

Patogeneza twardziny skórnej – przegląd piśmiennictwa

The pathogenesis of skin scleroderma – literature review

Katedra i Klinika Dermatologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik: Dr hab. med. Anna Wojas-Pelc

Dodatkowe słowa kluczowe:

twardzina skórna
patogeneza
przeciwciała
uraz
zaburzenia naczyniowe
cytokiny

Additional key words:

skin scleroderma
pathogenesis
antibodies
injury
vessel disorders
cytokines

Patogeneza twardziny skórnej jest nieznana. U chorych wykazano zaburzenia dotyczące układu naczyniowego, metabolizmu tkanki łącznej oraz odczynowości humoralnej i komórkowej. W różnych postaciach twardziny skórnej stwierdzano przeciwciała przeciwciałowe u 30 do 80% chorych. Znacznie częściej występowały u chorych z uogólnionymi zmianami skórnymi i twardziną liniową niż w postaciach plackowatych. W badaniach własnych u 28,5% chorych wykryliśmy występowanie przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi*. Uważa się, że najwcześniejszą zmianą w obrazie histologicznym twardziny zarówno układowej jak i skórnej, jest uszkodzenie komórek śródbłonna i proliferacja komórek w obrębie błony środkowej małych tętnic, co doprowadza do przewlekłego niedokrwienia. W ostatnich latach pojawiło się kilka interesujących doniesień dotyczących zmian funkcjonalnych komórek śródbłonna, prowadzących do zaburzeń napięcia mięśni gładkich naczyń. U osób predysponowanych genetycznie wolne rodniki mogą powodować powstawanie zmian twardzinowych poprzez uszkodzanie komórek śródbłonna i pobudzanie proliferacji fibroblastów. Proces fibrozy w twardzinie skórnej dotyczy początkowo przestrzeni okolonaczyniowej. Dochodzi do odkładania się składników tkanki łącznej, w tym głównie kolagenu typu I i III. Pobudzenie czynności fibroblastów i nadmierne odkładanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej we wszystkich postaciach twardziny jest zjawiskiem wtórnym związanym z obecnością w ustroju czynników stymulujących. Do czynników tych można zaliczyć substancje uwalniane z płytek: PDF, bFGF i TGF β oraz niektóre cytokiny. W surowicy chorych z twardziną skórną stwierdzano podwyższone poziomy IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 oraz IL-8. W badaniach stwierdzono obniżone wytwarzanie i aktywność kolagenaz, choć większość autorów sugeruje, że to raczej inhibitory tkankowych metaloproteinaz odgrywają znaczącą rolę w procesie włóknienia. Analiza powyższych badań pozwala przypuszczać, że nadmierne włóknienie tkanek w różnych postaciach twardziny może zale-

The pathogenesis of skin scleroderma (LS) is still unknown. Disturbances of vessels system, connective tissue metabolism and humoral and cellular immunological response is observed. Antinuclear antibodies are detected in 30-80% of patients with different types of skin scleroderma. They are present more often in patients with disseminated lesions and linear type of LS compared to morphoea au plaque. In our own analysis 28.5% of patients had also antibodies directed against *Borrelia burgdorferi*. It is believed that the injury of endothelial cells and proliferation in medial part of small vessels - which both lead to chronic ischemia - are the earliest disturbances observed in histopathological examination of the skin taken from systemic as well as from skin scleroderma patients. During last few years, there were some interesting reports concerning functional changes of endothelial cells which led to disturbances in tension of vessels smooth muscles. Free radicals - in genetically predispose people - can also provoke scleroderma lesions through their injury action on endothelial cells and stimulation of fibroblasts. In morphoea, the process of fibrosis begins around vessels. Deposition of connective tissue matrix is observed, especially collagen type I and III. This stimulation of fibroblasts as well as accumulation of connective tissue matrix are secondary to some stimulatory factors. These are: PDF, bFGF, TGF β and some cytokines. In morphoea patients serum levels of IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 and IL-8 were elevated. In literature, levels and production of collagenases were decreased, although more authors say that tissue inhibitors of metalloproteinases are the main factor in fibrosis. The analysis of data tends to suspicion that enormous fibrosis observed in different types of scleroderma can be the result of increased production of collagen and other components of connective tissue as well as their incomplete degradation. Presented clinical and laboratory data show how many different factors influence etiopathogenesis of morphoea.

Adres do korespondencji:
Dr hab. n. med. Anna Wojas-Pelc
Katedra i Klinika Dermatologii
CM UJ
31-501 Kraków, ul. Kopernika 19

żeć zarówno od wzmożonej produkcji kolagenu i innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, jak i ich niepełnej degradacji. Przedstawione w pracy badania kliniczne i doświadczalne dotyczące twardziny skórnej obrazują różnorodność czynników etiologicznych prowadzących do powstania stwardnień.

