilone dolegliwości i lepsze rokowanie niż pacjenci z wtórnym RP, u których objaw ma znacznie cięższy przebieg. Istnieje u nich również większe ryzyko powstania zmian troficznych.

Mimo coraz częściej pojawiającego się w literaturze zagadnienia występowania objawu Raynauda, patomechanizmu jego powstawania oraz stosowanej terapii, na wiele pytań do tej pory nie są znane odpowiedzi. Dzięki stosunkowo niedawno określonym jasnym kryteriom rozpoznania RP oraz różnicowania między pierwotnym i wtórnym jego charakterem istnieje szansa na intensyfikację badań, trafną interpretację otrzymanych wyników, dokładne poznanie tej jednostki chorobowej, a co za tym idzie – skuteczne leczenie.

W tabeli I zawarto wybrane cechy charakterystyczne 78 pacjentów włączonych do badania, którzy zgłaszali zmiany koloru skóry palców dłoni lub stóp i u których klinicznie potwierdzono RP. Znaczny odsetek badanych (87,2%) stanowiły kobiety, co potwierdza obserwacje innych badaczy o kilkakrotnie częstszym występowaniu RP wśród kobiet [70]. Zauważono, że przepływ krwi w naczyniach tętniczych palców młodych kobiet jest bardziej wrażliwy na obniżenie temperatury, a w odpowiedzi na lokalne narażenie na niską temperaturę osiąga znacznie mniejsze wartości niż u młodych mężczyzn [113]. Naidu i wsp. opisali występowanie wśród kobiet skurczu tętnic palców w odpowiedzi na miejscową ekspozycję na obniżenie temperatury, czego nie zaobserwowali u mężczyzn [181]. Może to być powodem znamiennej szybszego powrotu skórniego przepływu krwi do wartości prawidłowych u płci męskiej. U kobiet prócz tego, że czas ten jest dłuższy, to dodatkowo ujemnie koreluje ze stężeniem 17 β -estradiolu, czyli im wyższe jest jego stężenie, tym dłużej przepływ jest zmniejszony. Wrażliwość skórniego krążenia na ochłodzenie jest największa podczas fazy lutealnej cyklu menstruacyjnego i mimo wyższej wtedy temperatury ciała jej pomiary na palcach wskazywały niższe wartości niż w innych fazach cyklu [182, 183].

Tabela V przedstawia podział zebranych danych klinicznych wszystkich przebadanych pacjentów względem charakteru RP. Zaobserwowano, że wszyscy włączeni do badania mężczyźni należeli do grupy pacjentów z wtórnym RP ($p=0,011$), w której jednak wciąż przeważały kobiety. Ponadto statystycznie istotną różnicę stanowił wiek pierwszego wystąpienia RP—później następował pierwszy napadowy skurcz naczyń u mężczyzn ($p=0,037$) oraz jeżeli był objawem choroby podstawowej ($p=0,001$). Zależność ta jest zgodna z cechami charakterystycznymi wtórnego RP w porównaniu do pierwotnego, które zaprezentowali Bakst i wsp. [68]. Określili m.in., że pierwszy epizod RP pojawiający się po 30 roku życia może sugerować wtórny charakter objawu. Niedawne publikacje również wskazują na późniejszy wiek pojawienia się pierwszego RP w porównaniu do wieku pacjentów z pierwotnym objawem Raynauda, jednak za statystycznie istotny dla podłoża chorób układowych tkanki łącznej (CTD) podają >40 lat [184]. Te dwie obserwacje, czyli statystycznie istotny częstszy udział mężczyzn oraz istotnie starszy wiek pacjentów w grupie z wtórnym RP, potwierdzają wcześniejsze pojawianie się epizodu skurczu naczyń palców u młodych kobiet. Pierwotny RP najczęściej po raz pierwszy objawia się w wieku nastu lub dwudziestu lat, ale opisano również jego występowanie w bardzo wczesnym dzieciństwie [185]. W badaniach prowadzonych na grupie dzieci w wieku od 12 do 15 lat również zauważono predylekcję płci żeńskiej do występowania RP. W grupie 903 nastolatków RP stwierdzono u 15% badanych— 18% dziewczynek i 12% chłopców [69].

Uwagę w tabeli V zwraca również wysoki odsetek pacjentów z chorobami układowymi tkanki łącznej. Spośród 49 pacjentów, u których stwierdzono wtórny charakter RP, aż 30 cierpiało na CTD ze znaczną przewagą twardziny układowej zarówno uogólnionej (dSSc) ($n=10$), jak i ograniczonej jej formy (ISSc), dawniej zwanej zespołem CREST ($n=3$) oraz mieszanej choroby tkanki łącznej (MCTD) czyli zespołu Sharpa ($n=8$). U pozostałych pacjentów rozpoznano niesklasyfikowaną chorobę układową tkanki łącznej (UCTD) ($n=5$) oraz zespół Sjögrena (SS) ($n=4$).

Wśród jednostek chorobowych stanowiących podłoże rozpoznawanego wtórnego RP znaczną część stanowią zdefiniowane choroby układowe tkanki łącznej, które zwracają największą uwagę ze względu na ścisły związek z objawem. W przebiegu CTD skurcz naczyń jest bardzo nasilony i długotrwały, napady zdarzają się często i mogą prowadzić do poważnych komplikacji naczyniowych. Częściej powstają owrzodzenia pozostawiające po sobie blizny, a w najcięższych

przypadkach dochodzi do resorpcji kości a nawet amputacji paliczków [186]. Spośród wszystkich włączonych do badania pacjentów z RP, trzynastu zgłaszało w wywiadzie występowanie owrzodzeń palców rąk. U jedenastu z nich rozpoznano wtórny RP.

RP niejednokrotnie pojawia się jako pierwsza kliniczna manifestacja CTD i jest sygnałem do rozpoczęcia diagnostyki przede wszystkim w kierunku tej grupy chorób [55].

Aż 96% pacjentów chorych na SSc zgłasza RP [187]. Opisano występowanie objawu u wszystkich pacjentów z zespołem CREST [188]. W 2013 roku uznano RP za objaw choroby umożliwiający wcześniejsze postawienie diagnozy i włączono go do kryteriów klasyfikacyjnych SSc ACR/EULAR [189], a rok później ujęto w prospektywnym badaniu o nazwie VEDOSS zaprojektowanym przez EUSTAR [190]. Prócz tego, że RP jest bardzo powszechny wśród chorych na SSc, to dodatkowo jego przebieg jest w tej chorobie najcięższy i do powikłań naczyniowych oraz tak drastycznych komplikacji jak akroliza dochodzi najczęściej u pacjentów z twardziną.

Na drugim miejscu w częstości występowania RP u pacjentów z CTD są osoby z MCTD, spośród których 86% prezentuje objaw Raynauda [191]. Opublikowano jednak prace, które opisują podobne jak w SSc, bo aż 94,5% współwystępowanie RP i MCTD [192]. W przypadku MCTD spełnione są kryteria przynajmniej jednej CTD, ale również występują objawy innych chorób układowych tkanki łącznej. U tych pacjentów obserwuje się mniej nasilone napady skurczu naczyń niż u badanych z SSc, a co za tym idzie—rzadziej występują zmiany troficzne paliczków.

Chociaż toczeń rumieniowaty układowy (SLE) jest częściej niż SSc rozpoznawaną CTD, to jednak RP występuje u 31% – 46% cierpiących na tę chorobę, co w stosunku do jego rozpowszechnienia w SSc i MCTD stanowi niewielki odsetek pacjentów [193]. Pacjentki ze SLE istotnie częściej prezentują RP niż mężczyźni – odpowiednio 40,9% i 3,0%, a w przypadku późnej manifestacji choroby, RP występuje znacznie rzadziej [194, 195].

Objawy spotykane u pacjentów z UCTD nie spełniają wszystkich kryteriów rozpoznania chorób z zakresu CTD. Część pacjentów rozwija z czasem laboratoryjne lub kliniczne objawy, które jednoznacznie wskazują na określoną CTD. Najczęściej w ciągu pierwszych 5 lat trwania choroby pacjenci rozwijają SLE, SSc, SS, MCTD, RZS, zapalenie naczyń lub miopatie [196]. RP występuje u 30% chorych na UCTD i u tych, u których nie dochodzi do zdefiniowania CTD, ma łagodny przebieg [197].

Opisano występowanie RZS u 8% – 32% pacjentów z zespołem nakładania, w szczególności łącznie z SS i SS [198]. Częstość z jaką RZS przebiega z RP nie jest jednoznacznie określona. Opisuje się ją w dość szerokim zakresie 3% – 22% oraz zaobserwowano dodatnią korelację między mianem czynnika reumatoidalnego oraz długości trwania RP [199].

Wśród przebadanych przez Garcia-Carrasco i wsp. pacjentów z SS 13% prezentowało RP i u prawie połowy objaw był pierwszą manifestacją choroby. Przebieg kliniczny RP jest łagodniejszy u pacjentów z SS niż u tych z SS. Jedynie 40% pacjentów wymaga leczenia farmakologicznego i nie występują u nich komplikacje naczyniowe [200].

Wraz z wiekiem pacjentów bardziej powszechna staje się miażdżycza i ujawniają się skutki narażenia zawodowego. Wtedy odnotowuje się większą liczbę mężczyzn zgłaszających się do lekarza z powodu RP [72]. Mimo ogromnej przewagi występowania pierwotnego RP oraz wtórnego do CTD, przyczyny związane z urazami oraz narażeniem na wibracje są istotnym czynnikiem powodującym epizody naczynioskurczowe zwłaszcza u mężczyzn. Powtarzające się oddziaływanie wibracji jest najczęstszą przyczyną skurczu naczyń wywołanego urazem, a wśród chorób zawodowych RP jest najczęstszym objawem HAVS i HHS [201]. Określono urządzenia, które z największą, sięgającą 45%, częstością wywołują RP u pracowników je obsługujących – pneumatyczne noże i wiertarki udarowe, młoty, szlifierki, polerki oraz piły łańcuchowe [202, 203]. Do tej pory w piśmiennictwie pojawiło się kilka nazw dla RP w przebiegu HAVS – vibration-induced white finger, vibration white finger, vibration Raynaud's syndrome, vibration-induced Raynaud's phenomenon. W grupie włączonych do badania własnego mężczyzn z RP 50% cierpiało na HAVS. Istotnie rzadziej choroba dotyczyła kobiet ($p < 0,0001$). Wiele publikacji potwierdziło związek występowania RP u pacjentów, którzy zawodowo narażeni byli na wibracje. Mogą one powodować zaburzenia czucia, a przy długotrwałej ekspozycji wzrasta ryzyko rozwoju choroby wibracyjnej. Palmer i wsp. zbadali, że wśród wykonujących zawody predystynujące do HAVS, około 30% mężczyzn prezentowało RP w stosunku do jedynie 4% kobiet [204]. Charakterystyczna dla VRP jest obecność bledkości i drętwienia z rzadko pojawiającym się sinieniem, czy bólem oraz asymetryczność objawu. Uważa się, że nie występuje na palcach stóp. Ta obserwacja, poprzedzona dodatnim wywiadem w kierunku narażenia pacjenta na wibracje, potwierdza diagnozę. Bardzo rzadko, w ciężkich przypadkach, zdarzają owrzodzenia palców dłoni [205].

Chociaż najczęstszą przyczyną HHS są powtarzalne urazy dłoni, jednak zespół ten może rozwinąć się po jednokrotnym urazie [206]. To samo narażenie na wibracje wywołujące HAVS, może powodować również HHS [207]. Bezpośrednią przyczyną są zaburzenia przepływu krwi z powodu urazu tętnicy łokciowej, który następuje w miejscu jej przebiegu nad kością haczykową. W rezultacie dochodzi do zakrzepicy lub powstania tętniaka. Pracowników budowlanych, operatorów narzędzi pneumatycznych i wibrujących, stolarzy, mechaników i blacharzy określono jako zawody o najwyższym ryzyku uwolnienia zatoru w przebiegu HHS. Również wśród osób z zespołem młotkowym kłębika często znajdowali się sportowcy, jak rowerzyści, hokeiści, tenisści czy golfiści [188]. RP w większości przypadków jest jednostronny. Nawet u ponad 40% pacjentów dochodzi do martwicy palców dłoni. Zmiany zabarwienia skóry palców oraz temperatury występujące w HHS są mniej wyraźne niż odbywa się to w typowym RP. Brak trójfazowego przebiegu objawu może sugerować diagnozę, którą jako pierwsza potwierdzi próba Allena. Konieczne jest jednak przeprowadzenie badania USG Doppler oraz arteriografii. W przeciwieństwie do HAVS, RP na podłożu HHS jest potencjalnie uleczalne, zatem istotne jest rozróżnienie tych dwóch jednostek u pacjentów, u których czynniki wywołujące mogą być bardzo podobne [208].

Zespół cieśni nadgarstka (CTS) jako wtórną przyczynę RP określono u 5 pacjentów włączonych do badania własnego, co stanowi 12,2%. Hartmann i wsp., stosując metaanalizę, określili współwystępowanie tej dolegliwości i RP na poziomie 15,5%, jednak stwierdzili konieczność przeprowadzenia badań na dużej, jednorodnej grupie pacjentów [209]. CTS również opisano jako pierwotny i wtórny występujący w przebiegu SSc. Obrzęk powoduje ucisk nerwu pośrodkowego, wywołując objawy CTS – w tym RP, które mogą ustąpić bez konieczności interwencji chirurgicznej, gdy w miejsce obrzękowej, postępuje faza stwardnieniowa. Machel i wsp. zasugerowali, że pacjenci z CTS powinni być obserwowani w kierunku wczesnie rozpoznanej SSc [210].

Degeneracyjne choroby naczyń zostały opisane jako najczęstsza wtórna przyczyna RP wśród starszych pacjentów. Obserwowano aż 60% występowanie RP wśród pacjentów po 60 roku życia z rozpoznaną miażdżycą [211]. W badaniu własnym spośród pacjentów z RP u trzynastu (16,7%) rozpoznano miażdżycę zarostową (tabela II), jednak nie była ona przyczyną wystąpienia wtórnego RP.

W przeprowadzonym badaniu zauważono tendencję wśród pacjentów z wtórnym RP do nikotynizmu (tabela VI). Zdania na temat wpływu palenia papierosów na patogenezę RP są podzielone. Suter i wsp. opisali wyższe ryzyko występowania RP u palących mężczyzn [212], jednak wcześniejsza obszerna praca zaprzecza tej tezie, wskazując brak powiązania między paleniem papierosów a występowaniem RP [213]. Nikotynizm zdecydowanie negatywnie wpływa na ciężkość przebiegu RP i występowanie owrzodzeń skóry palców w SSc [214]. Wśród pacjentów z HAVS palący mieli niższe ciśnienia skurczowe mierzone na palcach rąk [215].

W badaniu własnym zauważono istotnie niższy BMI ($p < 0,0001$) w grupie pacjentów z pierwotnym RP (tabela VI). Istotnie częściej pacjenci, u których RP wynikało z choroby podstawowej, prezentowali nieprawidłowo wysoki współczynnik masy ciała. Nie zauważono już istotnych różnic po przeprowadzeniu próby oziębienia i podziale pacjentów względem jej wyniku, mimo że dodatni wynik próby istotnie częściej występował wśród pacjentów z CTD. Porównano BMI pacjentów z CTD do wartości wskaźnika tych, u których występowała inna przyczyna RP, jednak również istotność nie zaistniała. Zauważono jednak, że BMI tylko jednego pacjenta z pierwotnym RP przekroczył wartość 30, a znaczna większość wykazywała wartości w granicach normy lub niższe. Brak istotności i jednoznacznych wyników może być spowodowane zbyt małą liczebnością grup.

W ostatnich doniesieniach Giurgea i wsp. opisali badania nad związkiem m.in. BMI z temperaturą skóry po przeprowadzeniu próby oziębienia. Zauważyli odwrotną korelację tych dwóch czynników. Im wyższe BMI, tym większy spadek temperatury wyrażony w procentach po przeprowadzonym teście prowokacji. Ponadto zauważyli, że temperatura skóry oraz perfuzja przed lokalnym ochłodzeniem zwiększały się wraz ze wzrostem BMI, czyli wyjściowe wartości były niższe u osób z niskim, a wysokie u tych z wyższym BMI [216].

