

VILNIAUS UNIVERSITETAS
VILNIAUS UNIVERSITETO EKSPERIMENTINĖS IR KLINIKINĖS
MEDICINOS INSTITUTAS

Arvydas Rimkevičius

ODOS KRAUJAGYSLIŲ IR JUNGIAMOJO AUDINIO PAŽEIDIMAI
SERGANT SISTEMINE SKLEROZE
(HISTOPATOLOGINIAI IR IMUNOHISTOCHEMINIAI BIOPTATŲ
TYRIMAI)

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, medicina (07 B),
skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas (B 580)
Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2002-2009 metais Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institute.

Disertacija ginama eksternu.

Prof. habil. dr. Zygmunt Mackiewicz, (Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580).

Konsultantas:

Prof. habil. dr. Algirdas Venalis (Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B, skeletas, raumenų sistema, reumatologija, judėjimas - B 580).

Tekste naudojamų trumpinių sąrašas

- α -SMA – lygiųjų raumenų alfa aktinas (smooth muscle actin alpha)
- ACA – anticentromerinis antikūnas (anticentromere antibody)
- AIF – priešūždegiminis veiksnys (anti-inflammatory factor)
- ANA – antikūnas prieš branduolio komponentus (antinuclear antibody)
- CD4- diferenciacijos grupė 4 (Cluster of Differentiation 4)
- CD34 – diferenciacijos grupė 34 (Cluster of Differentiation 34)
- CD68 – diferenciacijos grupė 68 (Cluster of Differentiation 68)
- CREST – : C - kalcinozė, R - Reino sindromas, E - ezofagopatija, S - sklerodaktilija, T – teleangiektazijos (calcinosis, Raynaud phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, telangiectasis)
- CTGF – jungiamojo audinio augimo veiksnys (connective tissue growth factor)
- DR3 – serotipinė HLA reprezentacija (serotypic representation of HLA)
- DR5 – serotipinė HLA reprezentacija (serotypic representation of HLA)
- eNOS – endotelinė azoto oksido sintazė (endothelial nitric oxide synthase)
- ET-1 – endotelinas -1 (endothelin-1)
- FGFb – bazinis fibroblastų augimo veiksnys (fibroblast growth factor basic)
- GVHD- transplantato atmetimo liga (Graft vs. Host Disease)
- GVH- transplantato atmetimas (graft-versus-host)
- HLA – žmogaus leukocitų antigenas (histocompatibility antigen)
- HSP47 – karščio šoko baltymas 47 (heat shock protein 47)
- ICAM – tarpląstelinė adhezijos molekulė (intercellular adhesion molecule)
- IGF-1- į insuliną panašus augimo veiksnys -1 (insulin-like growth factor-1)
- IL-1- interleukinas 1 (interleukin 1)
- La(SSB)- antikūnai prieš branduolį (antinuclear antibodies)
- MCP-1- monocitų chemotaktinis baltymas -1 (monocyte chemotactic protein-1)
- MIF-makrofagų migraciją slopinantis veiksnys (macrophage migration inhibitory factor)

MIP-1a – makrofagų uždegiminis baltymas -1a (macrophage inflammatory protein-1a)

MMP- matrikso metaloproteinazės (matrix metalloproteinase enzymes)

PBS – fiziologinis tirpalas su fosfatiniu buferiu (phosphate buffered saline)

PDGF- trombocitų sintezuojamas augimo veiksnys (platelet-derived growth factor)

PM-Scl- polimiozito/sklerodermos autoantigenas 1 (polymyositis/scleroderma autoantigen 1)

PN-1- proteazė neksinas 1 (protease nexin- 1)

Ro(SSA)- antikūnai prieš branduolio komponentus (antinuclear antibodies)

RP – Reino sindromas (Raynaud’s Phenomenon)

SCF – kamieninių ląstelių veiksnys (stem cell factor)

Scl- 70 – anti topo- izomerazės antikūnas (anti topo-isomerase antibody)

SRV – sisteminė raudonoji vilkligė (systemic lupus erythematosus)

SSc – sisteminė sklerozė (systemic sclerosis)

TEM – peršviečiantis elektroninis mikroskopas (transmission electron microscope)

TGF-β – transformuojantis augimo veiksnys beta (transforming growth factor beta)

TIMP – audinių metaloproteinazių inhibitorius (tissue inhibitor of metalloproteinases)

TNF- naviko nekrozės veiksnys (tumor necrosis factor)

VCAM – kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė (vascular cell adhesion molecule)

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (vascular endothelial growth factor)

VEGFR – kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptoriai (vascular endothelial growth factor receptors)

vWF – von Willebrand’o veiksnys (von Willebrand factor)

Turinys

I. Įžanga	7
II. Darbo aktualumas.....	8
III. Darbo tikslas ir uždaviniai	9
IV. Literatūros apžvalga	11
IV.1 Sistemine sklerozė (sklerodermija) - SSc.....	11
IV.1.1. Sisteminės sklerozės patogenezė.....	12
IV.1.2. Endoteliocitų vaidmuo sergant SSc.....	13
IV.1.3. Fibroblastų vaidmuo SSc patogenezėje.....	14
IV.1.4. Imuniniai sutrikimai sergant SSc.....	15
IV.1.5. Makrofagų vaidmuo sergant SSc.....	17
IV.1.6. Putliųjų ląstelių vaidmuo sergant SSc	17
IV.1.7. Endoteliocitų, fibroblastų bei imunokompetentinių ląstelių santykiai sergant SSc.....	18
IV.1.8. Vaskulitai sergant SSc	18
IV.2. Reino sindromas (Raynaud’s Phenomenon) - RP	19
IV.3. Sistemine raudonoji vilkligė – SRV	19
V. Tyrimo medžiaga ir metodai.....	22
VI.1. Tiriamosios ir palyginamųjų grupių ligonių odos biopsijos.....	22
V.2. Tyrimo metodai.....	24
V.2.1. Histopatologiniai tyrimai: šviesos ir elektroninė mikroskopija.....	24
V.2.2. Histocheminiai tyrimai	24
V.2.3. Imunohistocheminiai (IHC) tyrimai	24
V.2.4. Elektroninis mikroskopinis tyrimas	25
V.2.5. Mikroskopinio vaizdo analizė.....	26
V.2.6. Statistinė rezultatų analizė	26
VI. Tyrimų rezultatai	27
VI.1. SSc ligonių histopatologinio tyrimo duomenys lyginant su SRV ir RP ligonių	27

VI.2. SSc ligonių odos histocheminės analizės duomenys, lyginant su SRV ir RP ligonių ir kontrole	36
VI.2.1. Fibrozės skirtumai SSc, SRV ir RP ligonių odoje po dažymo pikrosiriusu	36
VI.2.2. Odos putliųjų ląstelių nudažytų toluidino mėliu analizė sergančių SSc, SRV ir RP odoje lyginant su kontrole	40
VI.3. Imunohistocheminės analizės duomenys	43
VI.3.1. von Willebrand'o veiksnio (IHC) lokalizacija SSc ligonių odoje.....	43
VI.3.2. CD68 imunohistocheminė lokalizacija SSc, SRV ir RP odoje, lyginant su kontrole.....	48
VI.3.3. Endotelio azoto oksido sintazės imunohistocheminė lokalizacija SSc, SRV ir RP ligonių ir kontrolinės grupės odoje.....	51
VI.3.4. Terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija odoje sergantiems SSc, SRV ir RP palyginus su kontrole.....	54
VI.3.5. CD34 imunolokalizacija SSc, SRV ir RP ligonių odoje lyginant su kontrole	57
VI.3.6. Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF-A) ekspresija odoje sergantiems SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.....	61
VI.3.7. Kraujagyslių augimo veiksnio receptorių (VEGFRs) imunolokalizacija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole	63
VII. Rezultatų aptarimas	71
VIII. Išvados	85
X. Disertacijos autoriaus publikacijos disertacijos tema	88
Padėka	112

I. Įžanga

Sisteminė sklerozė (SSc) - tai pirminė idiopatinė odos ir vidaus organų fibrozė, susijusi su sutrikusia fibroblastų bei smulkių kraujagyslių veikla. Kiekvienam SSc ligoniui kartu su įvairaus laipsnio fibroze ir kraujagyslių pažeidimu nustatomi imuniniai sutrikimai. Minėtų pažeidimų laipsnis dažniausiai būna nevienodas. Pilnai nežinoma, kuris iš išvardintų pažeidimų ligą inicijuoja, o kuris atsiranda kaip pasekmė. Kraujagyslių pakitimai ir endotelio pažeidimas paprastai stebimi jau ankstyvoje SSc stadijoje. Sergant SSc vyrauja du klinikiniai procesai: 1 - jungiamojo audinio išvešėjimas, lydymas organų parenchimos atrofijos; 2 - išemija dėl kraujagyslių sklerozės bei vėlesnės jų atrezijos. Ikiklinikinės SSc stadijos diagnozuoti beveik neįmanoma, tuo tarpu ankstyvos gydymo priemonės galėtų būti efektyvios gerinant gydymo rezultatus. Kol kas visiškai pagydyti nuo SSc dar neįmanoma. Šios ligos biologinio proceso gilesnis pažinimas galėtų atverti naujas gydymo galimybes.

Pasaulyje per metus SSc susergera apie 20 milijonų žmonių (Karassa, Ioannidis 2008), Lietuvoje - keliasdešimt žmonių. Ligą provokuoja daugybė veiksnių: peršalimas, nepalankios aplinkos sąlygos, vibracija, darbas plastmasių pramonėje, ypač su poliviniliniaiis spiritais. Turi reikšmės ir genetiniai veiksniai: aptinkamas šeiminis sergamumas, nustatytas ryšys su II klasės ŽLA (DR3, DR5).

Sergant SSc pažeidžiami įvairūs organai, todėl ši liga domina keletą specialybių gydytojus. Pats SSc etiologija, sudėtinga patogenezė ir bloga prognozė daro SSc aktuali tyrimų objektu.

II. Darbo aktualumas

Sisteminės uždegiminės jungiamojo audinio ligos priklauso reumatinėms ligų grupei. Tai ligos, kurioms būdingas sisteminis jungiamojo audinio ir judamojo aparato pažeidimas. Jos pasižymi įvairialype klinika, etiologija ir patogenezė. Sisteminiams jungiamojo audinio ligoms priklauso šiame darbe nagrinėjamos sisteminė sklerozė (SSc) bei sisteminė raudonoji vilkligė (SRV). Šioms ligoms diagnozuoti taikomas ir biopsinės medžiagos histologinis tyrimas, nors jo duomenys nėra tarp šių ligų pagrindinių diagnostinių kriterijų. Tokiame tyrime svarbią reikšmę vaidina kraujagyslių pažeidimo histopatologinių požymių nustatymas.

Labai svarbu, siekiant laiku skirti tinkamą gydymą, ankstyvose ligos stadijos atskirti SSc nuo RP ir SRV. Taip pat labai svarbu žinoti patologinių procesų vystymosi eiliškumą, kuri ir bando nušviesti šis tyrimas.

Lyginant su kitomis jungiamojo audinio ligomis, SSc yra reliatyviai retas susirgimas: sergamumas apie 105-290 sergančiųjų milijonui gyventojų, susirgimo dažnis nuo 2,6 iki 28 atvejų milijonui gyventojų per metus (Silman 1997; Maricq et al. 1989; Medsger et al. 1971; Altman et al. 1991; Silman et al. 1988; Hausteina, Albrecht 1993; Mayes et al. 2003). Metinis mirštamumas nuo SSc: 0,8-3,8 mirčių milijonui gyventojų (Medsger 1985). Išgyvenamumas 5 ir 10 metų atitinkamai yra apie 86% ir 69% (Hesselstrand et al. 1998). Dauguma pacientų miršta nuo kardiopulmoninių ir renalinių komplikacijų. Dėl blogos SSc prognozės ir nepakankamai efektyvaus gydymo, šios ligos nauji tyrimai lieka labai aktualūs.

III. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas – nustatyti kraujagyslių pažeidimo ir fibrozės vystymosi eiliškumą, ištiriant kraujagyslių pakitimus odoje ir jungiamajame audinyje sergantiems SSc, su šiai patologijai būdinga kraujagyslių atrezija, bei palyginant su kitomis būklėmis, kurių metu kraujagyslių atrezijos nėra (SRV), bei su būklėmis, kurioms būdingas kraujagyslių funkcinis nestabilumas (Reino sindromas).

Uždaviniai:

1. Nustatyti vyraujančius histopatologinius pokyčius ir jų vystymosi eiliškumą odoje sergantiems SSc lyginant su pokyčiais sergantiems SRV ir RP.
2. Nustatyti histologinius, ultrastruktūrinius, histocheminius ir imunohistocheminius žymenis, geriausiai atspindinčius ankstyvą ir vėlyvą SSc stadijas ir palyginti šių žymenų ekspresiją odoje su jų ekspresija SRV ligonių odos biopsijose.
3. Palyginti kraujagyslių sienelės ir perivaskulinių audinių uždegiminio infiltrato ląstelinę sudėtį ankstyvoje ir vėlyvoje SSc ir SRV stadijose.
4. Palyginti SSc ir SRV ligų vėlyvą stadiją, lydimą fibrozės, ir/ar kraujagyslių atrezijos išreikštumą, siekiant nustatyti šių ligų patogenezės eigos skirtumus.

Darbo naujumas:

1. Imunohistocheminių endotelio žymenų eNOS, VEGF, VEGFR ir vWF analizė padeda nustatyti ankstyvus ryškius kraujagyslių endotelio pažeidimus ir ryškiai padidintą kraujagyslių pralaidumą SSc ligonių odoje ir diferencijuoti juos nuo SRV ir RP.
2. Imunohistocheminių endotelio žymenų eNOS, VEGF, VEGFR ir vWF analizė padeda diferencijuoti SSc nuo SRV ir RP ankstyvoje ligos stadijoje.

3. Nustatėme, kad ankstyvosios SSc stadijos patogenezėje odoje vyrauja smulkių kraujagyslių endotelio pažeidimai, o histologiniai ir ultrastruktūriniai fibroblastų pažeidimo požymiai pradeda ryškėti jau po kraujagyslių endotelio pažeidimo.

Ginamieji teiginiai:

1. SSc vystymosi metu smulkių kraujagyslių pažeidimas odos biopsijose atsiranda anksčiausiai, audinių fibrozavimas atsiranda vėliau ir rodo toli pažengusią ligą.
2. Organizmo homeostazę užtikrinančių sistemų pastangos atstatyti pažeistas SSc eigoje kraujagysles yra ženklios, tačiau dėl kol kas nenustatytų priešasčių kraujagyslių tinklas neatsistato, o audinio fibrozė toliau progresuoja.
3. Naudojant imunohistocheminius kraujagyslių pažeidimo žymenis odos biopsiatuose galima nustatyti ankstyvuosius kraujagyslių pažeidimus, būdingus SSc, SRV ir RP.

IV. Literatūros apžvalga

IV.1 Sisteminė sklerozė (sklerodermija) - SSc

SSc - tai kliniškai heterogeniška sisteminė liga, pažeidžianti odą, vidaus organus ir kraujagyslių sieneles. Šiai ligai būdingi mikrocirkuliacijos ir imuninės sistemos sutrikimai bei žymios kolageno ir kitų jungiamojo audinio matrikso medžiagų sankaupos (Doran, Veale 2008, Varga 2008).

Pirmą kartą detaliai į sklerodermą panašią ligą aprašė Curzio dar 1754 metais. 1847 metais Gintrac jau pasiūlė terminą skleroderma. Sisteminė sklerozė - tiklesnis šios ligos pavadinimas, nes procesas pasireiškia ne vien dermoje. Pagal šiuolaikinį apibrėžimą, SSc - tai pirminė idiopatinė odos ir vidaus organų fibrozė, susijusi su padidėjusia kolageno sinteze dėl sutrikusios fibroblastų veiklos.

Amerikos reumatologų kolegija apibrėžė SSc kriterijus, kurių jautrumas 97%, specifiškumas 98 % (Subcommittee for SSc, 1980).

Reino sindromas stebimas 90-98% SSc pacientų (Maricq et al. 1983). Jis gali aplenkti SSc daugeliu metų ir gali būti SSc išsivystymo perspėjimu, ypač jei pasireiškia kartu su nago guolio kapiliarų anomalijomis ir autoantikūnais prieš branduolio baltymus - ANA radimu (Maricq et al. 1983; Silman 1991).

Sergant SSc išskiriamos trys odos pažeidimo fazės:

1. Pabrinkimo (edemos) – trumpalaikė stadija kai pabrinksta pėdos, plaštakos, kartais nežymiai veidas;
2. Induracijos stadijoje - odoje pradeda kauptis padidintas kiekis jungiamojo audinio, oda storėja, plaštakų ir pėdų pirštų oda įtempta, blizganti, nesuimama į raukšlę. Vėliau sklerozė plečiasi į dilbius, žąstus, kaklą, blauzdas, šlaunis ir gali apimti visą kūną. Kartais procesas lieka lokalizuotas, tik iki blauzdų ar šlaunų vidurio.
3. Atrofijos stadijoje - oda plonėja, tampa panaši į pergamentą, dispigmentuota (tai ryškėja jau 2-oje stadijoje), pradeda vystytis

trofinės opos. Opos dažniausiai atsiranda blauzdose. Jų trukmė ilga, gijimas labai sunkus, persistuoja infekcija, gali atsirasti amiloidozė.

IV.1.1. Sisteminės sklerozės patogenezė

SSc patogenezė yra paini ir vis dar prastai išanalizuota.

Sergantiems SSc turi reikšmės ir genetiniai veiksniai (Mayes, Trojanowska 2007; Gutierrez-Roelens, Lauwerys 2008; Sargent et al. 2008). Labiausiai išreikštas genetinis veiksnys yra lytis. Kitas veiksnys – tai didysis audinių suderinamumo kompleksas (MHC). Rastas didesnis kiekis tam tikrų I ir II klasės MHC alelių, pvz. HLA Bw35, DR1, DR5 arba HLA1-B8-DR3 (Black, Welsh 1994). Kita vertus – DR5 DR3 ryšys su DRw52 dažnai siejamas su SSc kaip pirminės su šia liga asocijuotos MHC II klasės alelės. Taip pat nustatytas ryšys tarp B8-DR3-DRw52-DQB2 ir plaučių fibrozės. HLA DRw11 ir DQ seka yra susijusi su sunkia SSc eiga ir ACA (antikūnai prieš centromerus) pozityvumu (Morel et al. 1994). Grupės struktūriškai nesusijusių genų koduojamų baltymų produktų, tokių kaip komplemento komponentai (C2, B, C4A ir C4B), karščio šoko baltymas (HSP70), 21 hidroksilazė (CYP) ir tumor nekrozės veiksnys (TNF) demonstruoja didelį polimorfizmą (Reveille 1995). Studijose HLA C4A parodyta ryški MHC koreliacija su SSc (Reveille 1995).

Daugybė klinikinių SSc išraiškų daro šią ligą panašią į lėtinę transplantato atmetimo ligą (Graft vs. Host Disease). Ši hipotezė buvo dažnas diskusijų objektas prieš keletą metų. Buvo teigiama, kad SSc patogenezė susijusi su persistuojančia ląstelių mimikrija (Black, Stevens 1989), kai fetalinės ir galbūt kamieninės ląstelės migruoja per placentą į motinos kraujotaką (Schroder et al. 1974) ir jų dekadomis persistuojantis egzistavimas kraujotakoje veda prie ląstelių HLA II klasės molekulių pokyčių (Bianchi et al. 1996; Nelson et al. 1998; Arlett et al. 1997).

IV.1.2. Endoteliocitų vaidmuo sergant SSc

Kraujagyslių endotelis - tai sudėtingas, metaboliškai aktyvus organas, atliekantis daugybę svarbių biologinių funkcijų. Endotelis skiria skystąją ir kietąją audinio dalis, slopina trombocitų agregaciją ir leukocitų adheziją, gamina subalansuotą kiekį vazokonstriktinių ir vazodilatacinių molekulių, palaikančių tinkamą kraujagyslių tonusą, slopina ekstraląstelinio matrikso kaupimąsi ir lejomocitų proliferaciją, reguliuoja molekulių apsikeitimą tarp kraujagyslių ir audinių, reguliuoja vaskulogenezę ir angiogenezę kraujagyslių augimo bei reparacijos metu (Koch, Distler 2007). SSc metu endotelis būna stipriai pažeidžiamas. Endotelio atsakas į pažeidimus gali būti dvejopas: greitas pradinis, ir lėtas fenotipinis, vėlyvas. Greitas atsakas apjungia pakitimus azoto oksido, prostaglandinų, endotelino -1, vWF ir plazminogeno aktyvatoriaus gamyboje. Lėtas atsakas priklauso nuo fundamentinių pasikeitimų endoteliocitų aplinkoje, pamatinėje membranoje bei lejomocituose. Šitie pakitimai būna lydimi stiprios augimo veiksnų gamybos bei ekstraceliulinio matrikso kaupimosi, lejomocitų aktivacijos bei proliferacijos, pericitų bei kitų mezenchiminės kilmės ląstelių aktyvavimo. Tai sukelia kraujagyslės remodeliavimą ir gilius pakitimus jos ląstelinėje architektonikoje (Newby 2006).

Nustatyta, kad randami SSc priešendoteliniai antikūnai, po kontakto su endoteliocitais gali juos aktyvuoti, sukelti adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1 ir E-selektino) ekspresiją, po kurios seka monocitų adhezija, dalyvaujant IL-1. Be to, antiendoteliniai antikūnai didina krešėjimo veiksnų atpalaidavimą ir skatina endotelinių ląstelių apoptozę (Youinou et al. 1999). Manoma, kad priešendoteliniai antikūnai labiau veikia mikrocirkuliaciją nei stambesnes kraujagysles SRVs. Priešendoteliniai antikūnai, sergant SSc, randami nuo 28 iki 85% pacientų, vidutiniškai apie 44%, esant lokaliai SSc odos formai, ir 84% esant difuzinei SSc formai. Antikūnų afiniškumas apsprendžia endotelio pažeidimo laipsnį (Renaudin 1999; Pignone et al.

1998). Priešendoteliniai antikūnai gali betarpiškai aktyvuoti komplemento sistemą. Manoma, kad priešendoteliniai antikūnai, nors ir nėra specifiniai vien SSc, šios ligos patogenezėje vaidina labai svarbų vaidmenį. Taip pat endoteliniai SSc metu didina vazokonstrikciją bei skatina fibrozavimą (Garnarczyk et al. 2008).