Etiologia twardziny skórnej (LS) jest nieznana. Znakomita większość badań dotyczących patogenezы twardziny dotyczy chorych z układową postacią schorzenia. W obu odmianach twardziny zbliżone zaburzenia dotyczą układu naczyniowego, metabolizmu tkanki łącznej oraz zaburzeń odczynowości humoralnej i komórkowej.

Christianson i wsp. badając 191 chorych z twardzina linią i plackowatą w 14 przypadkach uznali, że uraz mechaniczny miał związek z pojawieniem się ognisk twardziny [11]. Uraz mechaniczny może poprzedzać o tydzień do kilku miesięcy pojawienie się zmian skórnych [11]. Opisywano powstawanie zmian w miejscu nawet niewielkiego urazu, jakim było skaleczenie okolicy nadgarstka [88]. Ogniska twardziny skórnej pojawiały się w miejscu po podaniu szczepionki przeciwżółciowej, po zabiegach radioterapii, w miejscu po wykwitach ospy wietrznej [12, 16, 54, 67, 74, 79]. Kumagai w 1984 r. opisał przypadek chorej, u której po 7 latach od zabiegu powiększania piersi przy użyciu iniekcji parafiny powstało w obrębie piersi ognisko głębokiej twardziny skórnej [40]. Podobną zmianę opisał Byron u chorej, u której również wykonał zabieg powiększenia piersi [9]. Zmianom skórnym towarzyszyły objawy zespołu Sjögrena i dodatni odczyn Waller-Rose'go. Kolejne doniesienia dotyczą rozwoju głębokich ognisk twardziny skórnej w miejscu założenia implantu silikonowego po zabiegach amputacji gruczołu piersiowego [17, 45].

Murell uważa, że wolne rodniki, których źródłem mogą być zarówno czynniki zewnętrzne (np.: silikon, alkohol, nikotyna, promienie słoneczne i rentgenowskie), jak wewnętrzne (ogniska niedokrwienia) mogą powodować u osób predysponowanych genetycznie powstawanie zmian twardzinowych poprzez uszkodzenie komórek śródbłonka i pobudzenie proliferacji fibroblastów [53]. Shakin i wsp. podkreślają znaczenie wolnych rodników w patogenezы LS [72]. Autorzy wykazali, że wysokie poziomy wolnych rodników w surowicy chorych z LS korelowały z progresją choroby i nasileniem stwardnień [72].

Aberer i wsp. u 5 spośród 10 chorych stwierdzili występowanie przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi*, podobne wyniki uzyskali także inni autorzy [1-4]. W badaniach własnych przeprowadzonych u 50 chorych z różnymi postaciami LS przeciwciała te stwierdziliśmy je u 28,5% chorych [86]. Berman i wsp. metodą immunofluorescencji bezpośredniej przy użyciu przeciwciał monoklonalnych stwierdzili obecność krętka w ogniskach *atrophoderma Pasini-Pierini* [7]. Dillon i wsp. przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) nie wykryli obecności krętka w skórnym postaciach twardziny [13]. Większość badań, zwłaszcza amerykańskich nie potwierdza roli *Borrelia burgdorferi* w wywoływaniu zmian typu LS [15, 22, 46, 73, 84]. Autorzy Ci uważają, że zjawisko to jest przypadkową koincydencją

w populacji o wyższej zachorowalności na boreliozę [15, 22, 46, 73, 84].

Uważa się, że najwcześniejszą zmianą w obrazie histologicznym twardziny zarówno układowej (SSc) jak i skórnej jest uszkodzenie komórek śródbłonka i proliferacja komórek w obrębie błony środkowej małych tętnic, co doprowadza do przewlekłego niedokrwienia [39, 55, 59, 91]. W ostatnich latach pojawiło się kilka interesujących doniesień dotyczących zmian funkcjonalnych komórek śródbłonka, prowadzących do zaburzeń napięcia mięśni gładkich naczyń. Są to badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych twardziny układowej [48, 70]. Komórki śródbłonka pod wpływem pewnych czynników rozszerzających naczynia (acetylocholina, bradykinina, adenozy-5-trójfosfataza [ATP], substancja P) mogą uwalniać substancje mające bezpośredni wpływ na komórki mięśniówki gładkiej naczyń (np. tlenek azotu [NO], prostacyklinę [PGI₂]) [26]. Uwalnianie tych substancji z komórek śródbłonka jest zależne od zmiany stężeń wolnych jonów wapnia (Ca²⁺) w ich cytoplazmie [48, 56]. Czynniki rozszerzające naczynia powodowały wzrost stężenia Ca²⁺ w komórkach śródbłonka pochodzących od zdrowej kontroli [51, 56]. Natomiast maksymalne stężenie wolnych jonów wapnia w komórkach śródbłonka (mierzone intensywnością fluorescencji) pod wpływem ATP, bradykininy oraz stężenie stabilnego analogu (odpowiednika) prostacykliny PGI₂ (Iloprost) było znacznie niższe u myszy TSK w stosunku do kontroli [49]. Także rozszerzenie aorty pod wpływem ATP i acetylocholiny było znacznie mniejsze u chorych myszy. Autorzy sugerują, że być może dystrybucja receptorów dla czynników rozszerzających naczynia na badanych komórkach śródbłonka (komórki śródbłonka aorty myszy TSK) jest nierównomierna lub ich ekspresja jest zmienna. Stwierdzono w badaniu zwiększone uwalnianie NO przez komórki śródbłonka myszy TSK, może powodować powstawanie wolnych rodników uszkodzających komórki śródbłonka [49, 87]. W obu postaciach twardziny stwierdzono apoptozę komórek śródbłonka [39, 71]. Obserwowane w badaniu ultrastrukturalnym zwielokrotnienie warstw błony podstawnej włókniczek żylnych jest wynikiem wielokrotnego obumierania jednych komórek śródbłonka i rozwoju nowych komórek śródbłonka (regeneracja) [10, 24, 41, 47]. W twardzinie skórnej wykazano podwyższone poziomy krążących naczyniowych cząstek adhezyjnych (sVCAM, sE-selectin) [89], ale także zwiększoną ekspresję tych cząsteczek, zarówno w skórze zmienionej jak i niezmięnionej twardzinowo, co może przemawiać za uogólnionym pobudzeniem układu naczyniowego w LS [38]. Zwężenie światła naczyń oraz zwolnienie przepływu krwi sprzyja tworzeniu zakrzepów poprzez aktywację płytek i uszkodzenie krwinek. Odczyn zapalny w miejscu uszkodzenia naczynia ulega nasileniu przez miejscowe uwalnianie mediatorów z płytek