Flavahan, wzięwszy pod uwagę obniżoną temperaturę ciała u pacjentów z RP w warunkach komfortu cieplnego, większy jej spadek podczas próby oziębienia, ale też brak różnicy między pacjentami z RP a osobami zdrowymi podczas ogrzewania, wysunął tezę nieprawidłowej odpowiedzi termogenicznej [217]. W swych badaniach poświęca wiele uwagi brunatnej tkance tłuszczowej (BAT), która bierze udział w termogenezie. W ostatnich latach odkryto, że BAT występuje głównie w okolicy nadobojczykowej również u dorosłych oraz jest rozszkana wśród komórek białej tkanki tłuszczowej (WAT). Stymulacja współczulna również w warunkach obniżonej temperatury prowadzi do transdiferencjacji komórek WAT do komórek BAT. Takie

same morfologiczne, genetyczne i proteomiczne cechy co BAT okazała się mieć okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa (PVAT) [218]. Jej rola w termogenezie polegać może na tym, że po narażeniu na niskie temperatury, poprzez unerwienie współczulne, zwiększa się w niej produkcja ciepła. Zatem prócz indukowanej zimnem reakcji wazokonstrykcyjnej mięśni gładkich, która przeciwdziała utracie ciepła, dołącza się jego produkcja w PVAT. Opisano większą aktywność BAT u kobiet oraz jej odwrotną korelację z wiekiem i BMI. Uważa się, że BAT u dorosłych może zapobiegać otyłości [219].

Wnioski obydwu badaczy uzupełniają się. Wyższe BMI pośrednio oznacza mniejszą aktywność termogenezy, mimo stymulacji układu współczulnego. Konieczne są jednak dalsze badania w tym kierunku. Słabsza odpowiedź na narażenie na niskie temperatury może objawiać się występowaniem RP lub jego cięższym przebiegiem i groźniejszymi skutkami.

Tabela VII zawiera wyniki standardowych badań laboratoryjnych oraz badań na obecność ANA u pacjentów z RP z uwzględnieniem podziału na pierwotny i wtórny jego charakter. Mimo pojawienia się istotnych różnic między obiema grupami, jak np. istotnie wyższe stężenie HDL we krwi pacjentów z pierwotnym RP wynikające najprawdopodobniej z ich młodszego wieku, to wszystkie zmienne – prócz stężenia ANA – mieszczą się w granicach normy.

Przeciwciała to niewielkie glikoproteiny produkowane przez komórki plazmatyczne (pobudzone limfocyty B). Biorą udział w odpowiedzi humoralnej układu odpornościowego, identyfikując i eliminując obce cząsteczki, jak np. bakterie, wirusy czy pasożyty zewnątrzkomórkowe. Autoprzeciwciała są skierowane przeciwko antygenom gospodarza. Generacja autoprzeciwciał jest prawidłową, fizjologiczną reakcją organizmu pozwalającą usunąć cząstki martwych komórek lub komórki atypowe, które mogą stać się rakowymi. W warunkach prawidłowych delecja klonalna przeciwdziała wzmożonej proliferacji komórek produkujących autoprzeciwciała. Wysokie miana autoprzeciwciał w chorobach autoimmunologicznych odkryto po raz pierwszy w SLE. Wiele z autoprzeciwciał było skierowanych przeciw zawartości jądra, jak np. DNA i nazwano je przeciwciałami przeciwjądrowymi. Autoprzeciwciała mogą jednakże być skierowane przeciwko macierzy zewnątrzkomórkowej, elementom błony komórkowej lub cytoplazmie i jej składnikom. Od momentu ich odkrycia powiązano określone autoprzeciwciała z poszczególnymi jednostkami chorobowymi, zatem stały się niezwykle

pomocne w diagnostyce, ale również odgrywają rolę w monitorowaniu przebiegu choroby i jako narzędzie prognostyczne.

Obecność ANA można oznaczyć u około 25 – 30% zdrowych osób, jednak w niskim mianie 1:40 lub jako niespecyficzne autoprzeciwciała [220]. W badaniu własnym dodatkowo wysokie miano ANA prezentowało 39 (50%) pacjentów z RP (tabela III). Wszyscy należeli do grupy z wtórnym RP (tabela VII). 30 z nich cierpiało na CTD i wykazywało stężenie specyficznych autoprzeciwciał w badaniu ANA profil 3. Pozostałym dziewięciu pacjentów prezentowało niskie miano ANA określane w wynikach laboratoryjnych jako ślad lub wynik wątpliwy. Obecność autoprzeciwciał wynikała w tych przypadkach z odmiennych przyczyn niż CTD, jednak występowały inne cechy wskazujące na wtórny charakter RP. W grupie 78 badanych u żadnego pacjenta z pierwotnym RP nie opisano dodatniego wysokiego miana ANA. Dodatkowo niskie miano ANA występują częściej wraz ze starszym wiekiem pacjentów, obecnością infekcji, współistniejącą chorobą lub procesem nowotworowym oraz przyjmowaniem niektórych leków. Prete i wsp. opisali występowanie ANA w niskich mianach w osoczu także u pacjentów z pierwotnym RP [55]. W klasyfikacji CTD istotne jest nie tyle miano ANA, ile obecność charakterystycznych dla danej choroby autoprzeciwciał. W przypadku braku innych klinicznych cech CTD, przy współwystępowaniu RP oraz dodatniego miana ANA, wzrasta prawdopodobieństwo rozwoju pełnoobjawowej choroby z zakresu CTD i tych pacjentów należy systematycznie kontrolować oraz powtórzyć badania na obecność ANA, jeżeli pojawią się objawy mogące wskazywać na CTD. Ziegler i wsp., obserwując pacjentów z RP i dodatnim mianem ANA przez 12 lat, określili ryzyko rozwoju CTD na poziomie 30%. Spośród pacjentów z RP i brakiem obecności ANA w badaniach laboratoryjnych u 9,2% zdiagnozowano chorobę układową tkanki łącznej jako podstawową [221]. Hirschl i wsp. opisali, że z grupy pierwotnego RP w ciągu roku 2% badanych było klasyfikowanych do grupy 'podejrzewanych o wtórny charakter RP', a u 1% badanych zdiagnozowano CTD. Średni okres od podejrzenia wtórnego charakteru RP do jego ostatecznego potwierdzenia wynosił 5 lat. Określili także miano ANA $\geq 1:320$ jako związane z wysokim ryzykiem rozwoju CTD u badanych [81]. Specyficzne dla poszczególnych CTD autoprzeciwciała zostały włączone do kryteriów klasyfikacyjnych SSc i SLE [189, 222]. Autoprzeciwciała charakterystyczne dla SSc to ACA, Scl-70, Th/To, przeciw RNA polimerazie III (RNAP III), przeciw fibrylarynie (U3nRNP). Warto zaznaczyć różne nazewnictwo pojawiające się w publikacjach, np. ACA stosuje się zamiennie z anty-CENP.

Większe komplikacje występują w przypadku autooprzeciwciał Scl-70, których poprawna nazwa, dzięki najnowszym odkryciom, powinna brzmieć ATA (anti-topo I antibody), jednak powszechnie stosowana jest wcześniejsza nomenklatura. Wśród pacjentów z SSc RP występuje często jako pierwsza manifestacja choroby [223], co czyni określenie miana ANA na tyle istotnym we wczesnej diagnostyce, że zostało włączone do kryteriów klasyfikacyjnych wczesnego i bardzo wczesnego rozpoznania SSc przy braku cech zajęcia organów wewnętrznych czy skóry [190].

Mimo występowania pewnych rozbieżności w literaturze co do procentowego ryzyka konwersji pierwotnego RP we wtórny na podłożu SSc, pewnym jest, że obecność autooprzeciwciał zwiększa to ryzyko. RP jest charakterystycznym dla SSc objawem, a występowanie określonych autooprzeciwciał – Scl-70, anty-RNAP III, ACA, U1nRNP i U3nRNP – związane jest z jego cięższym przebiegiem – silniej wyrażoną mikroangiopatią, krótszym czasem od pierwszego pojawienia się RP do wystąpienia owrzodzeń, większym ryzykiem powstania zmian troficznych czy wystąpienia wskazań do przeprowadzenia chirurgicznej amputacji palców [224].

Przeciwciała nRNP/Sm, zwłaszcza U1nRNP, są znamienne dla MCTD. Uznaje się, że zarówno w MCTD, jak i SLE jest możliwy również ich udział w przebudowie naczyniowej [225].

Chociaż zauważono powiązanie między specyficznymi dla SLE autooprzeciwciałami oraz objawami klinicznymi, jak w przypadku dsDNA i niewydolnością nerek, nie dopatrzono się podobnych zależności z występowaniem RP. Obecność ACA wykazano u około 5,6% pacjentów ze SLE, spośród których u 75% występował RP [226].

Taką samą zależność opisano wśród pacjentów z SS, u których dodatkowo RP zaznaczał się silniej w obecności ACA [227].

Istnieją doniesienia, że autooprzeciwciała nie tylko wskazują na występowanie CTD, ale również mają swój udział w patogenezie tych chorób poprzez uszkodzenie śródbłonka na drodze aktywacji dopełniacza, opsonizacji oraz pobudzania lub inhibicji receptorów komórkowych [228]. Uważa się, że uszkodzenie i dysfunkcja śródbłonka mają swój udział w patogenezie RP, zwłaszcza w SSc, jednak nie udowodniono tego związku z wysoce specyficznymi dla twardziny autooprzeciwciałami [229].

Przeciwciała skierowane przeciwko komórkom śródbłonka (AECA) zostały oznaczone u 86% pacjentów z SSc i są związane ze zwiększoną częstością występowania zmian troficznych skóry palców. Udowodniono asocjację wielkości ich miana z ciężkością przebiegu RP u tych pacjentów, co może wskazywać na związek patogenetyczny oraz bezpośredni ich wpływ na występowanie waskulopatii [230]. Prowadząc badania nad AECA w SSc, udowodniono, że mają one zdolność wywołania apoptozy komórek śródbłonka oraz uwolnienia chemokin i cytokin, co stanowi dowód, że ANA biorą udział w modyfikacji struktury aż do remodelingu naczyń w twardzinie [231]. AECA zostały oznaczone również w innych CTD. W MCTD ich stężenie było znacznie wyższe w aktywnej postaci choroby i korelowało z ciężkością przebiegu RP. W grupie chorych z RP towarzyszącym SS ich stężenie było wyższe niż u chorych z SS bez RP. Występowanie wyższego stężenia opisano również w SLE z RP, jednak bez statystycznie istotnej różnicy w porównaniu do SLE bez RP [232].

W badaniu własnym u niewielu pacjentów, bo jedynie u 19 z 78 poddanych lokalnemu działaniu niskiej temperatury, udało się wywołać RP. Wynik ten może się wiązać ze znacznie słabszą reakcją wazokonstrykcyjną podczas miejscowego narażenia w porównaniu do obniżenia temperatury całego ciała. Carter i wsp. uzyskali naczynioskurczową odpowiedź na test prowokacji zimnem u 109 z 125 pacjentów z wtórnym RP, u 21 z 37 z pierwotnym oraz niepewnym co do przyczyny go wywołującej oraz u 2 z 63 niezgłaszających objawów naczynioruchowych. Określili wysoką adekwatność testu we wtórnym RP w porównaniu do pierwotnego i o niepewnej przyczynie. Poza tym udowodnili, że lokalne narażenie na niską temperaturę daje niewielki niezależny efekt naczynioskurczowy w przeciwieństwie do ochłodzenia całego ciała, które określili jako niezbędne do wywołania RP [233].

Z rezultatów przeprowadzonej próby oziębienia zawartych w tabeli XII wynika, że istotnie częściej wynik próby oziębienia był dodatni, jeżeli występowało dodatkowo miano ANA we krwi pacjentów. Wśród badanych, u których wywołano objaw, znalazło się dziewięciu pacjentów (50%) z SSc, troje z MCTD, dwoje z SS, jeden z UCTD i czworo z pierwotnym RP. Występowanie waskulopatii, stanu uszkodzenia endotelium, może bezpośrednio przekładać się na łatwość wywołania objawu podczas prowokacyjnej próby oziębienia. Zwłaszcza że spośród trzynastu pacjentów z SSc, aż u dziewięciu wystąpił RP, a zmiany naczyniowe uważa się w tej chorobie za jedne z najcięższych. Efekty przeprowadzonego badania mogą stanowić potwierdzenie

udziału opisanej wyżej patogenetycznej roli autoprzeciwiactw w zaburzeniach prawidłowego funkcjonowania śródbłonna.

W tabeli X, w której zawarto ogólną charakterystykę badanej grupy pacjentów z uwzględnieniem podziału na ujemny i dodatni wynik próby oziębienia, zebrano wyniki wskazujące na to, że istotnie częściej niż u pacjentów z pierwotnym RP udaje się wywołać objaw u pacjentów z wtórnym RP. Uwagę zwraca znaczna przewaga dodatnich prób oziębienia wśród pacjentów z chorobami układowymi tkanki łącznej ($p < 0,0001$), a zwłaszcza u pacjentów z postacią uogólnioną twardziny układowej ($p < 0,0001$). Działanie niskich temperatur powoduje wzrost aktywności układu współczulnego w układzie krwionośnym skóry zarówno wśród zdrowych, jak i dotkniętych RP, jednak w tej drugiej grupie reakcja układu w postaci skurczu naczyń jest silniej wyrażona. Naidu i wsp. opisali następujące po ochłodzeniu rąk do 10°C zmniejszenie światła naczyń o 8,7% u pacjentów niezgłaszających incydentów naczyniospastycznych oraz o 92,4% u zgłaszających te objawy [181]. W wielu publikacjach udowodniono, posługując się radioizotopami, że w warunkach komfortu cieplnego wśród pacjentów z RP występuje mniejszy przepływ krwi przez naczynia palców dłoni niż wśród grupy kontrolnej [36, 234]. Podczas obniżenia temperatury otoczenia lub poddawania badanych działaniu niskiej temperatury oznaczany metodą pletyzmografii przepływ znacząco spadał [235], niejednokrotnie ustając zupełnie u pacjentów z SSc [236]. W badaniach przeprowadzonych na grupie 162 pacjentów z RP, w tym 56 z wtórnym, z których u 30 zdiagnozowano chorobę układową tkanki łącznej, a wśród nich SSc u 13, Carter i wsp. również opisali znacznie częściej występującą reakcję wazospastyczną po ochłodzeniu u pacjentów z wtórnym RP [233].

Podczas badania zaobserwowano tendencję do pozytywnego wyniku próby oziębienia wśród pacjentów, u których pierwszy epizod blednięcia palców pojawił się w późniejszym wieku ($p = 0,071$). Ta obserwacja pokrywa się z istotnie częściej występującym dodatnim rezultatem próby u pacjentów z wtórnym RP, ponieważ późny wiek wystąpienia RP jest jedną z cech wskazujących na istnienie choroby podstawowej.

Podobnie istotnie częściej próba oziębienia miała dodatni wynik, jeżeli pacjent zgłaszał w wywiadzie owrzodzenia skóry palców ($p = 0,02$). Również wiąże się to z występowaniem zmian troficznych u pacjentów z wtórnym RP, a w szczególności cierpiących na SSc i brakiem tych zmian u badanych z pierwotnym RP.

Z wyników przedstawionych w tabeli X można potwierdzić pośredni wpływ autoprzeciwciał na dodatni wynik próby oziębienia. Istotne różnice wśród przyczyn wtórnego RP prezentują jedynie choroby z grupy CTD. Chociaż poziom istotności wśród pacjentów ze zmianami kręgosłupa szyjnego wyniósł 0,036, to jednak u tych pacjentów, u których po oziębieniu wystąpił RP, została określona inna przyczyna objawu – dwoje pacjentów cierpiało na SSc i SS, a u pozostałych dwojga zdiagnozowano pierwotny RP. Poza tym nie wystąpiły żadne istotne różnice.

Zależność stopnia zmian w obrazie kapilaroskopowym od danych klinicznych pacjentów z RP zawiera tabela XXIII. Nie włączono do analizy danych pięciu pacjentów, u których albo obraz kapilaroskopowy nie był możliwy do oceny z powodu nasilonego obrzęku tkanek, albo nie można było przeprowadzić badania ze względu na drżenie rąk badanego.

Przypisując stopień zmian do uzyskanego w badaniu kapilaroskopowym obrazu, zastosowano trzystopniową skalę zaproponowaną przez Anrade i wsp. Skala ta zakłada szersze granice normy dla morfologii naczyń kapilarnych, uznając subtelne odchylenia za prawidłowe. Przeprowadzając wideokapilaroskopię i porównując cechy kliniczne pacjentów, ich objawy, nasilenie RP, jego charakter i przebieg, wywnioskowano, że największe znaczenie diagnostyczne mają zmiany, które są charakterystyczne dla danej choroby. Bardzo rzadko u zdrowych osób spotyka się idealne ułożenie architektoniczne pętli kapilarnych o kształcie 'spinki do włosów' i zachowanym prawidłowym stosunku szerokości prostych ramion.