IV.1.3. Fibroblastų vaidmuo SSc patogenezėje

Odos fibroblastai dalį ekstraląstelinio matrikso sintezuoja kaip atsaką į įvairius aktyvacijos veiksnius. Aktyvacijos signalai ateina iš limfocitų, monocitų, endoteliocitų ir trombocitų per tiesioginį kontaktą arba per specifinius citokinus, pvz. IL-1, IL-2, IL-4 (proliferacija, kolageno sintezė) ir IL-6 (matrikso metaloproteinazių sintezė) (LeRoy 1994). Interferonai potencialiai slopina kolageno sintezę. Aktyvuojantys veiksniai - PDGF ir TGF β - taip pat sintezuojami trombocitų. Aktyvuoti fibroblastai atpalaiduoja tokius citokinus ir augimo veiksnius, kaip IL-1, prostaglandinas E, TGF- β , jungiamojo audinio augimo veiksnių CTGF, PDGF ir IL-6, kas reiškia autoaktyvavimą per autokrininį ratą (Postlethwaite 1995; Feghali et al. 1994). Tuo būdu ICAM-1, ekspresuojamas fibroblastuose, papildo ir sustiprina imuninių ląstelių adheziją ir jų sulaikymą audinyje (Abraham et al. 1991; Gruschwitz, Vieth 1997). Nėra duomenų apie fibroblastų apoptozę sergant SSc, palyginus su sveika oda. Tai pilnai suderinama su pranešimais, kad fibroblastų skaičius sergant SSc išlieka toks pat, kaip ir sveikoje odoje. Masyvios fibrozės vystymasis SSc atveju sukliamas fibroblastų sintezės aktyvavimo, o ne fibroblastų skaičiaus padidėjimo. Vėlyvoje SSc stadijoje fibroblastų sumažėja.

Vienas iš įdomiausių SSc patofiziologijos aspektų yra fibrogeninio fenotipo fibroblastų persistavimas. Ląstelių kultūrose in vitro ir audiniuose in vivo SSc ligoniams randami fibroblastai su įvairiu kolageno ir kitų ekstraląstelinio matrikso komponentų sintezės padidintu aktyvumu, tai rodo fibroblastų populiacijos heterogeniškumą. Genų ekspresijos heterogeniškumas

SSc nėra apribotas vien kolageno bei kitų ekstraląstelinio matrikso komponentų sinteze. Aprašyta proteazės nexin 1 (PN-1) hiperekspresija. Tai gali būti homeostazinis atsakas į padidintą kolageno geno transkripciją (Strehlow et al.1999).

LeRoy teigia, kad SSc pradinėse stadijose kolageną masyviai gaminančių fibroblastų populiacija yra izoliuota nuo gilios retikulinės dermos (LeRoy 1974). Bet šie fibroblastai per autoaktyvacijos ratą citokiniais aktyvuoja gretimų audinių fibroblastus ir sukelia grandininę reakciją. Savo ruožtu – SSc nepažeistos odos fibroblastai nerodo padidinto sintezės aktyvumo, todėl apie bazinį fibroblastų defektą kalbėti anksti (Kahari et al. 1987).

Kartu su augimo veiksniais, chemokinais ir kitomis tirpiomis medžiagomis fibroblastų signalizavimas stipriai veikiamas ekstraląstelinio matriksų bei integrinų (Eckes et al. 2000; Asano et al. 2005;2004). Buvo nustatyta, kad integrinai prisideda prie fibroblastų fenotipo pakeitimo padidinant kolageno sintezę ir paverčiant juos miofibroblastais (Asano et al. 2005; 2006). Integrinai veikia profibrotiškai aktyvuojant TGF- β tuo atlikdami signalinę funkciją SSc patogenezėje (Ihn et al .2001).

V.1.4. Imuniniai sutrikimai sergant SSc

Imuninės sistemos aktyvavimas stebimas jau ankstyvosiose SSc stadijose (Zuber, Spertini 2006). Tačiau nėra žinoma, ar imuniniai sutrikimai ligą inicijuoja, ar tai antriniai dalyviai, atsirandantys ligos eigoje. Iš tikrųjų uždegimas odoje pasireiškia ankščiau negu fibrozės požymiai. Vėlesnėse ligos stadijose uždegiminių infiltratų mažėja (Prescott et al. 1992).

Detalus SSc patogenezės mechanizmas vis dar nėra pilnai ištirtas, tačiau pagrindiniai pažeidimai parodo, kad SSc procese dalyvauja mažiausiai trys ląstelių tipai: fibroblastai, imuninės ląstelės (T ir B limfocitai), bei endoteliocitai. Ligos metu atsiranda autoantikūnų, pažeisti audiniai infiltruojami mononuklearais (lėtinis uždegimas), daugiausiai T limfocitais bei

makrofagais. Limfokinių bei augimo veiksnių gamyba tampa išreguluota (Jimenez, Derk 2004).

T-ląstelių citokinus SSc metu gali gaminti Th1 ir Th2 limfocitai. Citokinių perteklius randamas pacientų kraujyje bei odoje. Jie didina fibroblastų proliferaciją ir skatina makrofagus gaminti TNF- α bei IL-1, kurie savo ruožtu skatina fibroblastus gaminti kolageną, IL-6, PDGF. Endoteliocitai skatinami gaminti IL-1, IL-6 bei adhezijos molekules ICAM-1 ir VCAM-1 (Kurosawa et al. 2000).

B-ląstelės SSc metu būna aktyvuotos, tai parodo hipergamaglobulinemija, autoantikūnai ir padidinta CD19 ekspresija periferiniame kraujyje (Sato et al. 2004). Aktyvuoti B limfocitai gamina IL-6 ir IL-10, o šie skatina Th2 imuninį atsaką ir kolageno sintezę. B limfocitų pagaminti IL-6 ir TGF- β SSc pacientams gali ir tiesiogiai sukelti fibrozę. Antiendoteliniai antikūnai gali sukelti endoteliocitų apoptozę (Worda et al. 2003). Antifibroblastiniai antikūnai reaguoja tik su fibroblastų paviršiumi ir juos aktyvuoja (Chizzolini et al. 2002).

Įvairūs autoantikūnai randami dažniau nei 95% SSc atvejų. Visiems ligoniams, kurie turi autoantikūnų randama ir transplantato prieš šeimininką ligos (GVHD) požymių, taip pat būna ryški odos ir plaučių fibrozė. Randami antikūnai ir prieš ekstraląstelinius komponentus. Pagal autoantikūnų prigimtį galima dalinai spręsti apie SSc etiologiją, prognozę, sekti gydymo rezultatus. Taip pat manoma, kad alogeninės fetalinės ir motinos ląstelės, kurios migruoja per placentą nėštumo metu abejomis kryptimis, gali būti įtrauktos į SSc patogenezę. Vaisiaus ir motinos ląstelės persistuoja cirkuliacijoje ir vaisiaus bei motinos audiniuose dėl HLA II (DRB1) suderinamumo tarp motinos ir vaisiaus. Tokios svetimos ląstelės gali būti aktyvuotos ir gali inicijuoti transplantato prieš šeimininką (Graft-versus-Host) reakciją SSc pavidalu (Arlett et al. 1998).

IV.1.5. Makrofagų vaidmuo sergant SSc

Sergantiems difuzine SSc forma randama sutrikusi makrofagų migracijos inhibicijos veiksnio (MIF) gamyba ir funkcijos. SSc metu MIF padidina ir palaiko prouždegiminį ydingą ratą, vedantį į audinių remodeliavimą. SSc pacientams odos biopsijose anti-MIF antikūnai nudažo bazalinius ir suprabazalinius keratinocitus. Negausių MIF-teigiamų mononuklearinių ląstelių susikaupimų randama apie kraujagysles (Selvi et al. 2003). Makrofagai išskiria TGF- β ir IL-1, kurie toliau aktyvuoja fibroblastus ir endoteliocitus.

Makrofagai šalia limfocitų įvairiais kiekiais randami visuose SSc stadijose tarp kolageno skaidulų, apie odos priedus ir kraujagysles. Paprastai ankstyvos stadijos infiltratuose makrofagų būna daugiau negu T limfocitų, ypač vietose, kuriose prasideda sunkūs odos pažeidimai (Ishikawa, Ishikawa 1992). Odos makrofagai vaidina svarbų nevienareikšmį vaidmenį visose SSc stadijose.

IV.1.6. Putliųjų ląstelių vaidmuo sergant SSc

Tikslus putliųjų ląstelių vaidmuo SSc metu nėra žinomas. Mastocitai gamina daugybę biologiškai aktyvių medžiagų: citokinų, augimo veiksnių, proteazių ir kitų labai svarbių ekstraląstelinio matrikso metabolizmui molekulių. Putliųjų ląstelių kiekis audinyje priklauso nuo jų pirmtakų ląstelių, cirkuliuojančių kraujyje, infiltracijos, jų proliferacijos bei išgyvenamumo in situ. Išgyvenimo pusperiodis naujai susiformavusiems mastocitams sudaro apie 40 dienų (Enerback, Lowhagen 1979).

SSc difuzinės formos pacientams buvo pastebėtas putliųjų ląstelių pagausėjimas (Nishioka et al. 1987). Putliosios ląstelės buvo aktyvuotos, jų granulės galėjo reguliuoti biologinį fibroblastų aktyvumą (Claman 1989; Subba et al. 1983). Putliųjų ląstelių heparinas - tai stiprus stimulatorius FGFb ir TGF-

β. Putliosios ląstelės sudaro svarbų uždegiminį bei fibrozę skatinantį SSc komponentą (Gospodarowicz, Cheng 1986; McCafftey et al. 1989).

IV.1.7. Endoteliocitų, fibroblastų bei imunokompetentinių ląstelių santykiai sergant SSc

Manoma, kad fibroblastų hiperaktyvumas ir endoteliocitų pažeidimas valdomi imuninių bei uždegiminių ląstelių gaminamų produktų. Endotelinas-1 (ET-1) - tai stiprus fibroblastų bei lejomocitų mitogenas dalyvaujantis SSc patogenezeje. ET-1 gali gaminti įvairios ląstelės: fibroblastai, endoteliocitai, epitelioцитai, monocitai (Michael, Markewitz 1996). Monocitai bei makrofagai aktyviai dalyvauja SSc patogenezeje.

Vaskulopatija vis plačiau pripažįstama sudėtine uždegiminių reumatinių ligų dalimi (Bijl 2003). Reino sindromas dažnai klaidingai vertinamas kaip gerybinis vaskulopatijos pasireiškimas. Jis aptinkamas apie 90% SSc atveju (Hall 2005). Tipiškojoje angiopatijoje SSc metu kraujagyslės spindžio susiaurėjimas atsiranda dėl intimos proliferacijos, medijos hipertrofijos ir adventicijos fibrozės (Kahaleh 2004). Tai baigiasi lėtine progresuojančia audinių ischemija. Kraujagyslės sienelės ląstelių disfunkcija yra susieta su uždegimu ir hemostazinės sistemos sutrikimu. Endotelio disfunkcijos metu gaminama mažiau vazodilatatoriaus - azoto oksido ir prostaciklino - tuo pačiu metu daugiau išskiriama endotelino-1. Endotelio disfunkcija įtakoja lygiųjų raumenų veiklą. Sutrinka tarpląstelinė komunikacija tarp endoteliocitų ir fibroblastų. Besivystanti fibrozė iškreipia įprastinę audinių architektūrą, padaro neįvykdoma mediatorių molekulių sąveiką. Pagaliau sutrinka organo funkcija (Ihn 2005). Manoma, kad cirkuliuojantys autoantikūnai gali tiesiogiai aktyvuoti fibroblastus ir sukelti fibrozę SSc metu.