krwi (PDF – *platelet derived growth factor*, TGFbeta – *transforming growth factor beta*), które wywierają silny efekt chemotaktyczny w stosunku do komórek zapalnych [29, 85]. Przy długotrwałym działaniu cytokin płytkowych dochodzi do blokady dopływu krwi, prowadząc do zaniku naczyń włosowatych (*capillary loss*) o charakterze nieodwracalnym, chociaż w części kapilarów komórki śródbłonkowe wykazują cechy regeneracyjne [10, 39, 41, 47].

Bezpośredni czynnik uszkodzający naczynia w twardzinie skórnej nie jest znany. Sugerowano, że podobnie jak w twardzinie układowej mogą to być przeciwciała przeciwko komórkom śródbłonka, ale może także prozapalne cytokiny odpowiedzialne za aktywację komórek śródbłonka [23, 38, 39, 71].

W ogniskach LS badanie immunohistochemiczne wykazało obniżony poziom białek MCP (*Membrane Cofactor Protein*) i DAF (*Decay Accelerating Factor*), które hamują tworzenie konwertaz dla składowych dopełniacza C3/C5. Uważa się, że niedobór tych białek w ogniskach LS poprzez zwiększenie poziomu komplementu może sprzyjać zwiększonej wrażliwości komórek śródbłonka na czynniki uszkodzające [82].

Proces fibrozy w twardzinie skórnej dotyczy początkowo przestrzeni około naczyniowej. Dochodzi do odkładania się składników tkanki łącznej, w tym głównie kolagenu typu I i III, co jest związane ze zwiększoną ekspresją mRNA dla tych kolagenów [18-20, 68]. Badanie mikroskopowo-elektronowe z użyciem przeciwciał przeciwko aminoproteptydowi prokolagenu typu I wykazało reakcję tych przeciwciał z włóknkami o szerokości 30 nm zlokalizowanymi w dolnych obszarach skóry właściwej. Użycie przeciwciał przeciwko aminoproteptydowi prokolagenu typu III wykazało reakcje z włóknkami o szerokości od 10 do 30 nm, znajdującymi się w środkowych i dolnych partiach skóry chorych z SSc i LS [57]. Wykazano także zwiększoną ekspresję fibronektyny w tkankach oraz w supernatancie z hodowli fibroblastów od chorych, a także zwiększoną syntezę glikozaminoglikanów [25, 52, 57]. Ekspresja tenascyny w ogniskach twardziny plackowatej była wzmożona w fazie zapalnej choroby i znacznie spadała w fazie włóknienia [27]. Fibroblasty od chorych z różnymi postaciami twardziny wykazywały także zwiększoną produkcję kolagenu typu I i III [30, 42, 57]. W twardzinie układowej odzwierciedleniem pobudzenia syntezy kolagenu jest zwiększony poziom w surowicy chorych aminoproteptydów prokolagenu typu III (PIIINP), co koreluje z aktywnością choroby [31, 90]. Sondergaard i wsp. wykazali podwyższone poziomy PIIINP oraz karboksypolipeptydów prokolagenu typu I (PICP), a także składnika macierzy zewnątrzkomórkowej – kwasu hialuronowego w surowicy oraz w płynie ze sztucznie wytworzonego pęcherza na obrzeżu stwardnienia skóry u chorych z twardziną układową [76]. Pozi-

my badanych markerów włóknienia były 100 razy wyższe w płynie pęcherzowym w stosunku do krwi, co zdaniem autorów wskazuje na ich pierwotne wytwarzanie w skórze chorych.