Poddając analizie wiek pierwszego wystąpienia epizodu naczynioruchowego, można zauważyć istotną statystycznie różnicę między wiekiem pacjentów, którzy wykazywali 1⁰ ($p=0,061$) oraz 2⁰ ($p=0,008$) zmian a tymi, którzy należeli do grupy osób ze stopniem 3. Wraz z wiekiem pacjentów z RP nasilają się zatem zmiany w obrazie kapilaroskopowym. Może mieć to związek z wtórnym charakterem objawu, gdyż zmienna ta zachowuje się podobnie, czyli im starszy wiek pierwszej manifestacji nadmiernego skurczu naczyń, tym większe ryzyko podłoża chorobowego.

Dokładnie tak samo statystycznie rysują się istotne różnice wśród pacjentów, u których wynik próby oziębienia był dodatni. Istotnie częściej niż 1⁰ ($p=0,0012$) a także 2⁰ ($p=0,006$) określano 3⁰ zmian w obrazie kapilaroskopowym u badanych, u których udało się wywołać RP poprzez lokalną ekspozycję na niską temperaturę. Biorąc pod uwagę, iż u żadnego pacjenta z pierwotnym RP nie zinterpretowano obrazu jako najbardziej zaburzonego oraz że tylko

u jednego z nich wystąpił dodatni wynik próby oziębienia, można z całą pewnością określić nieprawidłowości występujące u tych badanych w obrębie krążenia skóry palców jako mniej nasilone, a naczynia jako mniej wrażliwe na lokalne obniżenie temperatury.

W tabeli znajduje się także statystycznie istotna różnica między drugim a trzecim stopniem nieprawidłowej morfologii naczyń kapilarnych u przebadanych, którzy w wywiadzie zgłaszali owrzodzenie palców rąk ($p=0,003$). Wystąpienie zmian troficznych może sugerować obecność nieprawidłowości w funkcjonowaniu naczyń zaopatrujących zajęty obszar. Mimo że nie wystąpiła statystyczna istotność między rozwojem takich zmian a charakterem RP, to jednak jedenastu z trzynastu pacjentów z dodatnim wywiadem w kierunku rozwoju owrzodzeń należała do grupy osób z wtórnym RP. Co ważne, badanie wideokapilaroskopowe ewidentnie potwierdziło różnice morfologiczne naczyń wału paznokciowego między osobami, u których doszło do powstania owrzodzeń a tymi, u których one nigdy nie wystąpiły.

Wśród przebadanych pacjentów z objawem Raynauda występującym w przebiegu choroby podstawowej istotne statystycznie różnice wystąpiły zarówno między pierwszym a drugim stopniem zmian ($p<0,0001$), drugim a trzecim ($p=0,012$) oraz pierwszym a trzecim ($p<0,0001$). Oznacza to, że jeżeli RP ma charakter wtórny, to jest większe prawdopodobieństwo, że towarzyszyć mu będą duże nieprawidłowości w obrazie kapilaroskopowym. Warto podkreślić jest także to, że wszyscy pacjenci, u których występował 3^o zmian, należeli do grupy RP o wtórnym charakterze, a prawidłową morfologię naczyń kapilarnych prezentowało aż 94,1% pacjentów z pierwotnym RP.

Aż u siedemnastu z dwudziestu uczestników badania, którym przypisano 3^o zmian w obrazie kapilaroskopowym, RP był jednym z objawów układowej choroby tkanki łącznej. Istotność statystyczna wśród chorych na CTD występowała między wszystkimi trzema rodzajami morfologii kapilar – między 1^o a 2^o ($p=0,0015$), 1^o a 3^o ($p<0,0001$) oraz między 2^o a 3^o ($p=0,0006$). Zależność tę można opisać jako częstsze występowanie największych nieprawidłowości naczyń wału paznokciowego w grupie pacjentów z CTD. Wśród nich na postać uogólnioną twardziny układowej chorowało dziesięcioro, z których aż dziewięcioro przejawiało 3^o zmian w obrazie kapilaroskopowym. Nieprawidłowości naczyń kapilarnych u dziesiątego pacjenta oceniono na stopień 2. Żaden pacjent cierpiący na dSSc nie miał prawidłowego rysunku naczyniowego nawet w szerokich granicach normy. Wszyscy uczestnicy badania z ISSc–

czyli zespołem CREST—należeli do trzeciej grupy, co nie budzi wątpliwości, gdyż objaw Raynauda jest jednym z cech charakterystycznych tego zespołu (CR(Raynaud's Phenomenon)EST). Mimo braku pacjentów z ISSc w dwóch pozostałych grupach, istotność statystyczna zaznaczyła się, w tym przypadku, jedynie między 2 a 3 grupą ($p=0,04$). Jest to związane z liczebnością wymienionych grup. 36 obserwacji w drugiej grupie daje dużo węższy przedział ufności, co przekłada się na większą precyzję analizy jakościowej w porównaniu do siedemnastu obserwacji w grupie pierwszej.

Analizując zależność stopnia zmian w obrazie kapilaroskopowym od obecności dodatniego miana ANA, przeprowadzono test trendu chi-kwadrat i otrzymano poziom istotności $p<0,0001$, który oznacza istotnie rosnący trend częstości występowania ANA wraz ze stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym. Aż 95% największych nieprawidłowości prezentowali pacjenci, u których przeciwciała przeciwjądrowe występowały w dodatnim mianie. Warto zaznaczyć, że u żadnego pacjenta z tej grupy nie określono obrazu jako prawidłowy, a nie wszyscy włączeni do badania pacjenci z dodatnim mianem ANA mieli rozpoznaną CTD. Te obserwacje współgrają z doniesieniami o udziale ANA w patomechanizmie uszkodzenia endotelium i następujących zaburzeniach mikrokrążenia.

Największą zasługą badania kapilaroskopowego wału paznokciowego jest rozróżnienie pomiędzy pierwotnym i wtórnym objawem Raynauda oraz wykrycie wśród pacjentów zgłaszających RP, tych którzy rozwiną inne cechy kliniczne twardziny. Ustalono charakterystyczny obraz, tzw. scleroderma pattern, który – obok specyficznych dla SSc ANA – włączono do kryteriów ACR/EULAR 2013 rozpoznania twardziny [189]. W pozostałych CTD nie pełni tak znaczącej roli ze względu na brak określenia specyficznego wzorca. Jednak istnieją pewne cechy charakterystyczne jak morfologia kapilar, ich liczba w polu widzenia, czy ułożenie architektoniczne, które mogą sugerować obecność innych jednostek chorobowych z tej grupy, ale nie tworzą charakterystycznego obrazu. Dodatkowo w żadnej innej CTD RP nie występuje z taką częstością jak w SSc. Pavlov i wsp. w dużym badaniu obejmującym ponad trzy tysiące pacjentów z pierwotnym RP stwierdza, że kapilaroskopia jest niezwykle użytecznym narzędziem w różnicowaniu RP względem jego pierwotnego i wtórnego charakteru oraz w prognostyce rozwoju twardziny, jednak nie znajduje żadnego odzwierciedlenia innych niż SSc CTD w mikroskopowym obrazie wału paznokciowego [184]. Kapilaroskopowe znamiona SSc to megakapilary, utrata pętli, wybroczyny i neoangiogeneza. Megakapilary czyli tzw. pętle giganty

są najwcześniejszym i najbardziej charakterystycznym objawem wtórnego RP. Wybroczyny powstają na drodze pęknięcia bardzo poszerzonych naczyń. Należy jednak zaznaczyć, że mogą również pojedynczo występować u zdrowych osób jako chociażby następstwo urazu. Zmniejszona gęstość kapilar, tzw. wypadanie pętli, występuje w późniejszych okresach SSc. Neoangiogeneza objawia się rozgałęzionymi pętlami, wokół których nie obserwuje się prawidłowych naczyń. Cutolo i wsp., opierając się na występowaniu kapilaroskopowych znamion SSc w różnych proporcjach, określili obrazy charakterystyczne dla wczesnej, aktywnej i późnej SSc. Do wczesnej zakwalifikowali obecność kilku megakapilar i wybroczyn, dość zachowany porządek architektoniczny rozłożenia pętli oraz brak ich wypadania. W obraz aktywnej postaci wpisuje się częste występowanie pętli gigantów oraz wybroczyn, umiarkowana utrata kapilar, nieliczne rozgałęzione naczynia oraz niewielkie zaburzenie ułożenia pętli. Na postać późną składa się nieobecność megakapilar ani wybroczyn oraz rozległe obszary awaskularne, neoangiogeneza, jak i brak uporządkowanego rozłożenia pętli [237].

W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się publikacje, w których opisywane są próby oceny udziału różnych mechanizmów i czynników w patogenezie RP. Przyczyn napadowego skurczu naczyń oraz jego ciężkiego przebiegu wikłanego zmianami troficznymi, jak owrzodzenie i martwica opuszek palców, a nawet akrolizą poszukuje się na wielu polach. Często powtarza się podział wprowadzony w 2005 roku przez Herricka na przyczyny naczyniowe, neuronalne i wewnątrznaczyniowe. Jednak i on zaznaczył, że mechanizmy te są ze sobą powiązane, wpływają na siebie wzajemnie i ostatecznie wspólnie prowadzą do zaburzeń mikrokrążenia [59].

Ze względu na niewielką liczbę doniesień naukowych szeroko opisujących układ hemostazy u pacjentów z RP, ta tematyka pozostaje niedostatecznie poznana. Dlatego wskazane jest prowadzenie badań, które jednoznacznie pozwoliłyby na ocenę wpływu zaburzeń w układzie krzepnięcia i fibrynolizy na niekorzystny przebieg RP.

Prowadzone badania nad czynnikami krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia u pacjentów z objawem Raynauda to próba rozwiązania dwóch istotnych problemów: Dlaczego u części chorych cierpiących na RP dochodzi do powstania zmian troficznych? Czy obserwuje się u tych pacjentów zmiany w parametrach układu hemostazy? Brak jest obecnie przekonujących badań, które wskazywałyby rolę układu hemostazy w patogenezie powstania tych zmian oraz ciężkości napadów obwodowego niedokrwienia u pacjentów z RP. Uważa się, że niektóre z czynników układu krzepnięcia, fibrynolizy oraz stanu zapalnego związane są ze zwiększonym ryzykiem

wystąpienia wspomnianych stanów. Należy mieć również na uwadze, że ze zwiększonym ryzykiem pojawienia się owrzodzeń lub martwicy zwłaszcza opuszek palców oraz intensywnego przebiegu objawu wiążą się także niektóre ze schorzeń, na tle których powstaje objaw Raynauda.

Zgodnie z powszechnie przyjętym modelem pierwotnego RP jako schorzenia czynnościowego, nie towarzyszy mu żadna choroba organiczna, początkowo nie występują istotne odchylenia od normy w osoczym układzie krzepnięcia i fibrynolizy krwi, pomimo nieraz obserwowanych dramatycznych objawów naczynioskurczowych. Z kolei we wtórnym RP zmiany układu fibrynolizy zależą od zaawansowania choroby, tj. istnienia ogólnych objawów zapalnych i stopnia zajęcia naczyń krwionośnych. W schorzeniach o bardzo dużej aktywności procesu zapalnego, jak toczeń rumieniowaty układowy obserwuje się wysokie stężenie czynników prokoagulacyjnych, m.in. fibrynogenu czy PAI-1, wzrost białek profibrynolitycznych, m.in. t-PA, TM. W układzie hemostazy winno być utrzymanie równowagi pomiędzy układem krzepnięcia krwi i fibrynolizy. Mniej nasilone zaburzenia tego układu występują w chorobach o niewielkiej aktywności procesu zapalnego. Drugim ważnym elementem przy ocenie układu hemostazy jest zaawansowanie zmian naczyniowych. Na podstawie przedstawionych doniesień u tych chorych z wtórnym RP, u których doszło do trwałego zmniejszenia przepływu krwi, czyli przewlekłego niedokrwienia, aktywność fibrynolityczna początkowo zwiększa się, wzrasta bowiem stężenie i aktywność t-PA. Natomiast w momencie pojawienia się zmian troficznych aktywność fibrynolityczna się zmniejsza, obniża się wtedy aktywność t-PA w następstwie wytworzenia kompleksów t-PA/PAI-1. Bodźcem powodującym uwolnienie znacznej ilości t-PA ze śródbłonna naczyń jest zapewne niedotlenienie komórek śródbłonna oraz ból niedokrwienny.

W tabeli VIII zestawiono stężenie czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia z materiału pobranego przed przeprowadzeniem próby oziębienia i dokonano podziału na pacjentów z pierwotnym i wtórnym RP. W grupie 49 pacjentów z wtórnym RP wśród czynników krzepnięcia istotnie wyższe stężenie prezentował vWF ($p=0,002$), który jest znanym wskaźnikiem uszkodzenia śródbłonna naczyń. Wśród czynników fibrynolizy istotnie wyższe stężenie wykazywały t-PA ($p<0,0001$) i PAI-1 ($p=0,002$), co świadczy o podwyższonej aktywności fibrynolitycznej. t-PA znalazł również zastosowanie jako marker uszkodzenia endotelium. Wśród czynników zapalenia IL-6 ($p=0,036$) i IL-10 ($p=0,019$) również osiągały istotnie wyższe stężenie w tej grupie pacjentów. IL-6 prócz tego, że jest cytokiną prozapalną, pobudza sekrecję

endoteliny 1, która jest jednym z najsilniejszych czynników naczyniokurczących wydzielanych przez śródbłonek naczyniowy [238]. IL-10 z kolei działa przeciwzapalnie i jej aktywność wzrasta w odpowiedzi na stan zapalny. Wyniki te wskazują na upośledzenie aktywności układu fibrynolitycznego wśród pacjentów z wtórnym RP, co potwierdza doniesienia innych badaczy [239].

Istotnie statystycznie podwyższone stężenie t-PA było obserwowane w RP w przebiegu SSc, jak i w samej SSc, wraz ze wzrostem stężenia vWF i równoległe do postępu choroby [240]. Podobne tendencje opisano u pacjentów ze SLE [241] i niekiedy u chorych z obecnością antykoagulantu toczniowego, bądź istnieniem przeciwciał antyfosfolipidowych [242] oraz zakrzepicą i poronieniami w wywiadzie [243]. Prawidłowe stężenie t-PA było stwierdzane przez zespół Marasiniego w pierwotnym RP [244], ale także w innych chorobach naczyniowych – jak w chorobie Buergera [245], aktywnych postaciach RZS [246], w SSc z towarzyszącym RP, w MCTD i SLE [247]. Takie doniesienia, nieraz sprzeczne z innymi obserwacjami, mogły jednak wynikać z analizowania zbyt małych grup badanych pacjentów. Niskie stężenie t-PA było też stwierdzane w innych CTD. Tylko u osób zdrowych, pacjentów z pierwotnym RP, czy chorych na RZS bez zapalenia naczyń był widoczny wzrost stężenia antygenu t-PA po zastoju żylnym [248].

Niska aktywność t-PA w SLE jest dobrze znanym faktem [249] i może korelować z bardzo wysoką aktywnością PAI-1. Nie zwiększa się stężenie t-PA po teście zastoju żylnego [250]. Zmniejszenie aktywności t-PA może wynikać z wielokrotnie stwierdzanej obecności przeciwciał przeciw t-PA, co ma miejsce u 20% do 36% osób z zaawansowaną SSc, w porównaniu do 6% zdrowych [249].

Wyraźne podwyższone stężenie PAI-1 stwierdzono w SSc, szczególnie częściej w formie uogólnionej niż ograniczonej. Także wysokie PAI-1 jest u większości pacjentów z zespołem antyfosfolipidowym, zarówno pierwotnym, jak i wtórnym związanym ze SLE [251]. Podwyższone stężenie PAI-1 występuje także u chorych z obecnym antykoagulantem toczniowym [243]. Jednak nie zawsze jest stwierdzane wysokie stężenie PAI-1 u pacjentów z toczniem rumieniowatym, zespołem antyfosfolipidowym czy incydentami zakrzepic i poronień [252].

Prawidłowe stężenie antygenu PAI-1 stwierdzono u chorych z RP w SSc, z zachowanym fizjologicznie wyższym stężeniem PAI-1 w godzinach porannych. W ISSc było obserwowane nieco niższe stężenie PAI-1 niż we wtórnym RP w przebiegu MCTD. Istotnie wysoka aktywność PAI-1 została zaobserwowana w SLE. Również u pacjentów z obecnym antykoagulantem toczeniowym jest statystycznie wyższa aktywność PAI-1, w porównaniu do grupy bez tej anomalii, a z rozpoznaną CTD. Fizjologiczne zmniejszenie aktywności PAI-1 po teście zastoju żylnego opisał Cimminiello i wsp. tylko w pierwotnym RP i grupie kontrolnej, w porównaniu do pacjentów z wtórnym RP i CTD [248].