IV.1.8. Vaskulitai sergant SSc

Vaskulitas - tai kraujagyslės uždegimas. SSc vaskulitas - tai dažniausiai smulkių kraujagyslių (kapiliarų, arteriolių) vaskulitas. Kraujagyslės uždegimo

metu vystosi jos sienelės destrukcija, pasižyminti hemoragijomis, išopėjimais bei dėl intimos hiperplazijos, besiformuojančiomis aneurizmomis ir stenozėmis. To pasekoje audinyje išsivysto hipoksija bei infarktas. Vaskulitas gali būti pirminis patologinis procesas, be aiškios priežasties, arba antrinis, sukeltas vaistų, infekcijos ar sisteminės ligos (pav. reumatinės, kaip SSc), lokalaus veiksnio, traumos. Dermoje vaskulitai gana dažni (Stone, Noursari 2001; Jennette et al. 1994; Weedon 2002). Sergant SSc, vaskulitas yra neatsiejama patogenezės grandis.

IV.2. Reino sindromas (Raynaud's Phenomenon) - RP

Reino sindromas yra epizodinė lokali ischemija, provokuojama šalčio ir emocijų. Jai būdingos trys apsiraiškimo fazės: 1. Palor – pabalimas dėl vazospazmo, 2. Cianosis – pamėlynavimas dėl sumažėjusio deguonies kiekio ir 3. Rubor – paraudimas dėl reaktyvios hiperemijos. Reino sindromas stebimas 3-4% bendros populiacijos (Maricq et al. 1986) ir kaip gerybinė praeinanti 20-30% jaunų moterų būklė (Olsen, Neilssen 1978). Jis stebimas 98% SSc pacientų ir dažnai pasireiškia kaip pirmasis SSc simptomas 70% ligonių (Bench 1991). Reino sindromas būna susietas su kraujagyslių tonuso disreguliacija, vedančia į kraujagyslių spazmą ir kraujo tėkmės redukciją. Kartais Reino sindromas būna susijęs su traumuojančiu darbu (vibracinė liga). Jį gali provokuoti β -adrenoblokatoriai, taip pat - bleomicinas, metisergidas, polivinilchloridas.

IV.3. Sisteminė raudonoji vilkligė – SRV

SRV - sisteminė autoimuninė liga, pažeidžianti visas organų sistemas. Pirmą kartą SRV (lupus erythematosus) aprašė austrų dermatologas Ferdinand von Hebra 1845 metais, kaip seborrhea congestiva. Pirmą kartą lupus erythematosus terminą panaudojo prancūzų klinicistas Pierre Louis Alpheé Cazenave 1851 metais. SRV metu imuninis atsakas inicijuojamas prieš

apytiksliai 20 antigenų, daugiausia prieš DNR. Laisvos DNR kraujo plazmoje beveik nėra, jos atsiradimą gali sąlygoti virusinė infekcija ar kiti procesai, atpalaiduojantys DNR. DNR turi afiniškumą kai kurioms organizmo struktūroms - bazinėms membranoms (inkstų, kraujagyslių, epidermio - dermos riboje). Laisva DNR jungiasi su šiomis struktūromis, o vėliau su DNR rišasi autoantikūnas, vyksta komplemento sistemos aktyvacija ir uždegimas. Uždegiminis procesas atpalaiduoja dar daugiau laisvos DNR – susidaro ydingas patologinis ratas.

SRV gali sirgti bet kokio amžiaus ir lyties žmonės, bet dažniausiai serga jaunos 15-45 metų moterys.

Tipiški SRV bėrimai: - „vilkliginė plaštakė“, eritema, edema, dažnai neperžengianti nazolabialinių raukšlių, neplintanti į kaktą. SRV metu gali būti nežymus paraudimas arba papulinis, makulinis, vezikulinis bėrimas.

Diskoidinė vilkligė - nedideli 1-2 cm odos pakenkimo židiniai, kurių kraštai nedaug iškilę, ant jų dugno atsiranda keratozė (žvyneliai), formuojasi odos atrofija. SRV metu randamas kapiliaritas, plaštakų ir delnų teleangiektazijos. Paraudimai aptinkami ir ant proksimalinių pirštakaulių dorsalinių paviršių, tarp sąnarių. Vėliau atsiranda pirštų galų odos gangrenos, infarktų židiniai palei nago guolį. Jie dažniausiai būna maži, retais atvejais - viso piršto galo gangrena. Tuomet būna pažeistos ir stambesnės kraujagyslės.

Taip pat SRV būdingas gleivinės pažeidimas - opinis stomatitas, ryklės gleivinės opelės. Kai atsiranda alopecija - nelengva atskirti ar tai SRV, ar imunosupresantų poveikio pasekmė. Sergant SRV stebima fotosensibilizacija - hipererginė odos reakcija į UV spindulius, oda greitai parausta ir ją išberia. Sergantiems SRV randamas vidutinio dydžio (riešo, alkūnės, kelių) ir smulkių plaštakos sąnarių pažeidimas. Dažniausiai tai oligoartritas (2-4 sąnariai), kuris būna asimetrinis, nestabilus, migruojantis. Sąnariai nedeformuoti, nėra destruktijos, erozijų. Išimtis- Žaku (Jaccond) sindromas- tai pirštų sąnarių deformacijos, kurios pagal išorinę išvaizdą primena reumatoidinį artritą su ulnarine deviacija, metakarpofalanginių bei interfalanginių sąnarių subluksacijomis.

Inkstai SRV metu yra svarbūs diagnostikai organas, jie apsprendžia ligos prognozę. Inkstai yra pažeidžiami imunokompleksais, nusėdusiais Baumano kapsulėje.

SRV komplikuojasi pleuritu, širdies uždegimu, nervų sistemos bei daugelio kitų organų pakenkimais.

V. Tyrimo medžiaga ir metodai

VI.1. Tiriamosios ir palyginamųjų grupių ligonių odos biopsijos

Ištirta po 20 SSc, SRV ir Reino sindromu sergančių ligonių odos biopsijų, atliktų 1995-2004 metais Vilniaus Universiteto Medicinos Fakulteto Reumatologijos klinikoje (Lentelė 1). 20 atitinkamo amžiaus nesergančių sisteminiams susirgimams žmonių atitinkamos lokalizacijos odos mėginiai buvo analizuojami kaip kontroliniai. Visos SSc, SRV ir Reino sindromo diagnozės buvo patvirtintos kliniškai ir laboratorinių, imunologinių bei molekulinės diagnostikos tyrimų duomenimis. Ligos pradžia buvo skaičiuojama nuo laiko, kai ligoniui buvo diagnozuotos tiriamos ligos pagal naudotus klasifikacinius kriterijus. Visi SSc ligoniai atitiko ARC klasifikacinius kriterijus (Subcommittee for Scleroderma criteria of American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90) ir vėlesnius kriterijus (LeRoy et al. 1988). Sisteminės raudonosios vilkligės diagnozė nustatyta remiantis Amerikos reumatologų kolegijos (ARC) 1982 m. patikslintais SRV klasifikacijos kriterijais (Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7). Reino sindromas diagnozuotas remiantis Amerikos reumatologų kolegijos (ARC) 1992 m. RF klasifikacijos kriterijais (Leroy EC, Medsger TA Jr. Raynaud's phenomenon: A proposal for classification. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:485-8.)

Ankstyva ligos stadija buvo apibrėžiama kaip laikotarpis nuo diagnozės nustatymo iki 3 metų. SSc, SRV ir RP grupės buvo formuojamos taip, kad kiekvienoje ligonių grupėje būtų po 10 ankstyvos ir 10 vėlyvos ligos stadijų ligonių.

Visos ligonių biopsijos buvo paskirtos Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto Reumatologijos klinikos gydytojų diagnostikos tikslais, esant klinikinei būtinybei. Kontroliniai odos pavyzdžiai buvo paimti autoriaus iš Vilniaus miesto universitetinės ligoninės chirurgijos skyrių ligonių, kuriems nebuvo diagnozuota jokia sisteminė liga, autopsinės medžiagos, atliekant autopsijas pagal kliniškes ir medicinos teisės indikacijas. Odos biopsijos buvo apdorotos Vilniaus Universiteto Eksperimentinės ir kliniškes medicinos instituto Patologijos laboratorijoje pagal laboratorijos adaptuotas ir patvirtintas darbo instrukcijomis metodikas, parafininiai pjūviai buvo dažyti hematoksilinu ir eozinu, histocheminiais bei imunohistocheminiais metodais. Autorius atliko mikropreparatų vertinimą ir duomenų interpretavimą. Trys ankstyvos SSc stadijos odos biopsijos buvo iširtos elektroniniu mikroskopu Vilniaus Universiteto Eksperimentinės ir kliniškes medicinos instituto Patologijos laboratorijoje, autorius atliko elektroninės mikroskopijos nuotraukų vertinimą ir duomenų interpretavimą.

Lentelė 1. Tirtų ligonių pasiskirstymas pagal amžiu ir lytį.

Liga	Ligonių skaičius	Amžiaus vidurkis
SSc	20 (vyrų 1, moterų.19)	46.55 ± 10.87
SRV	20 (vyrų 2, moterų 18)	39.18 ± 11.55
RP	20 (vyrų 3, moterų 17)	37.02 ± 13.03
Kontrolinė grupė	20 (vyrų 3, moterų 17)	47.26 ± 14.05

V.2. Tyrimo metodai

V.2.1. Histopatologiniai tyrimai: šviesos ir elektroninė mikroskopija

Biopsinė medžiaga buvo fiksuojama 10% buferiniame formalino tirpale ir įliejama į parafiną, Tirti mėginiai buvo dažomi standartiniu rutininu histologiniu dažymo būdu - hematoksilinu ir eozinu. Vaizdo analizė bei fotografavimas atlikti šviesiniu mikroskopu Olympus BX51.

V.2.2. Histocheminiai tyrimai

Tirti preparatai buvo nudažyti šiais standartiniais histocheminiais būdais: Pikrino rūgšties ir sirius red mišiniu (pikrosirius) – jungiamojo audinio skaiduliniais komponentams ir analizei tamsiame poliarizuojančio mikroskopo lauke.

Toluidino mėliu, pH 2.0 – putliųjų ląstelių ir jungiamojo audinio matrikso baltymų- proteoglikanų analizei.

V.2.3. Imunohistocheminiai (IHC) tyrimai

Antigenams atstatyti deparafinizuoti pjūviai buvo apdorojami 10 minučių 0.01 M citrato buferyje (pH 6.0) mikrobanginėje krosnelėje esant +98°C, po to aušinami iki kambario temperatūros ir praplaunami PBS. Vidinės peroksidazės aktyvumas buvo blokuojamas preparatus inkubuojant 30 minučių 0.3% vandeniniame vandenilio peroksido tirpale. Po to preparatai buvo praplaunami PBS ir 30 minučių inkubuojami 3% normaliame gyvūno serume, kuriame pagaminti pirminiai antikūnai.

Pirminių antikūnų tirpaluose kambario temperatūroje pjūviai buvo inkubuojami 30 minučių, naudojant šiuos pirminius antikūnus:

- 1) triušio IgG prieš žmogaus vWF (2 µg/ml, Dakopats A/S, Glostrup, Danija);
- 2) pelės IgG prieš žmogaus CD34 (2 µg/ml, Cymbus Biotechnology Ltd, Charles Ford, Didžioji Britanija);
- 3) triušio IgG prieš žmogaus VEGF (2

µg/ml); 4) 2.9 µg/ml triušio IgG prieš žmogaus VEGFR-1 (FLT-1); 5) 4 µg/ml triušio IgG prieš žmogaus VEGFR- 2 (FLK-1); 6) 1 µg/ml triušio IgG prieš žmogaus VEGFR -3 (FLT-4) (Fitzgerald Industries International, Concord, MA, JAV); 7) pelės IgG prieš žmogaus CD68 (1.3 µg/ml, DAKO); 8) triušio IgG prieš žmogaus eNOS(III) (2 µg/ml, Abcam, Didžioji Britanija); 9) triušio IgG prieš žmogaus HSP47 (2 µg/ml, ProSci, Inc, CA, JAV). Po to pjūviai buvo praplaunami PBS ir 30 minučių kambario temperatūroje inkubuojami antrinių antikūnų tirpale, vėl praplaunami ir apdorojami ABC kompleksu (DAKO) 1 valandą kambario temperatūroje. Po praplovimo PBS, pjūviai buvo veikiami chromogenu (3,3'- diaminobenzidinu) 5 minutes, po to praplaunami PBS ir trumpai dažomi Mayerio hematoksilinu, praplaunami vandeniu, arba nedažomi. Galiausiai preparatai buvo dehidratuojami etanolyje, skaidrinami ksilole, padengiami dengiamąja medžiaga (Histomount) ir dengiamaisiais stikliukais.