Należy podkreślić, że *in vitro* dochodzi do utraty zdolności do nadmiernej produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej przez fibroblasty chorych z twardziną po około 10-30 pasażu [43]. Sugeruje to, że pobudzenie czynności fibroblastów i nadmierne odkładanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej we wszystkich postaciach twardziny jest zjawiskiem wtórnym związanym z obecnością w ustroju czynników stymulujących.

Do czynników tych można zaliczyć wspomniane substancje uwalniane z płytek: PDF, bFGF i TGF-beta oraz niektóre cytokiny. Higley i wsp. stwierdzili podwyższony poziom TGF-beta w surowicy chorych z SSc i LS [32]. Autorzy zauważyli również, że ekspresja TGF-beta w skórze chorych była najbardziej nasiloną w miejscu wzmoczonej produkcji prokolagenu typu I. Badanie to potwierdziło wcześniejsze obserwacje Kulozic'a oraz Grunschwitz'a, którzy w skórze chorych z SSc, w otoczeniu naczyń krwionośnych stwierdzili kolokalizację mRNA dla TGF-beta i prokolagenu typu I [28,44]. Igarashi i wsp. w ogniskach twardziny skórnej stwierdzili wzmoczoną ekspresję genu dla czynnika wzrostu tkanki łącznej (*connective tissue growth factor*, CTGF) [34]. W surowicy chorych z twardziną skórną stwierdzano podwyższone poziomy interleukiny-1 (IL-1), interleukiny-2 (IL-2), interleukiny-4 (IL-4), interleukiny-6 [IL-6] oraz interleukiny-8 (IL-8) [35,37,69].

Część autorów postuluje, że obniżone wytwarzanie i aktywność kolagenazy (matrix metalloproteinasa-1 [MMP-1]) – którą stwierdzali w hodowli fibroblastów twardzinowych może być odpowiedzialna za nadmierne gromadzenie składników macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix* [ECM]) [78]. Inne metaloproteiny pochodzące z komórek śródbłonka mogą powodować degradację białek macierzy błony podstawnej (kolagenu typu IV i lamininy), umożliwiając kontakt limfocytów krwi obwodowej ze składnikami tej błony, co promuje dalszą syntezę składników ECM [60]. Większość autorów sugeruje, że to raczej inhibitory tankowych metaloproteinaz odgrywają znaczącą rolę w procesie włóknienia. Mattila i wsp. sugerują, że tankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP – *tissue inhibitor of metalloproteinases*) TIMP-3 oraz TIMP-1 i TIMP-2 odgrywają rolę w patogenezie włóknienia skóry w obu odmianach twardziny: układowej i skórnej [50]. Wykazali oni zwiększoną ekspresję mRNA dla TIMP-3 w fibroblastach ze skóry chorych z SSc i LS. Autorzy sugerują, że w przeciwieństwie do rozpuszczalnych postaci pozostających inhibitorów tankowych (TIMP-1, TIMP-2), TIMP-3 łącząc się z różnymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej zabezpiecza je przed działaniem metaloproteinaz, co hamuje ich degradację [50].

Analiza powyższych badań pozwala przypuszczać, że nadmierne włóknienie tkanek w różnych postaciach twardziny może zależeć zarówno od wzmoczonej produkcji

kolagenu i innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, jak i ich niepełnej degradacji.