Rezultaty przedstawione w tabeli IX wskazują na podobne zachowanie się czynników krzepnięcia, fibrynolizy i zapalenia po przeprowadzeniu próby oziębienia. W grupie pacjentów z wtórnym RP wśród czynników krzepnięcia istotnie wyższe stężenie nadal prezentował vWF ($p=0,004$), wśród czynników fibrynolizy istotnie wyższe stężenie wykazywały, podobnie jak przed oziębieniem, t-PA ($p<0,0001$) i PAI-1 ($p<0,0001$), a wśród czynników zapalenia istotnie wyższe pozostało stężenie cytokiny przeciwzapalnej IL-10 ($p=0,019$).

Porównanie stężenia badanych czynników przed przeprowadzeniem próby oziębienia i po jej przeprowadzeniu, osobno u pacjentów z pierwotnym oraz z wtórnym RP, przedstawiają tabele odpowiednio XXI i XXII. W obu grupach uzyskano istotnie niższe stężenie t-PA i PAI 1 po lokalnym narażeniu na niską temperaturę. Poza tym pacjenci z pierwotnym RP prezentowali istotnie niższe stężenie CRP, natomiast badani cierpiący na wtórny RP—stężenie d-dimerów, a stężenie TGF- β 1 było bliskie istotności. Uzyskane wyniki nie pozwalają wskazać na znaczący udział próby oziębienia w zaburzeniach hemostazy.

Kolejnym zastosowanym podziałem było rozróżnienie pacjentów z RP względem wyniku prowokacyjnej próby oziębienia przed jej przeprowadzeniem (tabela XIII). Istotnie wyższe stężenie TAT ($p=0,046$) prezentowały osoby, u których wynik później przeprowadzonego narażenia na niską temperaturę był negatywny. U większości pacjentów z SSc Maeda i wsp. stwierdzili podwyższone stężenie AT, natomiast zespół badawczy Hausteina określił je jako prawidłowe i to niezależnie od zaawansowania zmian naczyniowych we wtórnym RP lub w SSc [247]. Podobnie niejednoznaczne dane dotyczące stężenia AT były przedstawiane w SLE. Stężenie kompleksów TAT jest podwyższone w RZS, w pierwotnej mieszanej kriglobulinemii, w HAVS z towarzyszącym RP [253] oraz nieznacznie przy obecności antykoagulantu

toczniowego. Natomiast u ponad połowy pacjentów z SSc opisywano prawidłowe bądź podwyższone stężenie kompleksów TAT.

U osób, u których udało się wywołać skurcz naczyń pod wpływem niskiej temperatury, występowało istotnie wyższe stężenie przeciwzapalnej cytokiny IL-10 ($p=0,002$).

Z kolei po przeprowadzeniu prowokacyjnej próby oziębienia (tabela XIV) wśród czynników krzepnięcia istotnie wyższe stężenie prezentowało TM ($p=0,037$) u pacjentów, u których próba miała wynik negatywny. Mimo doniesień, że stężenie osoczowego TM jest podwyższone w SSc z towarzyszącym objawem Raynauda [254] oraz w SLE niezależnie od występowania RP, czy obecności antykoagulanty toczniowego, to nie zawsze odnotowywano związek z przeprowadzeniem prowokacyjnej próby oziębienia [255, 256]. W różnych innych schorzeniach, jak cukrzyca czy schorzenia wątroby, stężenie tego czynnika również wzrasta [257]. Wyższe stężenie TM często koreluje ze wzrostem vWF, t-PA i endoteliny-1 [257]. Istnieją jednak też doniesienia, iż stężenie sTM nie wykazuje zmian u chorych z ograniczoną i uogólnioną postacią twardziny układowej oraz z wtórnym RP na tle nieodróżnianej choroby tkanki łącznej [258].

Wśród czynników fibrynolizy istotnie wyższe stężenie prezentowało t-PA ($p=0,038$) u pacjentów, u których wynik próby był dodatni, a wśród czynników zapalenia podobne tendencje prezentowała przeciwzapalna IL-10 ($p=0,001$), natomiast stężenie TGF- β 1 u tych samych badanych było istotnie niższe ($p=0,076$).

Badanie wpływu lokalnego narażenia na niską temperaturę na stężenie badanych czynników osobno u pacjentów z negatywnym oraz z pozytywnym wynikiem próby oziębienia przedstawiają tabele odpowiednio XIX i XX. W grupie badanych, u których nie udało się wywołać objawu uzyskano po próbie istotnie niższe stężenie t-PA i PAI 1 ($p<0,0001$) oraz CRP ($p=0,011$). W przypadku uzyskania po przeprowadzeniu próby reakcji naczyńskurczowej jako jedyne statystycznie istotne było niższe stężenie d-dimerów ($p=0,029$). Stężenie PAI-1 oraz TGF- β 1 były bliskie istotności, wykazując tendencję do istotnie niższych wartości po lokalnym obniżeniu temperatury.

Doniesienia o stężeniu d-dimerów u chorych na SSc są wyraźnie zróżnicowane. Bywają takie, które potwierdzają ich podwyższone wartości wraz ze wzrostem osoczowego stężenia vWF,

jednak bardziej w dSSc niż ISSc. Natomiast Trifiletti wraz ze współpracownikami wykazali u pacjentów z RP w przebiegu SSc, że stężenie d-dimerów jest podobne jak w grupie kontrolnej.

Tabela XV przedstawia zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia przed przeprowadzeniem próby oziębienia od występowania przeciwciał przeciwjądrowych ANA. U pacjentów z dodatnim mianem ANA wśród czynników krzepnięcia występowało istotnie wyższe stężenie vWF ($p=0,002$), co potwierdza destrukcyjny wpływ autoprzeciwciał na endotelium. Istotnie wyższe wartości przedstawiał t-PA ($p<0,0001$), a wśród czynników zapalenia – fibrynogen ($p=0,033$) i IL-10 ($p=0,001$). Lau i wsp. opisali wyższe stężenie fibrynogenu u chorych z wtórnym RP i towarzyszącą UCTD w porównaniu do pacjentów z wtórnym RP na tle miażdżycy tętnic. U chorych na SSc wysokie stężenie fibrynogenu dodatkowo korelowało z wysokim stężeniem innego białka ostrej fazy – vWF. Na granicy istotnej różnicy lokowało się również stężenie IL-6 ($p=0,051$), co wskazuje na trend IL-6 w kierunku istotnie wyższych wartości u pacjentów z dodatnim mianem ANA przed przeprowadzeniem próby oziębienia. Odwrotny trend przedstawiało stężenie TAT, które również było bliskie istotności ($p=0,062$). Po przeprowadzeniu prowokacyjnej próby narażenia na niską temperaturę (tabela XVI) dołączyło się istotnie wyższe stężenie PAI-1 ($p=0,032$), co wskazuje na zwiększoną aktywność fibrynolityczną oraz istotnie niższe stężenie TGF- β 1 ($p=0,048$) wśród pacjentów z dodatnim mianem ANA. Stężenie CRP było bliskie istotności, wykazując tendencję do wyższych wartości u pacjentów z dodatnim mianem ANA.

Znacznie mniej statystycznie istotnych różnic można zaobserwować, porównując w tabelach XVI i XVII badane czynniki przed i po przeprowadzeniu próby oziębienia osobno u pacjentów, u których nie wykryto ANA oraz u tych z dodatnim ich mianem. Uzyskane wyniki nie pozwalają, w tym przypadku, wskazać na znaczący udział próby oziębienia w zaburzeniach hemostazy.

Z danych przedstawionych w tabelach XXIV i XXV wynika, że wraz ze stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym, zwiększała się aktywność fibrynolityczna w materiale pobranym od pacjentów przed przeprowadzeniem próby oziębienia, ale przede wszystkim po jej przeprowadzeniu. Poza tym taką samą tendencję wykazuje stężenie przeciwzapalnej IL-10, prezentując istotnie wyższe wartości korelujące dodatnio z rozmiarem zaburzenia obrazu uzyskanego w mikroskopowym badaniu wału paznokciowego. Istotnie wyższe stężenie t-PA

świadczą o większym uszkodzeniu endotelium wraz z nasileniem zmian stwierdzanych w obrazie kapilaroskopowym.

Załącznik drugi zawiera zestawienie trzech modeli przedstawiających niezależny wpływ czynników wytypowanych we wcześniejszych tabelach na wystąpienie pozytywnego wyniku próby oziębienia. Analiza została wykonana przy pomocy wieloczynnikowego modelu regresji logistycznej.

Ze względu na założenie o niezależności zmiennych w pierwszych trzech modelach zamiennie użyto "ANA dodatnie", "CTD" lub "postać uogólnioną twardziny układowej". Każdy z tych modeli otrzymał dodatkowy wariant z usuniętymi nieistotnymi zmiennymi metodą eliminacji wstecznej (backward elimination). Miały one na celu zmniejszenie wariacji poprzez zachowanie redundantnych obserwacji.

W pierwszym modelu niezależnymi czynnikami zwiększającymi prawdopodobieństwo pozytywnego wyniku prowokacyjnej próby oziębienia były wiek pierwszego pojawienia się RP (OR=1,1234), dodatnie wysokie miano ANA (OR=178,7004) oraz stężenie sodu we krwi (OR=1,7557). Zmiany zwyrodnieniowe odcinka szyjnego kręgosłupa (OR=0,0377) zmniejszały to ryzyko. Wśród nieistotnych parametrów wykazujących pewną tendencję ($p < 0,1$) zaobserwowano stężenie TAT (OR=0,5228) oraz występowanie owrzodzenia palców rąk w wywiadzie (OR=12,781). Ich wpływ był odpowiednio zmniejszający i zwiększający szansę pozytywnego wyniku próby oziębienia.

Po zastosowaniu metody eliminacji wstecznej zaobserwowano wzrost istotności stężenia kompleksów trombina-antytrombina (OR=0,5084).

W drugim modelu istotnymi czynnikami zwiększającymi prawdopodobieństwo udanego przeprowadzenia próby oziębienia były CTD oraz stężenie sodu we krwi badanych. Bliski istotności był wiek pierwszego pojawienia się RP (OR=1,0681) i występowanie owrzodzenia palców rąk w wywiadzie (OR=7,6383), które zwiększały ryzyko wywołania RP, a zmiany zwyrodnieniowe odcinka szyjnego kręgosłupa (OR=0,2561) oraz stężenie TAT (OR=0,6728) wpływało odwrotnie na zbliżonym poziomie istotności.

Po zastosowaniu metody eliminacji wstecznej zaobserwowano wzrost istotności wieku pierwszego pojawienia się RP (OR=1,0725).

W trzecim modelu prawdopodobieństwo skurczu naczyń pod wpływem lokalnego oziębienia istotnie zwiększało występowanie owrzodzenia palców rąk w wywiadzie (OR=44,1532), postać uogólniona twardziny układowej (OR=732,403) oraz stężenie sodu we krwi (OR=2,1839). Stężenie TAT tradycyjnie zmniejszało ryzyko wywołania RP (OR=0,3977).

Po zastosowaniu metody eliminacji wstecznej zaobserwowano wzrost istotności wieku pierwszego epizodu naczynioskurczowego (OR=1,076).

Załącznik trzeci zawiera model przedstawiający analizę niezależnego wpływu wybranych czynników na wtórny charakter objawu Raynauda. W tej analizie nie można było uwzględnić czynników, które były mocno związane z wtórnością objawu (ANA dodatnie, CTD). Podobnie jak w poprzednich modelach i ten otrzymał dodatkowy wariant z usuniętymi nieistotnymi zmiennymi metodą eliminacji wstecznej (backward elimination). Miał on na celu zmniejszenie wariancji poprzez zachowanie redundantnych obserwacji.

Z analizy regresji wieloczynnikowej dla wtórnego RP wynika, że zmiennymi istotnie zwiększającymi jego prawdopodobieństwo był czynnik zapalenia o działaniu przeciwzapalnym – IL-10 (OR=1,4183), a wśród nieistotnych parametrów wykazujących jednak pewną tendencję ($p < 0,1$) zaobserwowano wiek pojawienia się pierwszego epizodu naczynioskurczowego (OR=1,1713), BMI (OR=1,6589) oraz HCT (OR=1,7907).

Na większą szansę pierwotnego charakteru RP istotnie wpływał ABPIsin (OR=4,18217E-08), a bliskie istotności było nadciśnienie tętnicze (OR=0,0866).

Po zastosowaniu metody eliminacji wstecznej zaobserwowano istotność nadciśnienia tętniczego (OR=0,2179) jako zwiększającego szansę na wystąpienie pierwotnego RP oraz BMI (OR=1,5585) dodatnio wpływającego na prawdopodobieństwo wtórnego charakteru RP.

7. Wnioski

- 1) U pacjentów z wtórnym objawem Raynauda obserwowano istotnie wyższe stężenie czynnika von Willebranda, tkankowego aktywatora plazminogenu, inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1, co może świadczyć o uszkodzeniu endotelium oraz zwiększonej aktywności fibrynolitycznej w porównaniu do osób, u których stwierdzono występowanie pierwotnego objawu Raynauda.
- 2) W grupie pacjentów z wtórnym objawem Raynauda w porównaniu do objawu pierwotnego obserwowano wśród markerów zapalenia istotnie wyższe stężenie interleukiny 6 i interleukiny 10, co może wskazywać na udział procesu zapalnego oraz predysponuje do zwiększenia wydzielania czynników wazokonstrykcyjnych.
- 3) Pacjenci z wysokim dodatnim mianem autoprzeciwciał prezentowali istotnie wyższe stężenie czynnika von Willebranda, tkankowego aktywatora plazminogenu, fibrynogenu oraz interleukiny 10, co pośrednio potwierdza udział tych czynników w uszkodzeniu endotelium.
- 4) Można założyć, że zaburzenia hemostazy bardziej niż procesy zapalne związane są z patogenezą objawu Raynauda zarówno w jego pierwotnej, jak i we wtórnej postaci.
- 5) Próba wywołania objawu Raynauda poprzez zastosowanie lokalnego narażenia na niską temperaturę powiodła się tylko u 19 z 78 pacjentów (24,4%). Oziębienie nie wpłynęło istotnie na stężenie badanych czynników ani na ich istotne zmiany względem obecności wysokiego miana autoprzeciwciał przeciwjądrowych.
- 6) Stężenie tkankowego aktywatora plazminogenu wzrasta wraz ze stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym, co może być związane z wyższym stopniem uszkodzenia endotelium.

8. Streszczenie

Objaw Raynauda (RP) charakteryzuje się wywołanym narażeniem na niską temperaturę lub stres zmniejszeniem przepływu krwi przez małe naczynia obwodowe. Następuje kolejno zblednięcie, zasinienie oraz zaczerwienienie skóry. Skurcz naczyniowy jest napadowy, odwracalny i nawracający. Najczęściej dotyczy palców rąk, często rąk i stóp, rzadziej samych stóp, a sporadycznie uszu, nosa, czy języka. Istnieją doniesienia o współwystępowaniu klinicznej manifestacji skurczu naczyń palców dłoni ze zmniejszonym przepływem krwi w naczyniach serca, mózgu, płuc i przełyku.

Rozróżnia się pierwotny i wtórny objaw Raynauda. Pierwotny w Europie najczęściej określany jest jako choroba Raynauda, a wtórny jako zespół Raynauda. Uważa się, że pierwotny RP związany jest z zaburzeniami czynnościowymi, podczas gdy we wtórnym, występującym w przebiegu innych schorzeń, dochodzi do nieprawidłowości strukturalnych mikrokrążenia, które najwyraźniej zaznaczają się u pacjentów z twardziną układową albo chorobą wibracyjną.

Objaw – zarówno pierwotny jak i wtórny – znacznie częściej dotyczy kobiet. Częstość występowania RP jest przedstawiana w bardzo szerokich granicach od 6% do 20% dla kobiet oraz od 3% do 12,5% dla mężczyzn, jednak większość publikacji przedstawia wartości 3-5% dla obu płci. Badania przeprowadzone w grupie nastolatków wykazały częstość występowania na poziomie 15% i ponowne stwierdzenie znacznej przewagi kobiet z RP.

Prawdopodobnymi czynnikami odpowiedzialnymi za występowanie objawu Raynauda są między innymi nieprawidłowa regulacja napięcia ściany naczyniowej, zaburzenia neurohormonalne, upośledzenie funkcji śródbłonka, a wtórnie – hemostazy, które wspólnie mogą prowadzić do martwicy lub zgorzeli dystalnych części palców.

Proces hemostazy osoczowej obejmuje dwa przeciwstawne układy – krzepnięcia i fibrynolizy, których wzajemne współdziałanie pozwala między innymi na zapewnienie płynności krwi krążącej w naczyniach.

Ze względu na nieliczne doniesienia naukowe opisujące zaburzenia w układzie fibrynolizy u pacjentów z objawem Raynauda, ważne staje się przedstawienie także tych danych w innych schorzeniach, w przebiegu których może wystąpić objaw Raynauda.

