

Lek. Paulina Cieplewicz

**Znaczenie wybranych cytokin z rodziny interleukiny 1 w patomechanizmie
twardziny ograniczonej**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. Adriana Polańska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Michał Kowalczyk

Zakład Dermatologii i Wenerologii



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2022

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi Pani Docent Adrianie Polańskiej
za umożliwienie mi realizacji pracy naukowej, opiekę merytoryczną, poświęcony czas,
za życzliwość i motywację oraz wszystkie cenne wskazówki.*

*Dziękuję Promotorowi Pomocniczemu Panu Doktorowi Michałowi Kowalczykowi
za opiekę merytoryczną, pomoc w przeprowadzeniu badań naukowych
i poświęcony czas.*

*Dziękuję Pani Profesor Aleksandrze Dańczak-Pazdrowskiej za cenne rady i pomoc
w powstaniu niniejszej pracy.*

*Dziękuję Panu Profesorowi Zygmuntowi Adamskiemu oraz Panu Profesorowi
Ryszardowi Żabie za umożliwienie mi realizacji pracy doktorskiej.*

Dziękuję mojemu Narzeczonemu Aleksandrowi za codzienne wsparcie i motywację.

Pracę dedykuję Aleksandrowi.

Spis treści

Spis najczęściej stosowanych skrótów.....	7
1. WSTĘP	8
1.1. Rys historyczny.....	8
1.2. Etiologia.....	9
1.2.1. Patogeneza	10
1.2.1.1. Uszkodzenie komórek śródbłónka.....	10
1.2.1.2. Zaburzenie macierzy pozakomórkowej	11
1.2.1.3. Zaburzenia immunologiczne.....	12
1.2.1.4. Inflamasom i cytokiny z rodziny IL-1	13
1.2.1.5. Inne czynniki w patogenezie morphea.....	21
1.3. Epidemiologia	23
1.4. Podział	23
1.5. Obraz kliniczny	24
1.6. Rozpoznanie.....	28
1.7. Leczenie	30
1.7.1. Leczenie miejscowe	30
1.7.2. Fototerapia	31
1.7.3. Leczenie ogólne	32
1.8. Rokowanie i przebieg	34
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	35
3. MATERIAŁ I METODYKA.....	36
3.1. Materiał.....	36
3.1.1. Grupa badana	36
3.1.2. Grupa kontrolna	37
3.2. Metodyka	39
3.2.1. Badanie podmiotowe	39
3.2.2. Badanie przedmiotowe	39
3.2.2.1. Postać morphea oraz współwystępowanie liszaja twardzinowego.....	39

3.2.2.2.	Ocena wskaźnika aktywności, nasilenia choroby i uszkodzenia tkanek u chorych na morphea połączona z ogólną oceną lekarską	39
3.2.2.3.	Ocena aktywności choroby	43
3.2.3.	Badania dodatkowe	43
3.2.3.1.	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej i osocze	43
3.2.3.2.	Badanie ekspresji genów <i>IL1 beta</i> i <i>IL18</i> w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)	44
3.2.3.2.1.	Izolacja RNA	44
3.2.3.2.2.	Odwrotna transkrypcja	44
3.2.3.2.3.	Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym	44
3.2.3.3.	Badanie metodą immunoenzymatyczną ELISA	57
3.3.	Analiza statystyczna	57
4.	WYNIKI	58
4.1.	Wyniki badania podmiotowego w grupie chorych na morphea	58
4.2.	Wyniki badania przedmiotowego w grupie chorych na morphea	58
4.3.	Ekspresja genu <i>IL1 beta</i> i <i>IL18</i> w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej w grupie chorych na morphea i w grupie kontrolnej	61
4.4.	Osoczowe stężenia IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea i w grupie kontrolnej	64
4.5.	Wyniki oceny korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a ekspresją genu <i>IL1 beta</i> i <i>IL18</i> w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz osoczowymi stężeniami IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea	66
4.6.	Wyniki analizy ekspresji genów <i>IL1 beta</i> i <i>IL18</i> w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz osoczowych stężeń IL-1 β , IL-18 i IL-33 z uwzględnieniem parametrów badania przedmiotowego	66
4.7.	Wyniki oceny korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a wskaźnikiem LoSCAT, PGA-A i PGA-D	69

4.8.	Wyniki oceny korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a wskaźnikami PGA-A i PGA-D	69
5.	DYSKUSJA	71
5.1.	Omówienie wyników badania podmiotowego	71
5.2.	Omówienie wyników badania przedmiotowego.....	73
5.3.	Omówienie wyników ekspresji genu <i>IL1 beta</i> w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i jej osoczonego stężenia z uwzględnieniem badania podmiotowego i przedmiotowego	74
5.4.	Omówienie wyników ekspresji genu <i>IL18</i> w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i jej osoczonego stężenia z uwzględnieniem badania podmiotowego i przedmiotowego.....	77
5.5.	Omówienie wyników osoczonego stężenia IL-33 z uwzględnieniem badania podmiotowego i przedmiotowego	80
5.6.	Analiza ekspresji genu <i>IL1 beta</i> i <i>IL18</i> oraz osoczowych stężeń IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea z współistnieniem oraz bez współistnienia liszaja twardzinowego	82
5.7.	Omówienie wyników korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a wskaźnikiem LoSCAT, PGA-A i PGA-D	82
5.8.	Omówienie wyników oceny korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a wskaźnikami PGA-A i PGA-D	83
6.	WNIOSKI	84
7.	STRESZCZENIE.....	85
8.	SUMMARY	87
9.	PIŚMIENNICTWO	89

10. ZAŁĄCZNIKI.....	108
10.1. Załącznik nr 1- Uchwała Komisji Bioetycznej nr 52/19	108
10.2. Załącznik nr 2- Uchwała Komisji Bioetycznej nr 238/19	109
10.3. Załącznik nr 3- Uchwała Komisji Bioetycznej nr 501/19	110

Spis najczęściej stosowanych skrótów

ACTB - gen kodujący β -aktynę, *ang. β -actin*

DM - postać głęboka morphea, *ang. deep morphea*

dSSc - postać uogólniona twardziny układowej, *ang. diffuse systemic sclerosis*

GAPDH - gen dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej, *ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GM - postać uogólniona morphea, *ang. generalized morphea*

IL - interleukina, *ang. Interleukin*

IL-18BP - rozpuszczalne białko IL-18, *ang. IL-18 binding protein*

INF - interferon

LM - postać linijna morphea, *ang. linear morphea*

LoSCAT - wskaźnik aktywności, nasilenia choroby i uszkodzenia tkanek w morphea, *ang. Localized scleroderma Cutaneous Assessment Tool*

LS - liszaj twardzinowy, *ang. lichen sclerosus*

ISSc - postać ograniczona twardziny układowej, *ang. limited systemic sclerosis*

Max - wartość maksymalna

MEP - postać ograniczona morphea, *ang. morphea en plaques*

Min - wartość minimalna

PBMC - komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, *ang. peripheral blood mononuclear cells*

PGA-A - ogólna ocena lekarska dotycząca aktywności choroby, *ang. Physician's Global Assessment of Disease Activity*

PGA-D - ogólna ocena lekarska dotycząca uszkodzenia, *ang. Physician's Global Assessment of Damage*

real-time PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, *ang. real time polymerase chain reaction*

SD - odchylenie standardowe, *ang. standard deviation*

SSc - twardzina układowa, *ang. systemic sclerosis*

TGF - transformujący czynnik wzrostu, *ang. transforming growth factor*

Th - limfocyty T pomocnicze, *ang. T helper*

TNF - czynnik martwicy guza, *ang. tumor necrosis factor*

1. WSTĘP

Twardzina ograniczona (*localized scleroderma*, LS) zwana również morphea, jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej, o nie w pełni wyjaśnionej etiopatogenezie. Charakteryzuje się nadmiernym odkładaniem kolagenu w obrębie skóry właściwej i/lub tkanki podskórnej (Chiriac A 2016). Choroba ta może zajmować także tkanki leżące głębiej, takie jak tkanka tłuszczowa, powięź, mięśnie i kości (Kreuter A 2009). Opisywanych jest kilka postaci morphea, z których każda prezentuje różne objawy kliniczne oraz inny stopień zajęcia tkanki łącznej. W przeciwieństwie do twardziny układowej (*systemic sclerosis*, SSc), w morphea nie stwierdza się objawu Raynauda, sklerodaktylii oraz zajęcia innych narządów i układów poza skórą (Adamski Z 2015, Fett N 2011, Careta MF 2015).

1.1. Rys historyczny

Termin *scleroderma* pochodzi z greki (*scleros*, *derma*) i oznacza dosłownie „twardą skórę” (Benedek TG 1982). Uważa się, że po raz pierwszy słowa *scleroderma* użył włoski lekarz, Giovambattista Fantonetti w 1836 roku, dla opisu objawów choroby u osoby dorosłej. Przedstawił on przypadek trzydziestoletniej pacjentki, u której stwierdzono rozlany obrzęk oraz obecność dużych krost na tułowie i nogach. Po krótkim czasie od wystąpienia powyższych zmian, skóra chorej stała się twarda, napięta i brązowa, z zaoszczędzeniem skóry wokół brodawek sutkowych i skóry twarzy (de Silva U 1994). Na istnienie twardziny ograniczonej zwrócił także uwagę angielski lekarz, Thomas Addison w 1854 roku podczas prezentacji dla Królewskiego Towarzystwa Medycznego i Chirurgicznego w Londynie. Addison przedstawił przypadek trzydziestoletniej kobiety, u której skóra na kończynach była twarda i napięta, dając wrażenie sztywnej opaski, natomiast palpacyjnie można było wyczuć nieelastyczną, sztywną „substancję” pod skórą. Addison określił to jako prawdziwe bliznowce (Kaposi M 1874).

Nazwa morphea wywodzi się z greki (*form*, *structure*) i oznacza zlokalizowane na skórze obszary stwardnień. Uznaje się, że po raz pierwszy terminu tego użył Erasmus Wilson w 1867 roku (Wilson E 1867). Henry Radcliffe Cracker oceniając histopatologicznie wycinek ze zmiany skórnej pacjenta z morphea początkowo nie

obserwował zmian patologicznych w naskórku, następnie wraz z progresją choroby opisywał zanik brodawek skórnych oraz rozrost tkanki łącznej. Doszedł do wniosku, że skóra w morphea jest biała i matowa, natomiast w twardzinie jest blada lub żółta. Crocker stwierdził, że morphea jest powierzchowną i ograniczoną postacią twardziny (Crocker HR 1880).

Kontrowersje dotyczące nomenklatury tej jednostki chorobowej nadal nie ustają (Fett N 2013). Odmienny obraz kliniczny i przebieg choroby w porównaniu do SSc wskazuje na używanie bardziej precyzyjnej terminologii niż słowo „twardzina”. Scleroderma to termin opisujący stan dermatologiczny stosowany dla grupy chorób, których cechą wspólną jest nadmierne włóknienie skóry i struktur przyległych (Gupta RA 2007). Jednak współcześnie pojęcie to jest przyczyną wielu nieporozumień, bowiem stosuje się go zamiennie z terminem twardzina, która najczęściej postrzegana jest jak choroba systemowa. Z kolei, jak wiadomo, LS jest synonimem morphea, czyli choroby, w której stwierdza się jedynie zajęcie skóry i struktur przyległych. Używanie nazwy twardzina wzbudza niepokój oraz niepotrzebny stres wśród pacjentów, a także wśród lekarzy innych specjalności (słyszac termin twardzina zakładają, że chodzi o twardzinę układową), co niejednokrotnie jest przyczyną zlecenia niepotrzebnych badań i konsultacji reumatologicznych. Zatem w celu uniknięcia nieporozumień wielu ekspertów w zakresie LS zaleca nazywanie tej jednostki chorobowej morphea (Fett N 2013, Dańczak-Pazdrowska A 2021).

1.2. Etiologia

Etiopatogeneza morphea nie została w pełni poznana. Większość badań i doniesień naukowych dotyczy SSc. Uważa się, że w morphea rolę odgrywają zarówno czynniki genetyczne, epigenetyczne, jak i środowiskowe. Zakłada się, że pierwotne znaczenie w patogenezie choroby ma uszkodzenie komórek śródbłonna, które może zainicjować proces chorobowy (Narbutt J 2017). Wymienia się następujące czynniki uszkodzające: uraz, infekcje, promieniowanie lub leki (β -bloker, bleomycyna, bromokryptyna, D-penicylamina). Powodują one uszkodzenie mikronaczyniowe i wtórną aktywację limfocytów T (Knobler R 2017). Te z kolei uwalniają cytokiny oraz czynniki wzrostu odgrywające kluczową rolę w procesie włóknienia. W badaniach potwierdzono, że transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor*,

TGF- β), interleukina IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-27, interferon gamma (*interferon gamma*, INF- γ) i ostatnio IL-17A są niezbędne w procesie zapalenia i włóknienia (Dańczak-Pazdrowska A 2012, Gu YS 2008, Schoenherr C 2010, Shimoizato O 2009, Dańczak-Pazdrowska A 2012, Shabgah AG 2014). Ostatecznie aktywacja tych prozapalnych i indukujących włóknienie mediatorów prowadzi do nadmiernej produkcji kolagenu i zmniejszenia produkcji metaloproteinaz odpowiedzialnych za degradację kolagenu (Knobler R 2017).

1.2.1. Patogeneza

1.2.1.1. Uszkodzenia komórek śródbłónka

Uważa się, że najprawdopodobniej najwcześniejszym zjawiskiem leżącym u podstaw patogenezy morphea jest aktywacja komórek śródbłónka wynikająca z jego uszkodzenia (Kahaleh MB 1979). Aktywacja komórek śródbłónka wraz ze wzrostem produkcji endoteliny-1 i obniżeniem produkcji prostacykliny prowadzi do skurczu naczyń. Innymi czynnikami przyczyniającymi się do waskulopatii jest brak równowagi pomiędzy mediatorami proangiogennymi i antyangiogennymi, obecność pochodzących z fibroblastów czynników antyangiogennych oraz obniżony poziom czynnika uczestniczącego w erytropoezie (*friend leukemia integration factor 1*, *Fli1*) odpowiadający za regulację funkcji immunologicznych oraz produkcję kolagenu. Uszkodzone komórki śródbłónka uwalniają cytokiny, które zwiększają produkcję cząsteczek adhezyjnych takich jak cząsteczki adhezji międzykomórkowej (*intracellular adhesion molecule*, ICAM)-1, cząsteczki adhezji komórkowej naczyń (*vascular cell adhesion molecule*, VCAM)-1, E-selektyna, P-selektyna. Zwiększenie liczby cząstek adhezyjnych powoduje z kolei zwiększoną rekrutację limfocytów T, a te następnie uwalniają cytokiny pobudzające proces włóknienia m.in. IL-4, IL-6, TGF- β (Fett N 2011). Uszkodzenie komórek endotelialnych prowadzi do obliteracji światła małych naczyń krwionośnych oraz uwolnienia antygenów komórkowych, co w konsekwencji może być początkowym czynnikiem wyzwalającym odpowiedź zapalną i autoimmunologiczną. Teoria naczyniowa w patogenezie morphea znajduje uzasadnienie w obrazie histopatologicznym zmienionej chorobowo skóry. W fazie

zapalnej morphea komórki śródbłónka wykazują obrzęk i pobudzenie, widoczne jest pogrubienie ścian naczyń krwionośnych otoczonych naciekiem zapalnym oraz aktywnymi fibroblastami. W późnej fazie morphea obserwuje się zwielenienie błony podstawnej i zmniejszenie gęstości naczyń (Gupta RA 2007).

1.2.1.2. Zaburzenia macierzy pozakomórkowej

Podstawowym zjawiskiem leżącym u podłoża morphea jest włóknienie. Proces włóknienia jest spowodowany nadmierną syntezą kolagenu i upośledzoną jego degradacją. Odpowiedzialne są za to fibroblasty, które po aktywacji produkują macierz pozakomórkową. Głównym regulatorem tego procesu jest TGF- β (Gupta RA 2007). TGF- β jest cytokiną występującą w 3 izoformach (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) i wykazującą działanie wielokierunkowe. Bierze ona udział w regulacji, różnicowaniu i migracji komórek, w procesach chemotaksji, apoptozy, a także w regulacji procesów immunologicznych. Jest wytwarzana głównie przez komórki jednojądrzaste, m.in. limfocyty, monocyty i płytki krwi (Budzyńska-Włodarczyk J 2016). Wzrost stężenia TGF- β powoduje wzrost ekspresji kolagenu typu I, III, VI, X, fibronektyny oraz proteoglikanów (Yamamoto T 2006, Asano Y 2006). Ponadto powoduje zmniejszenie produkcji proteaz, a wzrost ich inhibitorów (Yamamoto T 2006). Inaktywacji ulega także metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej (*matrix metalloproteinases*, MMP). Tomimura i wsp. wykazali, że u pacjentów z morphea oraz SSc obecne są przeciwciała anty-MMP, które nie były obecne u osób zdrowych z grupy kontrolnej (Tomimura S 2008). W patogenezie morphea podkreśla się również rolę insulinopodobnego czynnika wzrostu (*insulin-like growth factor*, IGF) (Fett N 2011). Fawzi i wsp. w skórze pacjentów chorujących na morphea wykazali zwiększoną ekspresję genu *IGF* w porównaniu do grupy kontrolnej (Fawzi MM 2008). IGF zwiększa produkcję kolagenu, rekrutuje fibroblasty oraz aktywuje nadmierną produkcję macierzy pozakomórkowej (Fawzi MM 2008).

1.2.1.3. Zaburzenia immunologiczne

Jedną z ważnych składowych biorących udział w patogenezie morphea jest aktywacja układu immunologicznego. Zwiększona produkcja cząsteczek adhezyjnych takich jak ICAM-1, VCAM-1, E-selektyny i P-selektyny prowadzi do wzrostu rekrutacji komórek zapalnych, w tym limfocytów T, monocytów oraz innych komórek układu odpornościowego (Mertens JS 2017). Badania wykorzystujące cytometrię przepływową u chorych na morphea (w grupie dorosłych i dzieci) wykazały, że w odpowiedzi immunologicznej dominują limfocyty T pomocnicze (*helper T cells*, Th) CD4+, a obserwuje się spadek limfocytów T regulatorowych (*regulatory T cells*, Treg) (Inoshita T 1981, Keystone EC 1982, Mirizio E 2018). Również w badaniu histopatologicznym zmian skórnych pobranych we wczesnej, zapalnej fazie morphea udowodniono aktywację przede wszystkim limfocytów T, co może wskazywać na ich udział w uszkodzeniu tkanek oraz indukcji włóknienia (Gupta RA 2017). Badania sugerują istnienie zaburzenia równowagi w populacji limfocytów Th, z przewagą limfocytów Th2 nad Th1, co również sprzyja procesom włóknienia (Artlett CM 2005). Ihn i wsp. oceniając surowice pacjentów chorych na morphea i SSc wykazali podwyższone stężenie CD30 (powierzchniowy antygen limfocytów Th2), co może również sugerować, że odpowiedź immunologiczna jest związana ze zwiększoną aktywnością limfocytów Th2 (Ihn H 2000). Postuluje się, że w fazie wczesnej, aktywnej morphea przeważa odpowiedź limfocytów Th1 i Th17. Limfocyty Th1 produkują IFN- γ i IL-2, które są stymulowane przez IL-12 (Mirizio E 2018). Cytokiny takie jak interferon gamma indukujący białko 10 (*interferon gamma-induced protein 10*, IP-10), białko chemotaktyczne monocytów (*monocyte chemotactic protein-1*, MCP-1), IL-17a, IL-12p70, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor-bb*, PDGF-bb), IFN- α 2 i IFN- γ , oznaczane w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) u pacjentów chorych na morphea w porównaniu z grupą kontrolną były podwyższone (Torok KS 2015). IL-12 stymuluje limfocyty Th1 do produkcji IFN- γ , który indukuje ekspresję IP-10 (Torok KS 2015). IP-10 jest produkowana m.in. przez fibroblasty i komórki śródbłonna. Uważa się, że IP-10 jest chemokiną związana z pobudzeniem odpowiedzi prozapalnej, Th1-zależnej i wykazuje

dodatnią korelację z aktywnością choroby. Sugeruje się, że w przyszłości białko to może być serologicznym markerem aktywności choroby (Torok KS 2015).

Limfocyty Th17 produkują IL-17A, IL-21, IL-22 (Mirizio E 2018). Dańczak-Pazdrowska i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję genu *IL-17A* w PBMC u pacjentów chorych na morphea w porównaniu z grupą kontrolną oraz ujemną korelację pomiędzy czasem trwania choroby a ekspresją genu *IL-17A* (Dańczak-Pazdrowska A 2012). O'Brien i wsp. również wykazali zwiększoną ekspresję genu *IL-17A* w PBMC i w skórze chorych na morphea, a także wykazali dodatnią korelację pomiędzy wzrostem ekspresji genu *IL-17A* i krótszym czasem trwania choroby (O'Brien JC 2017). Torok i wsp. przeprowadzili badanie na grupie 69 dzieci z rozpoznaniem morphea i wykazali znacząco wyższe osoczowe stężenie IP-10 i IL-17A oraz innych cytokin MCP-1, IL-12p70, GM-CSF, PDGF-bb, IFN- α 2 i IFN- γ u pacjentów chorych na morphea w porównaniu z grupą kontrolną. Podsumowując wyniki tego badania zasugerowano, że w morphea bardziej niż w SSc dominuje odpowiedź prozapalna zależna od limfocytów Th1 (IFN- γ) i Th17 (IL-17A). Wzrost wartości tych cytokin korelował z krótszym czasem trwania choroby. Dodatkowo wykazano, że IL-4, IL-5 i IL-13, wydzielane przez limfocyty Th2, nie były istotnie podwyższone (Torok KS 2015). Postuluje się, że odpowiedź zapalna zależna od limfocytów Th2 dominuje w fazie stwardnieniowej morphea (Mertens JS 2017). Limfocyty Th2 produkują IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13, które korelują z procesami włóknienia (Torok KS 2015). IL-4 indukuje produkcję TGF- β , która oprócz pobudzenia produkcji kolagenu, powoduje różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów komórek mięśni gładkich. Nagromadzenie miofibroblastów wzmacnia proces włóknienia, ponieważ zwiększa się sztywność macierzy pozakomórkowej (Rongioletti F 2018). W fazie włóknienia miofibroblasty nie ulegają apoptozie (Artlett CM 2018).

1.2.1.4. Inflamasom i cytokiny z rodziny IL-1

Inflamasom to wewnątrzkomórkowy kompleks białkowy, który łączy się z receptorem NOD-podobnym (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing family*, NLR) i działa jako receptor wielu sygnałów zagrożenia, takich jak drobnoustroje lub cząsteczki powstałe na skutek zaburzeń metabolicznych i uszkodzenia tkanek (Górska M 2015, Hornung V 2008). Inflamasomy produkowane

są w monocytach, makrofagach, limfocytach T, fibroblastach, miofibroblastach, keratynocytach, komórkach śródbłonna i komórkach wątrobowych (Artlett CM 2018). W ich tworzeniu szczególny udział biorą przedstawiciele podrodziny receptora NOD-podobnego (*nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing*, NLRP), z których kluczową rolę w regulacji odporności, jak również wpływ na choroby autoimmunologiczne, ma NLRP3 (Martinon F 2002). Aktywacja inflamasomu NLRP3 prowadzi do przekształcenia proenzymu kaspazy-1 do czynnej postaci, który następnie uczestniczy w rozszczepieniu nieaktywnych prekursorów IL-1 β i IL-18 w ich aktywne formy oraz indukuje ich wydzielanie z komórki (Murphy JE 2000).

Rola inflamasomu w patogenezie SSc i morphea nadal nie została poznana. Z uwagi na doniesienia literaturowe, iż IL-1 β i IL-18, które aktywowane są przez kaspazę-1 i wykazują działanie profibrotyczne, a inflamasom uczestniczy w aktywacji kaspazy-1, sugeruje się, że inflamasom może odgrywać rolę w procesie włóknienia. Artlett i wsp. wykazali 5-7 krotny wzrost transkrypcji NLRP3, IL-1 β i IL-18 w fibroblastach skóry, natomiast po leczeniu inhibitorem kaspazy-1 spadek poziomu kolagenu oraz zmniejszenie ekspresji α -aktyny mięśni gładkich (*α -smooth muscle action*, α -SMA) w miofibroblastach, co prowadziło do zmniejszenia liczby i grubości włókien naprężeniowych w komórce (Artlett CM 2011).

Cytokiny z rodziny IL-1 to grupa 11 cytokin (Tabela 1), które odgrywają ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Do tej grupy należą m.in. IL- 1 β , IL-18 i IL-33 o potencjalnym działaniu profibrotycznym (Artlett CM 2018).

Tabela 1. Cytokiny z rodziny IL-1 (Arlett CM 2018).

Nazwa	Nazwa rodziny IL-1	Działanie profibrotyczne/antyfibrotyczne
IL-1 α	IL-1F1	Profibrotyczne
IL-1 β	IL-1F2	Profibrotyczne
IL-1RA	IL-1F3	Antyfibrotyczne
IL-18	IL-1F4	Profibrotyczne
IL-33	IL-1F11	Profibrotyczne/antyfibrotyczne
IL-36 α	IL-1F6	Profibrotyczne
IL-36 β	IL-1F8	Nieznane
IL-36 γ	IL-1F9	Nieznane
IL-36RA	IL-1F5	Nieznane
IL-37	IL-1F7	Nieznane
IL-38	IL-1F10	Nieznane

IL-1 β

IL-1 β to jedna z najlepiej poznanych i zbadanych cytokin należących do rodziny IL-1. Jest uznawana za silną cytokinę prozapalną o działaniu ogólnoustrojowym oraz za amplifikator reakcji immunologicznych (Dinarello CA 1996, Dinarello CA 2014). Rodzina receptorów interleukiny 1 (IL-1R) składa się z 10 członków mających podobną strukturę. Zbudowane są z zewnątrzkomórkowych domen immunoglobulinowych i cytoplazmatycznych, z wyjątkiem IL-1R2. IL-1R1 wykazuje większe powinowactwo do IL-1 α , natomiast IL-1R2 do IL-1 β . Ponieważ IL-1R2 nie posiada domeny zwanej motywem związanym z Toll i receptorem dla interleukiny 1 (*toll/interleukin-1 receptor*, TIR) nie może pełnić funkcji sygnalizacyjnej, przez co działa jako receptor-pułapka (Colotta F 1993). Receptory IL-1R1 są obecne na większości komórek reagujących na IL-1, natomiast IL-1R2 znajduje się głównie na limfocytach B, monocytach i neutrofilach. Dodatkowo istnieje także rozpuszczalna forma receptora IL-1 oraz antagonist receptoru dla interleukiny 1 (IL-1Ra), który pojawia się w organizmie jako przeciwzapalna proteina konkurencyjnie blokująca receptory IL-1R1 i IL-1R2, uniemożliwiając łączenie się z IL-1 α i IL-1 β (Boraschi D 2018). IL-1 β wytwarzana i wydzielana jest głównie przez monocyty i makrofagi, jako nieaktywny prekursor

pro-IL-1 β w odpowiedzi na sygnały molekularne przenoszone przez wzorce molekularne związane z patogenami (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP). PAMP oddziałują na makrofagi poprzez receptory rozpoznające patogeny (*pathogen recognition receptors*, PRR). Aby zainicjować proces przetwarzania i wydzielania aktywnej IL-1 β , makrofag musi napotkać kolejny sygnał przenoszony przez PAMP lub wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (*damage associated molecular patterns*, DAMP) (Garlanda C 2013). Pro-IL-1 β jest rozszczepiana przez prozapalną kaspazę-1, natomiast kaspaza-1 jest aktywowana przez inflamasom. Najlepiej poznanym inflamasomem jest NLRP3, który ma trójdzielną budowę z PAMP/DAMP wykrywające C-końcowe powtórzenia bogate w leucynę (*C-terminal leucine rich repeat*, LRR), centralną domenę wiążącą nukleotydy (*nucleotide binding*, NB) oraz N-końcową domenę pirynową (*pyrin domain*, PYD) (Rider P 2013). Aktywacja pro-IL-1 β może również zachodzić pod wpływem innych proteaz, takich jak: elastaza, katepsyna G, chymaza (Afonina IS 2015). IL-1 β wspomaga proliferację aktywowanych limfocytów B i ich różnicowanie do komórek plazmatycznych. Indukuje wytwarzanie IL-2, a także ekspresję receptorów dla IL-2 oraz wspólnie z IL-2 promuje ekspansję komórek NK, a także limfocytów T CD4 $^{+}$ i CD8 $^{+}$. IL-1 β poprzez aktywację komórek prezentujących antygen (*antigen presenting cell*, APC) wzmacnia odpowiedź komórkową, poprzez wzrost wydzielania IFN- γ , zarówno przez cytotoksyczne limfocyty T oraz polaryzację limfocytów T CD4 $^{+}$ w kierunku Th1 (McArthur JG 1993). Razem z IL-6 i IL-23, IL-1 β powoduje różnicowanie limfocytów CD4 $^{+}$ w kierunku Th17, dodatkowo też wspiera indukowaną przez APC produkcję Th17 przez CD4 $^{+}$ (Ilarregui JM 2016).

IL-1 β wykazuje również działanie profibrotyczne promując syntezę kolagenu. Dodatkowo nasila rekrutację leukocytów do miejsca uszkodzenia, pobudza produkcję mediatorów prozapalnych oraz zwiększa ekspresję TGF- β , który jest ważnym czynnikiem profibrotycznym (Markovics A 2011). Maleszewska i wsp. wykazali, że IL-1 β i TGF- β 2 wykazują działanie synergistyczne w promowaniu przekształcenia się komórek o fenotypie nabłonkowym w komórki o fenotypie mezenchymalnym, co leży u podstaw procesu włóknienia (Maleszewska M 2013). Okazuje się również, że fibroblasty pochodzące z tkanki włóknistej wykazują większą wrażliwość na IL-1 β , poprzez wzrost liczby receptorów IL-R na powierzchni komórek oraz wzrost ich wrażliwości.