W różnych postaciach twardziny skórnej w zależności od użytego do badań substratu stwierdzano przeciwciała przeciwdrożdżowe u 30 do 80% chorych [21,61,62,81]. Znacznie częściej wykrywano przeciwciała przeciwdrożdżowe, jeżeli jako substratu używano ludzkie linie komórkowe HeLa (67%) lub linie ludzkich komórek raka krtani HEp-2 (46%) [21,77]. Według Falangi i wsp. przeciwciała u chorych z LS mogą być okresowo niewykrywalne [20]. Znacznie częściej stwierdzano je u chorych z uogólnionymi zmianami skórnymi i twardziną liniową niż w postaciach plackowatych [21,61,81]. Diaz-Perez i wsp. stwierdzili ANA u 3/14 chorych ze zniekształcającą głęboką twardziną u dzieci [14]. Miiana przeciwciał stwierdzanych u chorych były zwykle niskie i wahały się od 1:40 do 1:320 – były to najczęściej przeciwciała dające homogenny, ziarnisty, a najrzadziej jąderkowy typ świecenia [21,58]. Były to na ogół przeciwciała bez określonej swoistości. Pojawily się także zauistyczne doniesienia o obecności swoistych dla twardziny układowej przeciwciał przeciwdrożdżowych w przypadkach twardziny skórnej (ACA, Sci-70, U1-RNP) [8,64]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na obecność przeciwciał przeciwhistonowych u chorych z twardziną skórną. Sato i wsp. wykrywali je u 87% chorych z uogólnioną twardziną skórną, u 32% z twardziną liniową i u 25% chorych z postacią plackowatą [65]. Według innych badaczy występowały one u 15% dzieci z twardziną skórną [61]. Dane z literatury wskazują, że nawet u 60% chorych z LS występują przeciwciała przeciw jednoniciowemu kwasowi nukleinowemu ssDNA, które jednak wykrywa się także często w wielu innych chorobach autoimmunologicznych [21,65]. Pod koniec lat 90-tych zwrócono uwagę na obecność w surowicy chorych z ograniczoną do skóry postacią twardziny przeciwciał przeciw fibryllinie-1 [6]. Białko to jest głównym składnikiem mikrofibryli macierzy zewnątrzkomórkowej. Arnett i wsp. stwierdzili u 26-30% chorych z LS obecność przeciwciał przeciw fibryllinie-1 [6]. W naciekach zapalnych w zmianach skórnych w LS stwierdza się zarówno subpopulację limfocytów T jak i B [83]. Za pobudzeniem limfocytów B może przemawiać obecność w surowicy chorych z LS różnego typu przeciwciał krążących. Sato i wsp. wykazali u 49 chorych z uogólnioną, liniową i plackowatą twardziną podwyższony poziom krążącego receptora dla CD4 przy prawidłowym poziomie krążącego receptora dla CD8 [66].

W surowicach chorych z LS stwierdzono podwyższone poziomy cytokin: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 i krążącego receptora dla IL-2 [35-37].

Zwrócono uwagę, że komórki dendrytyczne skóry (DDC – *dermal dendritic cells*), które wykazują zdolności fagocytarne i wchodzić w skład układu immunologicznego skóry, mogą odgrywać rolę w procesie włóknienia w twardzinie skórnej [5,63,75]. Badanie przeprowadzone przez Aibę i wsp. [5] wykazało brak ekspresji tych komórek w ogniskach twardziny skórnej lub znaczne jej obniżenie w stosunku do kontroli, podobne

wyniki uzyskali inni badacze [5,75]. Gilmore i wsp. analizując biopsje z ognisk twardziny plackowatej wykazali, że wraz z ustępowaniem nacieków zapalnych i postępującym włóknieniem spada liczba komórek CD34+ DDC oraz poziom czynnika XIIIa+ DDC [27]. Podobnie zachowuje się jeden ze składników glikoproteinowych macierzy zewnątrzkomórkowej tenascyny, której ekspresja jest wzmocniona w fazie zapalnej i znacznie spada w fazie włóknienia [33].