Uważa się, że niektóre z czynników układu krzepnięcia, fibrynolizy oraz stanu zapalnego związane są ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia owrzodzeń i martwicy opuszek palców. Należy mieć również na uwadze, że ze zwiększonym ryzykiem pojawienia się owrzodzeń

lub martwicy zwłaszcza opuszek palców oraz intensywnego przebiegu objawu wiążą się także niektóre ze schorzeń, na tle których powstaje objaw Raynauda.

Cele pracy obejmowały określenie stężenia parametrów czynności śródbłonna, jak czynnik tkankowy (TF), inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (TFPI), czynnik von Willebranda (vWF), trombomodulina (TM), tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA), inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1), innych parametrów hemostazy, jak kompleksy trombina – antytrombina (TAT), i d-dimery oraz parametrów zapalenia, jak fibrynogen, białko C – reaktywne (CRP), interleukina 6 (IL-6), interleukina 10 (IL-10), transformujący czynnik wzrostu (TGF- β 1), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) w przebiegu pierwotnego i wtórnego objawu Raynauda. Wśród danych klinicznych i laboratoryjnych poszukiwano innych czynników mogących brać udział w patogenezie objawu. Przeprowadzono prowokacyjną próbę oziębienia, by przy jej pomocy określić wpływ układu hemostazy i zapalenia na przebieg napadowego skurczu naczyń. Badano również zależność stężenia czynników hemostazy i zapalenia od stopnia zmian w obrazie kapilaroskopowym.

Badaniem objęto 78 pacjentów (68 kobiet, 10 mężczyzn) w wieku od 22 lat do 84 lat (M-53 lata, Me-57, SD-14). Wśród włączonych do badań 78 pacjentów z objawem Raynauda zastosowano kilka podziałów: względem charakteru objawu Raynauda, względem wyniku prowokacyjnej próby oziębienia oraz względem obecności autoprzeciwciał. Analizowano dane uzyskane z badania podmiotowego, przedmiotowego, standardowych badań laboratoryjnych, przeprowadzonej prowokacyjnej próby oziębienia, badania kapilaroskopowego oraz oznaczonych metodą immunoenzymatyczną czynników krzepnięcia, fibrynolizy oraz zapalenia.

Uzyskane istotne statystycznie różnice jednoznacznie wskazują na większe uszkodzenie śródbłonna naczyniowego u pacjentów z wtórnym objawem Raynauda, u których wśród czynników krzepnięcia istotnie wyższe stężenie wykazywał vWF ($p=0,002$), wśród czynników fibrynolizy istotnie wyższe stężenie prezentował t-PA ($p<0,0001$) oraz PAI-1 ($p=0,002$), a wśród czynników zapalenia IL-6 ($p=0,036$) i IL-10 ($p=0,019$) również osiągały istotnie wyższe stężenie w tej grupie pacjentów.

Pacjenci z wysokim dodatnim mianem ANA wśród czynników krzepnięcia prezentowali istotnie wyższe stężenie vWF ($p=0,002$), wśród czynników fibrynolizy istotnie wyższe wartości t-PA ($p<0,0001$), a wśród czynników zapalenia- fibrynogenu ($p=0,033$) i IL-10 ($p=0,001$). Na granicy istotnej różnicy lokowało się również stężenie IL-6 ($p=0,051$).

Najwyższy stopień zmian w obrazie kapilaroskopowym był stwierdzany istotnie częściej w grupie pacjentów, u których pierwszy epizod RP wystąpił w późnym wieku, u pacjentów z wtórnym RP, u których wynik próby oziębienia był dodatni, którzy w wywiadzie podali występowanie owrzodzeń na zajętych objawem palcach oraz u chorych cierpiących na CTD. Przeprowadzając test trendu chi-kwadrat, otrzymano poziom istotności $p < 0,0001$, co oznacza istotnie rosnący trend częstości występowania ANA wraz ze stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym. Istotnie wyższe stężenie t-PA oraz IL-10 stwierdzono w najwyższym stopniu zmian w obrazie kapilaroskopowym.

U pacjentów z wtórnym objawem Raynauda obserwowano istotnie wyższe stężenie vWF, t-PA, PAI-1, co świadczy o uszkodzeniu endotelium oraz zwiększonej aktywności fibrynolitycznej w porównaniu do osób, u których stwierdzono występowanie pierwotnego objawu Raynauda.

W grupie pacjentów z wtórnym objawem Raynauda w porównaniu do objawu pierwotnego obserwowano wśród markerów zapalenia istotnie wyższe stężenie IL-6 i IL-10, co wskazuje na udział procesu zapalnego oraz predystynuje do zwiększenia wydzielania czynników wazokonstrykcyjnych.

Pacjenci z wysokim dodatnim mianem autoprzeciwciał prezentowali istotnie wyższe stężenie vWF, t-PA, fibrynogenu oraz IL-10, co pośrednio potwierdza udział tych czynników w uszkodzeniu endotelium.

Można założyć, że zaburzenia hemostazy bardziej niż procesy zapalne związane są z patogenezą objawu Raynauda zarówno w jego pierwotnej, jak i we wtórnej postaci.

Próba wywołania objawu Raynauda poprzez zastosowanie lokalnego narażenia na niską temperaturę powiodła się tylko u 19 z 78 pacjentów (24,4%). Oziębienie nie wpłynęło istotnie na stężenie badanych czynników ani na ich istotne zmiany względem obecności wysokiego miana ANA.

Stężenie t-PA rośnie wraz ze stopniem zmian w obrazie kapilaroskopowym, co może być związane z wyższym stopniem uszkodzenia endotelium.

9. Abstract

Raynaud's phenomenon is characterized by a reduced blood flow through small peripheral vessels resulting in paleness, cyanosis and rubor, it is caused by exposure to low temperatures or stress. Blood vessel spasm is reversible, recurrent and paroxysmal. Most often it afflicts hand digits, often hand and foot digits, less often only feet, and occasionally ears, nose and tongue. There are reports of clinical manifestation of hand digits' vessels spasm coappearing with a reduced blood flow in the heart, brain, lungs and esophagus vessels.

Primary and secondary forms of Raynaud's phenomenon are distinguished. The primary one in Europe is commonly referred to as Raynaud's disease and the secondary one as Raynaud's syndrome. It is believed that the primary RP is connected with functional disorders while in the secondary RP, occurring in other diseases, there are structural disorders of microcirculation, which are most severe in patients with scleroderma or vibration disease.

The symptom – primary as well as secondary – afflicts women much more often. The frequency of RP occurrences is shown in a wide range, from 6% to 20% for women and from 3% to 12.5% for men [68], but most of the publications show values of 3-5% for both sexes. A research conducted on a group of teenagers has shown the frequency of occurrences at the level of 15% and once again women were in the majority of the afflicted.

The probable factors responsible for Raynaud's phenomenon are, among others, abnormal regulation of vessel wall tension, neurohormonal disorders, impaired endothelial function, and secondarily – hemostasis, which may lead to necrosis or gangrene of the distal digits' parts .

The process of plasma hemostasis includes two opposite systems – coagulation and fibrinolysis, which cooperation allows for, among others, assuring the fluidity of blood circulating in the vessels.

Due to few scientific reports describing disorders in fibrinolysis system in patients with Raynaud's phenomenon, it becomes important to show also this data in different diseases in which Raynaud's phenomenon can occur.

It is believed that some of the factors of inflammation and the coagulation and fibrinolysis systems are connected to an increased risk of ulceration and necrosis of finger tips. One has also to consider the fact that some of the diseases causing Raynaud's phenomenon are

connected with an increased risk of ulceration and necrosis, especially of the finger tips, and intense course of the symptom.

Goals: The goals of the thesis included determining the concentration of the parameters of endothelium function TF, TFPI, vWF, TM, t-PA and PAI-1, other hemostasis parameters, such as TAT complexes, d-dimers and inflammation parameters: concentration of fibrinogen, CRP, IL-6, IL-10, and TGF- β 1, bFGF in the course of the primary and secondary forms of Raynaud's phenomenon. Other factors which could take part in the pathogenesis of the symptom were looked for in the clinical and laboratory data. Cold provocation test was conducted in order to determine the influence of the hemostasis system and inflammation on the course of paroxysmal vasoconstriction. The relationship between the concentration of hemostasis factors and inflammation and the level of changes in the capillaroscopic image was tested.

Materials and methods: The research was conducted on 78 patients (68 women, 10 men) in the age of 22 to 84 (M-53 years, Med-57, SD-14). Among the 78 patients with Raynaud's phenomenon a few divisions were used: according to the character of Raynaud's phenomenon, according to the result of the cold provocation test and according to the presence of autoantibodies. Data gathered from an interview, physical examination, standard laboratory tests, the conducted cold provocation test, capillaroscopic test and marked - using the immunoenzymatic method – coagulation factors, fibrinolysis and inflammation.

Results: The obtained significant statistical differences explicitly show larger damage of the endothelium in patients with the secondary form of the Raynaud's phenomenon, in which among coagulation factors significantly higher concentration is presented by vWF ($p=0,002$), among fibrinolysis factors significantly higher concentration is presented by t-PA ($p<0,0001$). What is more, PAI-1 ($p=0,002$), and among inflammation factors IL-6 ($p=0,036$) and IL-10 ($p=0,019$) also reached significantly higher concentration in this group of patients.

Patients with a high positive ANA titre in coagulation factors presented significantly higher concentration of vWF ($p=0,002$), among fibrinolysis factors significantly higher values of t-PA ($p<0,0001$), and among inflammation factors- fibrinogen ($p=0,033$) and IL-10 ($p=0,001$). The concentration of IL-6 ($p=0,051$) is also located on the boarder of significant difference.

The higher level of changes in the capillaroscopic image occurs significantly often in the group of patients which suffered from the first episode of RP later in life, in patients with secondary RP which had a positive result of the cold provocation test and stated in the interview the occurrence of ulcerations on the digits suffering from the symptom, and in patients suffering

from autoimmune diseases. The chi-squared test resulted in a statistical significance level of $p < 0,0001$ which means that a significantly growing trend of the frequency of the ANA occurrence in tandem with the level of changes in the capillaroscopic image is present. Significantly higher concentration of t-PA and IL-10 in the highest level of change in the capillaroscopic image occur.

Conclusions:

- 1) In patients with the secondary RP significantly higher concentration of vWF, t-PA, PAI-1 was observed which points to damaged endothelium and an increased fibrinolytic activity in this group of patients as compared to people with the primary RP.
- 2) In the group of patients with the secondary RP as compared to people with the primary symptom a significantly higher concentration of IL-6 and IL-10 was observed among inflammatory markers, which points to the role of the inflammatory process in the pathogenesis of the symptom and predestines to the secretion of vasoconstriction factors in this group of patients.
- 3) Patients with a high positive ANA titre presented significantly higher concentration of vWF, t-PA, fibrinogen and IL-10, which indirectly proves the role of autoantibodies in damaging the endothelium.
- 4) One can assume that the hemostasis disorders, more so than the inflammatory process, are connected to the pathogenesis of RP in its primary and secondary forms.
- 5) The attempt to provoke the RP by using localized low temperature proved successful only in 19 (24.5%) of all 78 patients taking part in the research. The cooling did not have a significant impact on the concentration of the tested factors or on their significant changes in correlation to a high ANA titre.
- 6) The concentration of t-PA grows together with the level of changes in the capillaroscopic image which may be connected to the larger damage of endothelium.

10. Piśmiennictwo

1. <http://www.raynauds.org.uk/raynauds/why-the-name>
2. Raynaud, M. "De l'asphyxie locale et de la gangrène symétrique des extrémités." Paris: L. Leclerc; 1862.
3. Hutchinson, J. "Raynaud's phenomenon." *Med. Press. Circ.* 1901; 72:403-5.
4. Gifford R. W. Jr., Hines E. A. Jr. "Raynaud's disease among women and girls." *Circulation.* 1957; 16:1012-1021.
5. Olmsted J., Olmsted E. "Claud Bernard and the experimental method in medicine." New York 1952; Henry Schuman, Inc.
6. Lewis T. "Observations upon the reaction of the vessels of the human skin to cold." *Heart.* 1929; 15:177-208.
7. Lewis T. "Experiments relating to the peripheral mechanism involved in spasmodic arrest of the circulation of the fingers. A variety of Raynaud's disease." *Heart.* 1929; 15:7-101.
8. Halpern A., Kuhn P. H., Shaftel H. E., Samuels S. S. et al. "Raynaud's disease, Raynaud's phenomenon, and serotonin." *Angiology.* 1960; 11:151-67.
9. Freedman RR., Mayes MD., Sabharwal SC. "Induction of vasospastic attacks despite digital nerve block in Raynaud's disease and phenomenon." *Circulation.* 1989; 80:859-62.
10. Jamieson GG., Ludbrook J., Wilson A. "Cold hypersensitivity in Raynaud's phenomenon." *Circulation.* 1971; 44:254-64.
11. Olsen N., Petring O. U., Rossing N. "Exaggerated postural vasoconstrictor reflex in Raynaud's phenomenon." *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* 1987; 294:1186-8.
12. Freedman RR., Baer RP., Mayes MD. "Blockade of vasospastic attacks by alpha 2-adrenergic but not alpha 1-adrenergic antagonists in idiopathic Raynaud's disease." *Circulation.* 1995; 92:1448-51.
13. Chotani M.A., Flavahan S., Mitra S., Daunt D., Flavahan N. A. "Silent alpha(2C)-adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries." *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000; 278:H1075-83.
14. Allen E., Brown G. "Raynaud's disease: a critical review of the minimum requisites for diagnosis." *Am. J. Med. Sci.* 1932; 183:187-200.
15. Allen E., Brown G. "Raynaud's disease affecting men." *Ann. Intern. Med.* 1932; 5:1384-6.

16. LeRoy E.C., Medsger T.A. Jr. "Raynaud's phenomenon: a proposal for classification." *Clin. Exp. Rheumatol.* 1992; 10:485-8.
17. Monro T. "Raynaud's disease." James Maclehose & Sons: Glasgow; 1899.
18. White W., Jelliffe S. "Angioneuroses and trophoneuroses." In: White W., Jelliffe S., editors. *The modern treatment of nervous and mental diseases.* 1st ed. USA: Lea & Febiger; 1913, p.511-15.
19. Lipkin M., McDevitt E., Schwartz M., Duryee A. "On the effects of suggestion in the treatment of vasospastic disorders of the extremities." *Psychosom. Med.* 1945; 7:152-9.
20. Surwit, RS. "Biofeedback: a possible treatment for Raynaud's disease." *Semin. Psychiatry.* 1973; 5:483-90.
21. Surwit RS., Pilon RN., Fenton CH. "Behavioral treatment of Raynaud's disease." *J. Behav. Med.* 1978; 1:323-35.
22. McIntyre, D. R. "A maneuver to reverse Raynaud's phenomenon of the fingers." *JAMA* 1978; 240:2760.
23. Kempson G. E., Coggon D., Acheson E. D. "Electrically heated gloves for intermittent digital ischaemia." *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 1983; 286:268.
24. Peterson LL., Vorhies C. "Raynaud's syndrome. Treatment with sublingual administration of nitroglycerin, swinging arm maneuver, and biofeedback training." *Arch. Dermatol.* 1983; 119:396-9.
25. Monro T. "Raynaud's disease." James Maclehose & Sons: Glasgow; 1899.
26. Turnipseed W., Vasko J. S., Evans W. E. "Hemodynamic effects of intravenous alcohol on patients with ischemic limb disease." *J. Surg. Res.* 1976; 20:477-8.
27. Cushing H. "Treatment by the tourniquet to counteract the vasomotor spasm of Raynaud's disease." *J. Nerv. Mental. Dis.* 1902; 29:657.
28. Adson A., Brown G. "Treatment of Raynaud's disease." *JAMA.* 1925; 84:1908.
29. Royle J. P. "A history of sympathectomy" *Aust. N Z J. Surg.* 1999; 69:302-7.
30. Flatt AE. "Digital artery sympathectomy." *J. Hand. Surg. Am.* 1980; 5:550-6.
31. Engelhart M. "The effect of sympathetic blockade and cooling in Raynaud's phenomenon." *Clin. Physiol.* 1990; 10:131-6.
32. Wigley F. M. "Clinical practice. Raynaud's Phenomenon." *N. Engl. J. Med.* 2002; 237:1001-8.