IL-18

IL-18 została zidentyfikowana w 1989 roku w surowicy krwi myszy, którym uprzednio podano endotoksynę *Propionibacterium acne*, początkowo nazywana IFN- γ (Okamaru H 1995). Podobnie jak IL-1 β , należy do rodziny cytokin IL-1. IL-18 wytwarzana jest przez makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki nabłonkowe, keratynocyty, chondrocyty, osteoblasty, fibroblasty oraz komórki endokrynne (Gracie JA 2003). Jest przechowywana wewnątrzkomórkowo jako biologicznie nieaktywny prekursor pro-IL-18, a następnie rozszczepiana przez enzym kaspaza-1 do formy aktywnej. Receptor dla IL-18 jest heterodimerem i składa się z 2 podjednostek α i β (Hoshino K 1999). IL-18R α , znane również jako białko związane z receptorem IL-1 (*IL-1 receptor related protein*, IL-1Rrp), odpowiedzialny jest za zewnątrzkomórkowe wiązanie IL-18, jednak jego powinowactwo do tej cytokiny jest niskie. IL-18R β wykazuje wysokie powinowactwo i odpowiada za wewnątrzkomórkową aktywację szlaku sygnalizacyjnego (Torigoe K 1997). Dodatkowo IL-18 posiada receptor - białko rozpuszczalne (*IL-18 binding protein*, IL18BP), które działa jako receptor „pułapka”, regulując jej aktywność oraz uniemożliwia wchodzenie w interakcję z receptorami innych komórek układu odpornościowego. Receptory dla IL-18 znajdują się między innymi na limfocytach T, komórkach NK, makrofagach, komórkach dendrytycznych, neutrofilach, bazofilach, komórkach tucznych, komórkach śródbłonna i komórkach mięśni gładkich (Nakamura S 2000, Chan WL 2001, Airolidi I 2000, Wang Z 2018). IL-18R, podobnie jak IL-1R, jest związany poprzez podjednostkę β z domeną receptora Toll-like. Przekazywanie sygnału do komórki odbywa się za pomocą wewnątrzkomórkowej proteiny MyD88, która zawiera w swoim szlaku sygnalizacyjnym TLR. Pobudzenie IL-18R powoduje rekrutację MyD88 do receptora Toll-like, a następnie fosforylację kinazy proteinowej IL-1R (*IL-1 receptor-associated kinase*, IRAK) (Kankaraj P 1999). Fosforylowany IRAK aktywuje czynnik 6 związanym z receptorem czynnika martwicy nowotworu (*TNF-R associated factor 6*, TRAF 6), a ten z kolei fosforyluje kinazę indukowaną przez jądrowy czynnik kappa B (NF- κ B) (Kojima H 1998). Wówczas NF- κ B jest zdolny do migracji do jądra komórkowego oraz zainicjowana transkrypcji genów, takich jak IFN- γ . Jak wspomniano powyżej, aktywność IL-18 regulowana jest przez endogenne inhibitory IL-18BP, który wykazuje w stosunku do niej wysokie powinowactwo. IL-18BP blokuje wiązanie IL-18 z receptorem oraz hamuje wytwarzanie IFN- γ (Muhl H 2000).

Aktywność IL-18 regulowana jest zatem w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego, w którym pośredniczy IL-18BP indukowane przez IFN- γ , hamując nadmierną odpowiedź zapalną IL-18.

Wykazano, że osoczowe stężenie IL-18BP jest znacznie podwyższone w posocznicy, chorobie Stilla, ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń czy toczeniu rumieniowatym układowym (Novick D 2001, Girard C 2016, Novick D 2009, Novick D 2010). Wydaje się, że rekombinowana IL-18BP może mieć zastosowanie w leczeniu chorób przebiegających z podwyższonym stężeniem IL-18 w surowicy. W badaniach klinicznych znajduje się lek biologiczny *tadekinig*, który zastosowano u pacjentów z chorobą Stilla (Gabay C 2018). IL-18 jest cytokiną plejotropową mogącą brać udział w odpowiedzi Th1 i Th2- zależnej. Jej główną rolą w układzie immunologicznym jest synergistyczne działanie z IL-12 w indukowaniu komórek Th1, komórek NK, limfocytów B i makrofagów do produkcji IFN- γ (Yoshimoto T 1998, Munder BM 1998). Zatem odgrywa ważną rolę w mechanizmach obronnych organizmu przed infekcjami wywołanymi przez wirusy, bakterie, grzyby czy pierwotniaki. IL-18 w obecności IL-12 hamuje produkcję IgE oraz wytwarzanie IL-4 i IL-13 przez bazofile i mastocyty w sposób zależny od IFN- γ . Wykazano również, że działając samodzielnie IL-18 indukuje produkcję IgE przez limfocyty B, poprzez wpływ na IL-4 i IL-13, co sugeruje jej udział w patomechanizmie chorób alergicznych (Yoshimoto T 2000). W komórkach NK wzmacnia działanie cytotoksyczne poprzez indukowanie zwiększenia ekspresji ligandu Fas i perforyn, co sugerowałoby, że IL-18 ma wpływ na odporność przeciwnowotworową (Tsutsui H 1996, Baker KJ 2019). Dodatkowo IL-18 indukuje produkcję GM-CSF oraz ekspresję cząsteczek adhezyjnych, wzmacnia również ekspresję ICAM-1 w komórkach mielomonocytowych oraz ICAM-1 i VCAM-1 w komórkach śródbłónka (Kohka K 1998).

Podobnie jak IL-1 β , IL-18 jest ważną cytokiną w trakcie gojenia się ran (Arlett CM 2017). Kampfer i wsp. wykazali, że podczas gojenia się rany poziom mRNA IL-18 w skórze wzrasta, osiągając najwyższe stężenie podczas jej zamknięcia (Kampfer H 2000). Nakamura i wsp. wykazali znacząco wyższy poziom osoczowego stężenia IL-18 u pacjentów z SSc w porównaniu z grupą kontrolną (Nakamura K 2016). Natomiast poziom stężenia IL-18 u pacjentów z postacią ograniczoną twardziny układowej (*limited systemic sclerosis*, lSSc), jak i postacią uogólnioną twardziny układowej (*diffuse systemic sclerosis*, dSSc) były porównywalne, w związku z czym autorzy

sugerowali, że IL-18 jest związana z innymi niż włóknienie mechanizmami patologicznymi leżącymi u podstaw SSc.

IL-33

IL-33 została odkryta w 2003 roku, początkowo nazywana czynnikiem jądrowym komórek wysokiego śródbłonka (*nuclear factor-high endothelial venules*, NF-HEV), ponieważ znajdowała się w naczyniach krwionośnych, które pośredniczyły w wejściu limfocytów do węzłów chłonnych i innych narządów limfatycznych (Baekkevold ES 2003). W 2005 roku Schmitz i wsp. opisali, że C-końcowa część białka NF-HEV wykazuje podobną strukturę do cytokin z rodziny IL-1, a także indukuje odpowiedź Th2 poprzez aktywację białka tłumienia rakotwórczości (*supression of tumorigenicity 2*, ST2) (należące do receptorów IL-1), na tej podstawie zaproponowali nazwę IL-33 (Schmitz J 2005). Cytokina ta posiada podwójną funkcję, działając jako cytokina zewnątrzkomórkowa oraz jako wewnątrzkomórkowy czynnik jądrowy regulujący transkrypcję genów (Baekkevold ES 2003). Jest również uważana za tzw. cytokinę alarmową, ponieważ jest uwalniana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej po uszkodzeniu, urazie czy martwicy komórek lub tkanek, następnie działając jako endogenne sygnał informujący sąsiadujące komórki i tkanki o niebezpieczeństwie (Liew FY 2010). W przeciwieństwie do innych interelukin z rodziny IL-1, IL-33 nie jest syntetyzowana przez leukocyty, ale przez tkanki m.in. przez komórki śródbłonka oraz komórki nabłonkowe (skóry, płuc, dróg oddechowych, przewodu pokarmowego), fibroblasty, komórki limfoidalne śledziony i węzłów chłonnych czy astrocyty (Moussion C 2008). IL-33 jest wydzielana jako aktywna biologicznie cytokina, nie wymagająca wcześniejszego rozszczepienia. Luthi i wsp. wykazali natomiast, że kaspazy-1, -3, i -7 powodują inaktywację IL-33 celem aktywacji apoptozy (Luthi AU 2009), a następnie uwalniana jest ona do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie ulega dalszemu rozszczepieniu przez proteazy serynowe, jak katepsyna-G i elastaza do rozpuszczalnej i rekombinowanej cytokiny o zwiększonej aktywności (Lefrancais E 2012). IL-33 jest ligandem dla heterodimerycznego receptora rodziny IL-1- ST2 związanego z błoną. ST2 to członek nadrodziny TLR/IL1R, który posiada przynajmniej 3 izoformy wynikające z różnego splicingu genów: receptor związany z błoną (ST2L), forma rozpuszczalna (sST2) oraz wariant konstytutywnie aktywny (ST2V) (Iwahana H

1999). ST2L jest członkiem nadrodziny TIR/IL-1R, zawiera 3 zewnątrzkomórkowe domeny IgG, jedną domenę transbłonową oraz wewnątrzkomórkową domenę TIR. Występuje głównie na mastocytach i komórkach Th2, gdzie IL-33 oddziałuje z białkiem pomocniczym IL-1R (IL-1RAcP) tworząc kompleks IL-33/ST2L/IL-1RAcP. Powstanie takiego kompleksu powoduje indukcję szlaków sygnałowych MyD88, IRAK1, IRAK4 i TRAF6, następnie aktywując szlaki NF- κ B i MAPK, tym samym zwiększając ekspresję cytokin związanych z Th2- IL-4, IL-5 i IL-13 (Schmitz J 2005). Ma to istotne znaczenie w inicjowaniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej podczas chorób zapalnych, zakaźnych czy alergicznych. sST2 nie posiada domeny transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Zaobserwowano, że jego osoczowe stężenie jest podwyższone u pacjentów, u których w organizmie toczy się stan zapalny (Hayakawa H 2007). Ponadto działa jako receptor pułapka dla IL-33, ujemnie regulując odpowiedź immunologiczną zależną od Th2 (Hayakawa H 2007). Natomiast rola ST2V nie jest do końca poznana, receptory te są głównie zlokalizowane w żołądku, jelicie cienkim i okrężnicy (Tago K 2001).

IL-33, w porównaniu z pozostałymi cytokinami z rodziny IL-1, przede wszystkim indukuje odpowiedź immunologiczną zależną od komórek Th2. Dodatkowo uczestniczy w różnicowaniu naiwnych limfocytów T do fenotypu Th2 oraz stymuluje je do wydzielania IL-5, IL-13 (Salimi M 2013). IL-33 może także indukować odpowiedź typu Th1 oraz produkcję cytokin takich jak IFN- γ . Na powierzchni limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ oraz limfocytów T regulatorowych również znajduje się ST2L (Chan WL 2001). IL-33 indukuje mastocyty do zapoczątkowania odpowiedzi zapalnej poprzez produkcję cytokin Th1 zależnych-IL-6 i TNF α ; cytokin Th2 zależnych-IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF oraz chemokin (Silver MR 2010). Jest również silnym aktywatorem bazofilów i eozynofilów indukując degranulację tych komórek. Wykazano również konstytutywną ekspresję receptora ST2L na powierzchni makrofagów, dlatego też IL-33 może być aktywatorem tych komórek podczas infekcji bakteryjnych (Oshikawa K 2002). Ponadto IL-33 promuje rozwój komórek dendrytycznych ze szpiku kostnego. W prawidłowych warunkach ekspresja IL-33 przez ludzkie keratynocyty jest niska lub niewykrywalna, natomiast po 24 godzinach po uszkodzeniu skóry wykazano jej zwiększoną ekspresję (Sudnes O 2015), co sugeruje że IL-33 pełni rolę czynnika inicjującego stan zapalny. Dodatkowo Sudnes i wsp. wykazali, że w keratynocytach IFN- γ był najsilniejszym sygnałem pobudzającym produkcję IL-33 (Sudnes O 2015).

1.2.1.5. Inne czynniki w patogenezie morphea

W patogenezie morphea pod uwagę bierze się również predyspozycję genetyczną. Określono szereg antygenów zgodności tkankowej (*Human Leucocyte Antigens*, HLA), które wiążą się ze zwiększonym ryzykiem morphea: HLA-DRB1*04:04, HLA-B*37, HLA-DR5, DR8 i DR11, jednak występowanie rodzinne jest bardzo rzadkie (Narbutt J 2017). W przypadku czynników infekcyjnych wymienia się wystąpienie zmian o charakterze morphea w przebiegu zakażeń wirusem odry, ospy wietrznej, Epstein-Barra, zapalenia wątroby typu B i C (Longo F 1993, Mihas AA 2003, Soyly S 2009, Spirer Z 1979). Wśród możliwych czynników etiologicznych wymienia się również zakażenie *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), którego rola nadal pozostaje kontrowersyjna i dyskusyjna. Związek między morphea a chorobą z Lyme po raz pierwszy zasugerował Aberer i wsp. w 1987 roku (Aberer E 1987). Od tamtego czasu w licznych doniesieniach, w których wykorzystywano metody serologiczne, jak i oznaczanie DNA *B. burgdorferi* metodą PCR w wycinku ze zmiany skórnej nie potwierdzono związku między morphea a zakażeniem *B. burgdorferi* (Pinazo Canales I 1990, Raguin G 1992, Ranki A 1994, Alonso-Llamazares J 1997, Espinoza-Leyn F 2006, Goodlad JR 2002). Weide i wsp. podają, że późnym zmianom skórnym w boreliozie mogą towarzyszyć zmiany pseudosklerotyczne, lecz nie można ich uznać za zmiany w przebiegu morphea (Weide B 2000). Obecnie nie zaleca się rutynowego oznaczenia poziomu przeciwciał w kierunku *B. burgdorferi*, z wyjątkiem przypadków w których istnieje uzasadnione podejrzenie kliniczne (Kreuter A 2016, Krasowska D 2019).

Powszechnie wiadomo, że obecność jednego zaburzenia autoimmunologicznego może wiązać się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia innych zaburzeń z kręgu chorób autoimmunologicznych, co zostało nazwane przez Szyper-Kravitz i wsp. jako "mozaika autoimmunizacji" (Szyper-Kravitz M 2005). Związek morphea z innymi chorobami z kręgu chorób autoimmunologicznych jest opisywany w literaturze medycznej od lat. Według Leitenberger i wsp. u 30% dorosłych pacjentów z morphea współistnieje choroba autoimmunologiczna (Leitenberger JJ 2009), częstość ta jest wyższa niż u zdrowej populacji. Najczęstsze zaburzenia autoimmunologiczne obejmują łuszczycę plackowatą, toczeń rumieniowaty układowy, stwardnienie rozsiane i bielactwo nabyte (Kreuter A 2016). Natomiast w ostatnich badaniach nie wykazano

zwiększonej częstości występowania dodatnich przeciwciał przeciwtarczycowych u dorosłych pacjentów z morphea (Dańczak-Pazdrowska A 2018), inaczej niż w populacji dziecięcej, w której współistnienie z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy jest istotne (Zulian F 2005). U pacjentów z uogólnioną postacią morphea znacznie częściej współistnieją zaburzenia autoimmunologiczne, niż u pacjentów z innymi postaciami (Kreuter A 2016). W literaturze medycznej opisuje się również częstsze współwystępowanie morphea z liszajem twardzinowym okolicy anogenitalnej, niektóre dane wskazują, że częstość ta wynosi 38% (Lutz V 2012).

Od 1990 roku opisywane są przypadki wystąpienia zmian o charakterze morphea u pacjentów po radioterapii, dotyczy to głównie pacjentów z rakiem piersi w wywiadzie (Vigneron C 2014). Patogeneza tego zjawiska jest nadal niejasna. Dotychczasowe dane wskazują, że promieniowanie jonizujące aktywuje fibroblasty do zwiększonego wydzielania cytokin o działaniu profibrotycznym (IL-4, IL-5, TGF- β) (Spalek M 2014). W literaturze medycznej opisywane są również przypadki zwłóknienia skóry związane z chemioterapią, po takich lekach jak: docetaksel, paklitaksel, bleomycyna, peplomycyna, fluoropirydyny, gemcytabina, doksorubicyna i cyklofosfamid (Alexandrescu DT 2005).

Dodatkowo wśród czynników mogących odgrywać rolę w patogenezie morphea wymienia się uraz. Część autorów postuluje występowanie zjawiska kebneryzacji jako istotnego czynnika w patogenezie morphea (Trattner A 1991, Toyama S 2019). Przyczyna tej reakcji nadal jest nieznana, uważa się, że pod wpływem urazu mechanicznego uwalniane są do skóry cytokiny, białka stresu, cząstki adhezyjne oraz/lub autoantygeny (Toyama S 2019). Jedną z cytokin uwalnianych podczas uszkodzenia komórek lub urazu tkanek jest wspomniana wcześniej IL-33, zwana cytokiną alarmową, która wykazuje działanie indukujące włóknienie (Li L 2018). Opisywano również przypadki morphea jako reakcję na wykonany tatuaż, gdzie zmiany skórne ograniczone były do wytatuowanego obszaru (Mehrtens SH 2018).

1.3. Epidemiologia

Morphea jest rzadką jednostką chorobową z kręgu autoimmunologicznych chorób tkanki łącznej, dlatego też wydaje się, że częstość jej występowania jest niedoszacowana. Jedyne badanie populacyjne przeprowadzone przez Petersona i wsp. w Olmsted County w latach 1960-1993 sugeruje, że zapadalność na morphea wynosi około 0,4-2,7 przypadków/100 000 (Peterson LS 1997). Nadal brakuje danych dotyczących populacji polskiej. Choroba ta 2,6-6 razy częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn (Kreuter A 2016). Na podstawie przeprowadzonych badań retrospektywnych wydaje się, że morphea częściej występuje wśród ludzi rasy kaukaskiej (Christen-Zaech S 2008, Leitenberger JJ 2009). Częstość występowania jest podobna u dzieci, jak i u dorosłych. Szczyt zachorowania u dorosłych przypada między 40. a 50. rokiem życia (Fett N 2013). Natomiast 90% dzieci diagnozuje się między 2. a 14. rokiem życia (Fett N 2013).

1.4. Podział

Jedną z pierwszych klasyfikacji choroby jest podział zaproponowany przez Peterson i wsp. w 1995 roku. Wyróżniono wówczas 5 głównych odmian twardziny: plackowatą (w tym liszaj twardzinowy, odmianą pierwotnie zanikową), uogólnioną, liniową, pęcherzową i głęboką (w tym eozynofilowe zapalenie powięzi) (Peterson LS 1995). Ta klasyfikacja była dyskusyjna z dwóch powodów. Po pierwsze uwzględniała np. liszaja twardzinowego, który nie wchodzi w spektrum morphea. Po drugie nie obejmowała postaci mieszanej morphea, która występuje u 15% pacjentów (Fett N 2011). W 2009 roku klasyfikacja ta została zmodyfikowana przez Kreutera i wsp., gdzie zaproponowano podział na 5 głównych typów klinicznych: ograniczoną, uogólnioną, liniową, głęboką i mieszaną (Kreuter A 2009). Podział ten podtrzymuje Europejskie Forum Dermatologiczne (Knobler R 2017) choć znane są wątpliwości np. w kwestii klasyfikacji postępującego połowiczego zaniku twarzy czy eozynofilowego zapalenia powięzi. Aktualnie według autorów europejskich wytycznych eozynofilowe zapalenie powięzi to osobna jednostka chorobowa w spektrum morphea (Knobler R 2017).

Klasyfikacja według Kreutera i wsp. obejmuje następujące odmiany (Kreuter A 2009):

- postać ograniczona
 - odmiana plackowata (*morphea en plaques*, MEP)
 - odmiana grudkowa
 - odmiana pierwotnie zanikowa, określana również jako *atrophoderma of Pasini and Pierini*, APP
- postać uogólniona
 - odmiana rozsiana lub uogólniona (*generalised morphea*, GM) (zajęcie co najmniej 2 anatomicznych okolic ciała)
 - eozynofilowe zapalenie powięzi (*fasciitis eosinophila*, FE)
 - disabling pansclerotic morphea
- postać linijna (*linear morphea*, LM)
 - odmiana linijna kończyn (akralna)
 - postępujący połowiczny zanik twarzy (*progressive hemifacial atrophy*, PHA)
 - odmiana typu cięcia szablą (*morphea en coup de sabre*, ECDS)
- postać głęboka (*deep morphea*, DM)
- postać mieszana (*mixed morphea*, MM)

1.5. Obraz kliniczny

MEP jest najczęstszą postacią kliniczną morphea występującą u osób dorosłych (Marzano AV 2003). Pierwszym objawem morphea jest rumieniowa plama szerząca się obwodowo (faza zapalna). Stopniowo w centrum zmiany dochodzi do stwardnienia, a ognisko przyjmuje barwę woskowożółtą (faza stwardnieniowa). Skóra w obrębie wykwitów pozbawiona jest owłosienia. Obszar stwardnienia otoczony bywa sinoczerwoną lub fioletową obwódką zapalną zwaną *lilac ring*, co świadczyć ma o aktywności procesu zapalnego. Zwykle po kilku latach utrzymywania się zmian, skóra w miejscu ogniska staje się atroficzna, przebarwiona lub rzadziej odbarwiona (faza regresji) (Gliński W 2017). Dobrym wyznacznikiem remisji jest odrost włosów. Zmiany skórne najczęściej zlokalizowane są w obrębie tułowia, zwłaszcza w obrębie obszarów pomiędzy biodrami i pachwinami (Gliński W 2017).

Odmiana grudkowa morphea charakteryzuje się występowaniem licznych, drobnych (mniejszych niż 1 cm) zmian sklerotycznych, koloru żółtego lub białego o świecącej powierzchni. Obrazem klinicznym przypominają liszaj twardzinowy, którego rozpoznanie jest możliwe po wykonaniu badania histopatologicznego (Kreuter A 2016). Zmiany te głównie lokalizują się na tułowiu. Początkowo mogą występować rumieniowe plamy (Kreuter A 2016).

APP jest rzadką odmianą morphea występującą częściej u dzieci niż u osób dorosłych (Kreuter A 2016). Charakteryzuje się występowaniem symetrycznych, pojedynczych lub mnogich, ostro odgraniczonych od otaczającej skóry przebarwionych plam o średnicy mniejszej niż 1 cm, którym nie towarzyszy stwardnienie. Dla podkreślenia wyraźnego odgraniczenia ognisk wprowadzono określenie „objawu urwiska” (ang. *cliff drop*). Zmiany te najczęściej lokalizują się na tułowiu i w obrębie proksymalnych części kończyn (Knobler R 2017). Kreuter i wsp. uważają, że może być to wczesna postać odmiany grudkowej morphea (Kreuter A 2016).

O odmianie GM mówimy wówczas, gdy obserwujemy występowanie 4 lub więcej stwardniałych blaszek, o średnicy większej niż 3 cm, obejmujące 2 lub więcej z 7 obszarów anatomicznych (głowa-szyja, każda z kończyn górnych i dolnych, przednia powierzchnia tułowia i tylna powierzchnia tułowia) (Knobler R 2017). Charakteryzuje się ona ciężkim przebiegiem. Częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn. Jako czynnik wyzwalający tę odmianę morphea wymienia się wysiłek fizyczny (Careta MF 2015). Zmiany częściej lokalizują się na tułowiu i udach, są symetryczne i wykazują tendencję do zlewania się ze sobą (Kreuter A 2016). Początek stwardnienia skóry jest stopniowy, lecz szybko postępuje w ciągu kilku miesięcy (Careta MF 2015), co wymaga różnicowania z SSc. W przypadku GM nie obserwuje się objawu Raynauda, odchył w kapilaroskopii, owrzodzeń w obrębie opuszków palców rąk czy zajęcia narządów wewnętrznych (Careta MF 2015). U części pacjentów z GM mogą pojawić się przykurcze w stawach lub bóle stawowo-mięśniowe (Careta MF 2015).

Disabling pansclerotic morphea jest rzadką uogólnioną postacią morphea, o agresywnym przebiegu i złym rokowaniu. Dotyczy głównie dzieci poniżej 14. roku życia. Charakteryzuje się szybko postępującym zwłóknieniem i stwardnieniem skóry, tkanki podskórnej, a także powięzi, mięśni i kości (Soh HJ 2019). Zmiany początkowo

obejmują kończyny, następnie rozprzestrzeniają się na tułów, twarz i skórę głowy z zaoszczędzeniem obszarów dystalnych. W konsekwencji dochodzi do wystąpienia przykurczów w stawach, skrócenia kończyn, a także powstania trudno gojących się ran i owrzodzeń (Knobler R 2017, Soh HJ 2019). W badaniach laboratoryjnych obserwowano hipergammoglobulinemię oraz eozynofilię (Soh HJ 2019).

FE, zwana też zespołem Shulmana, jest rzadką postacią morphea, po raz pierwszy opisaną przez Shulmana w 1974 roku (Shulman LE 1975). FE występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn, średni wiek wystąpienia to 47-57 lat (Wright NA 2016). Uważa się, że u blisko połowy pacjentów czynnikiem wyzwalającym proces chorobowy jest wysiłek fizyczny (Lakhanpal S 1988). FE charakteryzuje się nagłym początkiem, z widocznym rumieniem i obrzękiem, a następnie stwardnieniem obejmującym symetrycznie kończyny (Knobler R 2017). Początkowo skóra objęta procesem chorobowym staje się ciastowata, ale w późniejszych stadiach twardnieje i włóknienie, co daje obraz „skórki pomarańczy” (Knobler R 2017). Dodatkowo obserwuje się „objaw rowka/bruzdy” (ang. *groove sign*), czyli linijne zagłębienie wzdłuż przebiegu powierzchownych żył, wynikające z tego, że proces włóknienia omija obszary okołonaczyniowe. U około połowy pacjentów obserwuje się przykurcze stawów (Mazori DR 2017). W badaniach laboratoryjnych z odchyłen wykazano eozynofilię w krwi obwodowej oraz eozynofilię tkankową, a także hipergammoglobulinemię oraz podwyższony wskaźnik opadania erytrocytów (Bielsa Marsol I 2013). Brak tych odchyłen nie wyklucza jednak rozpoznania. Dodatkowo opisuje się współwystępowanie EF z zaburzeniami hematologicznymi oraz nowotworami złośliwymi, lecz są to rzadkie przypadki (Pinal-Fernandez I 2014).

LM jest najczęściej obserwowana u dzieci i młodzieży (Bielsa Marsol I 2013). Początek choroby może również wystąpić w wieku dorosłym. Objawia się jako linijne, głównie jednostronne stwardnienie skóry występujące przede wszystkim w obrębie kończyn (Bielsa Marsol I 2013). Zmiany skórne często układają się wzdłuż linii Blaschko. Włóknienie może obejmować również tkankę podskórną, powięź, mięśnie oraz kości. Wraz z postępem choroby pojawiają się przykurcze w stawach, deformacje kończyn z zaburzeniem ich wzrostu, a także atrofia mięśni i kości (Bielsa Marsol I 2013).

ECDS wiąże się z obecnością liniowego zwłóknienia, stwardnienia oraz atrofii tkanki podskórnej oraz tkanek leżących poniżej, przebiegającą najczęściej od wysokości brwi do okolicy czołowo-ciemieniowej (Knobler R 2017, Fledelius HC 2018). Ognisko stwardnienia może też rozciągać się do obszaru nosa, wargi górnej, czasem też dziąseł (Careta MF 2015). Zmiana jest najczęściej jednostronna, lecz opisywane są pojedyncze przypadki występowania obustronnego (Careta MF 2015). Odmiana ta występuje częściej u dzieci, średni wiek pojawienia się zmian skórnych to 13. rok życia (Careta MF 2015). Zajęcie skóry głowy owłosionej prowadzi do wystąpienia łysienia bliznowaciejącego. Ponadto może dochodzić do zajęcia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (powodując bóle głowy, migreny, drgawki), narządu wzroku, kości szczęki (deformacja/zanik korzeni zębów) (Careta MF 2015). W literaturze medycznej opisywane są również przypadki współistnienia ECDS z postępującym połowicznym zanikiem twarzy, częstość ocenia się na 40% (Knobler R 2017, Peterson LS 1995).

PHA, znany również jako zespół Parry-Romberg, został po raz pierwszy opisany w 1825 roku przez Parry'ego i 1846 roku przez Romberga. Jest to rzadka odmiana postaci liniowej morphea. Opisuje się, że pierwsze objawy choroby pojawiają się pomiędzy 1. a 2. dekadą życia. PHA charakteryzuje się jednostronnym zanikiem skóry, tkanki podskórnej, mięśni, a także leżących poniżej nich kości. Atrofia może być poprzedzona stwardnieniem lub hipo-/hiperpigmentacją zajętej skóry. Proces zwłóknienia w tej odmianie morphea występuje rzadko lub wcale. Choroba prowadzi do wyraźnej asymetrii twarzy, pojawienia się ognisk łysienia bliznowaciejącego oraz zaburzeń neurologicznych i okulistycznych (Knobler R 2017, Kreuter A 2016, Careta MF 2015).

DM to najrzadsza postać morphea, stanowi <5% przypadków (Knobler R 2017). Ogniska stwardnienia dotyczą głębszych warstw skóry takich jak: tkanka tłuszczowa, powięź lub mięśnie (Knobler R 2017). Zmiany te nie są poprzedzone pojawieniem się cech stanu zapalnego, stwardnienia czy przebarwienia w obrębie skóry (Knobler R 2017, Careta MF 2015). Postać ta najczęściej lokalizuje się na kończynach, zmiany są na ogół symetryczne (Knobler R 2017). W literaturze medycznej opisywane są przypadki DM po podaniu szczepionki lub po domięśniowym podaniu witaminy K (Careta MF 2015).

O odmianie MM mówimy wówczas, gdy występujące zmiany skórne charakterystyczne są dla więcej niż jednej postaci morphea. Dotyczy ona najczęściej dzieci, u których często współistnieje postać liniowa morphea z postacią ograniczoną lub liniowa postać morphea z postacią uogólnioną (Knobler R 2017, Kreuter A 2016).

1.6. Rozpoznanie

Z uwagi na charakterystyczny obraz kliniczny diagnoza morphea może być postawiona na podstawie badania przedmiotowego. Biopsja skóry zmienionej chorobowo i badanie histologiczne pozostają nadal „złotym standardem” w diagnostyce zmian o niejasnym obrazie klinicznym (Kreuter A 2016, Krasowska D 2019). Obraz histopatologiczny morphea zależy od dwóch czynników: od fazy choroby, a także od głębokości procesu chorobowego (Careta MF 2015). Na podstawie samego obrazu histopatologicznego nie jest możliwe różnicowanie morphea i SSc, jak również różnych postaci morphea. Dlatego też zawsze wynik badania histopatologicznego należy skorelować z obrazem klinicznym (Kreuter A 2016). Jeśli podejrzewamy morphea o łagodnym przebiegu, jak postać ograniczona morphea, zalecane jest wykonanie biopsji sztanckowej (3-6 mm) z okolicy *lilac ring*. Natomiast przy podejrzeniu postaci głębokiej, liniowej i uogólnionej należy pobrać głęboki wycinek z tkanką podskórną (Krasowska D 2019). W fazie zapalnej morphea, w badaniu histopatologicznym obserwuje się obecność gęstych, homogennych wiązek kolagenu w obrębie warstwy siateczkowatej skóry właściwej, które biegną równolegle do powierzchni skóry. Dodatkowo pomiędzy wiązkami kolagenu, naczyniami krwionośnymi i gruczołami potowymi obecny jest gęsty naciek zapalny, w którym przeważają limfocyty, mogą być również obecne komórki plazmatyczne, histiocyty oraz eozynofile. Naciek zapalny w niektórych przypadkach może sięgać do tkanki podskórnej. Naskórek może być niezmieniony lub cienki i zanikowy. Faza późna, sklerotyczna charakteryzuje się znacznym zwłóknieniem skóry właściwej, które stopniowo obejmuje również tkankę podskórną. Naciek zapalny jest nieobecny lub dyskretnie ograniczony wokół przydatków skóry ulegających atrofii. Naczynia krwionośne w tkance podskórnej posiadają pogrubiałą ścianę, co znacznie ogranicza światło naczyń (Knobler R 2017, Kreuter A 2016, Careta MF 2015). W obrazie histopatologicznym eozynofilowego zapalenia powięzi, wczesna faza charakteryzuje się obecnością gęstego nacieku

zapalnego składającego się z eozynofilów, komórek plazmatycznych i monocytów. Naciek zapalny może rozciągać się aż do powięzi i leżącego poniżej mięśnia. W fazie późnej naciek zapalny jest niewielki, przede wszystkim widoczne jest zwłóknienie obejmujące głównie powięź (Kreuter A 2016).