Negatyviai dažymo kontrolei vietoje tiriamojo antikūno buvo naudojamas atitinkamas kiekis tos pačios gyvūnų rūšies, tos pačios klasės ir tos pačios koncentracijos normalus IgG arba PBS.

Imunohistocheminiam dažymui buvo naudojami En-Vision vizualizacijos rinkiniai (DAKO).

V.2.4. Elektroninis mikroskopinis tyrimas

Biopsijos medžiaga buvo prefiksuojuama 2% gliutaraldehido ir fiksuojama 1% osmio rūgšties tirpaluose, įlieta į epono dervas. Ultraploni pjūviai (400-600Å) buvo dažomi uranilo acetato ir švino citrato tirpalais. Vaizdo analizė bei fotografavimas atliktas elektroniniu mikroskopu JEM 100-B.

V.2.5. Mikroskopinio vaizdo analizė

Histopatologiniai šviesos bei elektroninės mikroskopijos vaizdai buvo vertinami kokybinės analizės būdu.

Pusiau kiekybinei analizei imunohistocheminiai žymenys buvo vertinami keturių taškų (balų) sistema: 0 – nėra žymens, 1 – pavieniai žymenys, 2 – daugiau žymenų, 3 – labai daug žymenų. Kiekybinis vertinimas atliktas naudojant „ANALYSIS“ kompiuterinę programą. Preparatai buvo fotografuoti naudojant šviesos bei poliarizacinį Olympus BX51 mikroskopą ir Nikon DXM 2000 vaizdo kamerą.

V.2.6. Statistinė rezultatų analizė

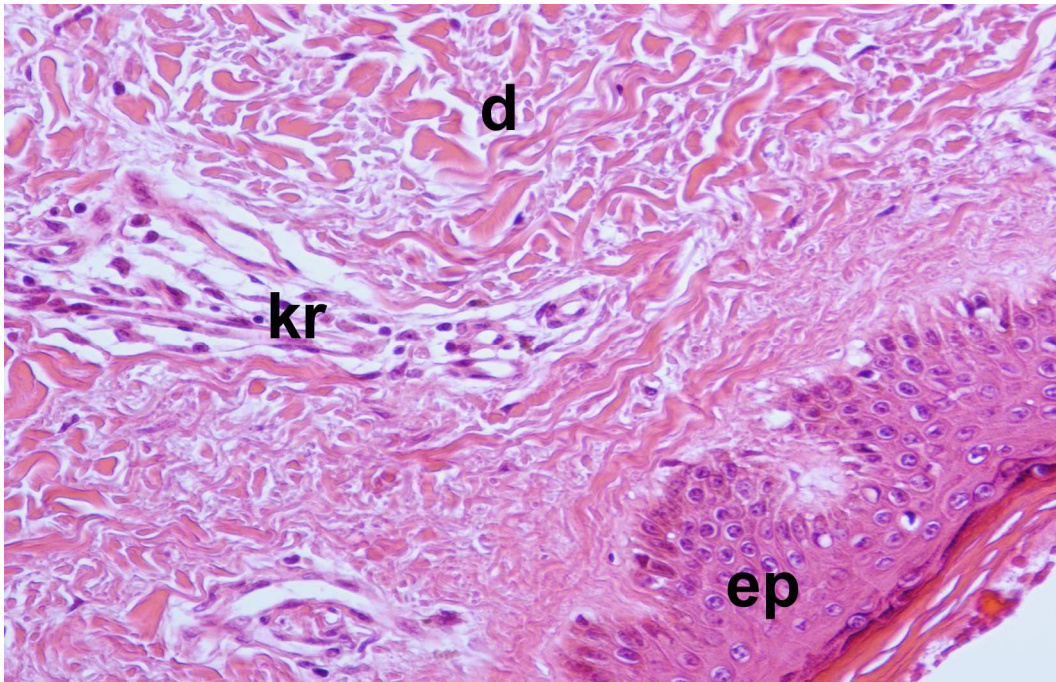
Statistinė duomenų analizė atlikti naudojant kompiuterinės statistikos programą SPSS for Windows (versija 12.0). Apskaičiuoti normaliųjų parametrų reikšmių vidurkiai (\bar{V}) su standartiniais nuokrypiais (SN). Nominaliųjų duomenų skirtumo statistinis reikšmingumas nustatytas pagal Chi kvadratu (χ^2) kriterijų, normaliųjų kiekybinių duomenų vidurkių skirtumas dviems nepriklausomoms imtims – naudojant Stjudento t kriterijų, normaliųjų kiekybinių duomenų vidurkių skirtumas trims nepriklausomoms imtims – vienfaktorinę dispersinę analizę ANOVA. Ranginių duomenų skirtumo statistinis reikšmingumas esant dviems nepriklausomoms imtims nustatytas naudojant Mano – Vitnio - Vilkoksono (Mann-Whitney – Wilcoxon) kriterijų.

Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, kuriame rezultatai laikyti statistiškai patikimais.

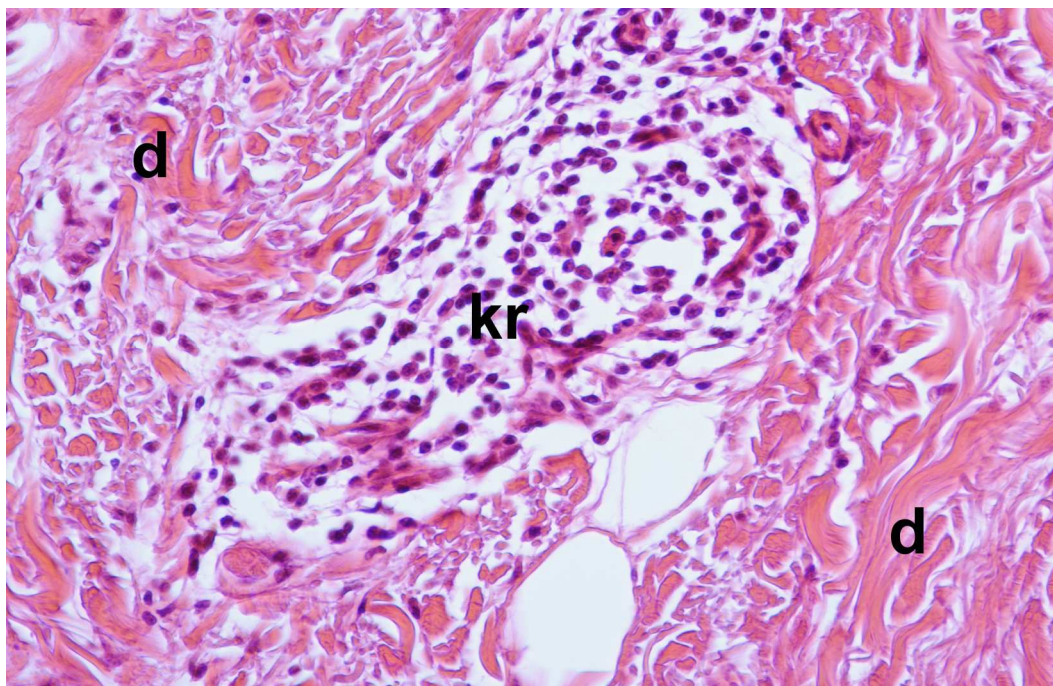
VI. Tyrimų rezultatai

VI.1. SSc ligonių histopatologinio tyrimo duomenys lyginant su SRV ir RP ligonių

Ankstyvoje SSc stadijoje buvo stebimi neutrofilų, limfocitų, monocitų, histiocitų ir pavienių plazmocitų infiltratai apie kraujagysles ir ekkrininių prakaito liaukų latakus. (Pav. 1, 2). Vietomis panašūs infiltratai buvo stebimi intersticiume ir poodiniame riebaliniame audinyje

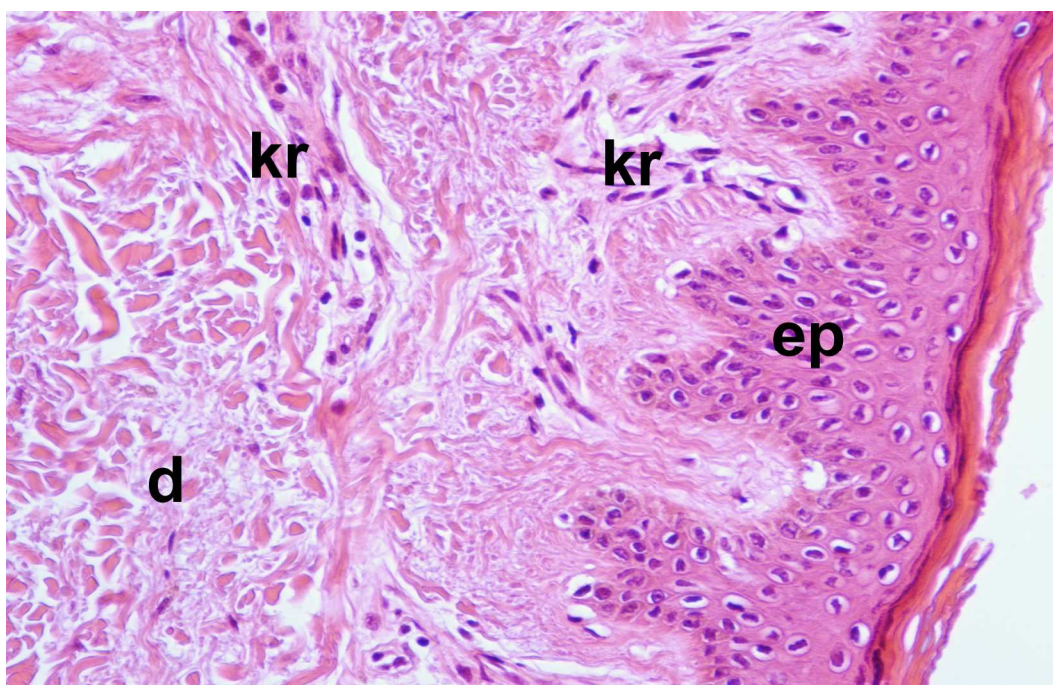


Pav. 1. SSc ankstyvoji stadija. Spenelinio odos sluoksnio redukcija, kompaktiškų kolageno skaidulų susikaupimas dermoje, odos priedų tankio sumažėjimas, kraujagyslių sienelės edema, infiltracija uždegiminėmis ląstelėmis. Oda. HE, x200.(kr- kraujagyslė, d- oda, ep- epidermis).