33. Coleiro B., Marshall S. E., Denton C. P., Howell K. et al. "Treatment of Raynaud's phenomenon with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine." *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:1038-1043.
34. Neumeister M. W. "Botulinum toxin type A in the treatment of Raynaud's phenomenon." *J. Hand. Surg. Am.* 2010; 35:2085-92.
35. Sycha T., Graninger M., Auff E., Schnider P. "Botulinum toxin in the treatment of Raynaud's phenomenon: a pilot study." *Eur. J. Clin. Invest.* 2004; 34:312-3.
36. Coffman J. D., Cohen A. S. "Total and capillary fingertip blood flow in Raynaud's phenomenon." *N. Engl. J. Med.* 1971; 285:259-63.
37. McFadyen I. J., Housley E., MacPherson A. I. "Intraarterial reserpine administration in Raynaud syndrome." *Arch. Intern. Med.* 1973; 132:526-528.
38. Varadi D. P., Lawrence A. M. "Suppression of Raynaud's phenomenon by methyldopa." *Arch. Intern. Med.* 1969; 124:13-18.
39. Waldo R. "Prazosin relieves Raynaud's vasospasm." *JAMA* 1979; 241:1037.
40. Clement D. L., Duprez D., De Pue N. "Effect of indoramin on finger circulation in patients with Raynaud disease." *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1986; 8:S84-87.
41. Brouwer R. M., Wenting G. J., Man in't Veld A. J., Schalekamp M. A. "Role of alpha-adrenergic blockade in the cardiovascular actions of ketanserin: studies in patients with essential hypertension, autonomic insufficiency, and Raynaud's phenomenon." *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1987; 10:S26-31.
42. Fava A., Wung P. K., Wigley F. M., Hummers, L. K. et al. "Efficacy of Rho kinase inhibitor fasudil in secondary Raynaud's phenomenon." *Arthritis. Care Res. (Hoboken)* 2012; 64:925-929.
43. Chung L., Shapiro L., Fiorentino D., Baron M. et al. "MQX-503, a novel formulation of nitroglycerin, improves the severity of Raynaud's phenomenon: a randomized, controlled trial." *Arthritis Rheum.* 2009; 60:870-877.
44. Lund F. "Percutaneous nitroglycerin treatment in cases of peripheral circulatory disorders, especially Raynaud's disease." *Acta. Med. Scand.* 1948; 131:196-206.
45. Fox M. J., Leslie C. L. "Treatment of Raynaud's diseases with nitroglycerine." *Wis. Med. J.* 1948; 47:855-858.
46. Miller D., Waters D. D., Warnica W., Szlachcic J., Kreeft J. et al. "Is variant angina the coronary manifestation of a generalized vasospastic disorder?" *N. Engl. J. Med.* 1981; 304:763-766.

47. Kahan A., Weber S., Amor B., Saporta L. et al. "Nifedipine and Raynaud's phenomenon." *Ann. Intern. Med.* 1981; 94:546.
48. Rodeheffer R. J., Rommer J. A., Wigley F., Smith C. R. "Controlled double-blind trial of nifedipine in the treatment of Raynaud's phenomenon." *N. Engl. J. Med.* 1983; 308:880-883.
49. Belch J. J., Newman P., Drury J. K., Capell H., Leiberman P. et al. "Successful treatment of Raynaud's Syndrome with prostacyclin." *Thromb. Haemost.* 1981; 45:255-256.
50. Belch J. J., Newman P., Drury J. K., McKenzie F. et al. "Intermittent epoprostenol (prostacyclin) infusion in patients with Raynaud's syndrome. A double-blind controlled trial." *Lancet.* 1983; 1:313-315.
51. Clifford P. C., Martin M. F., Sheddon E. J., Kirby J. D. et al. "Treatment of vasospastic disease with prostaglandin E1." *Br. Med. J.* 1980; 281:1031-1034.
52. Carlson L. A., Eriksson I. "Femoral-artery infusion of prostaglandin E 1 in severe peripheral vascular disease." *Lancet* 1973; 1:155-156.
53. Goldstein I., Lue T. F., Padma-Nathan H., Rosen R. C. et al. "Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group." *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 1397-1404.
54. Roustit M., Blaise S., Allanore Y., Carpentier P. H. et al. "Phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of secondary Raynaud's phenomenon: systematic review and meta-analysis of randomised trials." *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72:1696-1699.
55. Prete M., Fatone M. C., Favoino E., Perosa F. "Raynaud's phenomenon: from molecular pathogenesis to therapy." *Autoimmun. Rev.* 2014; 13:655-667.
56. Chikura B., Moore T., Manning J., Vail A., Herrick A. L. "Thumb involvement in Raynaud's phenomenon as an indicator of underlying connective tissue disease." *J. Rheumatol.* 2010; 37:783-786.
57. Wigley F. M. "Clinical practice. Raynaud's Phenomenon." *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 1001-1008.
58. Brennan P., Silman A., Black C., Bernstein R. et al. "Validity and reliability of three methods used in the diagnosis of Raynaud's phenomenon. The UK Scleroderma Study Group." *Br. J. Rheumatol.* 1993; 32: 357-361.
59. Herrick, A. L. "Pathogenesis of Raynaud's phenomenon." *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44:587-596.
60. Hummers L. K., Wigley F. M. "Management of Raynaud's phenomenon and digital ischemic lesions in scleroderma." *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 2003; 29:293-313.

61. Maricq H. R., LeRoy E. C., D'Angelo W. A., Medsger T. A. Jr. et al. "Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders." *Arthritis Rheum.* 1980; 23:183-189.
62. Cutolo M., Pizzorni C., Sulli A. "Identification of transition from primary Raynaud's phenomenon to secondary Raynaud's phenomenon by nailfold videocapillaroscopy: comment on the article by Hirschl et al." *Arthritis Rheum* 2007; 56:2102-2103; author reply 2103-2104.
63. Smith V. „When and how to perform capillaroscopy. In: Cutolo M., editor. *Atlas of capillaroscopy in rheumatic diseases.*” Milano: Elsevier Srl; 2010. p.33-42.
64. Andrade L. E., Gabriel Junior A., Assad R. L., Ferrari A. J., Atra E. "Panoramic nailfold capillaroscopy: a new reading method and normal range." *Semin. Arthritis Rheum.* 1990; 20:21-31.
65. ter Borg E. J., Piersma-Wichers G., Smit A. J., Kallenberg C. G., Wouda A. A. "Serial nailfold capillary microscopy in primary Raynaud's phenomenon and scleroderma." *Semin. Arthritis Rheum.* 1994; 24:40-47.
66. Kallenberg C.G., Wouda A.A., Hoet M.H., van Venrooij W.J. "Development of connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon: a six year follow up with emphasis on the predictive value of antinuclear antibodies as detected by immunoblotting." *Ann. Rheum. Dis.* 1988; 47:634–641.
67. Spencer-Green G., Alter D., Welch H.G. "Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies." *Am. J. Med.* 1997; 103:242–248.
68. Bakst R., Merola J. F., Franks A. G. Jr., Sanchez M. "Raynaud's phenomenon: pathogenesis and management." *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008; 59:633-653.
69. Jones G. T., Herrick A. L., Woodham S. E., Baildam E. M. et al. "Occurrence of Raynaud's phenomenon in children ages 12-15 years: prevalence and association with other common symptoms." *Arthritis Rheum.* 2003; 48:3518-3521.
70. Fraenkel L. "Raynaud's phenomenon: epidemiology and risk factors." *Curr. Rheumatol. Rep.* 2002; 4:123-128.
71. Keil J. E., Maricq H. R., Weinrich M. C., McGregor A. R., Diat F. "Demographic, social and clinical correlates of Raynaud phenomenon." *Int. J. Epidemiol.* 1991; 20:221-224.
72. Fraenkel L., Zhang Y., Chaisson C. E., Maricq H. R. et al. "Different factors influencing the expression of Raynaud's phenomenon in men and women." *Arthritis Rheum.* 1999; 42:306-310.

73. Maricq H. R., Carpentier P. H., Weinrich M. C., Keil J. E. et al. "Geographic variation in the prevalence of Raynaud's phenomenon: a 5 region comparison." *J. Rheumatol.* 1997; 24:879-889.
74. Freedman R. R., Mayes M. D. "Familial aggregation of primary Raynaud's disease." *Arthritis Rheum.* 1996; 39:1189-1191.
75. Smyth A. E., Hughes A. E., Bruce I. N., Bell A. L. "A case-control study of candidate vasoactive mediator genes in primary Raynaud's phenomenon." *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38:1094-1098.
76. Cherkas L. F., Williams F. M., Carter L., Howell K. et al. "Heritability of Raynaud's phenomenon and vascular responsiveness to cold: a study of adult female twins." *Arthritis Rheum* 2007; 57:524-528.
77. Frech T., Khanna D., Markewitz B., Mineau G. et al. "Heritability of vasculopathy, autoimmune disease, and fibrosis in systemic sclerosis: a population-based study." *Arthritis Rheum.* 2010; 62:2109-2116.
78. Fontana L., Marion M. J., Ughetto S., Catilina P. "Glutathione S-transferase M1 and GST T1 genetic polymorphisms and Raynaud's phenomenon in French vinyl chloride monomer-exposed workers." *J. Hum. Genet.* 2006; 51:879-886.
79. Suter L. G., Murabito J. M., Felson D. T., Fraenkel L. "The incidence and natural history of Raynaud's phenomenon in the community." *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1259-1263.
80. Spencer-Green, G. "Outcomes in primary Raynaud phenomenon: a meta-analysis of the frequency, rates, and predictors of transition to secondary diseases." *Arch. Intern. Med.* 1998; 158: 595-600.
81. Hirschl M., Hirschl K., Lenz M., Katzenschlager R. et al. "Transition from primary Raynaud's phenomenon to secondary Raynaud's phenomenon identified by diagnosis of an associated disease: results of ten years of prospective surveillance." *Arthritis Rheum.* 2006; 54:1974-1981.
82. Braverman I. M. "The cutaneous microcirculation." *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2000; 5:3-9.
83. Taylor G. I. Chapter 4: blood supply to the skin. "Grabb and Smith's Plastic Surgery, Sixth Edition by Charles H. Thorne." 2007; p.33-41.
84. Charkoudian N. "Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans." *J. Appl. Physiol.* 2010; 109:1221-1228.

85. Johnson J. M., Kellogg D. L. Jr. "Local thermal control of the human cutaneous circulation." *J. Appl. Physiol.* 2010; 109:1229-1238.
86. Shepherd J. T., Vanhoutte P. M. "The Human Cardiovascular System. Facts and Concepts." Raven Press, New York, 1979; pp. 1-351.
87. Schubert R., Mulvany M. J. "The myogenic response: established facts and attractive hypotheses." *Clin. Sci. (Lond)* 1999; 96:313-326.
88. Nowicki P. T., Flavahan S., Hassanain H., Mitra S. et al. "Redox signaling of the arteriolar myogenic response." *Circ. Res.* 2001; 89:114-116.
89. Shepherd, J. T. "Circulatory response to exercise in health." *Circulation* 1987; 76:VI3-10.
90. Furlan R., Barbic F., Casella F., Severgnini G. et al. "Neural autonomic control in orthostatic intolerance." *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009; 169:S17-20.
91. Chotani M. A., Flavahan N. A. "Intracellular alpha(2C)-adrenoceptors: storage depot, stunted development or signaling domain?" *Biochim. Biophys. Acta* 2011; 1813:1495-1503.
92. Shepherd J. T., Vanhoutte P. M. "George E. Brown memorial lecture. Local modulation of adrenergic neurotransmission." *Circulation* 1981; 64: 655-666.
93. Tune J. D. "Control of coronary blood flow during hypoxemia." *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 618:25-39.
94. Flavahan N. A., Vanhoutte P. M. "Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction." *Am. J. Hypertens.* 1995; 8:285-415.
95. Flavahan, N. A. "Balancing prostanoid activity in the human vascular system." *Trends Pharmacol. Sci.* 2007; 28: 106-110.
96. Voetsch B., Jin R. C., Loscalzo J. "Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis." *Histochem. Cell. Biol.* 2004; 122:353-367.
97. Libby P., Aikawa M., Jain M. K. "Vascular endothelium and atherosclerosis." *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006; (176 Pt 2): 285-306.
98. Sangiorgi S., Manelli A., Congiu T., Bini A. et al. "Microvascularization of the human digit as studied by corrosion casting." *J. Anat.* 2004; 204:123-131.
99. Thoresen M., Walloe L. "Skin blood flow in humans as a function of environmental temperature measured by ultrasound." *Acta. Physiol. Scand.* 1980; 109:333-341.
100. Minson C. T. "Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin." *J. Appl. Physiol.* 2010; 109:1239-1246.

101. Bergersen T. K., Eriksen M., Walloe L. "Effect of local warming on hand and finger artery blood velocities." *Am. J. Physiol.* 1995; 269:R325-330.
102. Bergersen T. K., Eriksen M., Walloe L. "Local constriction of arteriovenous anastomoses in the cooled finger." *Am. J. Physiol.* 1997; 273:R880-886.
103. Bini G., Hagbarth K. E., Hynninen P., Wallin B. G. "Regional similarities and differences in thermoregulatory vaso- and sudomotor tone." *J. Physiol.* 1980; 306:553-565.
104. Lossius K., Eriksen M., Walloe L. "Thermoregulatory fluctuations in heart rate and blood pressure in humans: effect of cooling and parasympathetic blockade." *J. Auton. Nerv. Syst.* 1994; 47:245-254.
105. Richardson D., Schmitz M., Borchers N. "Relative effects of static muscle contraction on digital artery and nailfold capillary blood flow velocities." *Microvasc. Res.* 1986; 31:157-169.
106. Bergersen T. K., Hisdal J., Walloe L. "Perfusion of the human finger during cold-induced vasodilatation." *Am. J. Physiol.* 1999; 276:R731-737.
107. Chotani M. A., Mitra S., Su B. Y., Flavahan S. et al. "Regulation of alpha(2)-adrenoceptors in human vascular smooth muscle cells." *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286:H59-67.
108. Flavahan N. A., McGrath J. C. "Are human vascular alpha-adrenoceptors atypical?" *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1984; 6: 208-210.
109. Flavahan N. A., Cooke J. P., Shepherd J. T., Vanhoutte P. M. "Human postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors: differential distribution in arteries of the limbs." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987; 241:361-365.
110. Coffman J. D., Cohen R. A. "Role of alpha-adrenoceptor subtypes mediating sympathetic vasoconstriction in human digits." *Eur. J. Clin. Invest.* 1988; 18:309-313.
111. Bollinger A., Schlumpf M. "Finger blood flow in healthy subjects of different age and sex and in patients with primary Raynaud's disease." *Acta Chir. Scand. Suppl.* 1976; 465:42-47.
112. Freedman R. R., Moten M. "Gender differences in modulation of peripheral vascular adrenoceptors." *Ann. Behav. Med.* 1995; 17:15-18.
113. Bartelink M. L., De Wit A., Wollersheim H., Theeuwes A., Thien, T. "Skin vascular reactivity in healthy subjects: influence of hormonal status." *J. Appl. Physiol.* 1993;74:727-732.
114. Cooke J. P., Creager M. A., Osmundson P. J., Shepherd J. T. "Sex differences in control of cutaneous blood flow." *Circulation* 1990; 82:1607-1615.

115. Eid A. H., Maiti K., Mitra S., Chotani M. A. et al. "Estrogen increases smooth muscle expression of alpha2C-adrenoceptors and cold-induced constriction of cutaneous arteries." *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2007, 293:H1955-1961.
116. Kleinert H., Wallerath T., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I. et al. "Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved." *Hypertension* 1998, 31:582-588.
117. Knapik-Kordecka M., Wysocki W. E. "Clinical spectrum of Raynaud's phenomenon in patients referred to vascular clinic." *Cardiovascular Surgery* 2000; 8:457-462.
118. Nemerson Y., Luther T., Kotschy M., Müller M. "Tissue factor: then and now." *Thromb. Haemost.* 1995; 74:180-184.
119. Naumnik B., Małyszko J., Myśliwiec M. „Rola czynnika tkankowego i jego inhibitora w hemostazie.” *Przegl. Lek.* 1998; 55:68-73.
120. Roberts H.R., Monroe D.M., Oliver J.A., Chang J.Y., Hoffman M. "Newer concepts of blood coagulation." *Haemophilia* 1998; 4:331-334.
121. Harlos K., Martin D. M., O'Brien D. P., Jones E. Y. et al. "Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor" *Nature* 1994; 370:662-666.
122. Kakkar A. K., DeRuvo N., Chinswangwatanakul V., Tebbutt S., Williamson R. C. "Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor." *Lancet* 1995; 346:1004-5.
123. Broze G. J., Leykam J. E., Schwartz B. D., Miletich J. P. "Purification of human brain tissue factor." *J. Biol. Chem.* 1985; 260:10917-10920.
124. Mackman N., Morrissey J. H., Fowler B., Edgington T. S. "Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade." *Biochemistry* 1989; 28:1755-1762.
125. Broze G. J. Jr., Miletich J. P. "Isolation of the tissue factor inhibitor produced by HepG2 hepatoma cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84:1886-1890.
126. Wun T. C., Kretzmer K. K., Girard T. J. Miletich J. P., Broze G.J. Jr. "Cloning and characterization of cDNA coding for the lipoprotein associated inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz type inhibitory domains." *J. Biol. Chem.* 1988; 263:6001-6004.
127. Rucińska M., Gacko M., Skrzydlewski Z. „Inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia krwi (TFPI) i jego znaczenie w patologii.” *Post. Hig. Med. Dośw.* 1997; 51:421-430.
128. Witt I. "Tissue factor pathway inhibitor biochemistry molecular biology, physiology and pathophysiology." *Haemostaseologie* 2002; 22:30-35.