Ryzyko pojawienia się odchyleń w badaniach laboratoryjnych zależy od postaci klinicznej morphea i jest większe w przypadku postaci linijnej i eozynofilowego zapalenia powięzi. Żadne badania laboratoryjne krwi nie są wysoce specyficzne i przydatne w celu postawienia rozpoznania morphea (Asano Y 2018). W opinii wielu autorów można zalecić wykonanie podstawowych badań laboratoryjnych, takich jak: białko C-reaktywne (CRP), aminotransferaza alaninowa (ALT), aminotransferaza asparaginianowa (AST), γ -Glutamylotranspeptydaza (GGTP), fosfataza alkaliczna (ALP), dehydrogenaza mleczanowa (LDH), kinaza kreatynowa (CK), kreatynina (Kreuter A 2016). Występowanie niektórych autoprzeciwciał (np. antyjądrowe, anty-jednoniciowy DNA, anty-histonowe, anty-topoizomeraza II, anty-RNP i przeciwciała przeciw macierzy metaloproteinaz) było opisywane u pacjentów z morphea (Christen-Zaech S 2008, Leitenberger JJ 2009), jednak wykonywanie rutynowych badań przesiewowych dla tych przeciwciał zaleca się jedynie celem wykluczenia współistnienia innej choroby z kręgu autoimmunizacyjnych chorób tkanki łącznej przy objawach ją sugerujących np. twardziny układowej (Knobler R 2017). W przypadku eozynofilowego zapalenia powięzi wskazane jest wykonanie elektroforezy i ilościowego pomiaru immunoglobulin. Należy zauważyć, że eozynofilowe zapalenie powięzi może współistnieć z zaburzeniami hematologicznymi. W celu monitorowania aktywności choroby można również u tych chorych rozważyć oznaczenie eozynofilii w krwi. Będzie ona występować we wczesnej fazie choroby (Kreuter A 2016). Ostatnie badania wykazały, że podwyższony poziom CK i aldolazy w osoczu, może wskazywać na aktywność morphea u młodych osób, w związku z tym parametry te mogą być pomocne w określonych przypadkach (Wu EY 2014). Gdy istnieje podejrzenie zapalenia mięśni (głębokie ograniczone zmiany, ból mięśni, ucisk i/lub osłabienie dotkniętych obszarów) zaleca się wówczas oznaczenie enzymów mięśniowych, OB i poziomu CRP. Ponieważ zapalenie mięśni w morphea może być ograniczone, wyniki badań laboratoryjnych mogą jednak być w normie.

Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (*magnetic resonance imaging*, MRI) z kontrastem i ultrasonografia (*ultrasonography*, USG) są przydatne do oceny

rozległości i głębokości procesu chorobowego. MRI z kontrastem jest szczególnie zalecane w celu poznania ewentualnego zajęcia układu kostno-stawowego (Asano Y 2018). Rutynowa USG jest wskazana w sytuacji gdy kontrast MRI nie może zostać podany z powodu nadwrażliwości na kontrast lub niewydolności nerek. W liniowych postaciach morphea takich jak, PHA oraz ECDS, badanie neurologiczne wraz z MRI głowy należy wykonać w celu wykluczenia zmian w OUN (Kreuter A 2016). Ponadto pacjenci z postacią ECDS powinni być skierowani na badanie okulistyczne, ocenę ortodontyczną lub laryngologiczną pod kątem odpowiednio powikłań ocznych, a także wykluczenia zaburzeń w stawie skroniowo-żuchwowym (Asano Y 2018). Za pomocą ultrasonografii wysokiej częstotliwości (*high-frequency ultrasonography*, HF-USG) można śledzić dynamikę procesu chorobowego. W fazie stwardnienia obserwuje się wzrost echogeniczności i pogrubienie skóry. Natomiast w fazie zapalnej obniżenie echogeniczności (Wortsman X 2011, Polańska A 2011).

1.7. Leczenie

1.7.1. Leczenie miejscowe

Dotychczas żadne z badań klinicznych nie potwierdziły hipotezy dotyczącej skuteczności miejscowych glikokortykosteroidów (GKS) w leczeniu morphea (Asano Y 2018). Wiadomo, że miejscowe GKS hamują stan zapalny oraz proces włóknienia poprzez hamowanie proliferacji fibroblastów (Sapadin AN 2002). W związku z czym, w opinii wielu autorów, miejscowe GKS są szczególnie skuteczne w aktywnej fazie choroby w przypadku powierzchownych zmian (Kreuter A 2016). Wytyczne europejskie w leczeniu morphea rekomendują stosowanie bardzo silnych miejscowych GKS 1 raz dziennie przez okres 1 miesiąca lub umiarkowanie silnych sterydów 1 raz dziennie przez 3 miesiące (Knobler R 2017). Aby zwiększyć ich skuteczność można stosować je pod okluzją. Gdy konieczne jest długoterminowe leczenie GKS powinno się je stosować w terapii przerywanej. W przypadku aktywnych zmian w ECDS najczęściej stosuje się doogniskową iniekcję acetonidu triamcynolonu 10-40 mg/ml lub rozcieńczonego lidokainą w stosunku 1:2-1:4 (Kreuter A 2016, Knobler R 2017).

Miejscowy kalcypotriol 0,005% można uznać za skuteczny lek w terapii aktywnych, zapalnych zmian powierzchniowych morphea z niskim stopniem stwardnienia (Knobler R 2017). Leczenie powinno być stosowane 2 razy dziennie przez co najmniej 3 miesiące, jeśli to możliwe w warunkach okluzji (Kreuter A 2016, Knobler R 2017).

Takrolimus 0,1% stosowany miejscowo można uznać za alternatywę dla leczenia miejscowego GKS aktywnych zmian morphea (Kreuter A 2016, Knobler R 2017). Randomizowane, podwójnie ślepe, kontrolowane badanie potwierdza jego skuteczność w terapii 2 razy dziennie (Kroft EB 2009). Już po 4 miesiącach stosowania obserwowano regresję rumienia oraz zmniejszenie stwardnienia skóry (Sapadin AN 2002). Nie obserwuje się również istotnych efektów ubocznych stosowanej terapii. Brakuje badań nad stosowaniem miejscowo pimekrolimusu w leczeniu morphea (Knobler R 2017).

1.7.2. Fototerapia

Terapia promieniami ultrafioletowymi (UV) to jedna z najskuteczniejszych metod leczenia miejscowego morphea (Breuckmann F 2004, Sunderkotter C 2006, Kroft EB 2008, Gambichler T 2013). Polega na ekspozycji zmian skórnych na UV, które ze względu na długość fali można podzielić na podtypy, takie jak UVA (UVA1 i UVA2) i UVB (szerokopasmowy i wąskopasmowy) (Teske NM 2016). Promieniowanie UVB dociera do warstwy brodawkowatej skóry właściwej, podczas gdy UVA może przenikać nawet do tkanki podskórnej. Promieniowanie UV ma właściwości przeciwzapalne, jak i hamujące proces włóknienia (głównie UVA). Wpływa na apoptozę limfocytów T i komórek Langerhansa oraz zmniejsza stężenie cytokin prozapalnych, takich jak IL-6, IL-8 i TGF- β . UVA indukuje metaloproteinazy macierzy komórkowej, co prowadzi do zahamowania produkcji kolagenu (Kreuter A 2016). UV można również podzielić w zależności od stopnia penetracji skóry.

Fotochemoterapia (*psoralen ultrafiolet A*, PUVA) polega na połączeniu UVA z podaniem fotouczulających psoralenów w formie doustnej lub aplikowanej miejscowo (krem lub kąpiele). Początkowa dawka UVA jest regulowana po określeniu minimalnej dawki fototoksycznej (*minimal phototoxic dose*, MPD). Terapię ogólną PUVA

rozpoczyna się od dawki UVA odpowiadającej 50-70% MPD. W terapii miejscowej od 30% MPD. W opinii autorów niemieckich, PUVA powinna być stosowana w przypadku wczesnych, zapalnych zmian morphea (Kreuter A 2016). Cykl leczenia powinien składać się z łącznie z 30 naświetlań przeprowadzanych 2-3 razy w tygodniu (Kreuter A 2016, Knobler R 2017).

Dotychczas opublikowano trzy badania dotyczące leczenia UVA szerokopasmowym (320-400 nm) wśród pacjentów z morphea (El-Mofty M 2004). 63 pacjentów otrzymało trzy różne dawki UVA 5, 10 i 20 J/cm², po 20 naświetlaniach osiągnięto podobny efekt terapeutyczny (Teske NM 2016). W związku z tym leczenie niskimi dawkami wydaje się również skuteczne. Zgodnie z wytycznymi niemieckimi szerokopasmowe promieniowanie UVA jest mniej skuteczne niż PUVA lub UVA1, a zatem powinno być stosowane tylko wtedy, jeśli fototerapia PUVA lub UVA1 nie jest dostępna (Kreuter A 2016).

Fototerapia UVA1 wykorzystuje fale o długości 340-400 nm. Zastosowanie mają 3 różne dawki UVA1: niska dawka (10-29 J/cm²), średnia dawka (30-59 J/cm²) oraz wysoka dawka promieniowania (60-130 J/cm²). Wszystkie te schematy zostały wykorzystane w leczeniu morphea (Knobler R 2017). Zaleca się naświetlanie średnią dawką promieniowania UVA1 (3-5 razy w tygodniu, łącznie 40 sesji) (Kreuter A 2016). W ciągu 3 lat od zakończenia leczenia UVA1 ok. 50% pacjentów doświadcza nawrotu zmian (Vasquez R 2014). W takich przypadkach należy rozważyć inny rodzaj terapii UV.

Zatem fototerapia jest leczeniem pierwszego wyboru w ograniczonych postaciach morphea, natomiast nie jest odpowiednia, gdy dochodzi do zajęcia głębszych struktur (tkanka tłuszczowa, powięź, mięśnie i kości) (Kreuter A 2016, Knobler R 2017).

1.7.3. Leczenie ogólne

Ogólnoustrojowe GKS stosowane są w leczeniu ciężkich odmian morphea, takich jak: odmiana linijna (w tym ECDS), uogólniona i głęboka (Knobler R 2017). Ponadto stanowią leczenie pierwszego rzutu w eozynofilowym zapaleniu powięzi (Michet CJ 1981). Wiele badań wykazało skuteczność ogólnie stosowanych GKS

w ostrej fazie choroby z aktywnymi zmianami skórnymi, zarówno w monoterapii, jak i w terapii skojarzonej z metotreksatem (MTX) (Knobler R 2017, Kreuter A 2016). W przypadku ciężkich postaci morphea z rozległym zajęciem skóry i/lub tkanek leżących głębiej (tkanka tłuszczowa, mięśnie, powięzi, kości, stawy) zalecane są dożylnie pulsusy metyloprednizolonu w dawce 500-1000 mg dziennie przez 3 dni powtarzane przez co najmniej 3-6 miesięcy (Knobler R 2017, Kreuter A 2016). W przypadku terapii doustnej zaleca się prednizon w dawce 0,5-2 mg/kg masy ciała w 2-3 dawkach podzielonych (maksymalna dawka dobową to 60 mg) przez 2-4 tygodnie, następnie ze stopniową redukcją dawki (Knobler R 2017, Kreuter A 2016). Ze względu na liczne działania niepożądane ogólnych GKS powinny one być stosowane tylko przez krótki czas w terapii wczesnych, ostrych zmian oraz w ciężkich postaciach morphea (Knobler R 2017).

MTX jest lekiem immunosupresyjnym stosowanym u osób dorosłych i dzieci, z bardzo dobrym profilem bezpieczeństwa. Ze wszystkich ogólnych terapii MTX jest najlepiej przebadanym lekiem. Zgodnie z zaleceniami w przypadku ciężkich postaci morphea z rozległym zajęciem skóry i/lub tkanek leżących głębiej (tkanka tłuszczowa, mięśnie, powięzi, kości, stawy) należy zastosować MTX w dawce 12,5–25 mg tygodniowo, max 25 mg tygodniowo w monoterapii lub w połączeniu z GKS stosowanymi ogólnie (dawkowanie jak powyżej) (Knobler R 2017, Kreuter A 2016). Leczenie powinno trwać co najmniej 12 miesięcy, po uzyskaniu odpowiedzi terapeutycznej można rozważyć zmniejszenie dawki (Knobler R 2017, Kreuter A 2016).

Mykofenolan mofetylu (MMF) to lek hamujący proliferację limfocytów T i B, ale także komórek typu mezenchymalnego, w tym komórek mięśni gładkich i fibroblastów. W 2009 r. MMF został opisany jako alternatywa leczenia morphea w przypadku oporności lub nietolerancji MTX i GKS (Martini G 2009). Według autorów europejskich wytycznych może stanowić leczenie drugiego rzutu morphea (Knobler R 2017). Autorzy polskich rekomendacji dotyczących leczenia morphea sugerują rozważenie dawki MMF 1-2 g/dobę (Krasowska D 2019).

1.8. Rokowanie i przebieg

Morphea wykazuje tendencję do samoograniczenia się i spontanicznej remisji zmian po 3-5 latach trwania (Christianson HB 1956, Kreuter A 2016, Mertens J 2017). W niektórych przypadkach przebiega w sposób postępujący i nawrotowy. W przeprowadzonej przez Martens i wsp. analizie retrospektywnej na grupie 344 pacjentach chorujących na morphea wynikało, że nawroty występowały częściej u dzieci niż u dorosłych. Kolejnym czynnikiem ryzyka nawrotu choroby była odmiana linijna morphea. U pacjentów dorosłych nawroty choroby znacznie częściej występowały w postaci uogólnionej morphea (Piram M 2013). Morphea nie przechodzi w SSc (Kreuter A 2016, Asano Y 2018). Natomiast w literaturze medycznej opisywane są bardzo rzadkie przypadki współistnienia morphea i SSc. W trzech analizach retrospektywnych, przeprowadzonych przez trzy niezależne grupy naukowe (Zulian F i wsp., Marzano AV i wsp., Piram M. i wsp.) wykazano, że 2-3% dzieci z odmianą linijną kończyn miało dodatnie przeciwciała przeciwko topoizomerazie I (Scl-70), z czego tylko u jednego z nich po 17 latach rozwinęła się SSc (Zulian F 2005, Marzano AV 2003, Piram M 2013).

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Morphea jest przewlekłą chorobą o nadal nie wyjaśnionej patogenezie. Uważa się, że pierwotne znaczenie ma uszkodzenie komórek śródbłónka, które prowadzi do zaburzeń immunologicznych i aktywacji fibroblastów, zaburzeń macierzy pozakomórkowej, a w konsekwencji do włóknienia tkanek. W ostatnich latach wskazuje się na udział interleukin z grupy IL-1 w patomechanizmie morphea. Zbadano przede wszystkim rolę IL-1 β w rozwoju tej choroby, jednak brak jest pełnych danych dotyczących jej związku z długością trwania choroby, stopniem nasilenia zmian skórnych i aktywnością choroby. Badania wskazują, że znaczenie w patomechanizmie morphea mogą mieć także inne interleukiny z rodziny IL-1 o działaniu potencjalnie profibrotycznym, takie jak IL-18 i IL-33, których rolę badano jedynie w odniesieniu do SSc. W niniejszej pracy planuje się zbadać znaczenie wybranych interleukin z rodziny IL-1 w patomechanizmie morphea.

Zatem celem pracy było:

1. Ocena ekspresji genów *IL1 beta* i *IL18* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) u chorych na morphea z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia, aktywności i uszkodzenia tkanek.
2. Ocena osoczowego stężenia IL-1 β , IL-18, IL-33 u chorych na morphea z uwzględnieniem poszczególnych odmian choroby, stopnia jej nasilenia, aktywności i uszkodzenia tkanek.
3. Zbadanie zależności pomiędzy wynikami badań i danymi uzyskanymi na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego.

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. Materiał

W badaniu udział wzięło 88 osób, w tym 59 chorych na morphea oraz 29 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Charakterystykę liczebności grup przedstawia tabela 2.

Wszystkim osobom z grupy badanej i kontrolnej zostały przedstawione informacje o celu, sposobie przeprowadzenia, a także wynikających z udziału w badaniach ewentualnych korzyściach i związanym z nim ryzyku. Materiał został pobrany po uzyskaniu pisemnej, dobrowolnej i świadomej zgody na uczestnictwo w badaniu. Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwały nr 52/19 z dnia 10 stycznia 2019 r., nr 238/19 z dnia 7 lutego 2019 r. oraz nr 501/19 z dnia 11 kwietnia 2019 r.).

Tabela 2. Charakterystyka i liczebność grup badanych.

Grupy badane	Liczba chorych - n	(%)
Łącznie	88	100,0
Morphea	59	67,0
Grupa kontrolna	29	33,0

n - liczebność grupy

3.1.1. Grupa badana

Badaniu zostało poddanych 59 chorych z rozpoznaniem morphea leczonych ambulatoryjnie oraz w warunkach szpitalnych w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Rozpoznanie zostało postawione, zgodnie z aktualnymi

wytycznymi, na podstawie klasycznego obrazu klinicznego (Knobler R 2017, Krasowska D 2019). Kryterium wykluczającym było stosowanie leczenia ogólnego i miejscowego w okresie miesiąca poprzedzającego pobranie materiału.

W badanej populacji chorych kobiety stanowiły 83,1% (49 osób) a mężczyźni 16,9% (10 osób). Średnia wieku w całej grupie wynosiła $48,9 \pm 16,7$ lat (min. 18 lat; max. 73 lata). Charakterystykę grupy badanej przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Statystyka opisowa w grupie chorych na morphea.

		Morphea
Liczba chorych	n	59
	%	100,0
Proporcje i odsetek kobiet/mężczyzn	n	49/10
	%	83,1/16,9
Wiek chorych (lata)	Średnia $\pm$ SD	$48,9 \pm 6,7$
	Mediana	52,0
	Min.	18
	Max.	73

n - liczebność grupy, SD - odchylenie standardowe, Min. - wartość minimalna, Max. - wartość maksymalna.

3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiło 29 ochotników niechorujących na choroby przewlekłe, dobranych pod względem płci i wieku do grupy badanej. W grupie tej kobiety stanowiły 83% (24 osoby), a mężczyźni 17% (5 osób). Średnia wieku wynosiła $46,3 \pm 12,7$ lat (min. 29 lat; max. 71 lat). Kryterium wykluczającym było występowanie

chorób autoimmunizacyjnych w rodzinie. Populacja ta stanowiła kontrolę w badaniu względnego poziomu transkryptów genów wybranych białek w PBMC, jak również ich osoczowego stężenia. Charakterystykę grupy kontrolnej przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Statystyka opisowa grupy kontrolnej.

		Osoby zdrowe
Liczba chorych	n	29
	%	100,0
Proporcje i odsetek kobiet/mężczyzn	n	24/5
	%	83,0/17,0
Wiek chorych (lata)	Średnia±SD	46,3±12,7
	Mediana	47,0
	Min.	29
	Max.	71

n - liczebność grupy, SD - odchylenie standardowe, Min. - wartość minimalna, Max. - wartość maksymalna.

3.2. Metodyka

3.2.1. Badanie podmiotowe

Rozpoznanie morphea zostało postawione zgodnie z aktualnymi wytycznymi, na podstawie klasycznego obrazu klinicznego (Knobler R 2017, Krasowska D 2019). U wszystkich chorych na morphea przeprowadzono szczegółowy wywiad, w którym uwzględniono czas trwania choroby (lata), występowanie urazu, który poprzedzał pojawienie się zmian skórnych oraz współwystępowanie innych schorzeń przewlekłych.

3.2.2. Badanie przedmiotowe

3.2.2.1. Postać morphea oraz współwystępowanie liszaja twardzinowego

Na podstawie oceny stanu klinicznego wyróżniono 5 podgrup morphea zgodnie z klasyfikacją przedstawioną przez Kreutera i wsp., która obejmuje następujące odmiany morphea (Kreuter A 2009): postać ograniczona morphea (MEP), postać uogólniona morphea (GM), postać liniowa morphea (LM), postać głęboka morphea (DM) oraz postać mieszana morphea (MM).

Dodatkowo u wszystkich chorych oceniono współwystępowanie ognisk o charakterze liszaja twardzinowego.

3.2.2.2. Ocena wskaźnika aktywności, nasilenia choroby i uszkodzenia tkanek u chorych na morphea połączona z ogólną oceną lekarską

U wszystkich chorych na morphea zakwalifikowanych do grupy badanej oceniono wskaźnik aktywności, nasilenia choroby i uszkodzenia tkanek połączony z ogólną oceną lekarską na podstawie skali LS Cutaneous Assessment Tool (LoSCAT) zaproponowanej przez Arkachaisriego i wsp. (Arkachaisriego T 2010, Arkachaisriego T 2013). Składa się ona ze zmodyfikowanego wskaźnika aktywności lub nasilenia choroby (*modified LS Skin Severity Index*, mLoSSI) i uszkodzenia tkanek (*LS Skin Damage Index*, LoSDI).

W oparciu o skalę mLoSSI oceniano wykładniki nasilenia lub aktywności procesu chorobowego, takie jak rumień, stwardnienie skóry, pojawianie się nowych wykwitów skórnych lub powiększenie już istniejących zmian w ciągu ostatniego miesiąca. Każdy z trzech wymienionych parametrów oceniono w skali od 0 do 3 pkt w 18 obszarach anatomicznych ciała (twarz lub głowa, szyja, klatka piersiowa, brzuch, górna część pleców, dolna część pleców, prawe kończyny - ramię, przedramię, ręka, udo, podudzie, stopa, lewe kończyny - ramię, przedramię, ręka, udo, podudzie, stopa).

Rumień oceniono w obrębie brzegu zmiany: 0 - brak rumienia w obrębie ocenianej lokalizacji anatomicznej, 1 - delikatny rumień o barwie różowej, 2 - nasilony czerwony rumień, 3 - oznacza rumień o barwie ciemnoczerwonej lub fioletowej.

Stwardnienie skóry oceniono na podstawie możliwości ujęcia skóry w fałd: 0 - skóra niezmieniona, 1 - niewielkie stwardnienie skóry, możliwość ujęcia skóry w fałd, 2 - umiarkowane stwardnienie utrudniające ujęcie skóry w fałd, 3 - znaczne stwardnienie, które zupełnie uniemożliwia ujęcie skóry w fałd.

Pojawienie się nowych wykwitów bądź powiększenie się już istniejących zmian, które wystąpiły w ciągu ostatniego miesiąca oceniono na 3 pkt, natomiast brak tych cech skutkowało przyznaniem 0 pkt.

W oparciu o skalę LoSDI oceniano obecność atrofii skóry, atrofii tkanki podskórnej oraz występowanie zaburzeń pigmentacji. W odniesieniu do oceny atrofii skóry: 0 - brak atrofii, 1 - atrofia niewielkiego stopnia lub skóra świecąca, 2 - umiarkowana atrofia i obecność prześwitujących naczyń, 3 - znaczna atrofia i obecność zagłębień skóry.

Przy ocenie atrofii tkanki podskórnej: 0 - jej brak, 1 - obecność płytkich wgłębień oraz utrata $\leq 1/3$ tkanki tłuszczowej, 2 - widoczne wklęsnięcie i utrata $1/3-2/3$ tkanki tłuszczowej, 3 - atrofia i utrata $\geq 2/3$ tkanki tłuszczowej.

W odniesieniu do zaburzeń pigmentacji (hipo- i hiperpigmentacja): 0 - brak, 1 - łagodne zaburzenia, 2 - umiarkowane, 3 - znacznego stopnia zaburzenia pigmentacji.

Każdy z wyżej wymienionych czynników oceniono na podstawie najbardziej zaawansowanej zmiany w obrębie danej lokalizacji anatomicznej. Następnie wszystkie wymienione wyniki zostały zsumowane (mLoSSI i mLoSDI), maksymalna wartość wynosić mogła 324 pkt.

W odniesieniu do ogólnej oceny lekarskiej dotyczącej aktywności choroby (*Physician's Global Assessment of Disease Activity*, PGA-A) i uszkodzenia (*Physician's Global Assessment of Damage*, PGA-D) oceny dokonano za pomocą 100 mm wizualnej analogowej skali, w której to 0 oznaczało chorobę nieaktywną lub brak uszkodzenia tkanek, natomiast 100 to choroba o dużej aktywności lub duże uszkodzenie tkanek (Arkachaisri T 2010, Arkachaisriego T 2013). Kwestionariusz LoSCAT przedstawiono w tabeli 5 (Arkachaisri T 2010, Arkachaisriego T 2013).

Tabela 5. Kwestionariusz oceny wskaźnika aktywności, nasilenia choroby i uszkodzenia tkanek u chorych na morphea (LoSCAT) wg Arkachaisri i wsp. (Arkachaisriego T 2010, Arkachaisriego T 2013).

Parametr	mLoSSI			LoSDI		
Lokalizacja	nowe zmiany lub powiększanie się już istniejących (ostatni miesiąc): 0=brak 3=obecne	rumień: 0=brak 1=różowy 2=czerwony 3=sinoczerwony lub fioletowy	zgrubienie skóry: 0=brak 1=łagodne 2=umiarkowane 3=znaczne	atrofia skóry: 0=brak 1=świecenie 2=prześwitujące naczynia 3=zagłębienie	atrofia tkanki podskórnej: 0=brak 1=płaska 2=wkłęsła 3=znaczna	zaburzenia pigmentacji (hipo/hiperpigmentacja): 0=brak 1=łagodne 2=umiarkowane 3=znaczne
twarz lub głowa						
szyja						
klatka piersiowa						
brzuch						
górna część pleców						
dolna część pleców						
prawe ramię						
prawe przedramię						
prawa ręka						
prawo udo						
prawo podudzie						
prawa stopa						
lewe ramię						
lewe przedramię						
lewa ręka						
lewe udo						
lewe podudzie						
lewa stopa						

3.2.2.3. Ocena aktywności choroby

Chorzy na morphea, u których w ciągu ostatniego miesiąca stwierdzono pojawienia się nowej zmiany rumieniowej i/lub blaszki stwardnieniowej lub obserwowano szerzenie się uprzednio istniejących ognisk lub obecna była rumieniowa obwódka (*lilac ring*), zostali zakwalifikowani do grupy z aktywnym procesem chorobowym. Chorzy, u których nie stwierdzono powyższych objawów, przydzielono do grupy z nieaktywnym procesem (Florez-Pollack S 2018, Arkachaisri T 2010).

3.2.3. Badania dodatkowe

3.2.3.1. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej i osocze

Od osób z grupy badanej oraz od zdrowych ochotników pobrano w warunkach jałowych maksymalnie 2 razy 4,9 ml krwi do probówko-strzykawek zawierających EDTA (*S-Monovette, Sarstedt*). PBMC uzyskano od 21 chorych na morphea oraz od 26 zdrowych ochotników. PBMC uzyskano poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Fikolu (*Ficoll-Histopaque 1.077 g/ml, Sigma Diagnostics*) -800 g, 40 minut, 22°C. Osocze do czasu wykonania badań przechowywane było w temperaturze -80°C. PBMC zostało zalane 1 ml Renozolu (*GenoPlast Biochemicals*) wortexowane, następnie przechowywane w temperaturze -80°C.

3.2.3.2. Badanie ekspresji genów *IL1 beta* i *IL18* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)

3.2.3.2.1. Izolacja RNA

Całkowite komórkowe RNA, izolowane z PBMC, uzyskano zgodnie z metodą opisaną przez Chomczyńskiego i wsp. na drodze ekstrakcji fenolowo-chloroformowej (Chomczyński P 1987, Chomczyński P 1993). Fazę wodną oczyszczano przy pomocy zestawu NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel). Zestaw ten wykorzystuje kolumny z filtrem krzemionkowym oraz DNazę. Dla oceny prawidłowego przebiegu izolacji i reakcji DNazowania, dla każdej próby RNA wykonano reakcję real-time PCR dla genu referencyjnego - reakcja kontrolna typu no-RT.

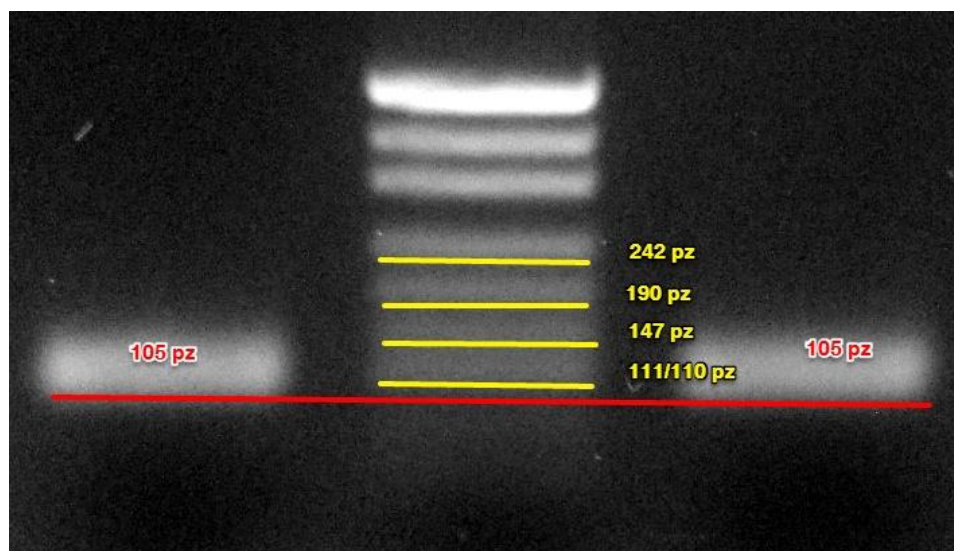
3.2.3.2.2. Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów (Roche Applied Science). Po przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji, próby komplementarnego DNA (*complementary* DNA, cDNA) przechowywane były w -80°C do czasu wykonywania reakcji real-time PCR.