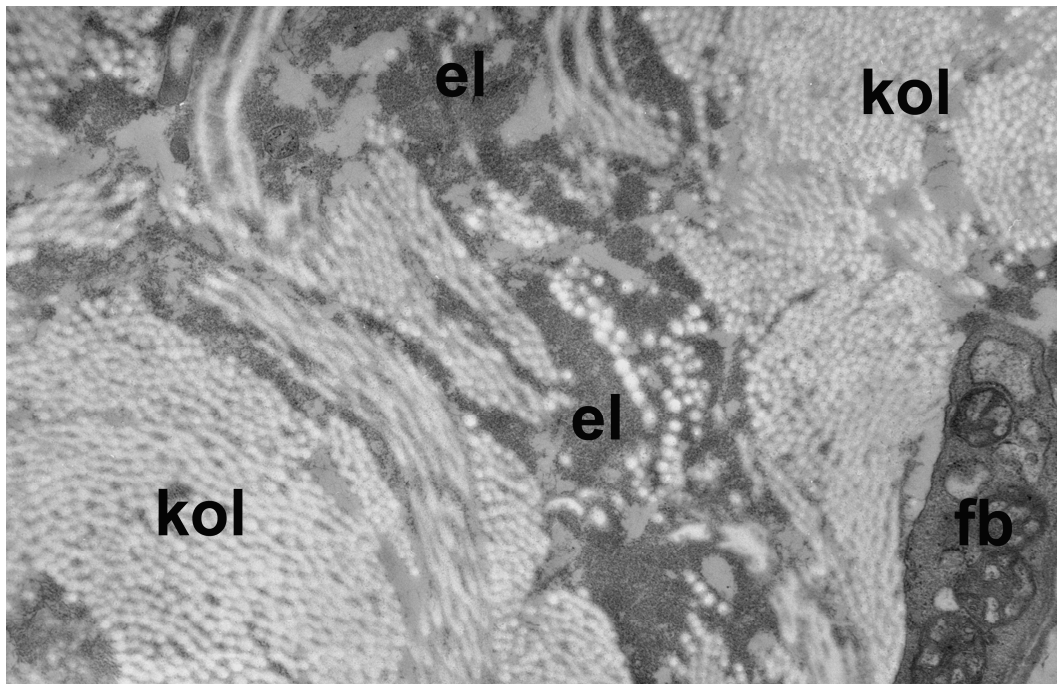
Pav. 2. SSc ankstyvoji stadija. Gausi infiltracija uždegiminėmis ląstelėmis. Oda. HE, x200. (d-derma, kr- kraujagyslė)

Ligai progresuojant, mažėjo odos kraujagyslių tinklo tankumas bei visų ląstelių bendras kiekis, tačiau gausėjo jungiamojo audinio ekstraląstelinio matriksa, ypač skaidulinio kolageno (Pav. 3).



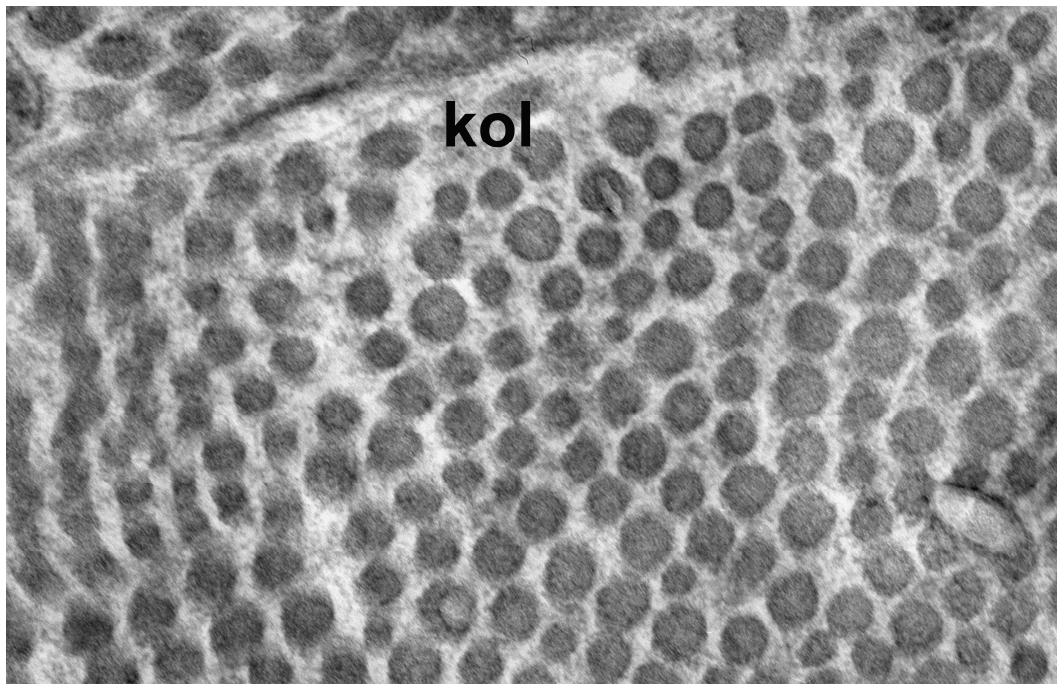
Pav. 3. SSc vėlyvoji stadija. Kraujagyslių bei odos priedų kiekio mažėjimas. Oda. HE, x200 (kr- kraujagyslė, d- oda, ep- epidermis).

Fibroblastai buvo hiperfunkciški bei edemiški (Pav.4).

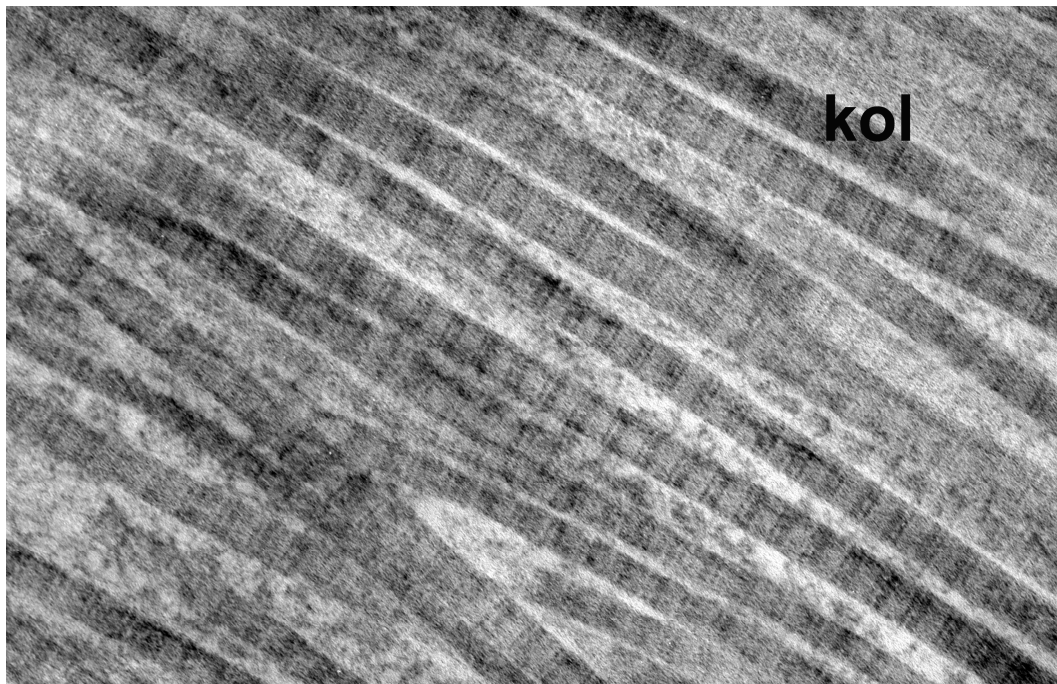


Pav. 4. SSc ankstyvoji stadija. Hiperaktyvus fibroblastas, gausu kolageninių bei elastinių skaidulų. Oda. TEM, x10000 (kol- kolageno skaidulos, el- elastinės skaidulos, fb – fibroblastas).

Elastinės skaidulos buvo fragmentuotos. Kolageno skaidulos buvo edemiškos ir nevienodo skersmens (Pav. 5, 6).

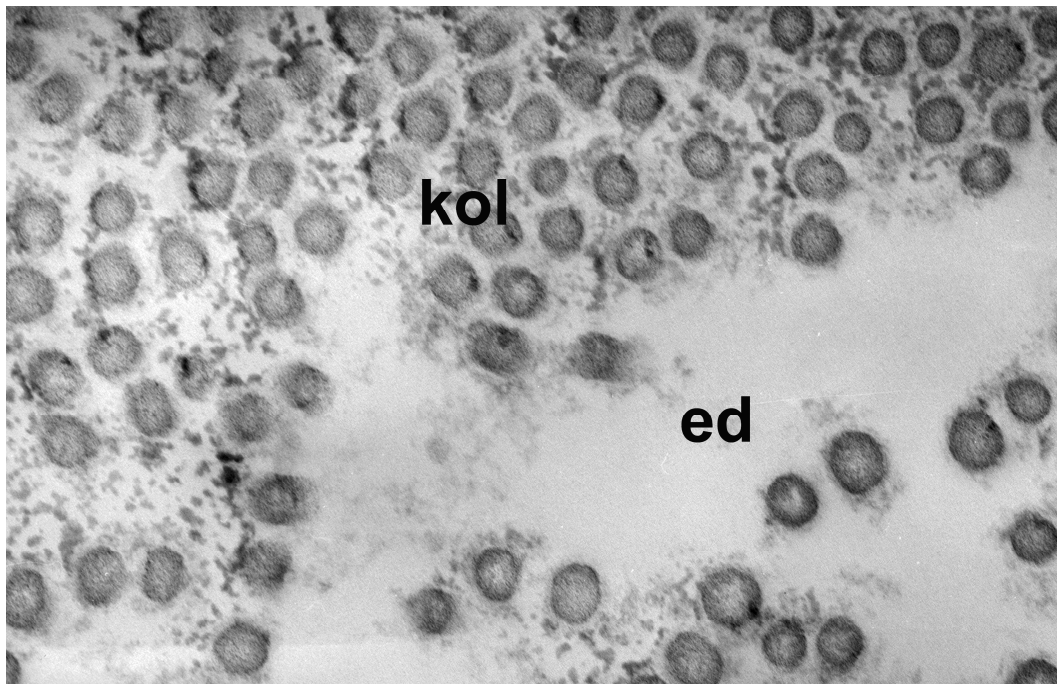


Pav.5. SSc ankstyvoji stadija. Įvairaus skersmens kolageninės skaidulos. Skersinis pjūvis. Oda. TEM, x50000 (kol- kolageno skaidulos).