Przedstawione w pracy badania kliniczne i doświadczalne dotyczące twardziny skórnej obrazują różnorodność czynników etiologicznych prowadzących do powstania twardnień.

Piśmiennictwo

1. Aberer E., Klade H., Stanek G. et al.: Borrelia burgdorferi and different types of morphea. *Dermatologica* 1991, 182, 145.
2. Aberer E., Neumann R., Stanek G.: Is localised scleroderma a Borrelia infection. *Lancet* 1985, 2, 273.
3. Aberer E., Stanek G.: Histological evidence for spirochetal origin of morphea and lichen sclerosus and atrophicus. *Am. J. Dermatopathol.* 1987, 9, 374.
4. Aberer E., Stanek G., Ertl M. et al.: Evidence for spirochetal origin of circumscribed scleroderma (morphea). *Acta Derm. Venereol.* 1987, 67, 225.
5. Aiba S., Tabata N., Ohtani H. et al.: CD34+ spindle shaped cells selectively disappear from the skin lesion of scleroderma. *Arch. Dermatol.* 1994, 130, 593.
6. Arnett F.C., Tan F.K., Uziel Y. et al.: Autoantibodies to the extracellular matrix microfibrillar protein, fibrillin-1 in patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1999, 12, 2656.
7. Berman A., Berman G.D., Winkelmann R.K.: Atrophoderma (Pasinetti-Pierini). Findings on direct immunofluorescent, monoclonal antibody and ultrastructural studies. *Int. J. Dermatol.* 1988, 27, 487.
8. Błaszczyk M., Jarząbek-Chorzelska M., Jabłoński S.: Związek między twardziną ograniczoną a układową. Czy badania immunopatologiczne są pomocne w ustalaniu przejścia twardziny skórnej w postać układową? *Przegl. Dermatol.* 2000, 2, 119.
9. Byron M.A., Venning V.A., Mowat A.G.: Post mammoplasty human adjuvant disease. *Br. J. Rheumatol.* 1984, 23, 227.
10. Chłbowska M., Toruń B., Siezieniewska Z. i wsp.: Ultrastrukturalne badania skóry i tkanki podskórnej w twardzinie ograniczonej. *Przegl. Dermatol.* 1991, 6, 343.
11. Christlanson H., Dorsey C., O'Leary P. et al.: Localized scleroderma: a clinical study of two hundred thirty-five cases. *Arch. Dermatol.* 1956, 74, 629.
12. Colver G.B., Rodger A., Mortimer P.S. et al.: Post irradiation morphea. *Br. J. Dermatol.* 1989, 120, 831.
13. Costenbader K.H., Kleavel R.I., Andersen R.J.: Eosinophilic phasciitis presenting as pitting edema of the extremities. *Am. J. Med.* 2001, 111, 318.
14. Diaz-Perez J.L., Connolly S.M., Winkelmann R.K.: Disabling pansclerotic morphea of children. *Arch. Dermatol.* 1980, 116, 169.
15. Dillon W.I., Saed G.M., Flivenson D.P.: Borrelia burgdorferi DNA is undetectable by polymerase chain reaction in skin lesions of morphea, scleroderma or lichen sclerosus et atrophicus of patients from North America. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995, 33, 617.
16. Drago F., Rampini P., Lugani C. et al.: Generalized morphea after antileptan vaccination. *Clin. Exp. Dermatol.* 1998, 23, 142.
17. Endo L.P., Edwards N.L., Longley S. et al.: Sili cone and rheumatic diseases. *Semin. Arthritis Rheum.* 1987, 17, 112.
18. Fajardo L.F., Prionas S.D., Kwan H.H. et al.: Transforming growth factor beta induced angiogenesis in vivo with a threshold pattern. *Lab. Invest.* 1996, 74, 600.
19. Falanga V., Julien J.: Observations on the potential role of transforming growth factor-β in cutaneous fibrosis: systemic sclerosis, transforming growth factor-β. [W:] *Chemistry, Biology and Therapeutics*. K Piez, M. Sporn. New York Academy of Science, New York, 1990.
20. Falanga V., Medsger T.A. Jr., Reichlin M. et al.