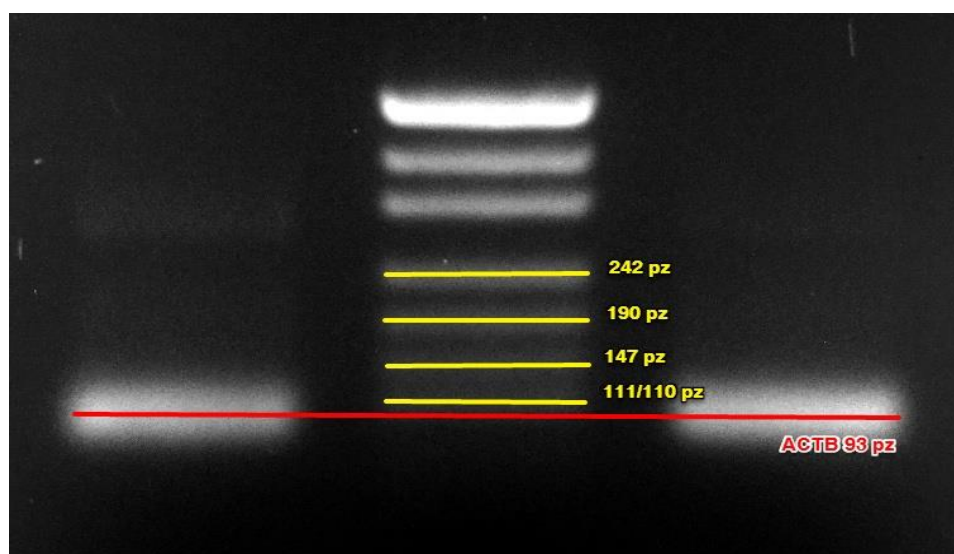
3.2.3.2.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

Aby zoptymalizować proces real-time PCR dla każdej z badanych sekwencji zastosowano odpowiedni dobór starterów, temperatury ich przyłączenia, czasu elongacji oraz stężenia jonów magnezu. Wielkość produktu oceniano wykorzystując proces elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (1xTAE). Za reakcję zoptymalizowaną uznawano taką, gdy uzyskano pojedynczy prążek o odpowiedniej długości (Rycina 1,2,3,4) oraz gdy analiza temperatury topnienia amplikonu po real-time PCR wykazywała pojedynczy i jednorodny produkt amplifikacji.

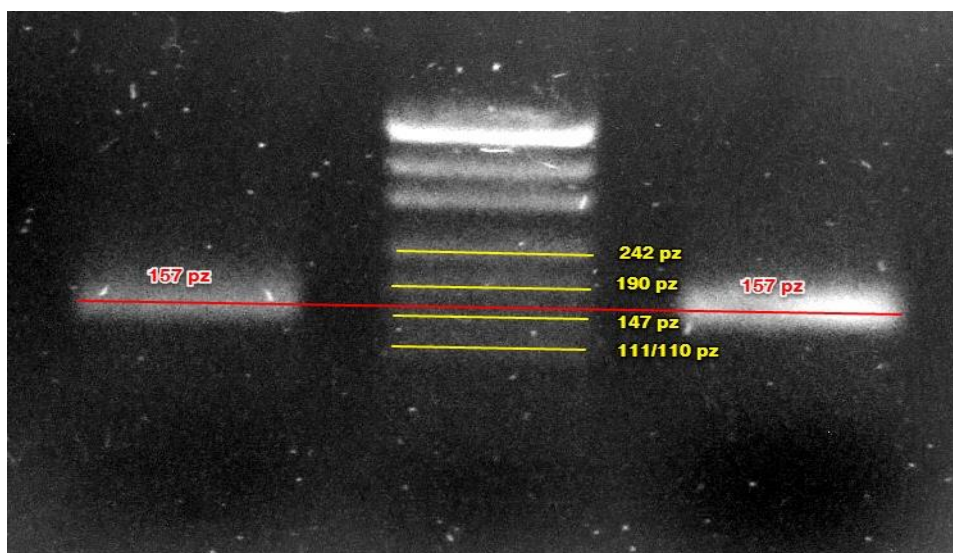
Następny etap polegał na sporządzeniu 10-krotnych rozcieńczeń poprzez dodanie 10 µl roztworu o znanej liczbie kopii (standard) oraz 90 µl wody. Standardy zostały wykorzystane jako wzorce w badaniu real-time PCR. W końcowym etapie wykreślono krzywe standardowe. Dla każdej analizowanej sekwencji została wykreślona oddzielna krzywa standardowa, co posłużyło jako punkt odniesienia dla wyników uzyskanych w real-time PCR. Na rycinie 5 przedstawiono przykładową krzywą standardową dla genu kodującego β -aktynę (*β -actin*, ACTB).



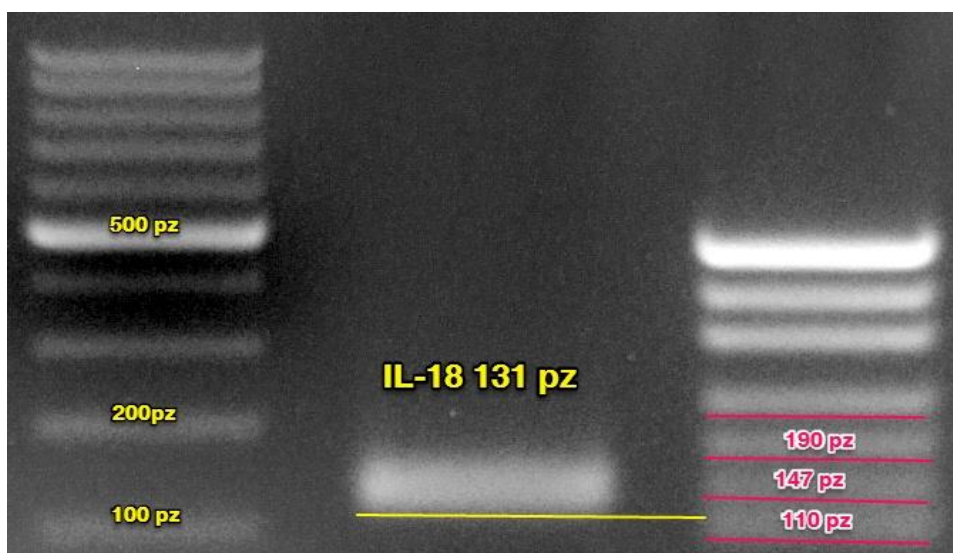
Rycina 1. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla genu *GAPDH*.



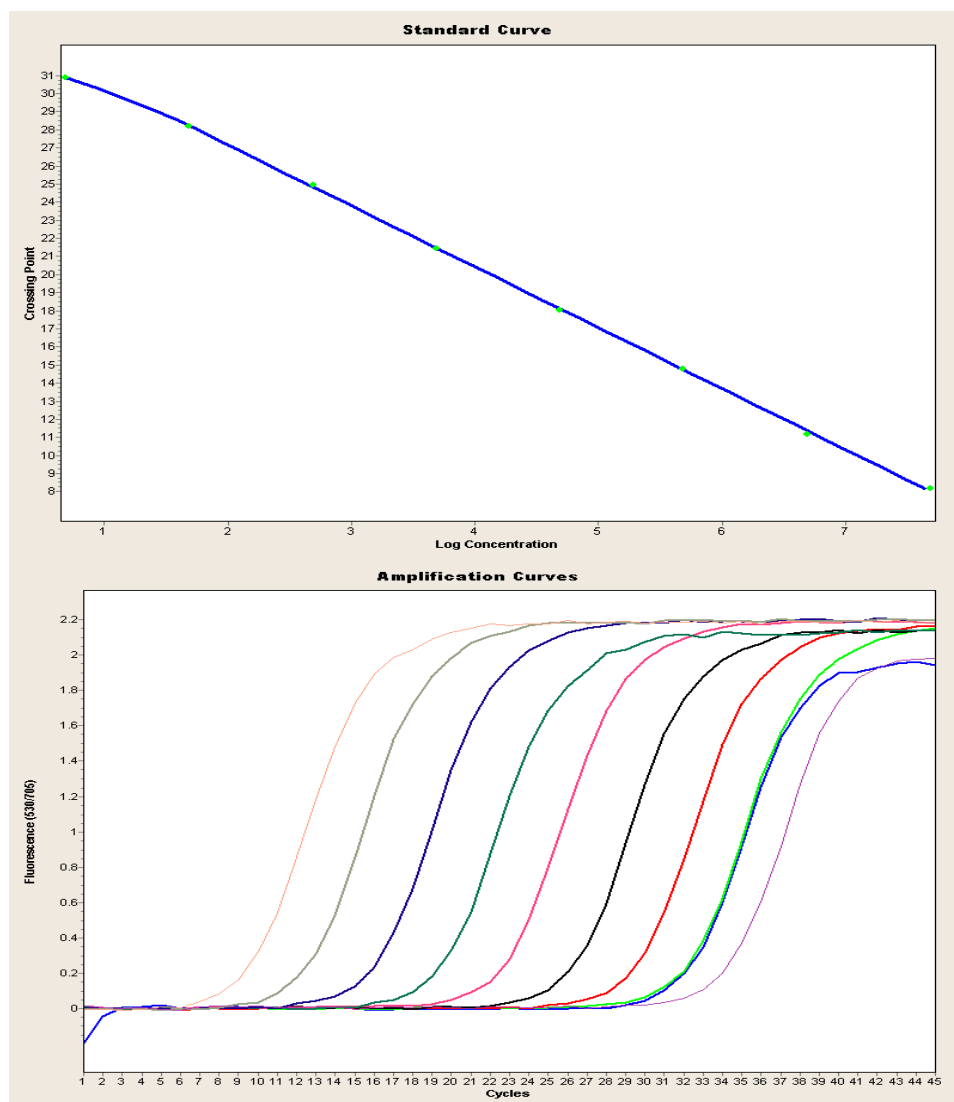
Rycina 2. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla genu *ACTB*.



Rycina 3. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla genu *IL1 beta*.

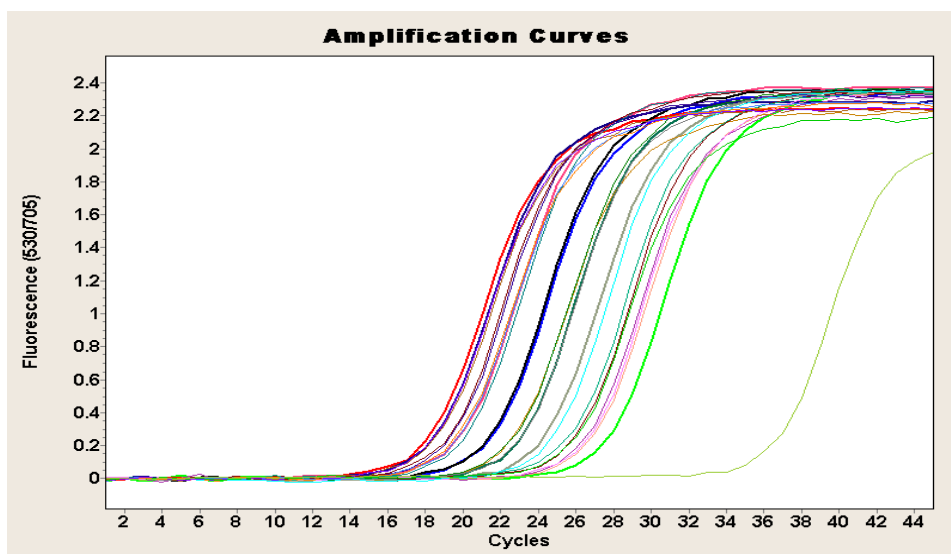


Rycina 4. Rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla genu *IL18*.

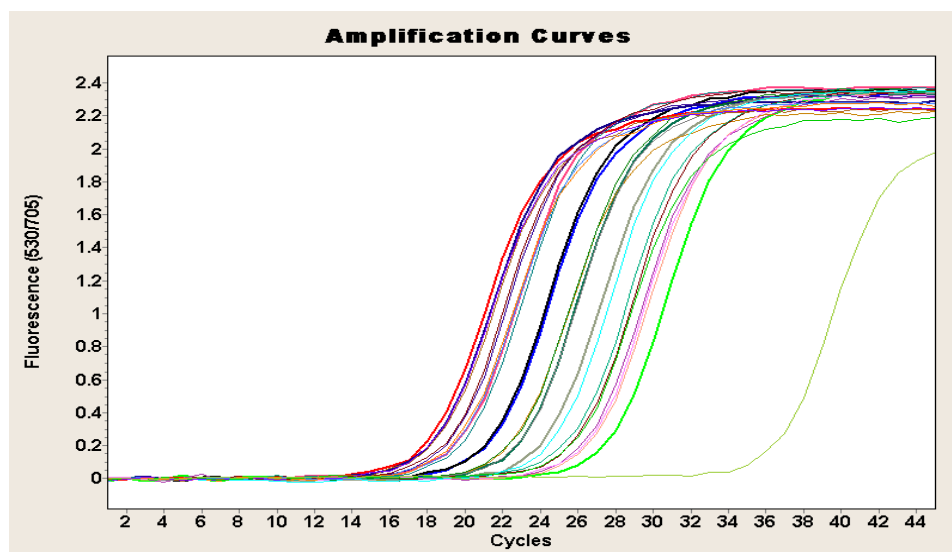


Rycina 5. Krzywa amplifikacji i krzywa standardowa genu *ACTB*.

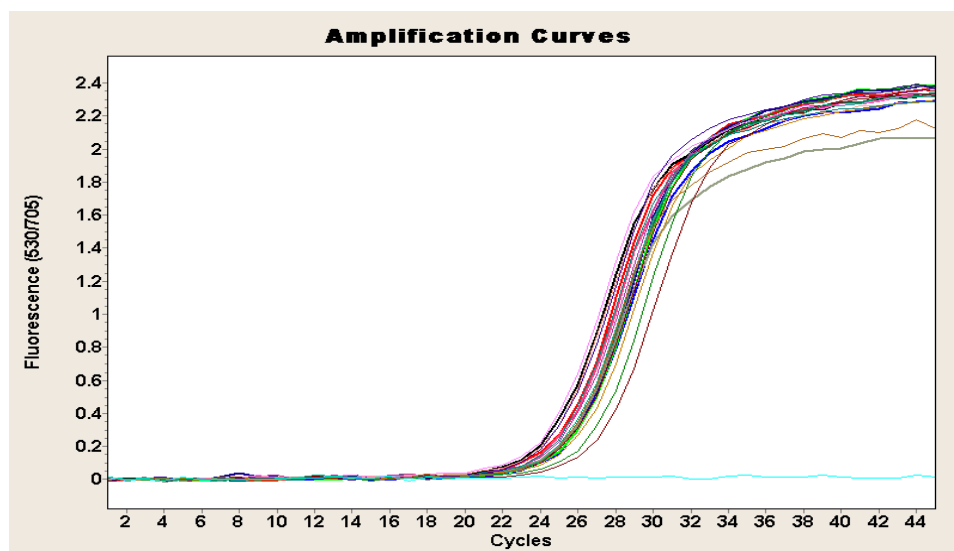
Każdą z prób cDNA amplifikowano dla wszystkich analizowanych transkryptów z użyciem komercyjnego zestawu odczynników LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green (Rycina 6,7,8,9). Uzyskane wyniki przedstawiono jako liczby transkryptów badanych sekwencji (genów) względem średniej geometrycznej z liczby transkryptów dwóch genów referencyjnych.



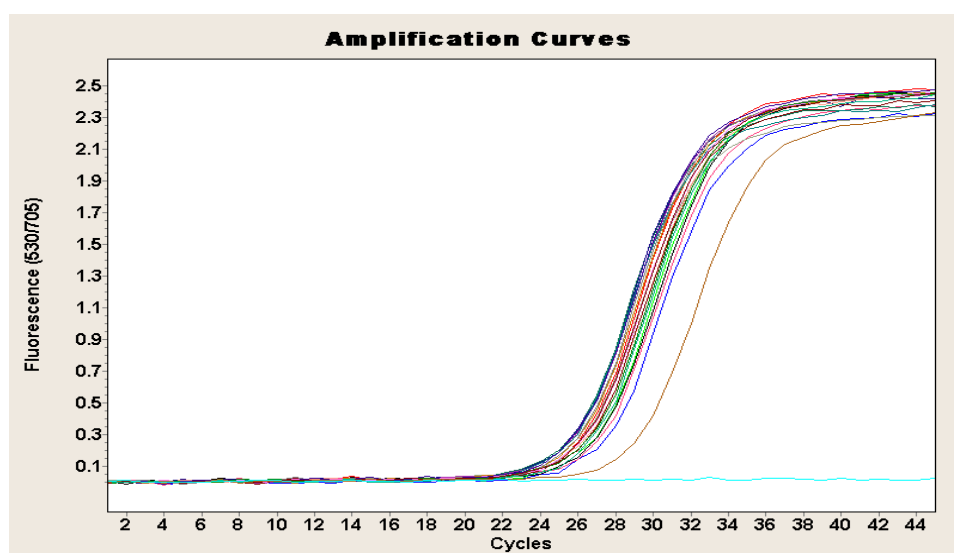
Rycina 6. Krzywa amplifikacji dla przykładowej partii prób genu *ACTB*.



Rycina 7. Krzywa amplifikacji dla przykładowej partii prób genu *GAPDH*.



Rycina 8. Krzywa amplifikacji dla przykładowej partii prób genu *IL1 beta*.



Rycina 9. Krzywa amplifikacji dla przykładowej partii prób genu *IL18*.

Ilościowej ocenie ekspresji z zastosowaniem metody real-time PCR zostały poddane próby cDNA. Jej zasada opiera się na monitorowaniu wzrostu fluorescencji po każdym cyklu reakcji. Możliwe jest to poprzez wykorzystanie systemów detekcyjnych opartych na związkach fluorescencyjnych. W opisanych badaniach został zastosowany system detekcyjny z barwnikiem SYBR Green, który wykazuje silne właściwości transmisyjne będąc w kompleksie z dwuniciowym DNA.

Analizie poddano wybrane fragmenty genów o długości od 74 do 157 par zasad (pz). Aby zminimalizować ryzyko amplifikacji niewłaściwych sekwencji pochodzenia genomowego, w każdym przypadku, amplikon obejmował przynajmniej jeden intron. Startery, których użyto w powyższym badaniu, zaprojektowano na podstawie sekwencji dostępnych w bazie danych GenBank i Ensembl, a także na podstawie doniesień z literatury medycznej (Dańczak-Pazdrowska A 2012, Martinez-Godinez MA 2015). Dane dotyczące charakterystyki starterów przedstawiono w tabeli 6.

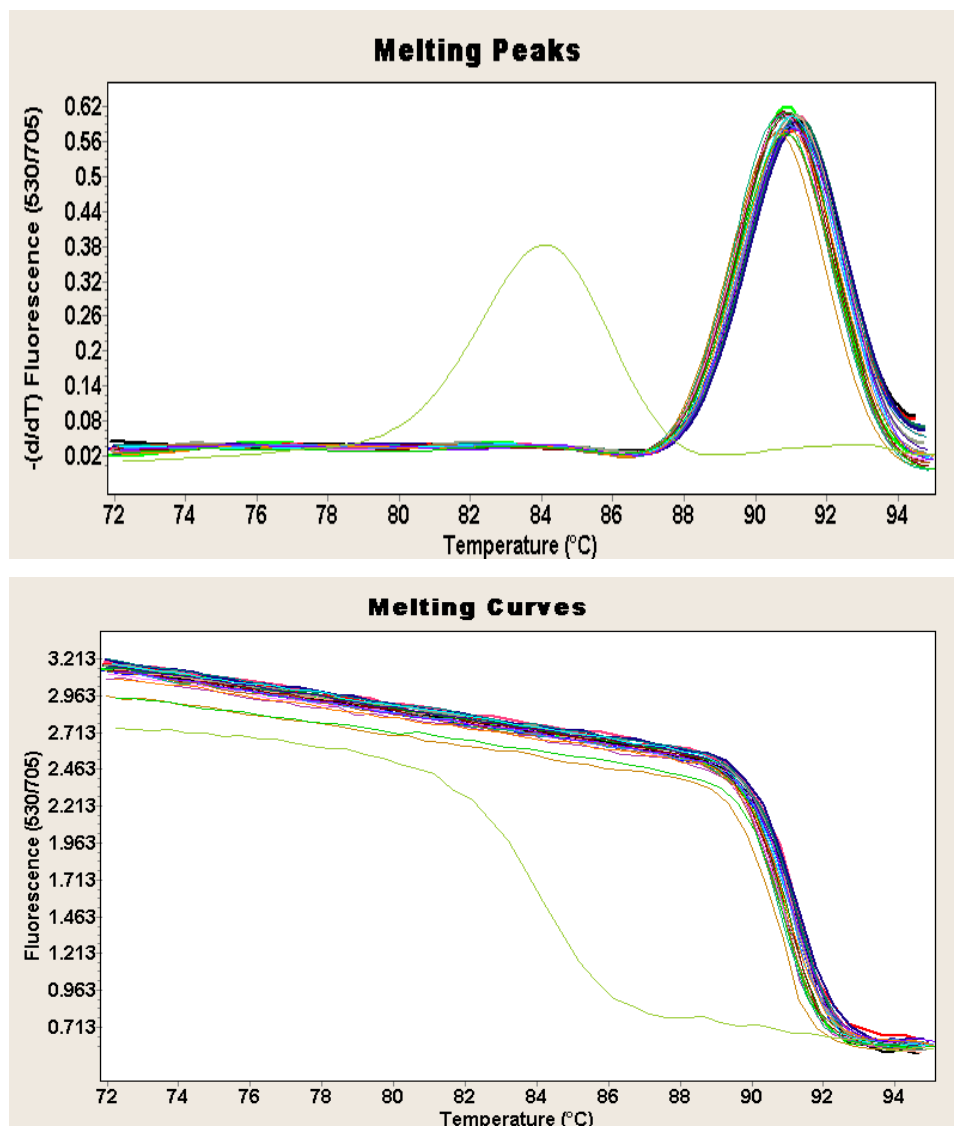
Istotny był również właściwy wybór genu referencyjnego. Jest to gen, którego poziom ekspresji jest możliwie jak najmniej zmieniony w tkance oznaczanej oraz w różnych warunkach eksperymentalnych (Ciesielska A 2008). Dlatego też jako geny referencyjne stosuje się geny podstawowego metabolizmu komórkowego. Pierwszym z genów, który został użyty w powyższej pracy jest *ACTB*. Drugim użytym genem referencyjnym jest gen dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH), należący do genów podstawowego metabolizmu komórkowego, dodatkowo nie wykazuje zależności względem płci czy wieku. Zastosowanie *GAPDH* jako genu referencyjnego znajduje uzasadnienie w literaturze medycznej, również w kontekście badań nad morphea (Bonet-Duquennoy M 2006, Dańczak-Pazdrowska A 2012). Ponadto użycie *ACTB* zostało potwierdzone w danych z piśmiennictwa (Suzuki T 2000).

Poprzez analizę spadku poziomu fluorescencji wraz ze stopniowym wzrostem temperatury można określić temperaturę topnienia wybranego fragmentu dsDNA. Początkowa wartość temperatury odpowiada temperaturze elongacji, po której następował pomiar fluorescencji w reakcji real-time PCR. Na koniec porównano profil topnienia z reakcją wzorcową uzyskaną podczas reakcji optymalizacji, co stanowiło kontrolę jakościową uzyskanych amplikonów. Wykresy fluorescencji w zależności od aktualnej temperatury oraz wykresy ujemnej pierwszej pochodnej w zależności od

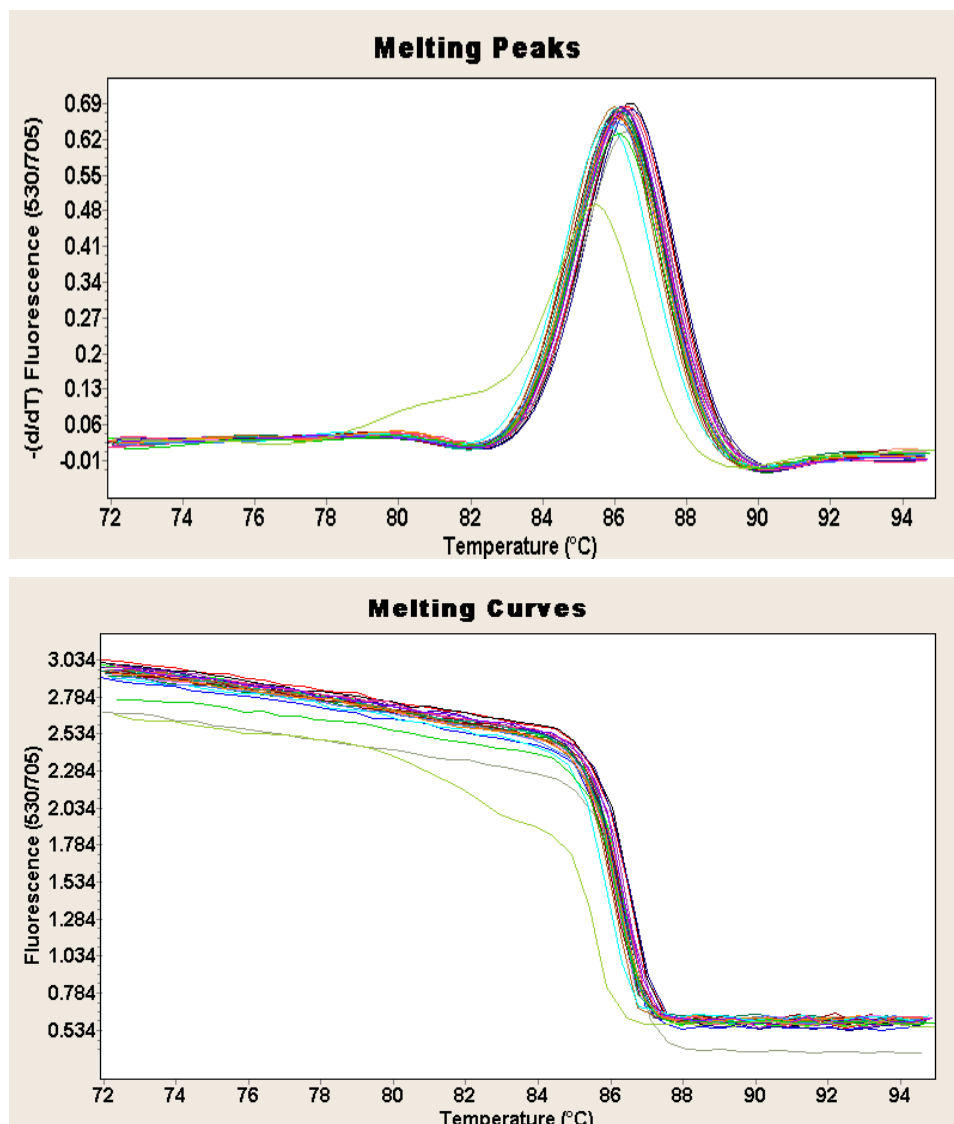
temperatury aktualnej uzyskane w czasie rzeczywistym dla poszczególnych prób przedstawiają ryciny 10,11,12,13.

Tabela 6. Startery zastosowane w badaniu.

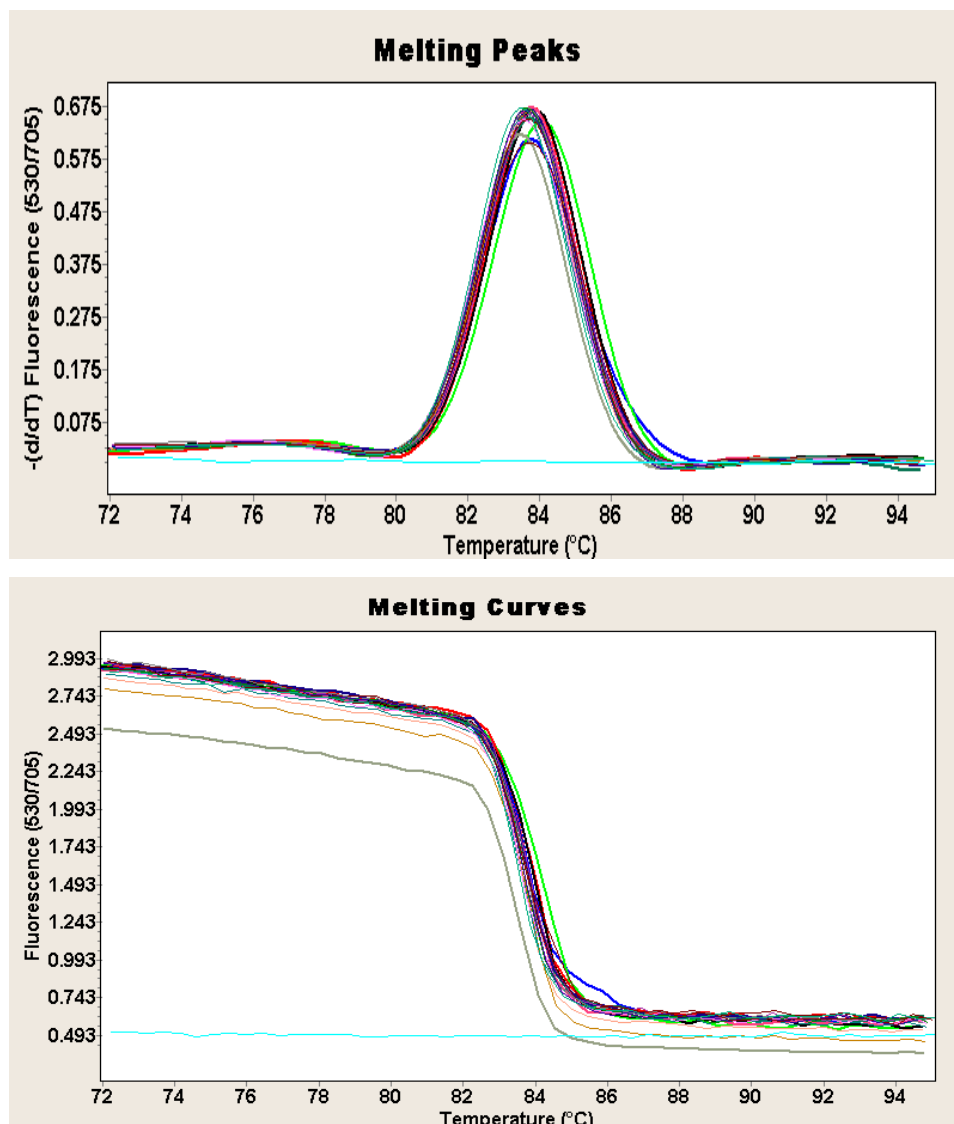
Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Długość ampliconu [pz]
GAPDH-F	CTGCACCACCAACTGCTTAG	105
GAPDH-R	TTCTGGGTGGCAGTGATG	
ACTB-F	GCACAGAGCCTCGCCTT	93
ACTB-R	GTTGTCGACGACGAGCG	
IL-1 β -F	TGGAGCAACAAGTGGTGT	157
IL-1 β -R	TTGGGATCTACACTCTCCAGC	
IL-18-F	CAACAAACTATTTGTCGCAGGA	131
IL-18-R	CAAAGTAATCTGATTCCAGGTTTTC	



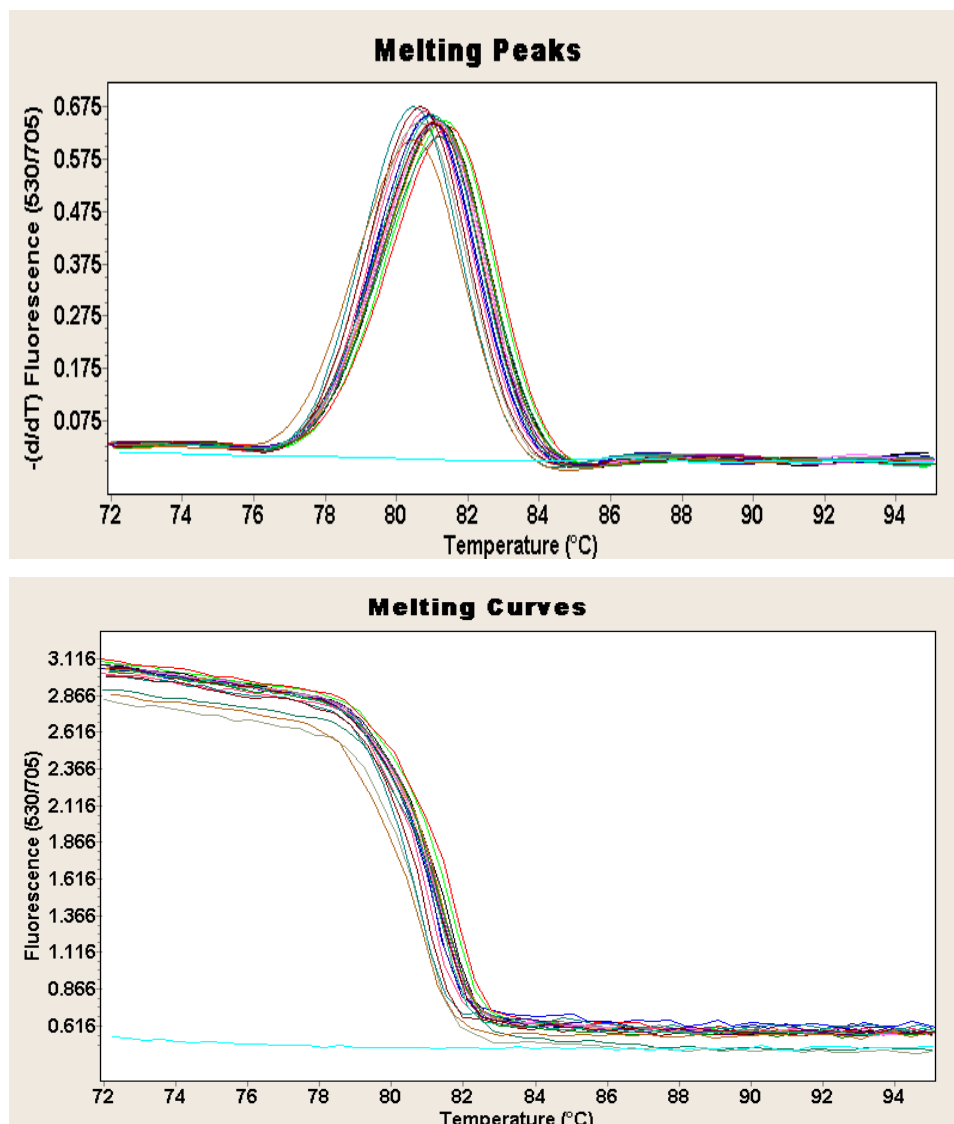
Rycina 10. Profil analizy topnienia dla genu *ACTB*.