129. Girard T. J., Eddy R., Wesserschmidt R. L., MacPhail L. A. et al. "Structure of the human lipoprotein-associated coagulation inhibitor gene. Intro/ex on gene organization and localization of the gene to chromosome 2." *J. Biol. Chem.* 1991; 263:6001–6004.
130. Sayer M. S., Cole V. J., Baker R., Staton J.M. "Polymorphism in the tissue factor pathway inhibitor gene are not associated with ischemic stroke." *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2007; 18:703–708.
131. Gori A. M., Pepe G., Attanasio M., Falciani M. et al. "Tissue factor reduction and tissue factor pathway inhibitor release after heparin administration." *Thromb. Haemost.* 1999; 81:589–593.
132. Silveira A., Yamamoto T., Adamson L., Hessel B., Blombäck B. "Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to von Willebrand factor (vWF) and its derivatives." *Thrombosis Research* 1986; 43:91-102.
133. Yamamoto T., Silveira A., Hessel B., Blombäck B. "Von Willebrand factor antigen in urine." *Thrombosis Research* 1987; 45:59-74.
134. Ruggeri Z. M. "The role of von Willebrand factor in thrombus formation." *Thromb. Res.* 2007; 120:S5–S9.
135. Rodeghiero F., Castaman G., Dini E. "Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease." *Blood* 1987; 69:454-459.
136. Silveira, A. Studies of vWF in urine and plasma in health and disease. Thesis. Karolinska Institute, Stockholm, 1990.
137. Bergman A., Andréén M., Blombäck M. "Plasma substitution with 3% dextran-60 in orthopaedic surgery: influence on plasma colloid osmotic pressure, coagulation parameters, immunoglobulins and other plasma constituents." *Acta Anaesth. Scand.* 1990; 34:21-9.
138. Martínez-Dolz L., Almenar L., Reganon E. Vila V. et al. "Follow-up study on the utility of von Willebrand factor levels in the diagnosis of cardiac allograft vasculopathy." *J. Heart Lung Transplant.* 2008; 27:760-6.
139. Hesselvik J. F., Blombäck M., Brodin B., Maller R. "Coagulation, fibrinolysis, and kallikrein systems in sepsis: relation to outcome." *Critical Care Medicine* 1989; 17:724-733.
140. Rość D. „Potencjał fibrynolityczny krwi w miażdżycy tętnic kończyn dolnych.” Praca habilitacyjna. Wydawnictwo Uczelniane Akademii Medycznej w Bydgoszczy. Bydgoszcz 1993, 7-110.
141. Suzuki K., Kusumoto H., Deyashiki Y., Maruyama I. et al. "Structure and expression of

human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation." *EMBO J.* 1987; 6:1891-1897.

142. Han H.-S., Wu H.-L., Lin B.-T., Shi C.-S., Shi G.-Y. "Effect of thrombomodulin on plasminogen activation." *Fibrinolysis & Proteolysis.* 2000; 14:221–228.

143. Sokołowska B. "The physiological function of hemostasis". *Acta Haematologica Polonica* 2010; 41:245–252.

144. Tezuka Y., Yonezawa S., Maruyama I., Matsushita Y. et al. "Expression of thrombomodulin in esophageal squamous cell cancer and its relationship to lymph node metastasis." *Cancer Res.* 1995; 55:4196–4200.

145. Li Y.-H., Kuo Ch.-H., Shi G.-Y., Wu H.-L. "The role of thrombomodulin lectin-like domain in Inflammation." *J. Biomed. Sci.* 2012; 19:34.

146. Kłoczko J. „Inhibitor drogi zależnej od czynnika tkankowego." *Acta Haematologica Polonica* 1997; 28:30-32.

147. Dugina T. N., Kiseleva, E. V., Chistov I. V., Umarova B. A., Strukova S. M. "Receptors of the PAR Family as a Link between Blood Coagulation and Inflammation." *Biochemistry (Mosc).* 2002; 67:65-74.

148. Luo W., Wang Y., Reiser G. "Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection." *Brain Res. Rev.* 2007; 56:331-45.

149. Davie E. W., Kulman J.D. "An Overview of the Structure and Function of Thrombin." *Semin. Thromb. Hemost.* 2006; 32:3-15.

150. Goldsack N. R., Chambers R. C., Dabbagh K., Laurent G.J. "Thrombin." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998; 30:641-6.

151. Quinsey N. S., Greedy A. L., Bottomley S. P., Whisstock J. C., Pike R. N. "Antithrombin: in control of coagulation." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36:386-9.

152. Cimminiello C., Arpaia G., Toschi V., Rossi F. et al. "Plasma levels of tumor necrosis factor and endothelial response in patients with chronic arterial obstructive disease or Raynaud's phenomenon." *Angiology* 1994; 45:1015-1022.

153. Kopeikina L. T., Kamper E. F., Koutsoukos V., Bassiakos Y., Stavridis I. "Imbalance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and its specific inhibitor (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis associated with disease activity." *Clin. Rheumatol.* 1997; 16:254-260.

154. Nakase T., Wada H., Minamikawa K., Wakita Y. et al. "Increased activated protein C-protein

C inhibitor complex level in patients positive for lupus anticoagulant." *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1994; 5:173-177.

155. Robak, T. „Biologia i farmakologia cytokin.” Wydawnictwo naukowe PWN. Warszawa-Łódź 1995.

156. Chen K.H., Wu C.C., Roy S., Lee S.M., Liu J.H. “Increased Interleukin-6 in Aqueous Humor of Neovascular Glaucoma.” *Investigative Ophthalmology. Visual Science*. 1999; 40:2627-2632.

157. Ames P.R., Lupoli S., Alves J., Atsumi T. et al. “The coagulation/fibrinolysis balance in systemic sclerosis: evidence for a haematological stress syndrome.” *Br. J. Rheumatol.* 1997; 36:1045-1050.

158. Ruiz-Arguelles G. J., Ruiz-Arguelles A., Lobato-Mendizabal E., Diaz-Gomez F. et al. “Disturbances in the tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor (t-PA/PAI) system in systemic lupus erythematosus.” *Am. J. Hematol.* 1991; 37:9-13.

159. Carmassi F., De Negri F., Morale M., Puccetti R., Chung S. I. “Elastase- and plasmin-mediated fibrinolysis in rheumatoid arthritis.” *Int. J. Tissue React.* 1994; 16:89-93.

160. Thompson D., Pepys M. B., Wood S. P. “The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine.” *Structure*. 1999; 7:169-177.

161. Yudkin J. S., Stehouwer C. D., Emeis J. J., Coppack S. W. “C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19:972–978.

162. Jialal I., Devaraj S., Venugopal S. K. “C-Reactive Protein: Risk Marker or Mediator in Atherothrombosis?” *Hypertension* 2004; 44:6–11.

163. Ridker P. M. “Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention.” *Circulation* 2003; 107:363–369.

164. Pradhan A. D., Manson J. E., Rifai N., Buring J. E., Ridker P. M. “C-reactive protein, interleukin 6 and risk of developing type 2 diabetes mellitus.” *JAMA* 2001; 286:327–334.

165. Pasceri V., Willerson J. T., Yeh E. T. “Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells.” *Circulation* 2000; 102:2165–2168.

166. Verma S., Li S. H., Badiwala M. V., Weisel R. D. et al. „Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein.” *Circulation* 2002; 105:1890–1896.

167. Verma S., Wang C. H., Li S. H., Dumont A. S. et al. “A self-fulfilling prophecy: C-reactive

protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis." *Circulation* 2002; 106:913–919.

168. Devaraj S., Xu D. Y., Jialal I. "C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis." *Circulation* 2003; 107: 398–404.

169. Naugler W. E., Karin M. "The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer." *Trends Mol. Med.* 2008; 14:109-19.

170. Yamamura M., Yamada Y., Momita S., Kamihira S., Tomonaga M. "Circulating interleukin-6 levels are elevated in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients and correlate with adverse clinical features and survival." *Br. J. Haematol.* 1998; 100:129-34.

171. Schuett H., Luchtefeld M., Grothusen C., Grote K., Schieffer B. "How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis." *Thromb. Haemost.* 2009; 102:215-22.

172. Jones S. A. "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6." *J. Immunol.* 2005; 175:3463-8.

173. Hodge D. R., Hurt E. M., Farrar W. L. "The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer." *Eur. J. Cancer.* 2005; 41:2502-12.

174. Cerutti A. Zan H., Schaffer A., Bergsagel L. et al. "CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line." *J. Immunol.* 1998; 160:2145-57.

175. Seo J. W., Kim H. K., Lee D. S., Cho H. I. "Clinical usefulness of plasma interleukin-6 and interleukin-10 in disseminated intravascular coagulation." *Korean J. Lab. Med.* 2007; 27:83-8.

176. Joseph L., Fink L. M., Hauer-Jensen M. "Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review." *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2002; 13:105-16.

177. Letterio J. J., Roberts A. B. "Regulation of immune responses by TGF-beta." *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16:137-61.

178. Brevetti G., Giugliano G., Brevetti L., Hiatt W. R. "Inflammation in peripheral artery disease." *Circulation.* 2010, 122:1862-75.

179. Norrby K. "Basic fibroblast growth factor and de novo mammalian angiogenesis." *Microvasc Res.* 1994; 48:96-113.

180. Pinderski Oslund L. J., Hedrick C. C., Olvera T., Hagenbaugh A. et al. "Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19:2847-53.

181. Naidu S., Baskerville P. A., Goss D. E., Roberts V. C. "Raynaud's phenomenon and cold stress testing: a new approach" *Eur. J. Vasc. Surg.* 1994; 8: 567-73.
182. Greenstein D., Jeffcote N., Ilsley D., Kester R. C. „The menstrual cycle and Raynaud's phenomenon." *Angiology* 1996; 47: 427-36.
183. Kim H., Richardson C., Roberts J., Gren L., Lyon, J. L. "Cold hands, warm heart." 1998; 351:1492.
184. Pavlov-Dolijanovic S., Damjanov N. S., Vujasinovic Stupar N. Z., Radunovic G. L. et al. "Late appearance and exacerbation of primary Raynaud's phenomenon attacks can predict future development of connective tissue disease: a retrospective chart review of 3,035 patients." *Rheumatol. Int.* 2013; 33: 921-926.
185. Herrick A. L., Jayson M. I. "Primary Raynaud's phenomenon in early childhood." *Br. J. Rheumatol.* 1991; 30:223-225.
186. Pope J. E. "The diagnosis and treatment of Raynaud's phenomenon: a practical approach." *Drugs* 2007; 67:517-525.
187. Meier F. M., Frommer K. W., Dinser R., Walker U. A. 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; 71:1355-1360.
188. Gayraud M. "Raynaud's phenomenon." *Joint Bone Spine* 2007; 74:e1-8.
189. van den Hoogen F., Khanna D., Fransen J., Johnson S. R. et al. "2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative." *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72:1747-1755.
190. Minier T., Guiducci S., Bellando-Randone S., Bruni, C. et al. "Preliminary analysis of the very early diagnosis of systemic sclerosis (VEDOSS) EUSTAR multicentre study: evidence for puffy fingers as a pivotal sign for suspicion of systemic sclerosis." *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73:2087-2093.
191. Maldonado M. E., Perez M., Pignac-Kobinger J., Marx E. T. et al. "Clinical and immunologic manifestations of mixed connective tissue disease in a Miami population compared to a Midwestern US Caucasian population." *J. Rheumatol.* 2008; 35:429-437.
192. Shi Y. H., Li R., Chen S., Su Y., Jia Y. "Analysis of clinical features and the outcome in 91 cases of mixed connective tissue diseases." *Beijing Da Xue Xue Bao* 2012; 44:270-274.

193. Nossent J., Kiss E., Rozman B., Pokorny G. et al. "Disease activity and damage accrual during the early disease course in a multinational inception cohort of patients with systemic lupus erythematosus." *Lupus* 2010; 19:949-956.]
194. Alonso M. D., Martinez-Vazquez F., Riancho-Zarrabeitia L., Diaz de Teran T. et al. "Sex differences in patients with systemic lupus erythematosus from Northwest Spain." *Rheumatol. Int.* 2014; 34:11-24.
195. Boddaert J., Huong D. L., Amoura Z., Wechsler B. et al. "Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature." *Medicine (Baltimore)* 2004; 83:348-359.
196. Mosca M., Tani C., Carli L., Della Rossa A. et al. "Analysis of the evolution of UCTD to defined CTD after a long term follow-up." *Clin. Exp. Rheumatol.* 2013; 31:471.
197. Vaz C. C., Couto M., Medeiros D., Miranda L. et al. "Undifferentiated connective tissue disease: a seven-center cross-sectional study of 184 patients." *Clin. Rheumatol.* 2009; 28:915-921.
198. Pakozdi A., Nihtyanova S., Moinzadeh P., Ong V. H. et al. "Clinical and serological hallmarks of systemic sclerosis overlap syndromes." *J. Rheumatol.* 2011; 38:2406-2409.
199. Pope J. E., Al-Bishri J., Al-Azem H., Ouimet J. M. "The temporal relationship of Raynaud's phenomenon and features of connective tissue disease in rheumatoid arthritis." *J. Rheumatol.* 2008; 35:2329-2333.
200. Garcia-Carrasco M., Siso A., Ramos-Casals M., Rosas J. et al. "Raynaud's phenomenon in primary Sjogren's syndrome. Prevalence and clinical characteristics in a series of 320 patients." *J. Rheumatol.* 2002; 29:726-730.
201. Cooke R. A. "Thoracic outlet syndrome—aspects of diagnosis in the differential diagnosis of hand-arm vibration syndrome." *Occup. Med. (Lond)* 2003; 53:331-336.
202. Hatron P. Y., Frimat P., Hachulla E. "Raynaud's phenomena of occupational origin." *Rev. Prat.* 1998; 48:1653-1658.
203. McLafferty R. B., Edwards J. M., Ferris B. L., Moneta G. L. et al. "Raynaud's syndrome in workers who use vibrating pneumatic air knives." *J. Vasc. Surg.* 1999; 30:1-7.
204. Palmer K. T., Griffin M. J., Syddall H., Pannett B. et al. "Prevalence of Raynaud's phenomenon in Great Britain and its relation to hand transmitted vibration: a national postal survey." *Occup. Environ. Med.* 2000; 57:448-452.

205. Noel B., Holtz J., Savolainen H., Depairon M. "Hand-arm vibration syndrome with proximal ulnar artery occlusion." *Vasa* 1998; 27:176-178.
206. Larsen B. T., Edwards W. D., Jensen M. H., Johnson C. H. et al. "Surgical pathology of hypothenar hammer syndrome with new pathogenetic insights: A 25-year institutional experience with clinical and pathologic review of 67 cases." *Am. J. Surg. Pathol.* 2013; 37:1700-1708.
207. Thompson A., House R. "Hand-arm vibration syndrome with concomitant arterial thrombosis in the hands." *Occup. Med. (Lond.)* 2006; 56:317-321.
208. Cooke R. A. "Hypothenar hammer syndrome: a discrete syndrome to be distinguished from hand-arm vibration syndrome." *Occup. Med. (Lond.)* 2003; 53:320-324.
209. Hartmann P., Mohokum M., Schlattmann P. "The association of Raynaud's syndrome with carpal tunnel syndrome: a meta-analysis." *Rheumatol. Int.* 2012; 32:569-574.
210. Machet L., Vaillant L., Machet M. C., Esteve E. et al. "Carpal tunnel syndrome and systemic sclerosis." *Dermatology* 1992; 185:101-103.
211. Belch J. "Raynaud's phenomenon." *Cardiovasc. Res.* 1997; 33:25-30.
212. Suter L. G., Murabito, J. M., Felson D. T., Fraenkel L. "Smoking, alcohol consumption, and Raynaud's phenomenon in middle age." *Am. J. Med.* 2007; 120:264-271.
213. Palesch Y. Y., Valter I., Carpentier P. H., Maricq, H. R. "Association between cigarette and alcohol consumption and Raynaud's phenomenon." *J. Clin. Epidemiol.* 1999; 52:321-328.
214. Steen V., Denton C. P., Pope J. E., Matucci-Cerinic M. "Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis." *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48:iii19-24.
215. Cherniack M., Clive J., Seidner A. "Vibration exposure, smoking, and vascular dysfunction." *Occup. Environ. Med.* 2000; 57: 341-347.
216. Giurgea G. A., Mlekusch W., Charwat-Resl S., Mueller M. et al. "Relationship of age and body mass index to skin temperature and skin perfusion in primary Raynaud's phenomenon." *Arthritis Rheumatol.* 2015; 67:238-242.
217. Flavahan, N. A. "A vascular mechanistic approach to understanding Raynaud phenomenon." *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015; 11:146-158.
218. Chang L., Villacorta L., Li R., Hamblin M. et al. "Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis." *Circulation* 2012; 126:1067-1078.