- Linear scleroderma: clinical spectrum, prognosis and laboratory abnormalities. *Ann. Intern. Med.* 1986, 104, 849.
21. Falanga V., Medsger T.A. Jr., Reichlin M.: Antinuclear and anti-single-stranded DNA antibodies in morphea and generalized morphea. *Arch. Dermatol.* 1987, 123, 371.
 22. Fan W., Leonard C.L., Penneys N.S.: Absence of *Borrelia burgdorferi* in patients with localized scleroderma [morphea]. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995, 33, 682.
 23. Feghall C.A., Wright T.M.: Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 1997, 2, 12.
 24. Fleischmajer R., Perlish J.S.: Capillary alterations in scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1980, 3, 161.
 25. Fleischmajer R., Perlish J.S., Krieg T. et al.: Variability in collagen and fibronectin synthesis by scleroderma fibroblasts in primary culture. *J. Invest. Dermatol.* 1981, 76, 400.
 26. Furchgott R.F., Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, 288, 373.
 27. Gilbour T.K., Wilkinson B., Breit S.N. et al.: Analysis of dendritic cell populations using a revised histological staging of morphea. *Br. J. Dermatol.* 2000, 143, 1183.
 28. Gruschwitz M., Muller P., Sepp N. et al.: Transcription and expression of transforming growth factor type beta in skin of progressive systemic sclerosis: a mediator of fibrosis? *J. Invest. Dermatol.* 1990, 94, 197.
 29. Hart C.E., Bailey M., Curtis D.A.: Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all free PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 1990, 29, 166.
 30. Hatamochi A., Ono M., Arakawa M. et al.: Analysis of collagen gene expression by cultured fibroblasts in morphea. *Br. J. Dermatol.* 1992, 126, 216.
 31. Hickendorff L., Zachariae H., Bjerring P. et al.: The use of serologic markers for collagen synthesis and degradation in systemic sclerosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995, 32, 584.
 32. Higley H., Perschitte K., Chu S. et al.: Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor beta 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea, and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum.* 1994, 37, 278.
 33. Hsu S., Lee M.W., Carlton S. et al.: Nodular morphea in linear pattern. *Int. J. Dermatol.* 1999, 38, 529.
 34. Igarashi A., Nashiro K., Kikuchi K. et al.: Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid and other fibrotic skin disorders. *J. Invest. Dermatol.* 1996, 106, 729.
 35. Ihn H., Sato S., Fujimoto M. et al.: Demonstration of interleukin-8 in serum samples of patients with localized scleroderma [letter]. *Arch. Dermatol.* 1994, 130, 1327.
 36. Ihn H., Sato S., Fujimoto M. et al.: Clinical significance of serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with localized scleroderma. *Br. J. Dermatol.* 1996, 134, 843.
 37. Ihn H., Sato S., Fujimoto M. et al.: Demonstration of interleukin-2, interleukin-4 and interleukin-6 in sera from patients with localized scleroderma. *Arch. Dermatol. Res.* 1995, 287, 193.
 38. Jones S.M., Mathew C.M., Dixey J. et al.: VCAM-1 expression on endothelium in lesions from cutaneous lupus erythematosus is increased compared with systemic and localized scleroderma. *Br. J. Dermatol.* 1996, 135, 678.
 39. Kahaleh M., Fan P.S.: Mechanism of serum mediated endothelial injury in scleroderma: identification of granular enzyme in scleroderma skin and sera. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1997, 83, 32.
 40. Kamugali Y., Shiokawa Y., Medsger A.T. et al.: Clinical spectrum of connective tissue disease after cosmetic surgery. *Arthritis Rheum.* 1984, 27, 1.
 41. Kazandjian S., Flessinger J.N., Camilleri J.P. et al.: Endothelial cell renewal in skin of patients with progressive systemic sclerosis [PSS]. An in vitro autoradiographic study. *Acta Derm. Venereol. [Stockh]* 1982, 62, 425.
 42. Krieg I., Luderschmidt C., Weber L. et al.: Scleroderma fibroblast: some aspects of in vitro assessment of collagen synthesis. *Arch. Dermatol. Res.* 1981, 270, 263.
 43. Krieg T., Perlish J.S., Fleischmajer R. et al.: Collagen synthesis in scleroderma: selection of fibroblast populations during subcultures. *Arch. Dermatol. Res.* 1985, 277, 373.
 44. Kulozik M., Hogg A., Lankat-Buttgereit B. et al.: Co-localisation of transforming growth factor beta with alpha 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* 1990, 86, 917.
 45. Lazar A.P., Laraz P.: Localized morphea after silicone gel breast implantation; more evidence for a cause-and-effect relationship. *Arch. Dermatol.* 1991, 127, 263.
 46. Lecerf V., Bagot M., Revuz J. et al.: *Borrelia burgdorferi* and localized scleroderma. *Arch. Dermatol.* 1989, 125, 297.
 47. Majewski S.: Zmiany naczyniowe i zaburzenia immunologiczne w twardzinie - ich wzajemne powiązania. *Praca habilitacyjna*, AM Warszawa 1988.
 48. Marie I., Beny J.L.: Calcium imaging of murine thoracic aorta endothelium by confocal microscopy reveals inhomogenous distribution of endothelial cells responding to vasodilator agents. *J. Vasc. Res.* 2002, 39, 260.
 49. Marie I., Beny J.L.: Endothelial dysfunction in murine model of systemic sclerosis: tight skin mice-1. *J. Invest. Dermatol.* 2002, 119, 1379.
 50. Mattila L., Alrola K., Ahonen M. et al.: Activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 [TIMP-3] mRNA expression in scleroderma skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 110, 416.
 51. Menton D.N., Hess R.A.: The ultrastructure of collagen in dermis of tight-skin [TSK] mutant mice. *J. Invest. Dermatol.* 1980, 74, 139.
 52. Moller R., Serup J., Ammitzbohl T.: Glycosaminoglycans in localized scleroderma [morphea]. *Connect. Tissue Res.* 1985, 13, 227.
 53. Murrell D.F.: A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993, 28, 78.
 54. Neill S.M., Nicholl J.J., Hanham I.W.F. et al.: Localized morphea at site of previous radiotherapy. *Br. J. Dermatol.* 1988, 118, (Suppl.), 110.