Rycina 11. Profil analizy topnienia dla genu *GAPDH*.



Rycina 12. Profil analizy topnienia dla genu *IL1 beta*.



Rycina 13. Profil analizy topnienia dla genu *IL18*.

3.2.3.3. Badanie metodą immunoenzymatyczną ELISA

Metoda immunoenzymatyczna ELISA służy do wykrywania oraz do ilościowego oznaczenia białek, które zawiera badana próbka. W reakcji tej pomiędzy antygenem a przeciwciałem tworzą się wiązania, które prowadzą do powstania reakcji barwnej. Natężenie barwy zależy od ilości powstałych wiązań i odczytywane jest przy użyciu spektrofotometru w oparciu o krzywą kalibracyjną (Crowther JR 2001).

Ocena osoczowych stężeń IL-1 β , IL-18, IL-33 została wykonana u wszystkich osób z grupy badanej i kontrolnej metodą immunoenzymatyczną ELISA z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów Biorbyt LLC (*St Luis, USA*). Oznaczenie zostały przeprowadzone zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta.

3.3. Analiza statystyczna

Wykonano analizę częstości wszystkich badanych zmiennych, które wyrażono za pomocą tabeli oraz wykresów. Następnie przeprowadzono testowanie hipotez badawczych poprzedzone testowaniem normalności rozkładu zmiennych. Odpowiednio dla charakteru zmiennych oraz wielkości próby zastosowano test Manna-Whitneya oraz współczynnik korelacji rho Spearmana wraz z określeniem istotności statystycznej otrzymanych wyników. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. Wszystkie analizy przeprowadzone zostały w oparciu o program statystyczny SPSS w wersji 27.

4. WYNIKI

4.1. Wyniki badania podmiotowego w grupie chorych na morphea

Średni czas trwania choroby wynosił 5,7 lat. W podgrupie MEP było to 4,9 lat; w podgrupie GM - 6,3 lata; w podgrupie LM - 14,7 lat oraz w podgrupie DM to 1,5 roku.

W grupie chorych na morphea 2 pacjentów (3,4%) podawało występowanie urazu, który poprzedzał pojawienie się zmian skórnych. 1 chory zgłaszał, że ogniska morphea pojawiły się po iniekcji heparyny drobnocząsteczkowej w skórę brzucha, natomiast drugi chory, że zmiany pojawiły się po przerwaniu ciągłości naskórka, do którego doszło w wyniku skaleczenia.

W badanej grupie najczęściej współwystępującymi chorobami autoimmunologicznymi były choroba Hashimoto - 13 chorych (22%), bielactwo - 3 chorych (5,1%) oraz zespół antyfosfolipidowy u 1 chorego (1,7%).

4.2. Wyniki badania przedmiotowego w grupie chorych na morphea

Najliczniejszą podgrupę stanowiła postać MEP - 46 osób (78%), a najrzadziej obserwowano postać DM 2 osoby (3,4%). Średnia wieku dla podgrupy MEP to $49,3 \pm 17$ lat (min. 18; max. 73 lata), w tym kobiety stanowiły 82,6% (38 osób), a mężczyźni 17,4% (8 osób). W podgrupie GM średnia wieku wynosiła $50,4 \pm 12,5$ lat (min. 32 lata; max. 73 lata); 85,7% chorych było płci żeńskiej (6 osób), a 14,3% płci męskiej (1 osoba). W podgrupie LM średnia wieku to 45,3 lata (min. 20 lat; max. 62 lata), odsetek kobiet to 75% (3 osoby), a mężczyzn 25% (1 osoba). W podgrupie DM średnia wieku to 32 lata (min. 21 lat; max 43 lata), odsetek kobiet to 100% (2 osoby).

W grupie chorych na morphea u 14 osób (23,7%) obserwowano współistnienie liszaja twardzinowego. W podgrupie MEP było to 12 osób (85,7%), w podgrupie LM - 2 osoby (14,3%), natomiast w podgrupie GM i DM nie stwierdzono współwystępowania ognisk liszaja twardzinowego.

Chorobę aktywną stwierdzono u 36 chorych na morphea, natomiast u 23 chorych - postać nieaktywną. W podgrupie MEP aktywna postać występowała u 25 chorych, u 21 - nieaktywna. Następnie odpowiednio w poszczególnych podgrupach: GM - 6/1, w LM - 3/1, w podgrupie DM - 2/0.

Mediana wskaźnika LoSCAT wynosiła 11 punktów, najwyższą obserwowano w postaci GM – 39, najniższą w postaci MEP - 10.

Średni wynik wskaźnika PGA-A wynosił 46,3 punktów; natomiast najwyższy był w postaci GM - 69,3; natomiast najniższy obserwowano w postaci MEP - 40,9.

Średni wynik wskaźnika PGA-D wynosił 55,9 punktów; najwyższy był w podgrupie LM - 76,3; najniższy w podgrupie MEP - 50,3.

Wyniki badania przedmiotowego w grupie chorych na morphea z uwzględnieniem poszczególnych podgrup morphea wraz z współistnieniem liszaja twardzinowego oraz wskaźnika LoSCAT, PGA-A, PGA-D i aktywności choroby przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Wyniki badania przedmiotowego w grupie chorych na morphea z uwzględnieniem poszczególnych podgrup morphea wraz z współistnieniem liszaja twardzinowego oraz wskaźnika LoSCAT, PGA-A, PGA-D i aktywności choroby.

		Morphea	Podtypy grupy badanej			
			MEP	GM	LM	DM
Liczba chorych	n	59	46	7	4	2
	%	100,0	78,0	11,9	6,7	3,4
Proporcje i odsetek kobiet/mężczyzn	n	49/10	38/8	6/1	3/1	2/0
	%	83,1/16,9	82,6/17,4	85,7/14,3	75,0/25,0	100,0/0,0
Wiek chorych (lata)	Średnia±SD	48,9±6,7	49,3±17,0	50,4±12,5	45,3±16,8	32,0±11,0
	Mediana	52,0	55,0	47,0	49,5	32,0
	Min.	18	18	32	20	21
	Max.	73	73	73	62	43
Współistnienie LS	n	14	12	-	2	-
	%	23,7	85,7	-	14,3	-
Choroba aktywna/nieaktywna	n	36/23	25/21	6/1	3/1	2/0
	%	61,0/39,0	54,3/45,7	85,7/14,3	75,0/25,0	100,0/0,0
Mediana LoSCAT (min.-max.)		11,0 (2,0-69,0)	10,0 (2,0-33,0)	39,0 (5,0-69,0)	15,5 (10,0-21,0)	11,0 (6,0-16,0)
Średni PGA-A (min.-max.)		46,3 (0,0-95,0)	40,9 (0,0-65,0)	69,3 (0,0-95,0)	57,5 (0,0-80,0)	67,5 (60,0-75,0)
Średni PGA-D (min.-max.)		55,9 (0,0-95,0)	50,3 (0,0-75,0)	75,7 (60,0-95,0)	76,3 (70,0-80,0)	75,0 (70,0-80,0)

n - liczebność grupy, SD - odchylenie standardowe, Min. - wartość minimalna, Max. - wartość maksymalna, MEP - postać ograniczona morphea, GM - postać uogólniona morphea, LM - postać linijna morphea, DM - postać głęboka morphea, LS - liszaj twardzinowy.

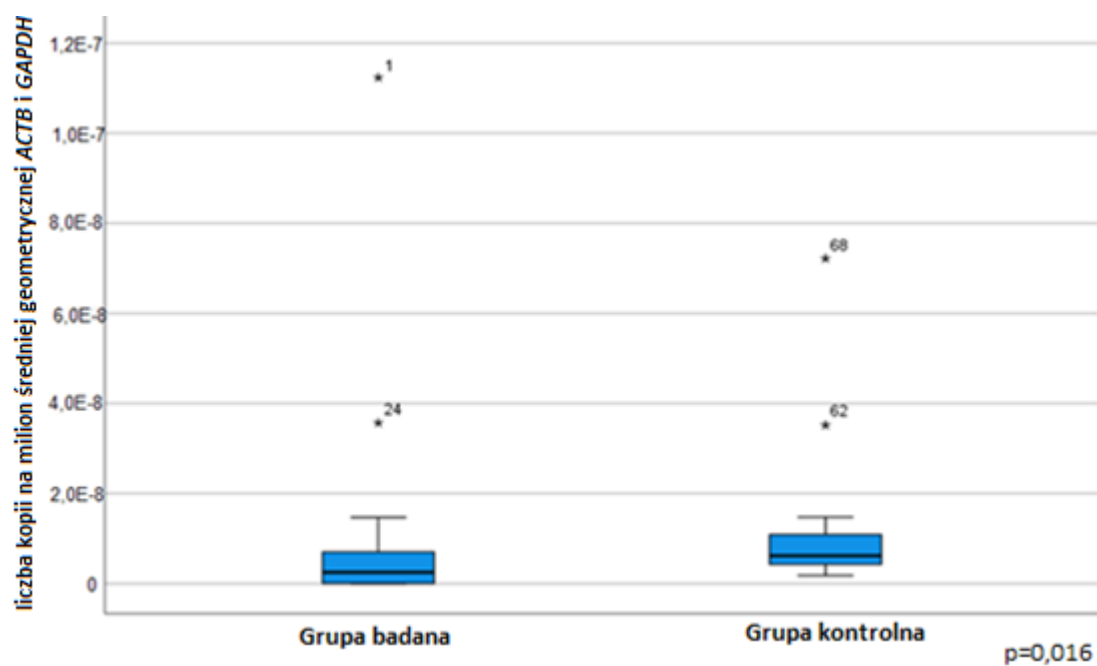
4.3. Ekspresja genu *IL1 beta* i *IL18* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej w grupie chorych na morphea i w grupie kontrolnej

Oceny ekspresji genów *IL1 beta* i *IL18* dokonano u 21 chorych na morphea (35,6%) i w grupie kontrolnej. Statystyki opisowe dotyczące chorych na morphea, u których przeprowadzono analizę ekspresji obu genów przedstawiono w tabeli 8.

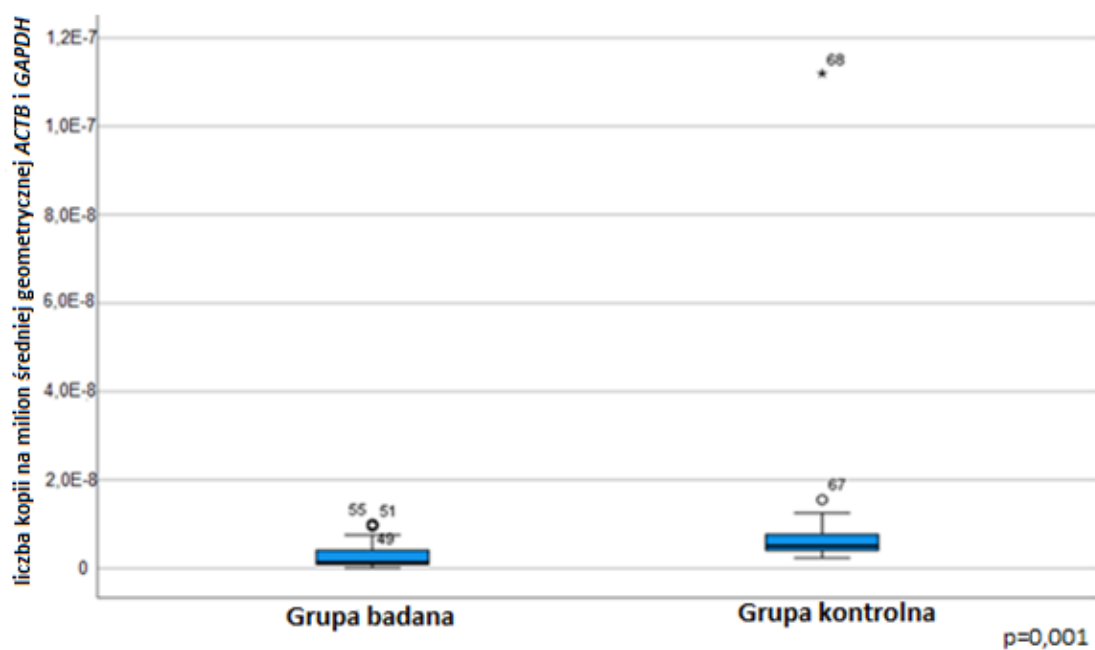
Wykazano istotnie niższą ekspresję genu *IL1 beta* w PBMC w grupie chorych na morphea niż w grupie kontrolnej ($p=0,016$) (Rycina 14). Średnia ekspresja genu *IL1 beta* w PBMC w liczbie kopii na milion średniej geometrycznej *ACTB* i *GAPDH* w grupie badanej wynosiła $1,02E-8$, natomiast w grupie kontrolnej $1,06E-8$.

Wykazano istotnie niższą ekspresję genu *IL18* w PBMC w grupie chorych na morphea niż w grupie kontrolnej ($p=0,001$) (Rycina 15). Średnia ekspresja genu *IL18* w PBMC w liczbie kopii na milion średniej geometrycznej *ACTB* i *GAPDH* w grupie badanej wynosiła $3,07E-9$, natomiast w grupie kontrolnej $1,01E-8$.

Wartości ekspresji genu *IL1 beta* i *IL18* w PBMC w liczbie kopii na milion średniej geometrycznej *ACTB* i *GAPDH* w grupie badanej, z uwzględnieniem poszczególnych postaci morphea oraz w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli 8.



Rycina 14. Porównanie ekspresji genu *IL1 beta* w PBMC pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.



Rycina 15. Porównanie ekspresji genu *IL18* w PBMC pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

Tabela 8. Statystyka opisowa dotycząca chorych na morphea, u których przeprowadzono analizę ekspresji genu *IL1 beta* i *IL18* w PBMC w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

		Morphea	MEP	GM	LM	DM	Kontrola
Liczba chorych	n	21	15	3	3	-	26
	%	100,0	71,4	14,3	14,3	-	100,0
Proporcja i odsetek kobiet/mężczyzn	n	19/2	14/1	3/0	2/1	-	22/4
	%	90,5/9,5	93,3/6,7	100,0/0,0	66,7/33,3	-	84,6/15,4
Wiek chorych (lata)	Średnia±SD	51,0±17,8	51,1±17,8	60,7±14,3	41,0±21,0	-	46,7±13,2
	Mediana	54,0	54,0	64,0	41,0	-	47,0
	Min.	20	21	45	20	-	29
	Max.	73	72	73	62	-	71
LoSCAT	Mediana	16,0	10,0	39,0	20,0	-	-
	Min.-Max.	2,0-60,0	2,0-60,0	33,0-44,0	11,0-21,0	-	-
PGA-A	Średnia	44,0	35,7	80,0	50,0	-	-
	Min.-Max.	0,0-90,0	0,0-75,0	60,0-90,0	0,0-75,0	-	-
PGA-D	Średnia	53,6	45,0	73,3	76,7	-	-
	Min.-Max.	0,0-80,0	0,0-60,0	70,0-75,0	70,0-80,0	-	-
Ekspresja genu <i>IL1 beta</i> w PBMC (liczba kopii na milion średniej geometrycznej <i>ACTB</i> i <i>GAPDH</i>)	Średnia±SD	1,02E-8 ±2,48E-8	5,25E-9 ± 9,78E-9	3,22E-8 ± 5,35E-8	4,09E-9 ± 3,64E-9	-	1,06E-8 ± 1,42E-8
	Mediana	2,48E-9	6,74E-10	6,96E-9	5,23E-9	-	6,18E-9
	Min.-Max.	5,87E-14-1,12E-7	5,87E-13-3,57E-8	2,48E-9-1,23E-7	2,16E-11-7,03E-9	-	1,80E-9-7,22E-8
	n	21	15	3	3	-	26
Ekspresja genu <i>IL18</i> w PBMC (liczba kopii na milion średniej geometrycznej <i>ACTB</i> i <i>GAPDH</i>)	Średnia±SD	3,07E-9 ±3,42E-9	2,74E-9 ±3,04E-9	5,63E-9 ± 4,98E-9	1,19E-9 ± 2,75E-10	-	1,01E-8 ± 2,10E-8
	Mediana	1,33E-9	1,37E-9	5,61E-9	1,33E-9	-	5,06E-9
	Min.-Max.	1,09E-10-1,00E-8	1,09E-10-9,47E-9	1,31E-9-1,00E-8	8,75E-10-1,37E-9	-	2,34E-9-1,12E-7
	n	21	15	3	3	-	26

n - liczebność grupy, SD - odchylenie standardowe, Min. - wartość minimalna, Max. - wartość maksymalna, MEP - postać ograniczona morphea, GM - postać uogólniona morphea, LM - postać linijna morphea, DM - postać głęboka morphea.

4.4. Osoczowe stężenie IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea i w grupie kontrolnej

Nie obserwowano istotnych różnic w osoczowym stężeniu IL-1 β pomiędzy grupą chorych na morphea a grupą kontrolną ($p>0,05$).

Nie obserwowano istotnych różnic w osoczowym stężeniu IL-18 pomiędzy grupą chorych na morphea a grupą kontrolną ($p>0,05$).

Nie obserwowano istotnych różnic w osoczowym stężeniu IL-33 pomiędzy grupą chorych na morphea a grupą kontrolną ($p>0,05$).

Wartości osoczowego stężenia (pg/ml) badanych cytokin w grupie chorych na morphea, z uwzględnieniem poszczególnych postaci morphea oraz w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Osoczowe stężenia IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

		Morphea	MEP	GM	LM	DM	Kontrola
Osoczowe stężenie IL-1β (pg/ml)	Średnia$\pm$SD	20,36 $\pm$ 21,27	22,81 $\pm$ 23,33	14,38 $\pm$ 7,54	8,80 $\pm$ 3,61	8,08 $\pm$ 3,40	20,96 $\pm$ 21,78
	Mediana	15,14	15,79	12,69	8,74	8,08	12,37
	Min.-Max.	0,01- 105,00	0,01- 105,00	5,07- 26,70	4,45- 13,27	5,68- 10,48	0,00- 105,00
	n	59	46	7	4	2	29
Osoczowe stężenie IL-18 (pg/ml)	Średnia$\pm$SD	266,45 $\pm$ 462,01	301,10 $\pm$ 518,59	158,78 $\pm$ 52,39	122,85 $\pm$ 30,77	133,58 $\pm$ 66,35	297,12 $\pm$ 479,69
	Mediana	155,46	163,92	142,35	119,70	133,58	167,36
	Min.-Max.	86,66- 2625,00	91,84- 2625,00	95,81- 231,52	96,11- 155,90	86,66- 180,50	106,34- 2625,00
	n	59	46	7	4	2	29
Osoczowe stężenie IL-33 (pg/ml)	Średnia$\pm$SD	72,22 $\pm$ 93,19	77,16 $\pm$ 95,28	48,90 $\pm$ 58,52	78,19 $\pm$ 146,14	28,40 $\pm$ 40,17	91,09 $\pm$ 125,06
	Mediana	66,46	69,68	37,25	7,81	28,40	101,21
	Min.-Max.	0,00- 477,84	0,00- 477,84	0,00- 169,80	0,00- 297,12	0,00- 56,81	0,00- 554,37
	n	59	46	7	4	2	29

n - liczebność grupy, SD - odchylenie standardowe, Min - wartość minimalna, Max. - wartość maksymalna, MEP - postać ograniczona morphea, GM - postać uogólniona morphea, LM - postać linijna morphea, DM - postać głęboka morphea.

4.5. Wyniki oceny korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a ekspresją genu *IL1 beta* i *IL18* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz osocзовymi stężeniami IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea

Ekspresja genu *IL1 beta* i *IL18* w PBMC w grupie chorych na morphea nie wykazywała korelacji z czasem trwania choroby ($p>0,05$).

Osocзовe stężenia IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea nie wykazywały korelacji z czasem trwania choroby ($p>0,05$).

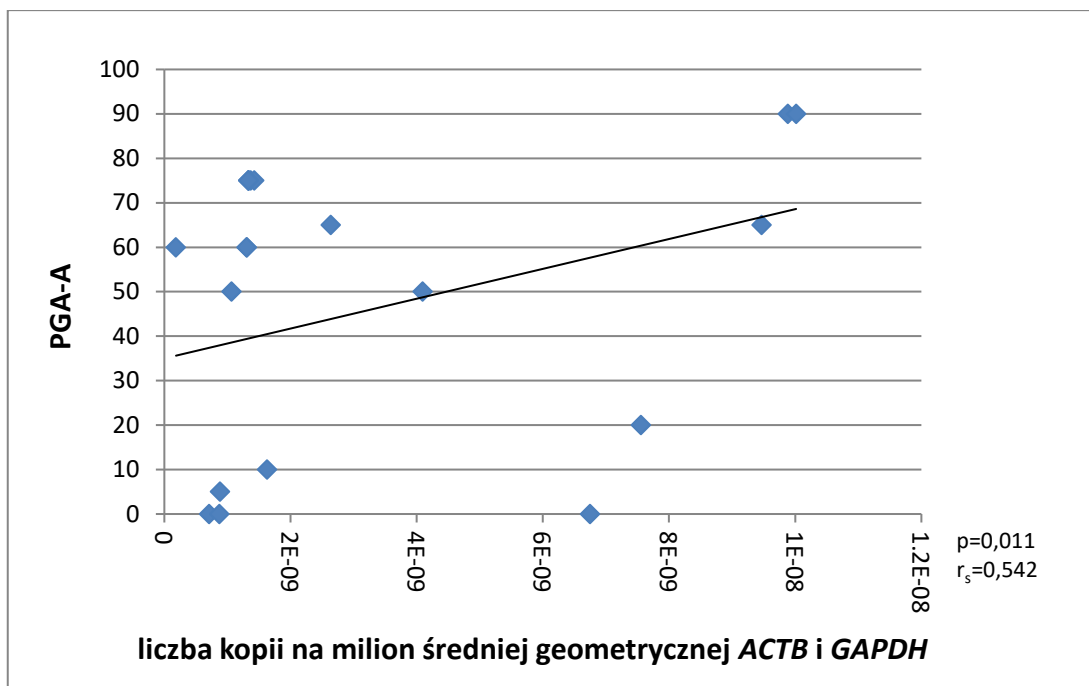
4.6. Wyniki analizy ekspresji genów *IL1 beta* i *IL18* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz osocзовych stężeń IL-1 β , IL-18 i IL-33 z uwzględnieniem parametrów badania przedmiotowego

Nie obserwowano istotnych różnic w osocзовym stężeniu IL-1 β oraz w ekspresji jej genu w PMBC pomiędzy grupą chorych na morphea z aktywną oraz nieaktywną postacią choroby oraz w grupie chorych na morphea z współistnieniem LS oraz bez współistnienia LS (w obu przypadkach $p>0,05$). Nie wykazano związku pomiędzy postacią morphea a osocзовym stężeniem IL-1 β oraz ekspresją jej genu w PBMC (w obu przypadkach $p>0,05$). Osocзовe stężenie badanej interleukiny oraz ekspresja jej genu w PBMC nie wykazywała korelacji ze wskaźnikami LoSCAT, PGA-A, PGA-D (we wszystkich przypadkach $p>0,05$).

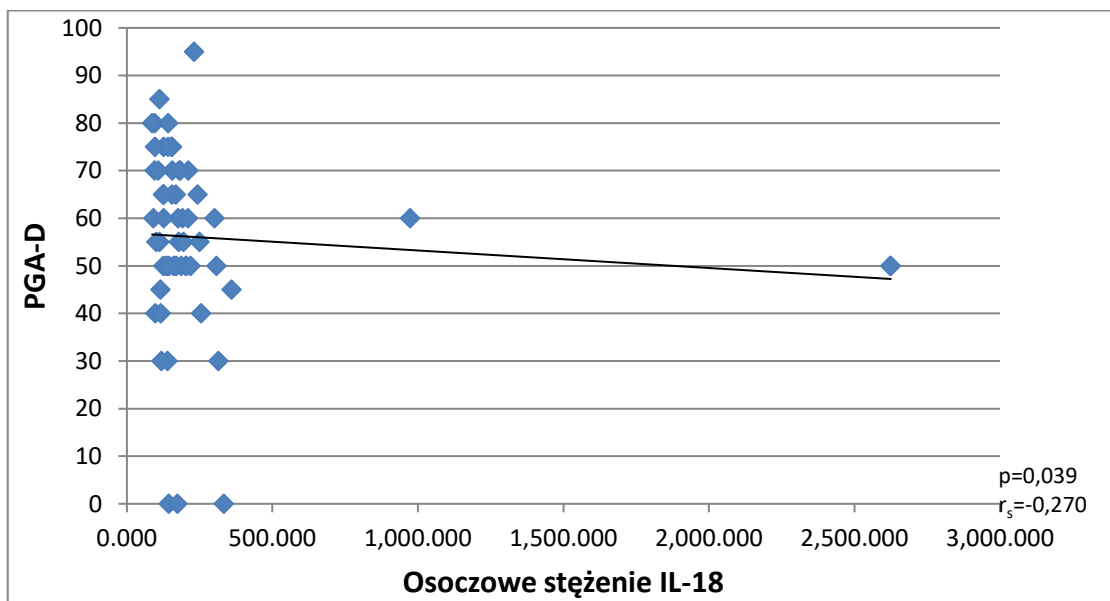
Nie obserwowano istotnych różnic w osocзовym stężeniu IL-18 oraz w ekspresji jej genu w PMBC pomiędzy grupą chorych na morphea z aktywną oraz nieaktywną postacią choroby oraz w grupie chorych na morphea z współistnieniem LS oraz bez współistnienia LS (w obu przypadkach $p>0,05$). Nie wykazano związku pomiędzy postacią morphea a osocзовym stężeniem IL-18 oraz ekspresją jej genu w PBMC (w obu przypadkach $p>0,05$). Osocзовe stężenie badanej interleukiny oraz ekspresja jej genu nie wykazywała korelacji ze wskaźnikiem LoSCAT ($p>0,05$). Ekspresja genu *IL18* w PBMC w grupie chorych na morphea dodatkowo korelowała z wyższymi wskaźnikami PGA-A ($p=0,011$, $r_s=0,542$) (Rycina 16). Stwierdzono

ujemną korelację pomiędzy osoczym stężeniem IL-18 w grupie chorych na morphea a PGA-D ($p=0,039$, $r_s=-0,270$) (Rycina 17).

Nie obserwowano istotnych różnic w osoczym stężeniu IL-33 pomiędzy grupą chorych na morphea z aktywną oraz nieaktywną postacią choroby oraz w grupie chorych na morphea z współistnieniem LS oraz bez współistnienia LS (w obu przypadkach $p>0,05$). Nie wykazano związku pomiędzy postacią morphea a osoczym stężeniem IL-33 (w obu przypadkach $p>0,05$). Osocze stężenie badanej interleukiny nie wykazywało korelacji ze wskaźnikami LoSCAT, PGA-A, PGA-D (we wszystkich przypadkach $p>0,05$).



Rycina 16. Ocena korelacji pomiędzy ekspresją genu *IL18* w PBMC a PGA-A.