219. Tam C. S., Lecoultre V., Ravussin E. "Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets." *Circulation* 2012; 125:2782-2791.
220. Self, S. E. "Autoantibody testing for autoimmune disease." *Clin. Chest. Med.* 2010; 31:415-422.
221. Ziegler S., Brunner M., Eigenbauer E., Minar E. "Long-term outcome of primary Raynaud's phenomenon and its conversion to connective tissue disease: a 12-year retrospective patient analysis." *Scand. J. Rheumatol.* 2003; 32:343-347.
222. Ippolito A., Wallace D. J., Gladman D., Fortin P. R. et al. "Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity." *Lupus* 2011; 20:250-255.
223. Garza-Rodriguez V., Villarreal-Alarcon M. A., Ocampo-Candiani J. et al. "[Scleroderma: an update on the pathogenesis and treatment]." *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 2013; 51:50-57.
224. Denton C. P., Krieg T., Guillevin L., Schwierin B. et al. "Demographic, clinical and antibody characteristics of patients with digital ulcers in systemic sclerosis: data from the DUO Registry." *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71:718-721.
225. Prete M., Fatone M. C., Vacca A., Racanelli V., Perosa F. "Severe pulmonary hypertension as the initial manifestation of systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature." *Clin. Exp. Rheumatol.* 2014; 32:267-274.
226. Nakano M., Ohuchi Y., Hasegawa H. Kuroda T. et al. "Clinical significance of anticentromere antibodies in patients with systemic lupus erythematosus." *J. Rheumatol.* 2000; 27:1403-1407.
227. Bournia V. K., Diamanti K. D., Vlachoyiannopoulos P. G., Moutsopoulos H. M. "Anticentromere antibody positive Sjogren's Syndrome: a retrospective descriptive analysis." *Arthritis. Res. Ther.* 2010; 12:R47.
228. Frisoni L., McPhie L., Colonna L., Sriram U. et al. "Nuclear autoantigen translocation and autoantibody opsonization lead to increased dendritic cell phagocytosis and presentation of nuclear antigens: a novel pathogenic pathway for autoimmunity?" *J. Immunol.* 2005;175:2692-2701.
229. Mehra S., Walker J., Patterson K., Fritzler M. J. "Autoantibodies in systemic sclerosis." *Autoimmun. Rev.* 2013; 12:340-354.
230. Dib H., Tamby M. C., Bussone G., Regent A. et al. "Targets of anti-endothelial cell antibodies in pulmonary hypertension and scleroderma." *Eur. Respir. J.* 2012; 39:1405-1414.

231. Sgonc R., Gruschwitz M. S., Boeck G., Sepp N. et al. "Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95." *Arthritis Rheum.* 2000; 43:2550-2562.
232. Lage L. V., de Carvalho J. F., Caleiro M. T., Yoshinari N. H. et al. "Fluctuation of anti-endothelial cell antibody titers in " mixed connective tissue disease." *Isr. Med. Assoc. J.* 2012; 14:84-87.
233. Carter S. A., Dean E., Kroeger E. A. "Apparent finger systolic pressures during cooling in patients with Raynaud's syndrome." *Circulation* 1988; 77:988-996.
234. Smyth A. E., Bell, A. L., Bruce I. N., McGrann S., Allen, J. A. "Digital vascular responses and serum endothelin-1 concentrations in primary and secondary Raynaud's phenomenon." *Ann. Rheum. Dis.* 2000, 59:870-874.
235. Greenstein D., Gupta N. K., Martin P., Walker D. R., Kester R. C. "Impaired thermoregulation in Raynaud's phenomenon." *Angiology* 1995, 46:603-611.
236. Engelhart, M., Kristensen J. K. "Raynaud's phenomenon: blood supply to fingers during indirect cooling, evaluated by laser Doppler flowmetry." *Clin. Physiol.* 1986, 6:481-488.
237. Cutolo M., Sulli A., Pizzorni C., Accardo S. "Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis." *J. Rheumatol.* 2000; 27:155-160.
238. Rychlik-Golema W., Mastej K., Adamiec R. et al. "The role of endothelin-1 and selected cytokines in the pathogenesis of Raynaud's phenomenon associated with systemic connective tissue diseases." *Int. Angiol.* 2006; 25:221-227.
239. Silveri, F. De Angelis, R. Poggi, A. Muti, S. et al. "Relative roles of endothelial cell damage and platelet activation in primary Raynaud's phenomenon (RP) and RP secondary to systemic sclerosis." *Scand. J. Rheumatol.* 2001; 30:290-296.
240. Herrick A. L., Illingworth K., Blann A., Hay C. R. et al. "Von Willebrand factor, thrombomodulin, thromboxane, beta-thromboglobulin and markers of fibrinolysis in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis." *Ann. Rheum. Dis.* 1996; 55:122-127.
241. Ferro D., Basili S., Roccaforte S., Di Franco M. et al. "Determinants of enhanced thromboxane biosynthesis in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum.* 1999; 42:2689-2697.
242. Ferro D., Pittoni V., Quintarelli C., Basili S. et al. "Coexistence of anti-phospholipid antibodies and endothelial perturbation in systemic lupus erythematosus patients with ongoing prothrombotic state." *Circulation* 1997; 95:1425-1432.

243. Violi F., Ferro D., Valesini G., Quintarelli C. et al. "Tissue plasminogen activator inhibitor in patients with systemic lupus erythematosus and thrombosis." *BMJ* 1990; 300:1099-1102.
244. Marasini B., Cugno M., Bassani C., Stanzani M. et al. "Tissue-type plasminogen activator and von Willebrand factor plasma levels as markers of endothelial involvement in patients with Raynaud's phenomenon." *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1992; 11:375-382.
245. Choudhury N. A., Pietraszek M. H., Hachiya T., Baba S. et al. "Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor 1 before and after venous occlusion of the upper limb in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease)." *Thromb. Res.* 1992; 66:321-329.
246. Wallberg-Jonsson S, Cederfelt M., Rantapaa Dahlqvist S. "Hemostatic factors and cardiovascular disease in active rheumatoid arthritis: an 8 year followup study." *J. Rheumatol.* 2000; 27:71-75.
247. Haustein U. F., Scheel H., Siegemund A., Krusche U. "Vascular function parameters in idiopathic and quartz-induced progressive scleroderma." *Hautarzt* 1993; 44:717-722.
248. Cimminiello C., Milani M., Uberti T., Arpaia G. et al. "t-PA, PAI, and protein C before and after vascular occlusion of the upper limb in patients with Raynaud's phenomenon." *Angiology* 1991; 42:231-238.
249. Ruiz-Arguelles A., Angles-Cano E., Perez-Romano B., Ruiz-Arguelles G. J. e al. "Serum antibodies to distinct epitopes of the tissue-type plasminogen activator (t-PA) in patients with systemic lupus erythematosus." *Am. J. Hematol.* 1995; 49:109-114.
250. Salazar-Paramo M., Garcia de la Torre I., Fritzier M. J., Loyau S., Angles-Cano E. "Antibodies to fibrin-bound tissue-type plasminogen activator in systemic lupus erythematosus are associated with Raynaud's phenomenon and thrombosis." *Lupus* 1996; 5:275-278.
251. Atsumi T., Khamashta M. A., Andujar C., Leandro M. J. et al. "Elevated plasma lipoprotein(a) level and its association with impaired fibrinolysis in patients with antiphospholipid syndrome." *J. Rheumatol.* 1998; 25:69-73.
252. Martini F., Farsi A., Gori A. M., Boddi M. et al. "Antiphospholipid antibodies (aPL) increase the potential monocyte procoagulant activity in patients with systemic lupus erythematosus." *Lupus* 1996;5:206-211.
253. Shunto R., Shirakami A., Ohara A., Toibana N., Saito S. "Activation of blood coagulation and fibrynolysis in vibration syndrome." *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1991; 63:293-296.
254. Trifiletti A., Bartolone S., Scamardi R., Pizzoleo M. A. et al. "Evaluation of haemostatic parameters and circadian variations of the haemostatic system in patients with systemic

sclerosis and Raynaud's phenomenon." *Panminerva Med.* 2000; 42:7-9.

255. Matsuda J., Kawasugi K., Gohchi K., Saitoh N. et al. "Clinical significance of the venous occlusion test on systemic lupus erythematosus patients with a focus on changes in blood levels of tissue plasminogen activator, von Willebrand factor antigen, and thrombomodulin." *Acta Haematol.* 1992; 88:22-6.

256. Matsuda J., Tsukamoto M., Gohchi K., Saitoh N. et al. "Effect of total-body cold exposure on plasma concentrations of von Willebrand factor, endothelin-1 and thrombomodulin in systemic lupus erythematosus patients with or without Raynaud's phenomenon." *Acta Haematol.* 1992; 88:189-193.

257. Takahashi H., Ito S., Hanano M., Wada K. et al. "Circulating thrombomodulin as a novel endothelial cell marker: comparison of its behavior with von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator." *Am. J. Hematol.* 1992; 4:32-39.

258. Herrick A. L., Illingworth K., Blann A., Hay C. R. M. et al. "Von Willebrand factor, thrombomodulin, thromboxane, β -thromboglobulin and markers of fibrinolysis in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis." *Ann. Rheum. Dis.* 1996; 55:122-127.

11. Załączniki

11.1. Załącznik 1.

Kryteria włączenia do badania:

1. Wiek > 18 lat.
2. Rozpoznanie na podstawie wywiadu objawu Raynauda, występującego co najmniej od 3 miesięcy.
3. Wyrażenie przez pacjenta pisemnej zgody na udział w badaniu.

Kryteria wyłączenia z badania:

1. Oczekiwany czas przeżycia chorego poniżej 12 miesięcy.
2. Prawdopodobieństwo amputacji kończyny w ciągu najbliższych 12 miesięcy.
3. Przebyta rewaskularyzacja naczyń w ciągu ostatniego miesiąca lub planowana rewaskularyzacja w trakcie tego badania klinicznego.
4. Przebycie jakiegokolwiek zabiegu operacyjnego w ciągu ostatnich 3 miesięcy, lub planowane wykonanie takiego zabiegu - w trakcie tego badania klinicznego, poza zabiegami okulistycznymi, stomatologicznymi i endoskopowymi.
5. Przebycie incydentu ostrego zespołu wieńcowego, udaru mózgowego w ciągu ostatnich 3 miesięcy.
6. Istnienie przewlekłej choroby lub stanu zapalnego, dającego wzrost CRP > 15 mg/l, w tym szczególnie: przewlekłej choroby płuc z częstymi infekcjami, choroby stawów, rozległej choroby skóry, poza chorobą układową tkanki łącznej (z CRP < 15 mg/l)
7. Rozległa martwica tkanek, ropowica, zapalenie kości, która może dawać w ciągu najbliższych dni kliniczne cechy uogólnionej infekcji ze wzrostem CRP > 15 mg/l – wg uznania badacza.
8. Istnienie aktywnej lub leczonej w ostatnich 24 miesiącach choroby rozrostowej poza rakiem podstawnokomórkowym skóry lub rakiem in situ.

9. Przewlekłe leczenie immunosupresyjne powyżej 14 dni poza podawanymi przewlekle wziewnymi kortykosterydami.
10. Przebycie w ciągu ostatnich 12 miesięcy incydentu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej poza przebyciem zapalenia żył powierzchownych.
11. Rozpoznanie zatorowości płucnej bez ustalonej przyczyny, takiej jak zakrzepica żylna.
12. Przewlekła niewydolność żylna w okresie 6 wg klasyfikacji klinicznej CEAP.
13. Aktualnie, jak i w ciągu ostatnich 3 miesięcy – terapia lekami, czy substancjami biologicznymi w ramach innych badań klinicznych.
14. Ciąża i okres połogu.
15. Czynniki psychiczne, socjalne i demograficzne, które mogą spowodować nieuczestniczenie pacjenta w realizacji badania.
16. Brak ubezpieczenia w Narodowym Funduszu Zdrowia.

11.2. Załącznik 2.

Regresja wieloczynnikowa dla pozytywnego wyniku próby oziębienia

Model 1.

model pełny			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,1234	1,0077 to 1,2523	0,0359
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	12,781	0,7420 to 220,1418	0,0793
ANA dodatnie	178,7004	5,8187 to 5488,1106	0,003
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa szyjnego	0,0377	0,0031 to 0,4571	0,01
sód	1,7557	1,0383 to 2,9688	0,0357
TAT	0,5228	0,2690 to 1,0160	0,0557
IL-10	1,0094	0,9516 to 1,0707	0,7565

model backward elimination			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,1292	1,0123 to 1,2596	0,0293
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	13,0683	0,7148 to 238,9325	0,083
ANA dodatnie	218,5937	7,1293 to 6702,3919	0,002
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa szyjnego	0,0318	0,0027 to 0,3787	0,0064
sód	1,7796	1,0494 to 3,0177	0,0324
TAT	0,5084	0,2597 to 0,9950	0,0483

Model 2.

model pełny			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,0681	0,9977 to 1,1435	0,0582
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	7,6383	0,8842 to 65,9852	0,0646
CTD	6,2373	1,3291 to 29,2706	0,0203
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa szyjnego	0,2561	0,0554 to 1,1833	0,0811
sód	1,4804	1,0041 to 2,1826	0,0476
TAT	0,6728	0,4370 to 1,0359	0,0719
IL-10	1,0168	0,9277 to 1,1144	0,7222

model backward elimination			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,0725	1,0027 to 1,1471	0,0414
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	7,2632	0,8065 to 65,4139	0,077
CTD	7,5364	1,6653 to 34,1070	0,0087
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa szyjnego	0,2264	0,0494 to 1,0363	0,0556
sód	1,4887	1,0128 to 2,1880	0,0429
TAT	0,6673	0,4349 to 1,0238	0,064

Model 3.

model pełny			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,063	0,9773 to 1,1563	0,1544
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	44,1532	2,5732 to 757,6101	0,009
postać uogólniona twardziny układowej	732,403	5,8002 to 92481,6907	0,0075
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa szyjnego	1,04	0,1490 to 7,2602	0,9685
sód	2,1836	1,1496 to 4,1478	0,017
TAT	0,3977	0,1873 to 0,8446	0,0164
IL-10	1,0897	0,8638 to 1,3748	0,4684

model backward elimination			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,076	1,0026 to 1,1548	0,042
owrzodzenie palców rąk w wywiadzie	34,713	2,8224 to 426,9362	0,0056
postać uogólniona twardziny układowej	267,3664	6,0950 to 11728,4332	0,0038
sód	2,0716	1,2505 to 3,4317	0,0047
TAT	0,4397	0,2313 to 0,8356	0,0121

11.3. Załącznik 3.

Regresja wieloczynnikowa dla wtórnego RP

model pełny			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,1713	0,9781 to 1,4027	0,0856
ABPIsin	4,18217E-08	5,69247E-015 to 0,3073	0,0352
zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa	2,4184	0,2450 to 23,8731	0,4497
nadciśnienie tętnicze	0,0866	0,0054 to 1,3874	0,0839
cukrzyca	4,2807	0,1258 to 145,7150	0,4191
paczkolata	0,8897	0,7669 to 1,0322	0,1232
BMI	1,6589	0,9593 to 2,8688	0,0701
HCT	1,7907	0,9358 to 3,4265	0,0785
kwas moczowy	0,8991	0,2268 to 3,5636	0,8796
potas	0,2824	0,0046 to 17,4512	0,5478
HDL	0,938	0,8577 to 1,0258	0,1611
ALP	0,9658	0,9028 to 1,0332	0,3122
vWF	1,0018	0,9995 to 1,0041	0,1214
t-PA	1,0256	0,7956 to 1,3221	0,8454
PAI-1	1,0516	0,9181 to 1,2043	0,4677
IL-6	1,0111	0,9878 to 1,0349	0,3535
IL-10	1,4183	1,0231 to 1,9663	0,036

model backward elimination			
zmienna	odds ratio	95% CI	p-value
wiek pojawienia się RP	1,0654	0,9969 to 1,1386	0,0616
ABPIsin	0	7,70636E-012 to 0,0401	0,0116
nadciśnienie tętnicze	0,2179	0,0356 to 1,3351	0,0995
BMI	1,5585	1,1726 to 2,0715	0,0022
HCT	1,4458	0,9617 to 2,1735	0,0764
IL-10	1,4768	1,0579 to 2,0616	0,022