 55. O'Leary P., Montgomery H., Ragsdale W.: Dermatohistopathology of various type of scleroderma. *Arch. Dermatol.* 1957, 75, 78.
 56. Olshi H., Budel S., Schuster A. et al.: Cytosolic free calcium in smooth muscle and endothelial cells in an intact arterial wall from rat mesenteric artery in vitro. *Cell Calcium* 2001, 30, 261.
 57. Perlish J.S., Lemlich G., Fleischmajer R.: Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.* 1988, 90, 48.
 58. Peterson L.S., Nelson A.M., Su W.O.: Classification of morphea [localized scleroderma]. *Mayo Clin. Proc.* 1995, 50, 1068.
 59. Prescott R.J., Freemont A., Jones C.: Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J. Pathol.* 1992, 166, 255.
 60. Raza S.L., Cornelius L.A.: Matrix metallo-proteinases: pro and anti-angiogenic activities. *J. Invest. Dermatol.* 2000, 115, 47.
 61. Rosenberg A.M., Uziel Y., Krafchik B.R. et al.: Antinuclear antibodies in children with localized scleroderma. *J. Rheumatol.* 1995, 12, 2337.
 62. Roslińska D., Błaszczuk M., Jurkowska-Sadowska I.: Twardzina ograniczona u dzieci w świetle własnych obserwacji. *Przegl. Dermatol.* 1993, 6, 503.
 63. Rowden G.: Macrophage and dendritic cells of human dermis. [w:] *Skin immune system [SIS]*. CRC Press, Boca Raton, 1997, 109.
 64. Ruffati A., Peserico A., Glorioso S. et al.: Anticentromere antibody in localized scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1986, 15, 637.
 65. Sato S., Fujimoto M., Ihn H. et al.: Antigen specificity of antihistone antibodies in localized scleroderma. *Arch. Dermatol.* 1994, 130, 1273.
 66. Sato S., Fujimoto M., Kikuchi K. et al.: Soluble CD4 and CD8 in serum from patients with localized scleroderma. *Arch. Dermatol. Res.* 1996, 288, 358.
 67. Schaffer J.V., Carroll C., Dvoretzky I. et al.: Postirradiation morphea of the breast presentation of two cases and review of the literature. *Dermatology* 2000, 200, 67.
 68. Scharfetter K., Lankat-Buttgereit B., Krieg T.: Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in situ hybridization. *Eur. J. Clin. Invest.* 1988, 18, 9.
 69. Schmidt J.A., Mizel S.B., Cohen D. et al.: Interleukin-1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J. Immunol.* 1982, 128, 2177.
 70. Sgonc R.: The vascular perspective of systemic sclerosis of chickens, mice and men. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999, 120, 169.
 71. Sgonc R., Gruschwitz M.S., Dietrich H. et al.: Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J. Clin. Invest.* 1996, 98, 785.
 72. Shahin A.A., Esmat S.M., Shaker O.G. et al.: Role of the free radical release process in the pathogenesis of morphea in contrast to systemic sclerosis. *Mod. Rheumatol.* 2001, 11, 321.
 73. Silny W., Plusa T., Stępień B. et al.: Wyniki oznaczeń przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* u chorych na twardzinę ograniczoną. *Pol. Tyg. Lek.* 1996, 23-26, 329.
 74. Singh J., Beck G.A.: Morphea following chicken pox. *Br. J. Dermatol.* 1975, 93, (Suppl.), 43.
 75. Skobieranda K., Helm K.F.: Decreased expression of the human progenitor cell antigen [CD34] in morphea. *Am. J. Dermatopathol.* 1995, 17, 471.
 76. Sondergaard K., Heckendorff L., Risteli L. et al.: Increased levels of type I and III collagen and hyaluron in scleroderma skin. *Br. J. Dermatol.* 1997, 136, 47.
 77. Takahera K., Morol Y., Nakabayashi Y. et al.: Antinuclear antibodies in localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1983, 26, 612.
 78. Takeda K., Hatamochi A., Ueki H. et al.: Decreased collagenase expression in cultured scleroderma fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1994, 103, 359.
 79. Trattner A., Figer A., David M. et al.: Circumscribed scleroderma induced by postlumpectomy radiation therapy. *Cancer* 1991, 68, 2131.
 80. Uziel Y., Krafchik B.R., Feldman B. et al.: Serum levels of soluble interleukin-2 receptor. A marker of disease activity in localized scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1994, 37, 898.
 81. Uziel Y., Krafchik B.R., Silverman E.D. et al.: Localized scleroderma in childhood: a report of 30 cases. *Semin. Arthritis Rheum.* 1994, 5, 328.
 82. Venneker G.T., Das P.K., Naafs B. et al.: Morphea lesions are associated with aberrant expression of membrane cofactor protein and decay accelerating factor in vascular endothelium. *Br. J. Dermatol.* 1994, 131, 237.
 83. Whittaker S.J., Smith N.P., Jones R.R.: Solitary morphea profunda. *Br. J. Dermatol.* 1989, 120, 431.
 84. Wienecke R., Schlupen E.M., Zochling N. et al.: No evidence for *Borrelia burgdorferi*-specific DNA in lesions of localized scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 1995, 104, 23.
 85. Wojas-Pelc A.: Korelacje kliniczne wybranych parametrów odczynowości humoralnej i komórkowej w twardzinie układowej. *Praca doktorska*, CM UJ Kraków, 1995.
 86. Wojas-Pelc A., Szybińska-Wielowlejska D., Kieltyka A.: Obecność przeciwciał przeciwjadrowych i przeciw *Borrelia burgdorferi* u chorych z twardziną plackową, liniową głęboką pierwotnie zanikową Pasi-ni-Pierini. *Przegl. Lek.* 2002, 59, 898.
 87. Yamamoto T., Katayama I., Nishioka K.: Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthases expression in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.* 1998, 25, 314.
 88. Yamanaka C.T., Gibbs N.F.: Trauma-induced linear scleroderma. *Cutis* 1999, 63, 29.
 89. Yamane K., In H., Kubo M. et al.: Increased serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 and E-selectin in patients with localized scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000, 42, 64.
 90. Zachariae H., Bjerring P., Halkler-Sorensen L. et al.: Skin scoring in systemic sclerosis - a modification. Relations to subtypes and the aminoterminal propeptide of type III procollagen [PIIINP]. *Acta Derm. Venereol. [Stockh]* 1994, 74, 444.
 91. Zweffler A.J., Trinka P.: Occlusive digital artery disease in patients with Raynaud's phenomenon. *Am. J. Med.* 1984, 77, 995.