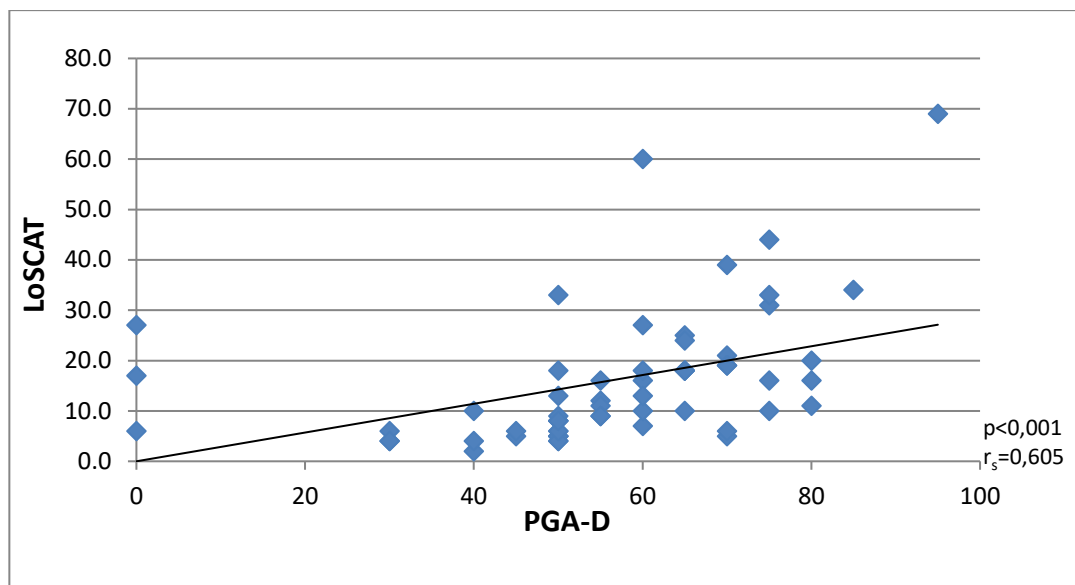
Rycina 17. Ocena korelacji pomiędzy osoczkowym stężeniem IL-18 a PGA-D.

4.7. Wyniki oceny korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a wskaźnikiem LoSCAT, PGA-A i PGA-D

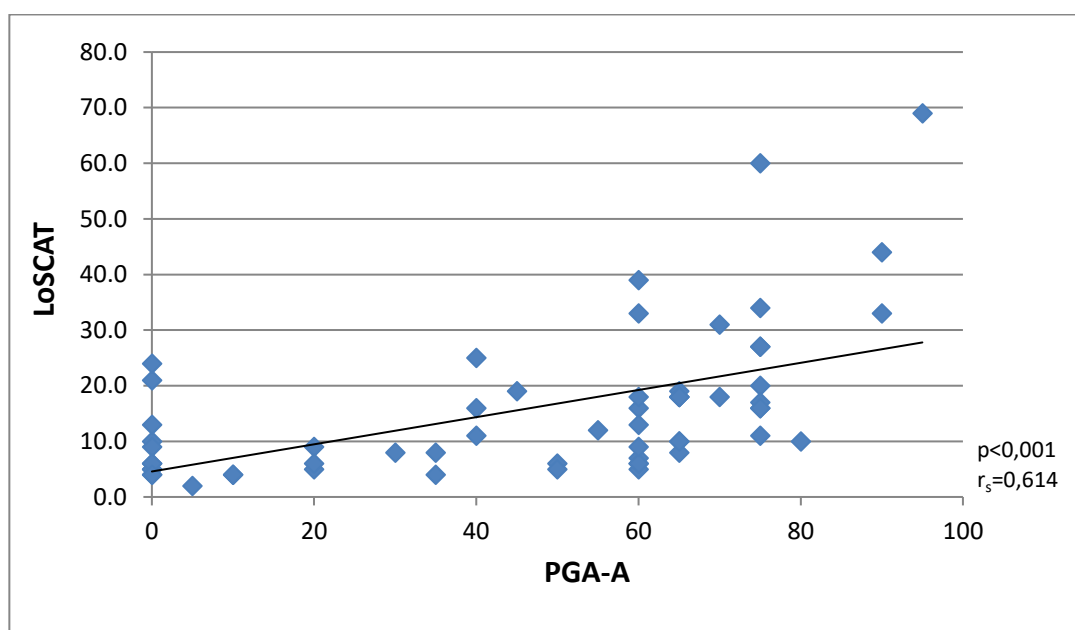
Nie wykazano korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a wskaźnikami LoSCAT, PGA-A i PGA-D (we wszystkich przypadkach $p > 0,05$).

4.8. Wyniki oceny korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a wskaźnikami PGA-A i PGA-D

Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a wskaźnikami PGA-A i PGA-D (odpowiednio: $p < 0,001$, $r_s = 0,614$; $p < 0,001$, $r_s = 0,605$) (Rycina 18 i 19).



Rycina 18. Ocena korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a PGA-D.



Rycina 19. Ocena korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a PGA-A.

5. DYSKUSJA

Twardzina ograniczona to przewlekła, autoimmunologiczna choroba tkanki łącznej, w której proces włóknienia obejmuje skórę właściwą i/lub tkankę podskórną (Chiriac A 2016). Etiopatogeneza choroby nadal nie została w pełni wyjaśniona. Uważa się, że pierwotne znaczenie ma uszkodzenie komórek śródbłónka, które prowadzi do zaburzeń immunologicznych i aktywacji fibroblastów, a w konsekwencji do włóknienia tkanek (Knobler R 2017). Ostatnie doniesienia naukowe mówią o udziale cytokin z rodziny IL-1 w patomechanizmie wielu chorób z kręgu chorób autoimmunologicznych, w tym również w procesie włóknienia w SSc (Xu D 2019). W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania roli IL-1 β w rozwoju morphea, w literaturze medycznej znajdują się doniesienia o jej udziale w patogenezie choroby (Dańczak-Pazdrowska A 2012, Torok KS 2015). Badania wskazują, że znaczenie mogą mieć też inne interleukiny z rodziny IL-1 o działaniu profibrotycznym, takie jak IL-18 i IL-33, których znaczenie analizowano jedynie w kontekście SSc i jak dotąd nie badano ich w odniesieniu do morphea (Zhang YJ 2018, Terras S 2013, Yanaba K 2011).

Zatem w niniejszej pracy wykorzystano 2 metody umożliwiające zbadanie udziału IL-1 β , IL-18 oraz IL-33 w patomechanizmie morphea. Wykorzystano zarówno metodę immunoenzymatyczną ELISA jak i real-time PCR.

5.1. Omówienie wyników badania podmiotowego

Morphea jest chorobą przewlekłą, choć wykazuje zazwyczaj tendencję do samoograniczania się i spontanicznej regresji. Szacuje się, że czas ten wynosi 3-5 lat (Christianson HB 1956). Ustąpienie ognisk stwardnienia obserwuje się średnio po 2,7 latach, natomiast w przypadku, gdy choroba obejmuje głębiej leżące struktury po 5 latach (Mertens JS 2017). Uważa się, że w postaci ograniczonej morphea, nawet u 50% pacjentów regresja choroby pojawia się po 2,5 roku (Christianson HB 1956). W przypadku postaci uogólnionej, liniowej i głębokiej czas trwania choroby jest dłuższy, szacuje się, że średnio jest to 5,5 roku (Kreuter A 2016).

Ujawnienie się morphea może mieć związek z szeroko pojętym urazem (Trattner A 1991, Toyama S 2019). W niniejszym badaniu u 3,4% chorych (2 chorych)

stwierdzono, że pierwsze zmiany skórne zlokalizowane były w miejscu wcześniejszego urazu. Christianson i wsp. zaobserwowali, że w grupie 191 pacjentów z postacią plackowatą i liniową morphea odsetek ten był nieco wyższy, bowiem 7,3% z nich zgłosiło, że wystąpienie ognisk morphea było poprzedzone urazem. Autorzy artykułu uznali, że związek ten był kontrowersyjny, ponieważ uraz był niewielki i wystąpił na kilka tygodni/miesięcy przed pojawieniem się morphea (Christianson HB 1956). Toyama i wsp. przedstawili przypadek 55-letniej pacjentki, u której w miejscach przewlekłe narażonych na miejscową kompresję - na kończynach dolnych oraz na brzuchu pojawiły się ogniska stwardnienia. Autorzy wiążą to zjawisko z objawem Koebnera (Toyoma S 2019). Grabell i wsp. w prospektywnych badaniach analizowali związek urazu z morphea w grupie 329 pacjentów dorosłych i dzieci. Wykazali, że 16% chorych obserwowało, iż uraz/otarcie skóry prowadziło do pojawienia się ognisk morphea oraz dystrybucja tych zmian była zgodna z miejscem urazu. Zjawisko to najczęściej występowało u chorych dorosłych z uogólnioną postacią morphea, w populacji pediatrycznej uraz, według cytowanych autorów może mieć mniejsze znaczenie (Grabell D 2014). Mechanizmy leżące u podstaw procesu włóknienia pod wpływem urazu nadal są niejasne. Postuluje się udział IL-33 jako cytokiny alarmowej w patogenezie włóknienia (Liew FY 2010). Sugeruje się również, że przewlekłe lub długotrwałe uszkodzenie tkanki prowadzi do zwiększenia endogennych receptorów Toll-podobnych, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji fibroblastów (Liew FY 2010).

Współwystępowanie innych chorób autoimmunologicznych u chorych na morphea było opisywane od wielu lat (Kreuter A 2016). Również w badanej grupie u części chorych stwierdzono inną chorobę autoimmunizacyjną (28,8%), najczęściej była to choroba Hashimoto (22%), którą obserwowano najczęściej w podgrupie chorych na MEP. W grupie 245 pacjentów chorujących na morphea Leitenberger i wsp. wykazali, że u 17,6% jednocześnie współwystępowały choroby autoimmunologiczne, czterokrotnie częściej niż w populacji ogólnej. 45,9% stanowili pacjenci z uogólnioną postacią morphea, co stanowiło dwanaście razy większe ryzyko zaburzeń autoimmunologicznych niż w populacji ogólnej. W badaniu tym obserwowano również, że najczęściej współwystępowały takie choroby jak: łuszczyca plackowata, toczeń rumieniowaty układowy, stwardnienie rozsiane i bielactwo nabyte (Leitenberger JJ 2009). Natomiast Kreuter i wsp. w grupie 472 pacjentów dorosłych i dzieci chorujących

na morphea wykazali, że u 8,1% z nich współistniały zaburzenia autoimmunologiczne, z czego u 42,1% chorych była to choroba Hashimoto (Kreuter A 2012). Zulian i wsp. wśród 129 pacjentów pediatrycznych chorujących na morphea wykazali, że zapalenie tarczycy występowało u 6,2% z nich, natomiast bielactwo u 2,3% chorych (Zulian F 2006). W kontekście bielactwa Gill i wsp. wykazali, że w grupie 1098 chorych na bielactwo, tylko u 0,2% współwystępowała morphea (Gill L 2016). Dodatkowo w literaturze medycznej dostępne są tylko pojedyncze opisy przypadków dotyczące współistnienia obu chorób (Finkelstein E 1995, Dervis E 2004).

5.2. Omówienie wyników badania przedmiotowego

Zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi najczęstszą postacią morphea u osób dorosłych jest MEP. Postać uogólniona występuje u 7-9% pacjentów, w populacji pediatrycznej morphea linijna kończyn stanowi 51-65% wszystkich postaci. DM to rzadka postać morphea występująca u kilku procent populacji (Peterson LS 1995, Marzano AV 2003, Zulian F 2006, Kreuter A 2016). Powyższe dane są zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszych badaniach, gdzie chorzy z MEP stanowili 78% badanej populacji, a z GM 11,8%.

Już w 1980 roku Uitto i wsp. po raz pierwszy opisali współwystępowanie morphea z liszajem twardzinowym u 10 chorych, z czego u 7 z nich zmiany skórne nakładały się w obrębie tej samej lokalizacji (Uitto J 1980). Na podstawie danych literaturowych szacuje się, że częstość ta wynosi 38% (Lutz V 2012), dotyczy głównie nakładania się morphea z postacią genitalną liszaja twardzinowego. Najczęściej obserwuje się to zjawisko w postaci MEP, rzadziej w pozostałych podtypach. Na podstawie badanej populacji chorych na morphea u 14 (23,7%) stwierdzono obecność ognisk liszaja twardzinowego, w tym u 85,7% z postacią MEP i 14,3% z postacią LM. Natomiast u 3 z 14 chorych (21,4%) z postacią MEP obserwowano postać genitalną liszaja twardzinowego, były to kobiety. W badaniu Kreuter i wsp. na grupie 472 chorych na morphea stwierdzono obecność liszaja twardzinowego u 27 (5,7%) z nich, z czego u 19 była to postać pozagenitalna, natomiast u 8 genitalna. Dodatkowo 23 osoby były płci żeńskiej, natomiast 4 osoby stanowili mężczyźni. Postać genitalna liszaja twardzinowego występowała tylko u kobiet (Kreuter A 2012). Obserwacje te pokrywają się z danymi z niniejszego badania, gdzie liczba kobiet i mężczyzn ze

współistnieniem liszaja twardzinowego wynosiła odpowiednio 12 i 2, a postać genitalna była stwierdzona tylko u kobiet.

5.3. Omówienie wyników ekspresji genu *IL1 beta* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i jej osoczkowego stężenia z uwzględnieniem badania podmiotowego i przedmiotowego

Z uwagi na prawdopodobną rolę cytokin z rodziny IL-1 w procesie włóknienia, w poniższych badaniach podjęto się próby oceny ekspresji genu *IL1 beta* w PBMC w liczbie kopii na milion średniej geometrycznej *ACTB* i *GAPDH* oraz jej osoczkowego stężenia w grupie badanej, z uwzględnieniem poszczególnych postaci morphea oraz w grupie kontrolnej.

Wykazano istotnie niższą ekspresję genu *IL1 beta* w PBMC w grupie badanej niż w grupie kontrolnej ($p=0,016$). Nie obserwowano natomiast istotnych różnic w osoczkowym stężeniu IL-1 β w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej ($p>0,05$). Uzyskane wyniki są zgodne z pojedynczymi danymi literaturowymi, choć dostępne analizy wskazują na silny udział IL-1 β w patogenezie chorób przebiegających ze zwłóknieniem, szczególnie SSc (Gasse P 2007, Hussein MR 2005, Martinez-Godinez MA 2015). Między innymi Torok i wsp. wykazali zmniejszenie osoczkowego stężenia IL-1 w grupie dzieci chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej. Swoje badania przeprowadzili na 69 pacjentach (Torok KS 2015). W pracy Patricka i wsp. nie obserwowano istotnych różnic w wartościach osoczkowego stężenia IL-1 β pomiędzy grupą chorych na SSc ($n=24$) a grupą kontrolną (Patrick MR 1995). Również Gourh i wsp. analizując dużą grupę pacjentów z rozpoznaniem SSc ($n=444$) nie wykazali istotnych różnic w osoczkowym stężeniu IL-1 β w porównaniu z grupą osób zdrowych (Gourh P 2009). Natomiast badanie Dańczak-Pazdrowskiej i wsp. wskazuje na znaczenie analizowej cytokiny w patomechanizmie morphea, gdyż wykazano jej istotnie wyższe osoczkowe stężenie IL-1 β w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych (Dańczak-Pazdrowska A 2012). Różnice w powyższych wynikach mogą mieć związek ze zróżnicowaniem grupy badanej, u Dańczak-Pazdrowskiej i wsp. populacja chorych z cięższą postacią morphea (GM i LM) stanowiła połowę badanej grupy, natomiast w poniższym badaniu liczba chorych z MEP do liczby osób z cięższą postacią stanowiła odpowiednio 46/13.

Alecu i wsp. również obserwowali znacząco wyższe osoczowe stężenie IL-1 u pacjentów z morphea (Alecu M 1998).

W kontekście oceny ekspresji genu *IL1 beta* u chorych na morphea istnieją tylko pojedyncze doniesienia (Dańczak-Pazdrowska A 2012). Dańczak-Pazdrowska i wsp. wykazali istotnie wyższą ekspresję *IL1 beta* w PBMC w całej grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych ($p < 0,001$) (Dańczak-Pazdrowska A 2012).

Analizując omawianą cytokinę w odniesieniu do danych uzyskanych na podstawie badania podmiotowego nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją genu *IL1 beta* w PBMC i jej osoczowym stężeniem w grupie chorych na morphea a czasem trwania choroby. Torok i wsp. w populacji pediatrycznej chorych na morphea wykazali, że w podgrupie LM, gdzie średni czas trwania choroby w porównaniu z pozostałymi postaciami morphea był najdłuższy, obserwowano niższe średnie wartości osoczowego stężenia IL-1 β (8,80 pg/ml $\pm$ 3,61) (Torok KS 2015). Natomiast Dańczak-Pazdrowska i wsp., wykazali ujemną korelację pomiędzy ekspresją genu *IL1 beta* w skórze a czasem trwania choroby ($p = 0,02$) (Dańczak-Pazdrowska A 2012). W niniejszej pracy nie obserwowano także istotnych różnic w osoczowym stężeniu IL-1 β oraz ekspresji jej genu w PMBC w grupie chorych na morphea z aktywną oraz nieaktywną postacią choroby oraz w zależności od podtypu choroby. Nie wykazano także korelacji pomiędzy takimi wskaźnikami jak LoSCAT, PGA-A, PGA-D a ekspresją *IL1 beta* w PMBC oraz jej osoczowym stężeniem. Inni badacze również nie obserwowali związku pomiędzy aktywną a nieaktywną postacią choroby, lecz wskazywali na znaczącą korelację pomiędzy mLoSSI a osoczowym stężeniem IL-1 β (Torok KS 2015). We wspomnianym już badaniu Dańczak-Pazdrowskiej i wsp. nie wykazano istotnych różnic w zakresie ekspresji i stężeń badanej cytokiny pomiędzy poszczególnymi grupami morphea, a także LoSSI i aktywnością choroby, co jak już wyżej wspomniano, mogłoby świadczyć o tym, że cytokina ta jest zaangażowana w morphea głównie na jej wczesnych etapach (Dańczak-Pazdrowska A 2012). W prezentowanych badaniach średni PGA-A wynosił 46,3 punktów; natomiast średni PGA-D był wyższy i wynosił 55,9 punktów, co wskazuje na to, że w grupie badanej częściej obserwowano chorych z późną fazą choroby. Jak już wspomniano morphea jest chorobą o samoograniczającym się charakterze, ale przewlekłym przebiegu, przy czym coraz częściej podkreśla się jej nawrotowość (Piram M 2013, Zulian F 2017).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na złożoną i nie do końca wyjaśnioną etiopatogenezę morphea. Wiadomo, że morphea w porównaniu do SSc na poziomie skóry ma większą komponentę prozapalną niż profibrotyczną (Torres JE 1998, Succaria F 2013) i jest chorobą narządowo swoistą, ograniczoną jedynie do tego narządu. Uważa się, że IL-1 β promuje odpowiedź komórkową zależną od Th1 i Th17, które występują przede wszystkim we wczesnym, zapalnym etapie morphea, natomiast w późniejszym okresie choroby znaczną rolę odgrywa Th2. Być może wskazana byłaby ocena ekspresji genu *IL1 beta* w obrębie skóry chorobowo zmienionej u chorych na morphea i porównanie wyników ze skórą zdrową. Podsumowując, nie można jednak jednoznacznie wykluczyć udziału IL-1 β w patomechanizmie morphea, przemawia za tym fakt, że różnice średnich wartości ekspresji genu *IL1 beta* pomiędzy grupą badaną a kontrolną były niewielkie. Zatem potrzebne są dalsze analizy na większej grupie chorych na morphea.

5.4. Omówienie wyników ekspresji genu *IL18* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej i jej osoczowego stężenia z uwzględnieniem badania podmiotowego i przedmiotowego

W niniejszej pracy obserwowano istotnie niższą ekspresję genu *IL18* w PBMC w grupie chorych na morphea niż w grupie kontrolnej ($p=0,001$). Nie wykazano natomiast istotnych różnic w osoczym stężeniu IL-18 w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej ($p>0,05$). W kontekście SSc, a także innych aCTD wydaje się, że IL-18 może mieć znaczenie w patomechanizmie włóknienia, choć jej rola jest nadal kontrowersyjna, ponieważ dostępne są doniesienia mówiące o jej charakterze profibrotycznym, jak i antyfibrotycznym (Kampfer H 2000, Artlett CM 2017, Nakatani-Okuda A 2005). IL-18 w warunkach *in vitro* indukuje produkcję kolagenu typu III, pobudza również proliferację fibroblastów, a także integryny $\alpha 2\beta 1$, która jest jednym z głównych receptorów wiążących kolagen (Artlett CM 2017). Ponadto cytokina ta *in vitro* zwiększa ekspresję fibronektyny oraz uczestniczy w procesie włóknienia wątroby (Artlett CM 2012). Aktywowany inflamasom NLRP3 *in vitro* pośredniczy w uwalnianiu IL-1 β i IL-18, powodując indukcję sygnalizacji autokrynnej w fibroblastach, ich różnicowanie w miofibroblasty oraz odkładanie się kolagenu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Artlett CM 2012). Kampfer i wsp. na modelu zwierzęcym wykazali, że IL-18 pełni ważną rolę podczas gojenia się ran, podczas zranienia obserwowano szybki wzrost jej stężenia, natomiast po zagojeniu rany nastąpił gwałtowny spadek ekspresji mRNA tej cytokiny w skórze (Kampfer H 2000). Bezpośrednie podanie rekombinowanej IL-18 w mięsień sercowy myszy prowadzi do jego przebudowy i zwłóknienia śródmiąższowego (Platis A 2008). Z kolei Tanino i wsp. na modelu zwierzęcym wykazali, że niedobór IL-18 chroni przed zwłóknieniem nerek (Tanino A 2016). Mosaad i wsp. obserwowali istotnie wyższe osoczowe stężenie IL-18 w grupie pacjentów z różnymi chorobami autoimmunologicznymi (32 pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym, 36 z reumatoidalnym zapaleniem stawów, 2 pacjentów z chorobą Behceta, 2 - z zapaleniem skórno-mięśniowym, 2 - z zespołem Sjogrena, 1 - twardzina układowa, 2 - z mieszaną chorobą tkanki łącznej). Dodatkowo uzyskano dodatnią korelację pomiędzy osoczym stężeniem IL-18 a poziomem ANA i stanem klinicznym pacjentów (Mosaad YM 2003). Martinez-Godinez i wsp. w grupie 42 pacjentów z SSc (21 z postacią lSSc i 21 z dSSc), u których pobrano biopsję ze zmian skórnych celem oceny ekspresji IL-18 wykazali istotnie wyższy poziom ($p<0,05$)

w porównaniu z grupą zdrową. Obserwowano również dodatnią korelację pomiędzy ekspresją genu *IL18* a mRSS (Martinez-Godinez MA 2015).

Z drugiej jednak strony, Kim i wsp. wykazali, że ekspozycja ludzkich fibroblastów skóry na działanie IL-18 spowodowała zmniejszenie produkcji kolagenu, hamowała również ekspresję genu kolagenu przez TGF β poprzez Ets-1 i szlak ERK. Ponadto wykazano, że IL-18 obniżała produkcję kolagenu w fibroblastach pacjentów z SSc, co wskazuje, że może wykazywać działanie antyfibrotyczne (Kim HJ 2010). Również Nakatani-Okuda i wsp. wykazali, że u myszy IL-18 może chronić przed zwłóknieniem płuc spowodowanym przez bleomycynę (Nakatani-Okuda A 2005). Natomiast Zhang i wsp. odkryli, że IL-18 odwraca proces włóknienia wątroby wywołany przez *Schistosoma*, poprzez indukcję odpowiedzi Th1-zależnej (Zhang LH 2001). Ciekawe w tym kontekście są wnioski, które wysunęli Pan i wsp. którzy stwierdzili, że IL-18 może wykazywać zarówno działanie pro- jak i antyfibrotyczne, w zależności od indukcji odpowiedzi Th1 lub Th2 (Pan HF 2011). Wyniki naszych badań stanowiłyby raczej potwierdzenie dla antyfibrotycznego działania IL-18 w morphea, chociaż teza ta wymaga przeprowadzenia analiz w obrebie chorobowo zmienionej skóry u chorych na morphea i na większej grupie badanej.

W niniejszym badaniu nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją genu *IL18* w PBMC oraz jej osoczymym stężeniem w grupie chorych na morphea a czasem trwania choroby. Obserwowano natomiast, że ekspresja genu *IL18* w PBMC w grupie chorych na morphea dodatnio korelowała z wyższymi wskaźnikami PGA-A ($p=0,011$, $r_s=0,542$). Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy osoczymym stężeniem IL-18 w grupie chorych na morphea a PGA-D ($p=0,039$, $r_s=-0,270$). Dane te mogą świadczyć o większym zaangażowaniu badanej cytokiny w proces zapalny u chorych na morphea, choć nie obserwowano istotnych różnic w osoczymym stężeniu badanej interleukiny oraz ekspresją jej genu w PMBC w grupie chorych na morphea z aktywną oraz nieaktywną postacią choroby. Nie wykazano związku pomiędzy postacią morphea a osoczymym stężeniem IL-18 oraz ekspresją jej genu w PBMC. Osoczone stężenie badanej interleukiny oraz ekspresja jej genu w PBMC nie wykazywała także związku z LoSCAT.

W danych literaturowych nie znajdujemy doniesień analizujących znaczenie IL-18 w morphea. Spośród chorób przebiegających z włóknieniem najszerzej pod tym

kątem diskutowana jest natomiast SSc. Lin i wsp., którzy analizowali osoczowe stężenie IL-18 w grupie 103 pacjentów z SSc i zaobserwowali, że było ono istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Natomiast nie zaobserwowano istotnej korelacji pomiędzy osoczym stężeniem IL-18 a czasem trwania choroby, mRSS, pomiędzy postaciami SSc czy obecnością choroby śródmiąższowej płuc (Lin E 2019). Podobne wyniki uzyskali Zhang i wsp. w grupie 56 pacjentów z SSc, gdzie osoczowe stężenie IL-18 było istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej, ale nie wykazano korelacji z parametrami klinicznymi (Zhang YJ 2018). Nakamura i wsp. wykazali, że surowicze stężenie IL-18BP w grupie 57 pacjentów z SSc było wyższe niż w grupie kontrolnej, natomiast wyniki te nie różniły się istotnie u pacjentów z lSSc i dSSc. Nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem IL-18BP, a stopniem zwłóknienia płuc i skóry, natomiast zaobserwowano istotną dodatnią korelację z ciśnieniem skurczowym w prawej komorze serca. Dodatkowo u 24 pacjentów z SSc wykazano dodatnią korelację pomiędzy poziomem IL-18BP, a średnim ciśnieniem w tętnicy płucnej (Nakamura K 2016).

W kontekście IL-18 są to pierwsze badania przeprowadzone w grupie chorych na morphea, które mogą przyczynić się do dalszej dyskusji oraz poszerzenia obserwacji. Z uwagi na doniesienia literaturowe dotyczące SSc, również w kontekście patogenezy morphea można wziąć pod uwagę, że IL-18 nie jest związana bezpośrednio z procesem zwłóknienia, a bardziej z zaburzeniami naczyniowymi i promowaniem procesu zapalnego (Martinez-Godinez MA 2015). Wydaje się jednak, że analiza ekspresji omawianej interleukiny na poziomie skóry objętej procesem chorobowym byłaby w tym zakresie istotnym elementem uzupełniającym.

5.5. Omówienie wyników osoczowego stężenia IL-33 z uwzględnieniem badania podmiotowego i przedmiotowego

Dostępne w literaturze medycznej dane wskazują na to, że IL-33 działa jako cytokina profibrotyczna (Li L 2018, Gao Q 2015, Belato A 2016) i wzmacnia proces włóknienia zależny od TGF- β , a także aktywację szlaków sygnalizacyjnych TLR/NF- κ B promujących włóknienie. W niniejszym badaniu, po raz pierwszy podjęto próbę poznania roli, jaką cytokina ta może odgrywać w morphea. Nie obserwowano istotnych różnic w osoczowym stężeniu IL-33 w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej ($p>0,05$). Rankin i wsp. wykazali z kolei, że podskórne podanie myszom IL-33 spowodowało zwłóknienie skóry podobne do tego, które obserwuje się u pacjentów z SSc oraz obecność mastocytów i neutrofili w skórze (Rankin AL 2010). Wykazano, że u pacjentów z SSc stężenia IL-33 i sST2 w surowicy były podwyższone oraz korelowały z postacią choroby (wyższe wartości obserwowano w dSSc niż w lSSc), nasileniem śródmiąższowego zwłóknienia płuc i zmianami naczyniowymi (Terras S 2013, Yanaba K 2011). Sugeruje się, że ekspresja IL-33 w uszkodzonych tkankach zmienia się w zależności od nasilenia choroby, we wczesnej postaci SSc jest obniżona i wzrasta wraz z postępem zwłóknienia. Lee i wsp. obserwowali, że ekspresja mRNA IL-33 w fibroblastach tkanki płucnej była wyższa zarówno u chorych na SSc z śródmiąższowym zwłóknieniem płuc, jak i w idiopatycznym zwłóknieniu płuc (Lee JU 2017). Artlett sugeruje jednak, że rola IL-33 w procesie włóknienia może zależeć od badanego transkryptu, gdyż IL-33 o pełnej długości transkryptu promuje odpowiedź zapalną, ale nie odpowiedź immunologiczną zależną od Th2 (Artlett CM 2017). Luzina i wsp. u pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc wykazali istotnie podwyższone stężenie białek IL-33 o pełnej długości transkryptu, natomiast nie obserwowano istotnego wzrostu formy dojrzałej (Luzina LG 2012). Natomiast Manetti i wsp. zaobserwowali, że u pacjentów z wczesną postacią SSc w komórkach śródbłonna i keratynocytach ekspresja IL-33 była obniżona lub nieobecna, ale mRNA wykazywało prawidłową ekspresję lub było nieco podwyższone. Dodatkowo komórki śródbłonna, mastocyty, makrofagi, limfocyty T, limfocyty B oraz aktywowane fibroblasty i miofibroblasty wykazywały silną ekspresję ST2. Odwrotna sytuacja była w późnej postaci SSc, gdzie IL-33 była obecna we wszystkich komórkach śródbłonna, a ekspresja ST2 była słabsza (Manetti M 2010). Również w kontekście wielu schorzeń dermatologicznych takich jak:

atopowe zapalenie skóry, łuszczyca, alergiczne kontaktowe zapalenie skóry, choroby tkanki łącznej czy bielactwo wykazano zwiększone osoczowe stężenie IL-33 w porównaniu z grupą kontrolną i zwiększoną ekspresję cytokiny w wycinkach skórnych (Savinko T 2012, Theoharides TC 2010, Taniguchi K 2013, Yanaba K 2010, Yang Q 2013, Yuan L 2013, Li P 2015).