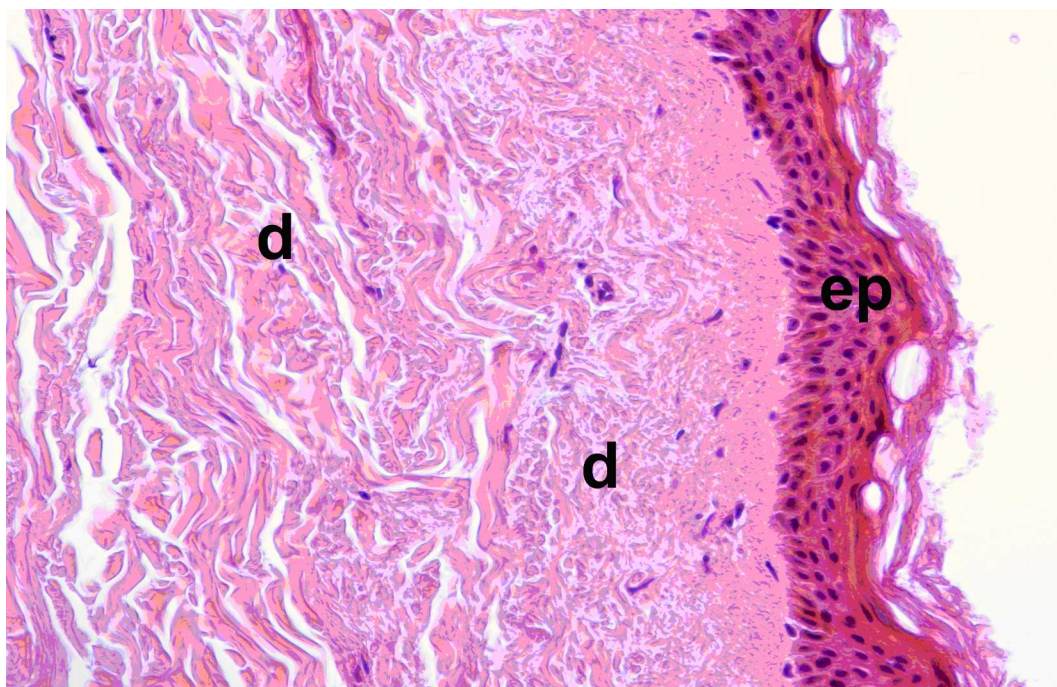
Pav.6. SSc ankstyvoji stadija. Išilginis kolageninių skaidulų pjūvis. Oda. TEM, x50000 (kol- kolageno skaidulos).

Tarp kolageninių skaidulų buvo edema (Pav. 7).



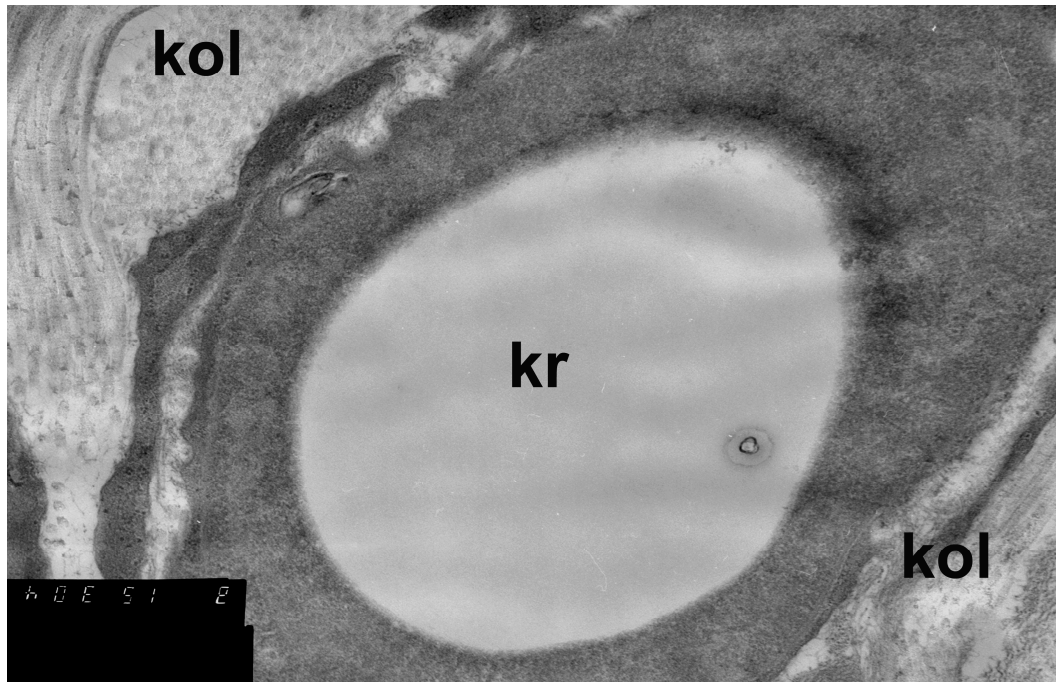
Pav.7. SSc ankstyvoji stadija. Ryški edema tarp kolageninių skaidulų. Oda. TEM, x50000 (kol- kolageno skaidulos, ed- edema)

Vėlesnėse SSc stadijose uždegiminių infiltratų sumažėjo arba jie beveik visiškai išnyko. Buvo stebima ryški sponginio odos sluoksnio redukcija (Pav.8).



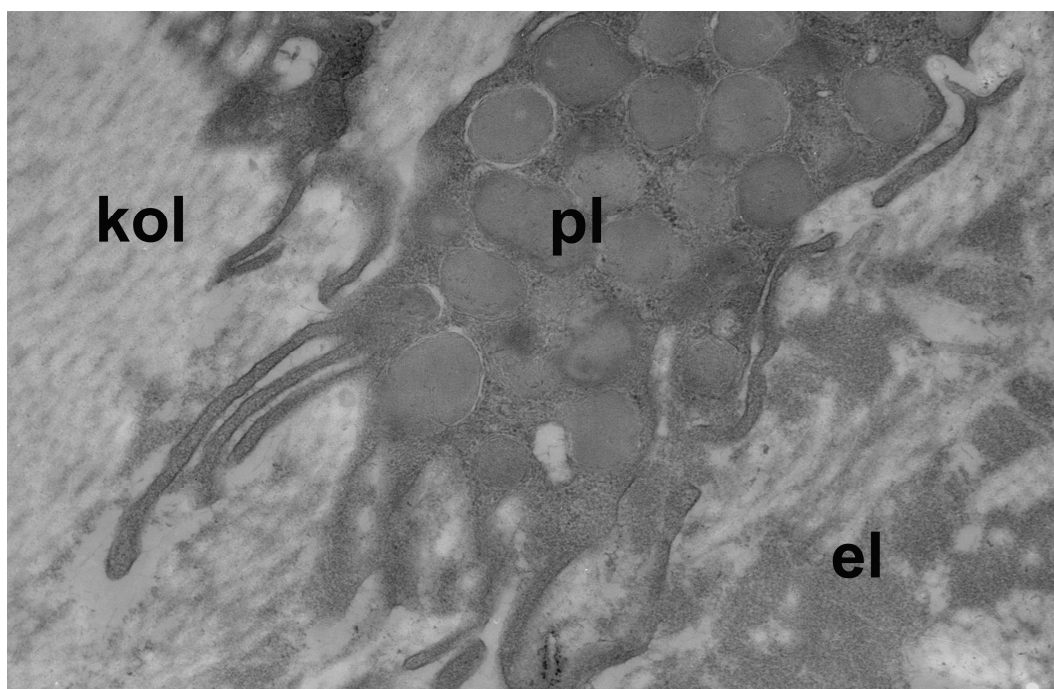
Pav.8. SSc. Vėlyvoji stadija. Epidermio sponelių, odos priedų bei kraujagyslių tinklo tankumo sumažėjimas. Oda. HE, x200 (d- oda, ep- epidermis).

Kraujagyslių sienelės sustorėdavo, atsirasdavo hialinozė bei nekrozė (Pav. 9), spindžiai siaurėjo, laipsniškai vystėsi devaskuliarizacija.

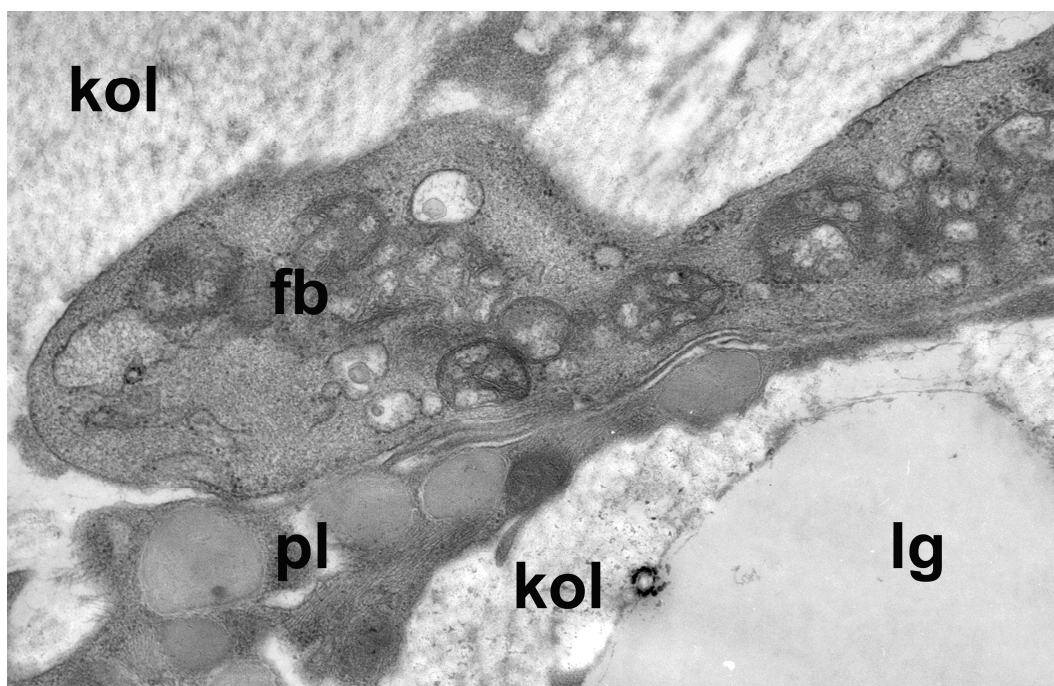


Pav.9. SSc ankstyvoji stadija. Kraujagyslės sienelės nekrozė. Oda. TEM, x10000. (kr- kraujagyslė, kol - kolagenas)

Kolageno skaidulos palaipsniui storėjo ir tankėjo. Vėlesnėse SSc stadijose sumažėjo fibroblastų. Ekrininės prakaito liaukos tapo atrofiškos dėl supančios fibrozės ir dėstėsi tik viršutiniame dermos sluoksnyje. Išreikštas kolageno ir kitų ekstraląstelinio matrikso baltymų kaupimasis pirmiausiai buvo matomas retikulinės dermos ir poodžio ribose. Ankstyvojoje sisteminės sklerozės stadijoje elektroniniu mikroskopu buvo matomos plonos, naujai sintezuotos 10-30 nm kolageno fibrilės. Vėliau vyravo didesnio skersmens fibrilės. Tai rodė kolageno brendimą. Ultrastruktūrinė kraujagyslių analizė parodė endotelio ląstelių pažeidimą, jų vakuolizaciją, hialinizaciją bei nekrozę, o taip pat pericitų ir fibroblastų endoplazminio tinklo aktyvaciją. Ankstyvojoje stadijoje buvo stebima gana gausi infiltracija putliosiomis ląstelėmis (Pav. 10, 11), aptinkamomis glaudžiam kontaktui su fibroblastais bei pažeistomis kraujagyslėmis ir limfagyslėmis.