W poniższym badaniu nie wykazano korelacji pomiędzy osoczym stężeniem IL-33 w grupie chorych na morphea a czasem trwania choroby. Nie obserwowano ponadto istotnych różnic w osoczym stężeniu IL-33 w grupie chorych na morphea z aktywną oraz nieaktywną postacią choroby. Nie wykazano również związku pomiędzy postacią morphea a osoczym stężeniem IL-33. Osoczowe stężenie badanej interleukiny nie wykazywało związku z LoSCAT, PGA-A, PGA-D. Powyższe wyniki wydają się odbiegać od danych literaturowych dotyczących SSc. Terras i wsp. i Yanaba i wsp. wykazali, że u pacjentów z SSc osoczowe stężenie IL-33 było wyższe oraz korelowało z postacią choroby (wyższe wartości obserwowano w dSSc niż w lSSc) (Terras S 2013, Yanaba K 2011). W niniejszym badaniu brak zależności pomiędzy osoczym stężeniem IL-33 a parametrami badania przedmiotowego może wynikać również z tego, że w badanej populacji przewagę stanowili chorzy z postacią MEP oraz średni LoSCAT wynosił 15,8 punktów. Podobnie jak przy IL-18, również w kontekście IL-33 jest to pierwsze badanie oceniające jej udział w patomechanizmie morphea. Na podstawie badań innych autorów dotyczących SSc, nie można jednoznacznie wykluczyć udziału IL-33 w patogenezie morphea i potrzeba dalszych analiz oceniających ekspresję genu cytokiny oraz ST2 zarówno w surowicy, jak i w skórze. Ponadto, badania genetyczne z ostatnich lat wskazują, że istnieje kilka polimorfizmów genów *IL33*, które mogą być związane z różnymi zaburzeniami zapalnymi oraz wpływem na układ immunologiczny (Koca S 2015), co z pewnością wymaga dalszych analiz.

5.6. Analiza ekspresji genu *IL1 beta* i *IL18* oraz osoczowych stężeń IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea z współistnieniem oraz bez współistnienia liszaja twardzinowego

W niniejszej pracy nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy ekspresją genu *IL1 beta* i *IL18* oraz osoczowymi stężeniami IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea z współistnieniem oraz bez współistnienia LS. Niniejsze badania są pierwszymi oceniającymi takie zależności. Wydaje się, że w obliczu ostatnich doniesień dotyczących zaangażowania przede wszystkim Th1 zależnych cytokin w patomechanizm LS, udział IL-1 β , IL-18 i IL-33 może mieć mniejsze znaczenie. U chorych na LS stwierdzono podwyższone stężenie cytokin oraz mediatorów prozapalnych takich jak: IL-1, IL-7, IL-15, INF- γ , TNF α , kaspazy 1 czy ICAM-1 (Corazza M 2021, Terlou A 2012). Pilatz i wsp. u chłopców ze stulejką oraz LS również wykazali zwiększoną ekspresję IL-4, TGF- β 2, a także MMP-1, MMP-9 (Pilatz A 2013). Zaburzenia równowagi immunologicznej prowadzące do wzrostu produkcji cytokin prozapalnych, głównie INF- γ , powodują utrzymywanie się cytotoksyczności limfocytów T i zjawiska autoimmunizacyjnego (Corazza M 2021). Brak wpływu współistnienia zmian o typie LS na ekspresję *IL1 beta* i *IL18* oraz osoczowe stężenia cytokin IL-1 β , IL-18 i IL-33 w niniejszym badaniu może wynikać także z faktu, że w badanej grupie przeważali pacjenci z późną fazą choroby (średni PGA-D wynosił 55,9 punktów), czyli dominowała odpowiedź Th-2 zależna.

5.7. Omówienie wyników korelacji pomiędzy czasem trwania choroby a wskaźnikiem LoSCAT, PGA-A i PGA-D

W niniejszych badaniach nie wykazano korelacji pomiędzy czasem trwania morphea a wskaźnikami takimi jak LoSCAT, PGA-A i PGA-D. Najdłuższy czas obserwowano w postaci LM - 14,7 lat; w podgrupie tej mediana LoSCAT wynosiła 15,5 punktów; średni wynik PGA-A 57,5 punktów; natomiast średni wynik PGA-D 76,3 punktów. Najkrótszy czas trwania morphea obserwowano w DM, było to 1,5 roku; przy czym mediana LoSCAT wynosiła 11 punktów, średni PGA-A 67,5 punktów; a średni PGA-D 75 punktów. Powyższe dane wskazują na to, że długość procesu chorobowego nie wpływa na aktywność, nasilenie i stopień uszkodzenia tkanek w morphea.

5.8. Omówienie wyników oceny korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a wskaźnikami PGA-A i PGA-D

Obecność korelacji pomiędzy wskaźnikiem LoSCAT a PGA-A i PGA-D wskazuje, że są to parametry zbieżne w ocenie stanu klinicznego pacjenta chorującego na morphea. Zgodnie z zaleceniami Polskiego i Europejskiego Towarzystwa Dermatologicznego wskaźniki te powinny być stosowane razem, w celu właściwej oceny postępu choroby, jej aktywności oraz wpływu na odpowienie leczenie chorego (Krasowska D 2019, Knobler R 2017). Dane te sugerują, że zarówno PGA-A, jak i PGA-D można stosować w codziennej praktyce klinicznej. Z uwagi na prostotę w szybszy sposób pozwalają określić nasilenie choroby, jednak nie można wykluczyć tutaj znacznej subiektywnej komponenty oceny.

..

6. WNIOSKI

1. Nie znaleziono jednoznacznych dowodów na udział prozapalnej IL-1 β w patogenezie morphea, ponieważ obserwowano istotnie niższą ekspresję genu *IL1 beta* w PBMC w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej oraz nie wykazano istotnych różnic dotyczących osoczowego stężenia IL-1 β w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Nie znaleziono jednoznacznych dowodów na udział IL-18 w patogenezie morphea, ponieważ obserwowano jedynie istotnie niższą ekspresję genu *IL18* w PBMC w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej oraz nie wykazano istotnych różnic dotyczących osoczowego stężenia IL-18 w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie wykazano, że ekspresja genu *IL18* może mieć związek z wyższymi wskaźnikami ogólnej oceny lekarskiej dotyczącej aktywności choroby (PGA-A), a osoczowe stężenie IL-18 może odwrotnie korelować z rozległością uszkodzeń związanych z chorobą (PGA-D).
3. Nie znaleziono dowodów na rolę IL-33 w patogenezie morphea, ponieważ nie obserwowano istotnych różnic w osoczowym stężeniu IL-33 w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej.
4. Nie stwierdzono związku pomiędzy badanymi interleukinami a podtypem morphea i współwystępowaniem zmian o typie liszaja twardzinowego.
5. Wskaźniki PGA-A i PGA-D korelowały ze wskaźnikiem LoSCAT, co może sugerować ich przydatność w codziennej praktyce ambulatoryjnej z uwagi na ich prostotę.

7. STRESZCZENIE

Morphea jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej, znaną od wielu lat. Natomiast etiologia schorzenia nadal pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Większość badań i doniesień naukowych dotyczy SSc. W kontekście morphea, wśród czynników mogących odgrywać rolę w jej etiopatogenezie, wymienia się czynniki genetyczne, epigenetyczne jak i środowiskowe. Uważa się, że pierwotne znaczenie ma uszkodzenie komórek śródbłonna, które prowadzi do zaburzeń immunologicznych i aktywacji fibroblastów, zaburzeń macierzy pozakomórkowej a w konsekwencji do włóknienia tkanek. W literaturze medycznej znajdują się dane wskazujące na udział cytokin z rodziny IL-1 w patomechanizmie wielu chorób autoimmunologicznych, w tym również w procesie włóknienia w przebiegu SSc. W przypadku morphea zbadano przede wszystkim rolę IL-1 β w rozwoju choroby, potwierdzając jej udział. Badania wskazują, że znaczenie mogą mieć również inne cytokiny z rodziny IL-1 o działaniu potencjalnie profibrotycznym, takie jak IL-18 i IL-33, których znaczenie w patomechanizmie morphea jak dotąd nie rozpatrywano.

Zatem w niniejszej pracy podjęto próbę zbadania udziału IL-1 β , IL-18 i IL-33 w patomechanizmie morphea wykorzystując metodę immunoenzymatyczną ELISA oraz real-time PCR.

Badanie przeprowadzono na grupie 88 osób, w tym 59 chorych na morphea (49 kobiet i 10 mężczyzn) oraz 29 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej (24 kobiety i 5 mężczyzn). Rozpoznanie morphea zostało postawione na podstawie klasycznego obrazu klinicznego. Kryterium wykluczającym było stosowanie leczenia ogólnego i miejscowego w okresie miesiąca poprzedzającego pobranie materiału. Ochotnicy nie chorowali na choroby przewlekłe oraz w ich rodzinie nie stwierdzano chorób autoimmunizacyjnych.

Nie znaleziono jednoznacznych dowodów na udział IL-1 β , IL-18 i IL-33 w patogenezie morphea. W grupie chorych na morphea obserwowano niższą ekspresję genów *IL1 beta* i *IL18* w PBMC w porównaniu do grupy kontrolnej oraz nie wykazano istotnych różnic dotyczących osoczowych stężeń IL-1 β , IL-18 i IL-33 w grupie chorych na morphea w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto zarówno podtyp morphea, obecność aktywnej choroby, a także współwystępowanie LS nie wpływały na osoczowe

stężenia IL-1 β , IL-18, IL-33 oraz ekspresję *IL1 beta* i *IL18* w PMBC. Jednocześnie stwierdzono, że IL-18 może okazać się przydatna w monitorowaniu aktywności choroby oraz ocenie stopnia uszkodzenia tkanek w morphea. Wniosek ten potwierdza zależność, że ekspresja genu *IL18* w PBMC w grupie chorych na morphea dodatnio korelowała z wyższymi wskaźnikami PGA-A, natomiast osoczowe stężenie IL-18 w grupie chorych na morphea ujemnie korelowało z PGA-D. Wykazano również, że LoSCAT dodatnio koreluje ze wskaźnikami takimi jak PGA-A i PGA-D, co może wskazywać na ich przydatność w codziennej praktyce dermatologicznej.

Etiopatogeneza morphea nadal pozostaje złożona, nie można wykluczyć innej niż profibrotyczna działalności niektórych z badanych cytokin. Odnosząc się do IL-18 jest to pierwsze badanie oceniające jej udział w patomechanizmie morphea, być może wskazujące, że jej prozapalne i antyfibrotyczne właściwości odgrywają znaczenie w tej chorobie. Jednak z uwagi na doniesienia literaturowe oraz liczebność badanej grupy w odniesieniu do oceny ekspresji, uzasadnionym wydaje się być poszerzenie badań na większej grupie badanych i dalsze analizy w tym zakresie. Warto byłoby wykonać badania na poziomie skóry z uwzględnieniem zróżnicowanego obrazu klinicznego.

8. SUMMARY

Morphea is a chronic, autoimmune disease of connective tissue that has been known for many years. However, the etiology of the disease is still not fully understood. Most research and scientific reports concern SSc. In the context of morphea, genetic, epigenetic and environmental factors are mentioned among the factors that may play a role in its etiopathogenesis. Endothelial cell damage is believed to be of primary importance, leading to immune disorders and fibroblast activation, disorders of the extracellular matrix and consequent tissue fibrosis. In the medical literature, there are data indicating the involvement of the IL-1 family of cytokines in the pathomechanism of many autoimmune diseases, including the process of fibrosis in the course of SSc. In the case of morphea, the role of IL-1 β in the development of the disease was primarily investigated, confirming its involvement. Research indicates that other cytokines from the IL-1 family with potentially profibrotic activity, such as IL-18 and IL-33, whose role in the pathomechanism of morphea has not yet been investigated, may also play a role.

Therefore, in this study an attempt was made to investigate the role of IL-1 β , IL-18 and IL-33 in the pathomechanism of morphea using the immunoenzymatic ELISA method and real-time PCR.

The study was conducted on a group of 88 people, including 59 patients with morphea (49 women and 10 men) and 29 people qualified for the control group (24 women and 5 men). The diagnosis of morphea was made on the basis of the classical clinical picture. The exclusion criterion was the use of general and local treatment in the month preceding the collection of the material. The volunteers did not suffer from chronic diseases and no autoimmune diseases were found in their family.

There was no conclusive evidence for the involvement of IL-1 β , IL-18 and IL-33 in the pathogenesis of morphea. In the group of patients with morphea, a lower expression of *IL1 beta* and *IL18* genes was observed in PBMC compared to the control group, and no significant differences in plasma concentrations of IL-1 β , IL-18 and IL-33 were found in the group of patients with morphea compared to the control group. Moreover, both the morphea subtype, the presence of active disease, and the coexistence of LS did not affect the plasma concentrations of IL-1 β , IL-18, IL-33 and the expression of *IL1 beta* and *IL18* in PMBC. At the same time, it was found that IL-18

may prove useful in monitoring disease activity and assessing the degree of tissue damage in morphea. This conclusion confirms that the expression of the *IL18* gene in PBMC in the group of patients with morphea positively correlated with higher PGA-A indices, while the plasma concentration of IL-18 in the group of patients with morphea negatively correlated with PGA-D. It was also shown that LoSCAT positively correlates with indicators such as PGA-A and PGA D, which may indicate their usefulness in everyday dermatological practice.

The etiopathogenesis of morphea still remains complex and other than profibrotic activity of some of the cytokines under study cannot be ruled out. Referring to IL-18, this is the first study to assess its involvement in the pathomechanism of morphea, possibly indicating that its proinflammatory and antifibrotic properties play a role in this disease. However, due to the literature reports and the size of the studied group in relation to the expression assessment, it seems justified to extend the research on a larger group of subjects and further analyzes in this regard. It would be worthwhile to carry out tests at the skin level, taking into account the varied clinical picture.

9. PIŚMIENNICTWO

1. **Aberer E. i wsp. 1987** - Aberer E., Stanek G., Ertl M., Neumann R. Evidence for spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). *Acta Derm Venereol.* 1987; 67: 225-231.
2. **Afonina I.S. i wsp. 2015** - Afonina I.S., Muller C., Martin S.J., Beyaert R. Proteolytic processing of interleukin-1 family cytokines: Variations on a common theme. *Immunity.* 2015; 42: 991-1004.
3. **Airoidi I. i wsp. 2000** - Airoidi I., Gri G., Marshall J.D. i wsp. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *J Immunol.* 2000; 165: 6880-8.
4. **Alecu M. i wsp. 1998** - Alecu M., Geleriu L., Coman G., Gălăţescu L. The interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha serological levels in localised and systemic sclerosis. *Rom J Intern Med.* 1998; 36: 251-9.
5. **Alexandrescu D.T. i wsp. 2005** - Alexandrescu D.T., Bhagwati N.S., Wiernik P.H. Chemotherapy-induced scleroderma: a pleiomorphic syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 2005; 30: 141-5.
6. **Alonso-Llamazeres J. i wsp. 1997** - Alonso-Llamazeres J., Persing D.H., Anda P. No evidence for *Borrelia burgdorferi* infection in lesions of morphea and lichen sclerosus et atrophicus in Spain. *Acta Dermatol Venereol (Stockh).* 1997; 77: 299-304.
7. **Arkachaisri T. i wsp. 2010** - Arkachaisri T., Vilaiyuk S., Torok K.S., Medsger T.A. Development and initial validation of the localized scleroderma skin damage index and physician global assessment of disease damage: a proof-of-concept study. *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49: 373-831.
8. **Artlett C.M. 2005** - Artlett C.M. Immunology of systemic sclerosis. *Frontiers in Bioscience.* 2005; 10: 1707-1719.
9. **Artlett C.M. i wsp. 2011** - Artlett C.M., Sassi-Gaha S., Rieger J.L., Boesteanu A.C., Feghali-Bostwick C.A., Katsikis P.D. The inflammasome activating caspase-1 mediates fibrosis and myofibroblast differentiation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 3563-74.
10. **Artlett C.M. 2012** - Artlett C.M. The role of the NLRP3 inflammasome in fibrosis. *Open Rheumatology Journal.* 2012; 6: 80-86.
11. **Artlett C.M. 2017** - Artlett C.M. The IL-1 family of cytokines. Do they have a role in scleroderma fibrosis? *Immunology Letters.* 2017; 195: 30-37.

12. **Asano Y. i wsp. 2006** - Asano Y., Ihn H., Jinnin M., Mimura Y., Tamaki K. Involvement of $\alpha 5 \beta 1$ integrin in the establishment of autocrine TGF β signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 1761-9.
13. **Asano Y. i wsp. 2018** - Asano Y., Fujimoto M., Oshikawa O. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of localized scleroderma. *Journal of Dermatology.* 2018; 45: 755-780.
14. **Baekkevold E.S. i wsp. 2003** - Baekkevold E.S., Roussigne M., Yamanaka T. i wsp. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003; 163: 69-79.
15. **Baker K.J. i wsp. 2019** - Baker K.J., Houston A., Brint E. IL-1 family members in cancer; two sides to every story. *Front Immunol.* 2019; 10: 1197.
16. **Balato A. i wsp. 2016** - Balato A., Raimondo A., Balato N., Ayala F., Lembo S. Interleukin-33: increasing role in dermatological conditions. *Archives of Dermatological Research.* 2016; 308: 287-296.
17. **Benedek T.G. i wsp. 1982** - Benedek T. G., Rodnan G. P. The early history and nomenclature of scleroderma and of its differentiation from sclerema neonatorum and scleroedema. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 1982; 12: 52-67.
18. **Bielsa Marsol I. 2013** - Bielsa Marsol I. Update on the Classification and Treatment of Localized Scleroderma. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 2013; 104: 654-666.
19. **Boraschi D. i wsp. 2018** - Boraschi D., Italiani P., Weil S., Martin M.U. The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol. Rev.* 2018; 281: 197-232.
20. **Breuckmann F. i wsp. 2004** - Breuckmann F., Gambichler T., Altmeyer P., Kreuter A. UVA/UVA1 phototherapy and PUVA photochemotherapy in connective tissue diseases and related disorders: a research based review. *BMC Dermatol.* 2004; 4: 11.
21. **Budzyńska-Włodarczyk J. i wsp. 2016** - Budzyńska-Włodarczyk J., Michalska-Jakubas M.M, Kowal M., Krasowska D. Evaluation of serum concentrations of the selected cytokines in patients with localized scleroderma. *Postepy Dermatol Alergol.* 2016; 33: 47-51.
22. **Careta M.F. i wsp. 2015** - Careta M.F., Romiti R. Localized scleroderma: clinical spectrum and therapeutic update. *An Bras Dermatol.* 2015; 90: 62-73.

23. **Chan W.L. i wsp. 2001** - Chan W.L., Pejnovic N., Lee C.A. i wsp. Human IL-18 receptor and ST2L are stable and selective markers for the respective type 1 and type 2 circulating lymphocytes. *J Immunol.* 2001; 167: 1238-1244.
24. **Chiriac A. i wsp. 2016** - Chiriac A., Brzezinski P., Chiriac A.E. i wsp. The Value of Ultrasonography in the Diagnosis and Monitoring of Localized Morphea-Case Report. *Journal of Interdisciplinary Medicine.* 2016; 1: 193-196.
25. **Chomczynski P. i wsp. 1987** - Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-9.
26. **Chomczynski P. 1993** - Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993; 15: 532-4, 536-7.
27. **Christen-Zaech S. i wsp. 2008** - Christen-Zaech S., Hakim M. D., Afsar F. S., Paller A. S. Pediatric morphea (localized scleroderma): Review of 136 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2008; 59: 385-396.
28. **Christianson H.B. i wsp. 1956** - Christianson H.B., Dorsey C.S., Kierland R.R., O'Leary P.A. Localized scleroderma: a 101. clinical study of two hundred thirty-five cases. *AMA Arch Derm.* 1956; 74: 629-39.
29. **Ciesielska A. i wsp. 2008** - Ciesielska A., Sikorski M.M. Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego. *Biotechnologia.* 2008; 4: 88-100.
30. **Colotta F. i wsp. 1993** - Colotta F., Re F., Muzio M. i wsp. Interleukin-1 type-II receptor- a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science.* 1993; 261: 472-475.
31. **Corazza M. i wsp. 2021** - Corazza M., Schettini N., Zedde P., Borghi A. Vulvar Lichen Sclerosus from Pathophysiology to Therapeutic Approaches: Evidence and Prospects. *Biomedicines.* 2021; 9: 950.
32. **Cracker H.R. 1880** - Cracker H.R. Diseases of the skin. *Trans Path Soc Lond.* 1880; 31: 315-22.
33. **Crowther J.R. 2001** - Crowther J.R. The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology.* 2001; 149: 1-421.
34. **Dańczak-Pazdrowska A. i wsp. 2012** - Dańczak-Pazdrowska A., Kowalczyk M. J., Szramka-Pawlak B. i wsp. Clinical immunology Interleukin 1 β in morphea. *Central European Journal of Immunology.* 2012; 3: 247-252.

- 35. Dańczak-Pazdrowska A. i wsp. 2012** - Dańczak-Pazdrowska A., Kowalczyk M., Szramka-Pawlak B. Interleukin-17A and interleukin-23 in morphea. *Arch Med Sci.* 2012; 8: 1089-95.
- 36. Dańczak-Pazdrowska A. i wsp. 2015** - Dańczak-Pazdrowska A., Polańska A. Diagnostyka autoimmunizacyjnych chorób tkanki łącznej [w:] *Metody diagnostyczne w dermatologii, wenerologii i mikologii lekarskiej* [red:] Adamski Z., Kaszuba A., wyd. Czelej 2015, t. II: 191-197.
- 37. Dańczak-Pazdrowska A. i wsp. 2018** - Dańczak-Pazdrowska A., Polańska A., Synakiewicz J. i wsp. Morphea and antithyroid antibodies. *Adv Dermatol Allergol.* 2018; 5: 470-473.
- 38. Dańczak-Pazdrowska A. i wsp. 2021** - Dańczak-Pazdrowska A., Cieplewicz P., Żaba R., Adamski Z., Polańska A. Controversy around the morphea. *Advances in Dermatology and Allergology.* 2021; 38: 716-720.
- 39. De Silva U. i wsp. 1994** - De Silva U., Parish L. C. Historical approach to scleroderma. *Clinics in Dermatology.* 1994; 12: 201-205.
- 40. Dervis E. i wsp. 2004** - Dervis E., Acbay O., Barut G. i wsp. Association of vitiligo, morphea and Hashimoto's thyroiditis. *Int J Dermatol.* 2004; 43: 236-7.
- 41. Dinarello C.A. 1996** - Dinarello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87: 2095-2147.
- 42. Dinarello C.A. 2014** - Dinarello C.A. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Mol. Med.* 2014; 20: S43-S58.
- 43. El-Mofty M. i wsp. 2004** - El-Mofty M., Mostafa W., El-Darouty M. i wsp. Different low doses of broad-band UVA in the treatment of morphea and systemic sclerosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2004; 20: 148-56.
- 44. Espinoza-Leyn F. i wsp. 2006** - Espinoza-Leyn F., Hassanhi-Hassanhi M., Arocha-Sandoval F. i wsp. Absence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in the sera of Venezuelan patients with localized scleroderma (morphea). *Invest Clin.* 2006; 47: 283-288.
- 45. Fawzi M.M. i wsp. 2008** - Fawzi M.M., Tawfik S.O., Eissa A.M., El-Komy M.H., Abdel-Halim M.R., Shaker O.G. Expression of insulin-like growth factor-I in lesional and non-lesional skin of patients with morphoea. *Br J Dermatol.* 2008; 159: 86-90.

46. **Fett N. i wsp. 2011** - Fett N., Werth V.P. Update on morphea: part I. Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 64: 217-228.
47. **Fett N. i wsp. 2013** – Fett N. Scleroderma: Nomenclature, etiology, pathogenesis, prognosis, and treatments: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology.* 2013; 31: 432-437.
48. **Finkelstein E. i wsp. 1995** - Finkelstein E., Amichai B., Metzker A. Coexistence of vitiligo and morphea: a case report and review of the literature. *J Dermatol.* 1995; 22: 351-3.
49. **Fledelius H.C. i wsp. 2018** - Fledelius H.C., Danielsen P.L., Ullman S. Ophthalmic findings in linear scleroderma manifesting as facial en coup de sabre. *Eye (Lond).* 2018; 32: 1688-1696.
50. **Florez- Pollack S. i wsp. 2018** - Florez-Pollack S., Kunzler E., Jacobe H.T. Morphea: current concepts. *Clin Dermatol.* 2018; 36: 475-486.
51. **Gabay C. i wsp. 2018** - Gabay C., Fautrel B., Rech J. Open-label, multicentre, dose-escalating phase II clinical trial on the safety and efficacy of tadekinig alfa (IL-18BP) in adult-onset Still's disease. *Ann Rheum Dis.* 2018; 77: 840-7.
52. **Gambichler T. i wsp. 2013** - Gambichler T., Terras S., Kreuter A. Treatment regimens, protocols, dosage, and indications for UVA1 phototherapy: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2013; 31: 438-54.
53. **Gao Q. i wsp. 2015** - Gao Q., Li Y., Li M. The potential role of IL-33/ST2 signaling in fibrotic diseases. *J Leukoc Biol.* 2015; 98: 15-22.
54. **Garlanda C. i wsp. 2013** - Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. The interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity.* 2013; 39: 1003–1018.
55. **Gasse P. i wsp. 2007** - Gasse P., Mary C., Guenon I. i wsp. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 3786-3799.
56. **Gill L. i wsp. 2016** - Gill L., Zarbo A., Isedeh P. i wsp. Comorbid autoimmune diseases in patients with vitiligo: a cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol.* 2016; 74: 295-302.
57. **Girard C. i wsp. 2016** - Girard C., Rech J., Brown M. i wsp. Elevated serum levels of free interleukin-18 in adult-onset Still's disease. *Rheumatology.* 2016; 55: 2237-47.

58. **Goodlad J.R. i wsp. 2002** - Goodlad J.R., Davidson M.M., Gordon P. i wsp. Morphea and *Borrelia burgdorferi*: results from the Scottish Highlands in the context of the world literature. *Mol Pathol.* 2002; 55: 374-378.
59. **Gourh P. i wsp. 2009** - Gourh P., Arnett F.C., Assassi S. i wsp. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: R147.
60. **Górska M. i wsp. 2015** - Górska M., Majewska-Szczepanik M., Szczepanik M. Mechanizmy immunologiczne towarzyszące otyłości i ich rola w zaburzeniach metabolizmu. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015; 69: 1384-1404.
61. **Grabell D. i wsp. 2014** - Grabell D., Hsieh C., Andrew R. i wsp. The role of skin trauma in the distribution of morphea lesions: a cross-sectional survey of the Morphea in Adults and Children cohort IV. *J Am Acad Dermatol.* 2014; 71: 493-498.
62. **Gracie J.A. i wsp. 2003** - Gracie J.A., Robertson S.E., McInnes I.B. Interleukin-18. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 213-24.
63. **Gu Y.S. i wsp. 2008** - Gu Y.S., Kong J., Cheema G.S. i wsp. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2008; 38: 132-60.
64. **Gupta R.A. i wsp. 2007** - Gupta R.A., Fiorentino D. Localized scleroderma and systemic sclerosis: Is there a connection? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2007; 21: 1025-1036.
65. **Hasegawa M. i wsp. 2003** - Hasegawa M., Sato S., Nagaoka T., Fujimoto M., Takehara K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. *Dermatology.* 2003; 207: 141-7.
66. **Hayakawa H. i wsp. 2007** - Hayakawa H., Hayakawa M., Kume A., Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 26369-6380.
67. **Hornung V. i wsp. 2008** - Hornung V., Bauernfeind F., Halle A. i wsp. Silica crystals and aluminum salts activate the Nalp3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. immunol.* 2008; 9: 847-856.
68. **Hoshino K. i wsp. 1999** - Hoshino K., Tsutsui H., Kawai T. i wsp. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol.* 1999; 162: 5041-4.

69. **Hussein M.R. i wsp. 2005** - Hussein M.R., Hassan H.I., Hofny E.R. i wsp. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1 β and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 178-84.
70. **Ihn H. i wsp. 2000** - Ihn H., Yazawa N., Kubo M. i wsp. Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with localized scleroderma and correlated with serological and clinical features of the disease. *The Journal of Rheumatology.* 2000; 27: 698-702.
71. **Ilarregui J.M. i wsp. 2016** - Ilarregui J.M., van Beelen A.J., Fehres C.M., Bruijns S.C., Garcia-Vallejo J.J., van Kooyk Y. New roles for CD14 and IL-beta linking inflammatory dendritic cells to IL-17 production in memory CD4 (+) t cells. *Immunol. Cell. Biol.* 2016; 94: 907-916.
72. **Inoshita T. i wsp. 1981** - Inoshita T., Whiteside T.L., Rodnan G.P., Taylor F.H. Abnormalities of T lymphocyte subsets in patients with progressive systemic sclerosis (PSS, scleroderma). *J Lab Clin Med.* 1981; 97: 264-77.
73. **Iwahana H. i wsp. 1999** - Iwahana H., Yanagisawa K., Ito-Kosaka A. i wsp. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem.* 1999; 264: 397-406.
74. **Kahaleh M.B. i wsp. 1979** - Kahaleh M.B., Sherer G.K., LeRoy E.C. Endothelial injury in scleroderma. *The Journal of Experimental Medicine.* 1979; 149: 1326-1335.
75. **Kampfer H. i wsp. 2000** - Kampfer H., Paulukat J., Muhl H., Wetzler C., Pfeilschifter J., Frank S. Lack of interferon-gamma production despite the presence of interleukin-18 during cutaneous wound healing. *Mol. Med.* 2000; 6: 1016-1027.
76. **Kanakaraj P. i wsp. 1999** - Kanakaraj P., Ngo K., Wu Y. i wsp. Interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice. *J Exp Med.* 1999; 189: 1129-38.
77. **Kaposi M. 1874** - Kaposi M. *Scleroderma adultorum*. [w:] *On Disease of the Skin Including the Exanthemata* [red:] Hebra F., Kaposi M., wyd. London: The New Sydenham Society 1874; 3: 104-24.
78. **Keystone E.C. i wsp. 1982** - Keystone E.C., Lau C., Gladman D.D., Wilkinson S., Lee P., Shore A. Immunoregulatory T cell subpopulations in patients with scleroderma using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol.* 1982; 48: 443-8.

- 79. Kim H.J. i wsp. 2010** - Kim H.J., Song S.B., Choi J.M. i wsp. IL-18 down regulates collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK pathway. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010; 130: 706-715.
- 80. Kirtsching G. i wsp. 2015** - Kirtschig G., Becker K., Gunthert A. i wsp. Evidence based (S3) Guideline on (anogenital) Lichen sclerosus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2015; 29: 1-43.
- 81. Knobler R. i wsp. 2017** - Knobler R., Moinzadeh P., Hunzelmann N. i wsp. European Dermatology Forum S1-guideline on the diagnosis and treatment of sclerosing diseases of the skin, Part 1: localized scleroderma, systemic sclerosis and overlap syndromes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2017; 31: 1401-1424.
- 82. Kohka H. i wsp. 1998** - Kohka H., Yoshino T., Iwagaki H. i wsp. Interleukin-18/interferon-g-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. *J Leukoc Biol*. 1998; 64: 519-27.
- 83. Kojima H. i wsp. 1998** - Kojima H., Takeuchi M., Ohta T. i wsp. Interleukin-18 activates the IRAK-TRAF6 pathway in mouse EL-4 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 244: 183-6.
- 84. Krasowska D. i wsp. 2019** - Krasowska D., Rudnicka L., Dańczak-Pazdrowska A. i wsp. Localized scleroderma (morphea). Diagnostic and therapeutic recommendations of the Polish Dermatological Society. *Dermatol Rev/Przegl Dermatol*. 2019; 106: 333-353.
- 85. Kreuter A. i wsp. 2009** - Kreuter A., Krieg T., Worm M. . Diagnosis and therapy of circumscribed scleroderma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2009; 7: 1-14.
- 86. Kreuter A. i wsp. 2012** - Kreuter A., Wischniewski J., Terras S. i wsp. Coexistence of lichen sclerosus and morphea: a retrospective analysis of 472 patients with localized scleroderma from a German tertiary referral center. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 67: 1157-62.
- 87. Kreuter A. i wsp. 2016** - Kreuter A., Krieg T., Worm M. i wsp. German guidelines for the diagnosis and therapy of localized scleroderma. *Journal of the German Society of Dermatology*. 2016; 14: 199-216.
- 88. Krieg T. 2017** - Krieg T. Twardzina [w:] Braun-Falco Dermatologia [red:] Gliški W., Czarnecka-Operacz M., Krasowska D., Serwin A.B., Wolska H., wyd. Czelej 2017, t. III: 725-740.

- 89. Kroft E.B. i wsp. 2008** - Kroft E.B., Berkhof N.J., VanDe Kerkhof P.C. i wsp. Ultraviolet a phototherapy for sclerotic skin diseases: a systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 59: 1017-30.
- 90. Kroft E.B. i wsp. 2009** - Kroft E.B., Groneveld T.J., Seyger M.M. i wsp. Efficacy of topical tacrolimus 0.1% in active plaque morphea: randomized, double-blind, emollient-controlled pilot study. *Am J Clin Dermatol.* 2009; 10: 181-187.
- 91. Lakhanpal S. i wsp. 1988** - Lakhanpal S., Ginsburg W.W., Michet C.J., Doyle J.A., Moore S.B. Eosinophilic fasciitis: clinical spectrum and therapeutic response in 52 cases. *Semin Arthritis Rheum.* 1988; 17: 221-31.
- 92. Lee J.U. i wsp. 2017** - Lee J.U., Chang H.S., Lee H.J. i wsp. Upregulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin levels in the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2017; 17: 39.
- 93. Lefrancais E. i wsp. 2012** - Lefrancais E., Roga S., Gautier V.A. i wsp. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 1673-8.
- 94. Leitenberger J.J. i wsp. 2009** - Leitenberger J.J., Cayce R.L., Haley R.W., Adams-Huet B., Bergstresser P.R., Jacobe H.T. Distinct autoimmune syndromes in morphea: a review of 245 adult and pediatric cases. *Arch Dermatol.* 2009; 145: 545-550.
- 95. Li L. i wsp. 2018** - Li L., Zhu H., Zuo X. Interleukin-33 in Systemic Sclerosis: Expression and Pathogenesis. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2663.
- 96. Li P. i wsp. 2015** - Li P., Ma H., Han D., Mou K. Interleukin-33 affects cytokine production by keratinocytes in Vitiligo. *Clin Exp Dermatol.* 2015; 40: 163-170.
- 97. Liew F.Y. i wsp. 2010** - Liew F. Y., Pitman N. I., McInnes I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 103-110.
- 98. Lin E. i wsp. 2019** - Lin E., Vincent F.B., Sahhar J. i wsp. Analysis of serum interleukin (IL)-1 α , IL-1 β and IL-18 in patients with systemic sclerosis. *Clin Transl Immunology.* 2019; 8: e1045.
- 99. Longo F. i wsp. 1993** - Longo F., Salett a S., Lepore L. i wsp. Localized scleroderma after infection with Epstein-Barr virus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1993; 11: 681-3.

- 100. Luheshi N.M. i wsp. 2009** - Luheshi N.M., Rothwell N.J., Brough D. Dual functionality of interleukin- 1 family cytokines: implications for anti interleukin-1 therapy. *British Journal Pharmacology*. 2009; 157: 1318-1329.
- 101. Luthi A.U. i wsp. 2009** - Luthi A.U., Cullen S.P., McNeela E.A. i wsp. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009; 31: 84-98.
- 102. Lutz V. i wsp. 2012** - Lutz V., Franc ès C., Bessis D. i wsp. High frequency of genital lichen sclerosus in a prospective series of 76 patients with morphea: toward a better understanding of the spectrum of morphea. *Arch Dermatol*. 2012; 148: 24-28.
- 103. Luzina I.G. i wsp. 2012** - Luzina I.G., Pickering E.M., Kopach P. i wsp. Full-length IL-33 promotes inflammation but not Th2 response in vivo in an ST2-independent fashion, *J. Immunol*. 2012; 189: 403-410.
- 104. Malaszewska M. i wsp. 2013** - Maleszewska M., Moonen J.R., Huijkman N., van de Sluis B., Krenning G., Harmsen M.C. IL-1beta and TGFbeta2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NFkappaB-dependent manner. *Immunobiol*. 2013; 218: 443-454.
- 105. Manetti M. i wsp. 2010** - Manetti M., Ibba-Manneschi L., Liakouli V. i wsp. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69: 598-605.
- 106. Markovics A. i wsp. 2011** - Markovics A., Araya J., Cambier S. Interleukin-1beta induces increased transcriptional activation of the transforming growth factor-beta-activating integrin subunit beta through altering chromatin architecture. *J. Biol. Chem*. 2011; 286: 36864-36874.
- 107. Martinez-Godinez M.A. i wsp. 2015** - Martinez-Godinez M.A., Cruz-Dominguez M.P., Jara L.J. i wsp. Expression of NLRP3 inflammasome, cytokines and vascular mediators in the skin of systemic sclerosis patients. *Isr Med Assoc J*. 2015; 17: 5-10.
- 108. Martini G. i wsp. 2009** - Martini G., Ramanan A.V., Falcini F. i wsp. Successful treatment of severe or methotrexate-resistant juvenile localized scleroderma with mycophenolate mofetil. *Rheumatology*. 2009; 48: 1410-3.
- 109. Martinon F. i wsp. 2002** - Martinon F., Burns K., Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002; 10: 417-426.

- 110. Marvie P. i wsp. 2010** - Marvie P., Lisbonne M., L'Helgoualc'h A. i wsp. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J. Cell. Mol. Med.* 2010; 10: 1726-1739.
- 111. Marzano A.V. i wsp. 2003** - Marzano A.V., Menni S., Parodi A. i wsp. Localized scleroderma in adults and children. Clinical and laboratory investigations on 239 cases. *Eur J Dermatol.* 2003; 13: 171-6.
- 112. Mazori D. i wsp. 2017** - Mazori D. R., Femi, A. N., Vleugels, R. A. Eosinophilic Fasciitis: an Updated Review on Diagnosis and Treatment. *Current Rheumatology Reports.* 2017; 19: 74.
- 113. McArthur J.G. i wsp. 1993** - McArthur J.G., Raulet D.H. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 1645–1653.
- 114. Mehrtens S.H. i wsp. 2019** - Mehrtens S. H., Fleming A., Shall L. A rare case of a tattoo-induced morphea reaction. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2019; 44: 467-469.
- 115. Mertens J.S. i wsp. 2015** - Mertens J.S., Seyger M.M., Kievit W. i wsp. Disease recurrence in localized scleroderma: a retrospective analysis of 344 patients with paediatric- or adult-onset disease. *Br J Dermatol.* 2015; 172: 722-728.
- 116. Mertens J.S. i wsp. 2017** - Mertens J.S., Seyger M.M.B., Thurlings R.M., Radstake T.R.D.J., de Jong E.M.G.J. Morphea and Eosinophilic Fasciitis: An Update. *Am J Clin Dermatol.* 2017; 18: 491-512.
- 117. Michet C.J. Jr. i wsp. 1981** - Michet C.J. Jr., Doyle J.A., Ginsburg W.W. Eosinophilic fasciitis: report of 15 cases. *Mayo Clin Proc.* 1981; 56: 27-34.
- 118. Mihas A.A. i wsp. 2003** - Mihas A.A., Abou-Assi S.G., Heuman D.M. Cutae morphea associated with chronic hepatitis. *C. J. Hepatol.* 2003; 39: 458-9.
- 119. Milovanovic M. i wsp. 2012** - Milovanovic M., Volarevic V., Radosavljevic G. i wsp. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol. Res.* 2012; 52: 89-99.
- 120. Mirizio E. i wsp. 2018** - Mirizio E., Marathi A., Hershey N. i wsp. Identifying the signature immune phenotypes present in pediatric localized scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2018; 139: 715-8.
- 121. Mosaad Y.M. i wsp. 2003** - Mosaad Y.M., Metwally S.S., Auf F.A. i wsp. Proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-18) in immune rheumatic diseases: relation with disease activity and autoantibodies production. *Egypt J Immunol.* 2003; 10: 19-26.

122. **Moussion C. i wsp. 2008** - Moussion C., Ortega N., Girard J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? PLoS ONE. 2008; 3: e3331.
123. **Mühl H. i wsp. 2000** - Mühl H., Kämpfer H., Bosmann M., Frank S., Radeke H., Pfeilschifter J. Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 267: 960-3.
124. **Munder B.M. i wsp. 1998** - Munder B.M., Mallo M., Eichmann K., Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. J Exp Med. 1998; 187: 2103-8.
125. **Murphy J.E. i wsp. 2000** - Murphy J.E., Robert C., Kupper T.S. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. J Invest Dermatol. 2000; 114: 602-8.
126. **Nakamuro S. i wsp. 2000** - Nakamura S., Otani T., Okura R. i wsp. Expression and responsiveness of human interleukin-18 receptor (IL-18R) on hematopoietic cell lines. Leukemia. 2000; 14: 1052-9.
127. **Nakamuro K. i wsp. 2016** - Nakamura, K., Asano, Y., Taniguchi, T. i wsp. Serum levels of interleukin-18-binding protein isoform a: Clinical association with inflammation and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. The Journal of Dermatology. 2016; 43: 912-8.
128. **Nakatani-Okuda A. i wsp. 2005** - Nakatani-Okuda A., Ueda H., Kashiwamura S. i wsp. Protection against bleomycin-induced lung injury by IL-18 in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005; 289: L280-7.
129. **Narbutt J. i wsp. 2017** - Narbutt J., Hołdrowicz A., Lesiak A. Morphea-selected local treatment methods and their effectiveness. Reumatologia. 2017; 6: 305-313.
130. **Novick D. i wsp. 2001** - Novick D., Schwartzburd B., Pinkus R. i wsp. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. Cytokine. 2001; 14: 334-42.
131. **Novick D. i wsp. 2009** - Novick D., Elbirt D., Dinarello C.A., Rubinstein M., Stoecker Z.M. Interleukin-18 binding protein in the sera of patients with Wegener's granulomatosis. J Clin Immunol. 2009; 29: 38-45.

- 132. Novick D. i wsp. 2010** - Novick D., Elbirt D., Miller G., Dinarello C.A., Rubinstein M., Sthoeger Z.M. High circulating levels of free interleukin-18 in patients with active SLE in the presence of elevated levels of interleukin-18 binding protein. *J Autoimmun.* 2010; 34: 121-6.
- 133. O'Brien J.C. i wsp. 2017** - O'Brien J.C., Rainwater Y.B., Malviya N. i wsp. Transcriptional and cytokine profiles identify CXCL9 as a biomarker of disease activity in morphea. *J Invest Dermatol.* 2017; 137: 1663-70.
- 134. O'Neill L.A. 2008** - O'Neill L.A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008; 226: 10-8.
- 135. Oboki K. i wsp. 2010** - Oboki K., Ohno T., Kajiwara N. i wsp. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107: 18581-18586.
- 136. Okamura H. i wsp. 1995** - Okamura H., Nagata K., Komatsu T. i wsp. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun.* 1995; 63: 3966-72.
- 137. Okamaru H. i wsp. 1995** - Okamura H., Tsutsi H., Komatsu T. i wsp. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 1995; 378: 88-91.
- 138. Oshikawa K. i wsp. 2002** - Oshikawa K., Yanagisawa K., Tominaga S., Sugiyama Y. ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 299: 18-24.
- 139. Pan H.F. i wsp. 2011** - Pan H.F., Wang J., Leng R.X. i wsp. Interleukin-18: friend or foe for systemic sclerosis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2011; 13: 2495.
- 140. Patrick M.R. i wsp. 1995** - Patrick M.R., Kirkham B.W., Graham M., Harrison L.C. Circulating interleukin 1 beta and soluble interleukin 2 receptor: evaluation as markers of disease activity in scleroderma. *The Journal of Rheumatology.* 1995; 22: 654-658.
- 141. Peterson L.S. i wsp. 1995** - Peterson L.S., Nelson A.M., Su W.P.D. Classification of morphea (localized scleroderma). *Mayo Clin Proc.* 1995; 70: 1968-1976.
- 142. Peterson L.S. i wsp. 1997** - Peterson L.S., Nelson A.M., Su W.P., Mason T., O'Fallon W.M., Gabriel S.E. The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. *J Rheumatol.* 1997; 24: 73-80.

- 143. Pilatz A. i wsp. 2013** - Pilatz A., Altinkilic B., Schormann E. i wsp. Congenital phimosis in patients with and without lichen sclerosus: distinct expression patterns of tissue remodeling associated genes. *J Urol.* 2013; 189: 268-274.
- 144. Piłat D. i wsp. 2014** - Piłat D., Mika J. Rola cytokin z rodziny interleukiny-1 w transmisji nocycytywnej. *Ból.* 2014; 15: 39-47.
- 145. Pinal-Fernandez I. 2014** - Pinal-Fernandez I., Selva-O' Callaghan A., Grau J. M. Diagnosis and classification of eosinophilic fasciitis. *Autoimmunity Reviews.* 2014; 13: 379-382.
- 146. Pinazo Canales I. i wsp. 1990** - Pinazo Canales I., Betloch Mas I., Mestre Bauza F. i wsp. Determination of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with morphea, lichen sclerosus et atrophicus and erythema chronicum migrans. *Rev Clin Esp.* 1990; 186: 320-323.
- 147. Piram M. i wsp. 2013** - Piram M., McCuaig C.C., Saint-Cyr C. i wsp. Short-and long-term outcome of linear morphoea in children. *Br J Dermatol.* 2013; 169: 1265-1271.
- 148. Platis A. i wsp. 2008** - Platis A., Yu Q., Moore D., Khojeini E., Tsau P., Larson D. The effect of daily administration of IL-18 on cardiac structure and function. *Perfusion.* 2008; 23: 237-242.
- 149. Polanska A. i wsp. 2011** - Polanska A., Danczak-Pazdrowska A., Silny W. i wsp. High-frequency ultrasonography in monitoring the effects of treatment of selected dermatoses. *Post Dermatol Alergol.* 2011; 28: 255-60.
- 150. Puren A.J. i wsp. 1999** - Puren A.J., Fantuzzi G., Dinarello C.A. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 2256-2261.
- 151. Raguin G. i wsp. 1992** - Raguin G., Boisnic S., Souteyrand P. i wsp. No evidence for a spirochaetal origin of localized scleroderma. *Br J Dermatol.* 1992; 127: 218-220.
- 152. Ranki A. i wsp. 1994** - Ranki A., Aavik E., Peterson P. i wsp. Successful amplification of DNA specific for Finnish *Borrelia burgdorferi* isolates in erythema chronicum migrans but not in circumscribed scleroderma lesions. *J Invest Dermatol.* 1994; 102: 339-345.
- 153. Rankin A.L. i wsp. 2010** - Rankin A. L., Mumm J. B., Murphy E. i wsp. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J. Immunol.* 2010; 184: 1526-1535.

- 154. Rider P. i wsp. 2013** - Rider P., Carmi Y., Voronov E., Apte R.N. Interleukin-1alpha. *Semin. Immunol.* 2013; 25: 430-438.
- 155. Rongioletti F. i wsp. 2018** - Rongioletti F., Ferreli C., Atzori L. Bottoni U., Soda G. Scleroderma with an update about clinico-pathological correlation *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia.* 2018; 153: 208-15.
- 156. Salimi M. i wsp. 2013** - Salimi M., Barlow J.L., Saunders S.P. i wsp. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 2013; 210: 2939-2950.
- 157. Sapadin A.N. i wsp. 2002** - Sapadin A.N., Fleischmajer R. Treatment of scleroderma. *Arch Dermatol.* 2002; 138: 99-105.
- 158. Savinko T. i wsp. 2012** - Savinko T., Matikainen S., Saarialho-Kere U. i wsp. IL-33 and ST2 in atopic dermatitis: expression profiles and modulation by triggering factors. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 1392-1400.
- 159. Schmitz J. i wsp. 2005** - Schmitz J., Owyang A., Oldham E. i wsp. IL-33 an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005; 23: 479-490.
- 160. Schoenherr C. i wsp. 2010** - Schoenherr C., Weiskirchen R., Haan S. Interleukin-27 acts on hepatic stellate cells and induces signal transducer and activator of transcription 1-dependent responses. *Cell Commun Signal.* 2010; 19: 8-19.
- 161. Shabgah A.G. i wsp. 2014** - Shabgah A.G., Fattahi E., Shahneh F.Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Adv Dermatol Allergol.* 2014; 31: 256-61.
- 162. Shimoizato O. i wsp. 2009** - Shimoizato O., Sato A., Kawamura K. i wsp. The secreted form of p28 subunit of interleukin (IL)-27 inhibits biological function of IL-27 and suppresses anti-allogenic immune responses. *Immunology.* 2009; 128: 818-25.
- 163. Shulman L.E. 1975** - Shulman L.E. Diffuse fasciitis with hypergammaglobulinemia and eosinophilia: a new syndrome? *Trans Assoc Am Physicians.* 1975; 88: 70-86.
- 164. Silver M.R. i wsp. 2010** - Silver M.R., Margulis A., Wood N. i wsp. IL-33 synergizes with IgE-dependent and IgE-independent agents to promote mast cell and basophil activation. *Inflamm Res.* 2010; 59: 207-218.
- 165. Soh H.J. i wsp. 2019** - Soh H.J., Samuel C., Heaton V., Renton W.D., Cox A., Munro J. Challenges in the diagnosis and treatment of disabling pansclerotic morphea of childhood: case-based review. *Rheumatol Int.* 2019; 39: 933-941.

166. **Soylu S. i wsp. 2009** - Soylu S., Gül U., Gönül M. i wsp. An uncommon presentation of the co-existence of morphea and vitiligo in a patient with chronic hepatitis B virus infection: is there a possible association with autoimmunity? *Am. J. Clin. Dermatol.* 2009; 10: 336-8.
167. **Spalek M. i wsp. 2014** - Spalek M., Jonska-Gmyrek J., Gałecki J. Radiation-induced morphea-a literature review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2014; 29: 197-202.
168. **Spirer Z. i wsp. 1979** - Spirer Z., Ilie B., Pick I.A. i wsp. Localized scleroderma following varicella in a three-year-old girl with IgA deficiency. *Acta Pediatr. Scand.* 1979; 68: 783-5.
169. **Succaria F. i wsp. 2013** - Succaria F., Kurban M., Kibbi AG, Abbas O. Clinicopathological study of 81 cases of localized and systemic scleroderma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV.* 2013; 27: e191-e196.
170. **Sunderkötter C. i wsp. 2006** - Sunderkötter C., Kuhn A., Hunzelmann N., Beissert S. Phototherapy: a promising treatment option for skin sclerosis in scleroderma? *Rheumatology.* 2006; 45: 52-54.
171. **Sundnes O. i wsp. 2015** - Sundnes O., Pietka W., Loos T. i wsp. Epidermal expression and regulation of interleukin-33 during homeostasis and inflammation: strong species differences. *J Invest Dermatol.* 2015; 135: 1771-1780.
172. **Swain S.L. 2001** - Swain S.L. Interleukin 18 Tipping the Balance towards a T Helper Cell 1 Response. *J Exp Med.* 2001; 194: f11-f14.
173. **Szyper-Kravitz M. i wsp. 2005** - Szyper-Kravitz M., Marai I., Shoenfeld Y. Coexistence of thyroid autoimmunity with other autoimmune diseases: friend or foe? Additional aspects on the mosaic of autoimmunity. *Autoimmunity.* 2005; 38: 247-55.
174. **Tago K. i wsp. 2001** - Tago K., Noda T., Hayakawa M. i wsp. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285: 1377-1383.
175. **Taniguchi K. i wsp. 2013** - Taniguchi K., Yamamoto S., Hitomi E. i wsp. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2013; 23: 428-434.

- 176. Tanino A. i wsp. 2016** - Tanino A., Okura T., Nagao T. i wsp. Interleukin-18 deficiency protects against renal interstitial fibrosis in aldosterone/salt-treated mice. *Clin. Sci.* 2016; 130: 1727-1739.
- 177. Terlouw A. i wsp. 2012** - Terlouw A., Santegoets L.A., van der Meijden W.I. i wsp. An autoimmune phenotype in vulvar lichen sclerosus and lichen planus: a Th1 response and high levels of microRNA-155. *J Invest Dermatol.* 2012; 132: 658-66.
- 178. Terras S. i wsp. 2013** - Terras S., Opitz E., Moritz R.K., Hoxtermann S., Gambichler T., Kreuter A. Increased serum IL-33 levels may indicate vascular involvement in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72: 144-5.
- 179. Teske N.M. i wsp. 2016** - Teske N.M., Jacobse H.T. Phototherapy for sclerosing skin conditions. *Clin Dermatol.* 2016; 34: 614-622.
- 180. Theoharides T.C. i wsp. 2010** - Theoharides T.C., Zhang B., Kempuraj D. i wsp. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 4448-4453.
- 181. Tomimura S. i wsp. 2008** - Tomimura S., Ogawa F., Iwata Y. i wsp. Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with localized scleroderma. *J Dermatol Sci.* 2008; 52: 47-54.
- 182. Torigoe K. i wsp. 1997** - Torigoe K., Ushio S., Okura T. i wsp. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272: 25737-42.
- 183. Torok K.S. i wsp. 2015** - Torok K.S., Kurzinski K., Kelsey C. i wsp. Peripheral blood cytokine and chemokine profiles in juvenile localized scleroderma: T-helper cell associated cytokine profiles. *Semin Arthritis Rheum.* 2015; 45: 284-93.
- 184. Torres J.E. i wsp. 1998** - Torres J.E., Sanchez J.L. Histopathologic differentiation between localized and systemic scleroderma. *The American Journal of dermatopathology.* 1998; 20: 242-245.
- 185. Toyama S. i wsp. 2019** - Toyama S., Sato S., Asano Y. Localized scleroderma manifesting with skin lesions associated with mechanical stress. *European Journal of Dermatology.* 2019; 29: 439-440.
- 186. Trattner A. i wsp. 1991** - Trattner A., David M. Morphea and the Isomorphic Response of Koebner. *International Journal of Dermatology.* 1991; 30: 747-747.
- 187. Tsutsui H. i wsp. 1996** - Tsutsui H., Nakanishi K., Matsui K. i wsp. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol.* 1996; 157: 3967-73.

- 188. Uitto J. i wsp. 1980** - Uitto J., Santa Cruz D.J., Bauer E.A. Morphea and lichen sclerosus et atrophicus: clinical and histopathologic studies in patients with combined features. *J Am Acad Dermatol.* 1980; 3: 271-279.
- 189. Vasquez R. i wsp. 2014** - Vasquez R., Jabbar A., Khan F. i wsp. Recurrence of morphea after successful ultraviolet A1 phototherapy: a cohort study. *J Am Acad Dermatol.* 2014; 70: 481-8.
- 190. Vigneron C. i wsp. 2014** - Vigneron C., Bauer N., Waisse W. i wsp. Morphée du sein radio-induite: une complication méconnue. *Cancer Radiother.* 2014; 18: 64-7.
- 191. Wang Z. i wsp. 2018** - Wang Z., Liu Z., Wang L. i wsp. Altered expression of IL-18 binding protein and IL-18 receptor in basophils and mast cells of asthma patients. *Scand J Immunol.* 2018; 87: e12658.
- 192. Weide B. i wsp. 2000** - Weide B., Walz T., Garbe C. Is morphoea caused by *Borrelia burgdorferi*? a review. *Br J Dermatol* 2000; 142: 636-644.
- 193. Wilson E. 1867** - Wilson E. On striae et maculae atrophicae cutis, or false cicatrices of the skin. *J Cut Med.* 1867; 68: 140-47.
- 194. Wortsman X. i wsp. 2011** - Wortsman X., Wortsman J., Sazunic I., Carreno L. Activity assessment in morphea using color Doppler ultrasound. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65: 942-948.
- 195. Wright N.A. i wsp. 2016** - Wright N.A., Mazori D.R., Patel M., Merola J.F., Femia A.N., Vleugels R.A. Epidemiology and treatment of eosinophilic fasciitis: an analysis of 63 patients from 3 tertiary care centers. *JAMA Dermatol.* 2016; 152: 97-9.
- 196. Wu E.Y. i wsp. 2014** - Wu E.Y., Li S.C., Torok K.S. i wsp. CARRA Registry Investigators. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66: S43.
- 197. Xu D. i wsp. 2019** - Xu D., Mu R., Wei X. The Roles of IL-1 Family Cytokines in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2025.
- 198. Yamamoto T. 2006** - Yamamoto T. Chemokines and chemokine receptors in scleroderma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 140: 345-56.
- 199. Yaaba K. i wsp. 2011** - Yanaba K., Yoshizaki A., Asano Y., Kadono T., Sato S. Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Clin. Rheumatol.* 2011; 30: 825-830.
- 200. Yang Q. i wsp. 2013** - Yang Q., Yu C., Yang Z. i wsp. Deregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes and their correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2013; 41: 444-452.

- 201. Yoshimoto T. i wsp. 1998** - Yoshimoto T., Takeda K., Tanaka T. i wsp. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: Synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol.* 1998; 161: 3400-7.
- 202. Yoshimoto T. i wsp. 2000** - Yoshimoto T., Mizutani H., Tsutsui H. i wsp. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol.* 2000; 1: 132-7.
- 203. Yuan L. i wsp. 2013** - Yuan L., Yao L., Zhao L. i wsp. Serum levels of soluble ST2 and interleukin-33 in patients with dermatomyositis and polymyositis. *Clin Exp Rheumatol.* 2013; 31:428-432.
- 204. Zhang L.H. i wsp. 2001** - Zhang L.H., Pan J.P., Yao H.P. i wsp. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes: an effective approach to reverse hepatic fibrosis in schistosomiasis through induction of dominant Th1 response. *Gene Ther.* 2001; 8: 1333-42.
- 205. Zhang Y.J. i wsp. 2018** - Zhang Y. J., Zhang Q., Yang G.J. i wsp. Elevated serum levels of interleukin-1 β and interleukin-33 in patients with systemic sclerosis in Chinese population. *Zeitschrift fur Rheumatologie.* 2018; 77: 151-159.
- 206. Zulian F. i wsp. 2005** - Zulian F., Vallongo C., Woo P. i wsp. Localized scleroderma in childhood is not just a skin disease. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2873-81.
- 207. Zulian F. i wsp. 2006** - Zulian F., Athreya B.H., Laxer R. i wsp. Juvenile localized scleroderma: clinical and epidemiological features in 750 children. An international study. *Rheumatology (Oxford).* 2006; 45: 614-620.
- 208. Zulian F. 2017** - Zulian F. Scleroderma in children. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017; 31: 576-595.

10. ZAŁĄCZNIKI

10.1. Załącznik nr 1- Uchwała Komisji Bioetycznej nr 52/19



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 52/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczególnych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 10 stycznia 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: dr hab. n. med. Adriana Polańska

Miejsce prowadzenia badań:

**Zakład Dermatologii i Wenerologii, Katedra i Klinika Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Paulina Cieplewicz

Członkowie zespołu

badawczego:

lek. Paulina Cieplewicz

dr n. med. Michał Kowalczyk

dr hab. n. med. Adriana Polańska

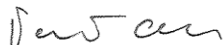
dr hab. n. med. Aleksandra Dańczak- Pazdrowska

Temat badań:

„Znaczenie wybranych cytokin w patomechanizmie morphea”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji


prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

10.2. Załącznik nr 2- Uchwała Komisji Bioetycznej nr 238/19



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersytecie Medycznym
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 238/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 07 lutego 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: dr hab. n. med. Adriana Polańska

Miejsce prowadzenia badań:

**Zakład Dermatologii i Wenerologii, Katedra i Klinika Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Paulina Cieplewicz

Członkowie zespołu

**badawczego: lek. Paulina Cieplewicz, dr n. med. Michał Kowalczyk,
dr hab. n. med. Adriana Polańska, dr hab. n. med. Aleksandra Dańczak-
Pazdrowska, lek. Marta Szymoniak-Lipska**

Temat badań:

**„Znaczenie wybranych cytokin z rodziny interleukiny 1 w
patomechanizmie morphea”.**

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do
protokołu powyższego badania, polegających na modyfikacji w metodyce badania ,
zmianie tematu badania z „Znaczenie wybranych cytokin w patomechanizmie
morphea” na powyższy, poszerzeniu składu zespołu badawczego (jak wyżej), zgodnie
z Aneks nr 1 z dnia 07.02.2019r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 52/19
z dnia 10.01.2019r.**

**Do dokumentacji dołączono poprawioną Informację i zgodę pacjenta na udział w
badaniu (wersja z dn. 05.02.2019r.)**

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

10.3. Załącznik nr 3- Uchwała Komisji Bioetycznej nr 501/19



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 501/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r., Nr 101, poz. 843); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem pacjentów (Dz. U. z 2004 r., Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłoszenia niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r., Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r., Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 11 kwietnia 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: dr hab. n. med. Adriana Polańska

Miejsce prowadzenia badań:

**Zakład Dermatologii i Wenerologii, Katedra i Klinika Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Paulina Cieplewicz

Członkowie zespołu

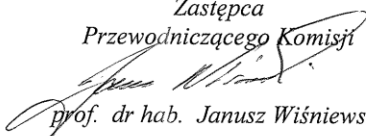
**badawczego: lek. Paulina Cieplewicz, dr n. med. Michał Kowalczyk,
dr hab. n. med. Adriana Polańska, dr hab. n. med. Aleksandra Dańczak-
Pazdrowska, lek. Marta Szymoniak-Lipska**

Temat badań:

„Znaczenie wybranych cytokin z rodziny interleukiny 1 w patomechanizmie twardziny ograniczonej”.

**Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu poprawek wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na zmianie tematu badania ze „Znaczenie wybranych cytokin z rodziny interleukiny 1 w patomechanizmie morphea” na powyższy, zgodnie z Aneks nr 2 z dnia 11.04.2019r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 52/19 z dnia 10.01.2019r. (Aneks nr 1 z dnia 07.02.2019r.)
Metodyka badania pozostaje bez zmian.**

Zastępca
Przewodniczącego Komisji


prof. dr hab. Janusz Wiśniewski