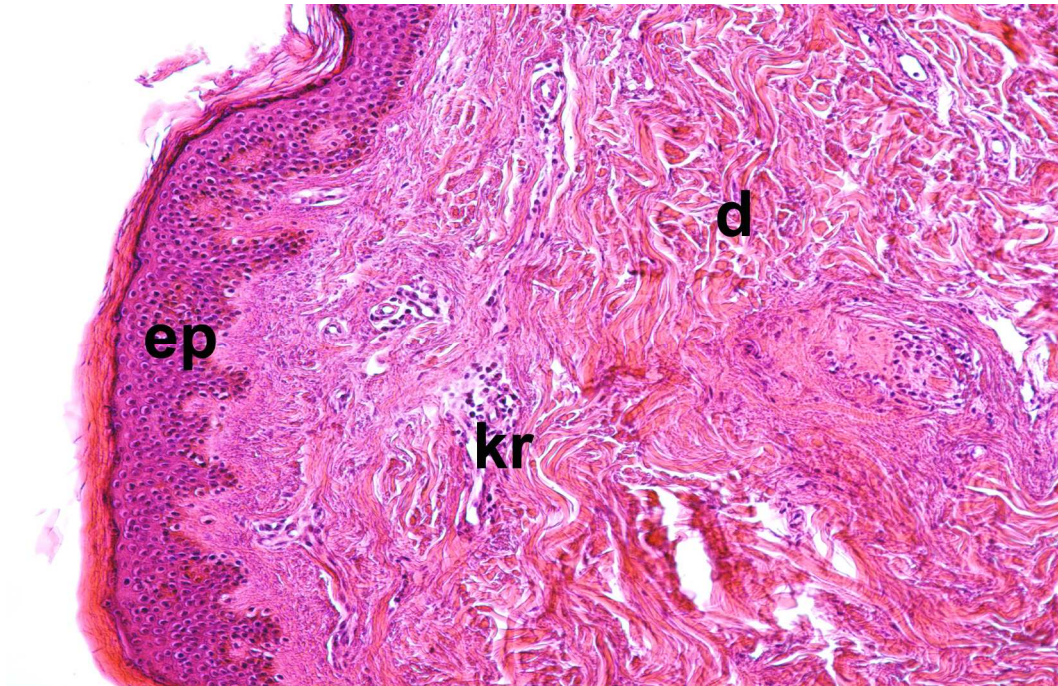


Pav. 10. SSc ankstyvoji stadija. Putlioji ląstelė intersticiume. Oda. TEM, x15000.

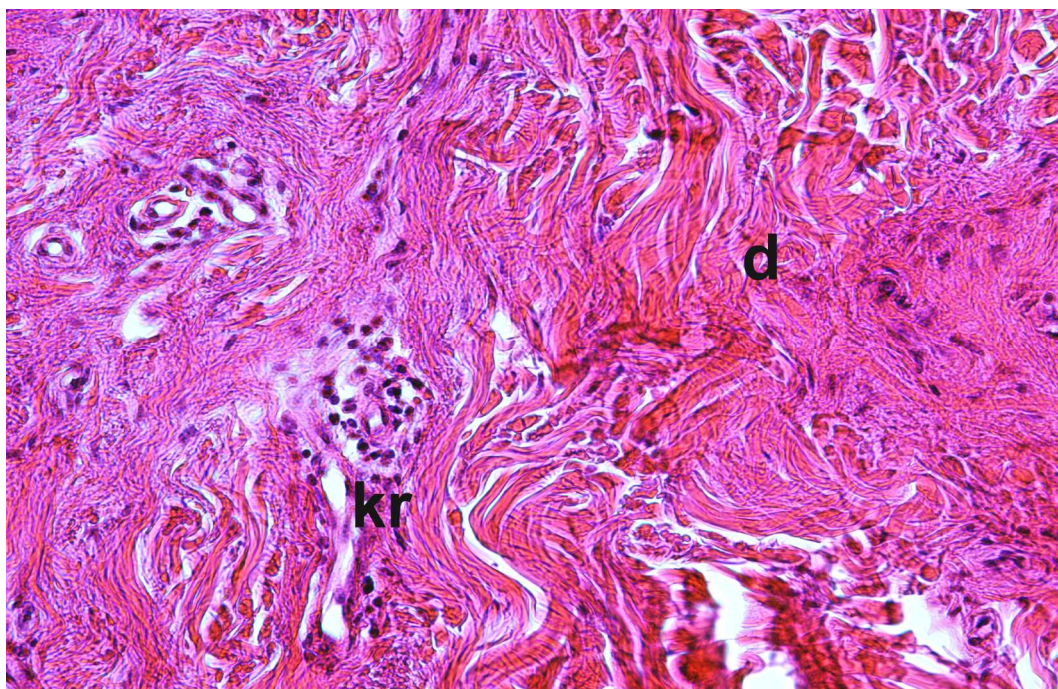


Pav. 11. SSc ankstyvoji stadija. Fibroblasto bei putliosios ląstelės kontaktas. Limfagyslės nekrozė. Oda. TEM, x15000 (kol- kolageno skaidulos, fb – fibroblastas, lg- limfagyslė, pl- putlioji ląstelė).

SRV atvejais kraujagyslių sienelėse ir perivaskuliariai buvo įvairaus laipsnio audinių edema ir uždegiminių ląstelių infiltracija (Pav. 12, 13).



Pav. 12. SRV. Smulkių kraujagyslių vaskulitas. Oda. HE, x100(kr- kraujagyslė, d- oda, ep- epidermis).



Pav. 13. SRV. Smulkių kraujagyslių vaskulitas, perivaskulinė uždegiminių ląstelių infiltracija. Oda. HE, x200 (kr- kraujagyslė, d- oda).

Reino sindromo atvejais rasdavome arterijų susitraukimo požymių, tačiau vaskulito požymių nebuvo arba jie buvo nežymūs.

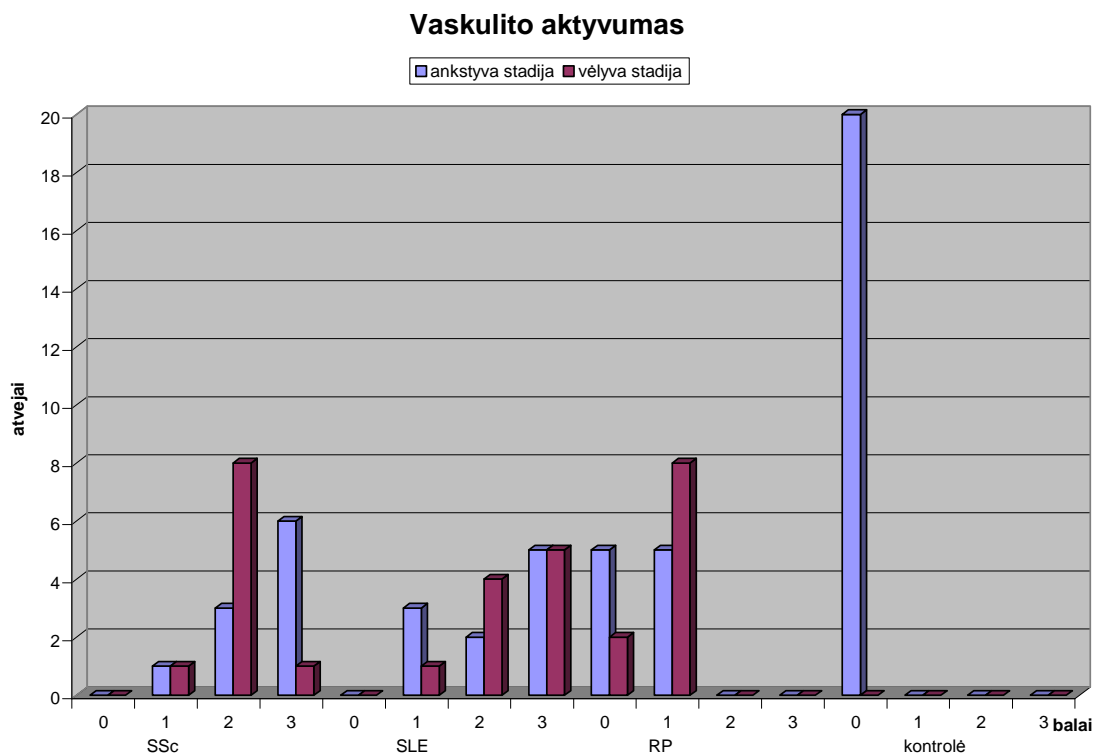
Vaskulito požymiai labiau buvo išreikšti SSc atvejais, ir ypač ankstyvoje ligos stadijoje (Lentelė 2, Pav.14).

Lentelė 2. Vaskulito aktyvumo (pagal histopatologinius požymius) pasiskirstymas odoje SSc ankstyvoje ir vėlyvoje stadijose, SRV bei RP atvejais.

Liga	Vaskulito aktyvumas			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/0	1/1	3/8	6/1
SRV N=20	0/0	3/1	2/4	5/5
RP N=20	5/2	5/8	0/0	0/0
Kontrolė N=20	20	0	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,789
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	<0,0001
SRV – Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	<0,0001

Paaiškinimai: „0“ = nėra vaskulito požymių; „1“ = endotelio edema, palei kraujagyslę pavieniai neutrofilai; „2“ = endotelio edema, palei kraujagyslę negausi neutrofilų, makrofagų, limfocitų infiltracija; „3“ = endotelio pažeidimai, palei kraujagyslę gausi infiltracija uždegiminėmis ląstelėmis; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija



Pav. 14. Vaskulito aktyvumo (pagal histopatologinius požymius) pasiskirstymas odoje SSc, SRV bei RP atvejais, anstyvojoje bei vėlyvojoje stadijose.

Antrinio vaskulito aktyvumas tiesiogiai koreliavo su vWF prasisunkimu į audinius, kuris patikimai didesnis SSc sergantiems ligoniams (Lentelė 5).

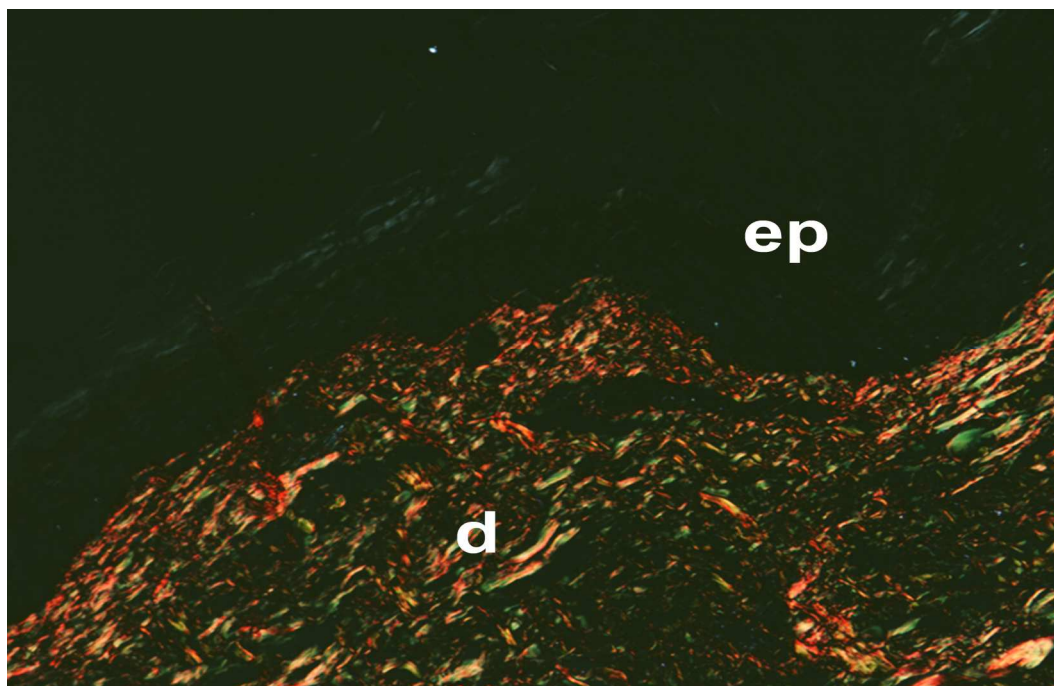
Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje vaskulito aktyvumas SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė, o vėlyvoje stadijoje SRV ligonių odoje vaskulito aktyvumas išliko aukštas, o SSc – mažėjo.

VI.2. SSc ligonių odos histocheminės analizės duomenys, lyginant su SRV ir RP ligonių ir kontrole

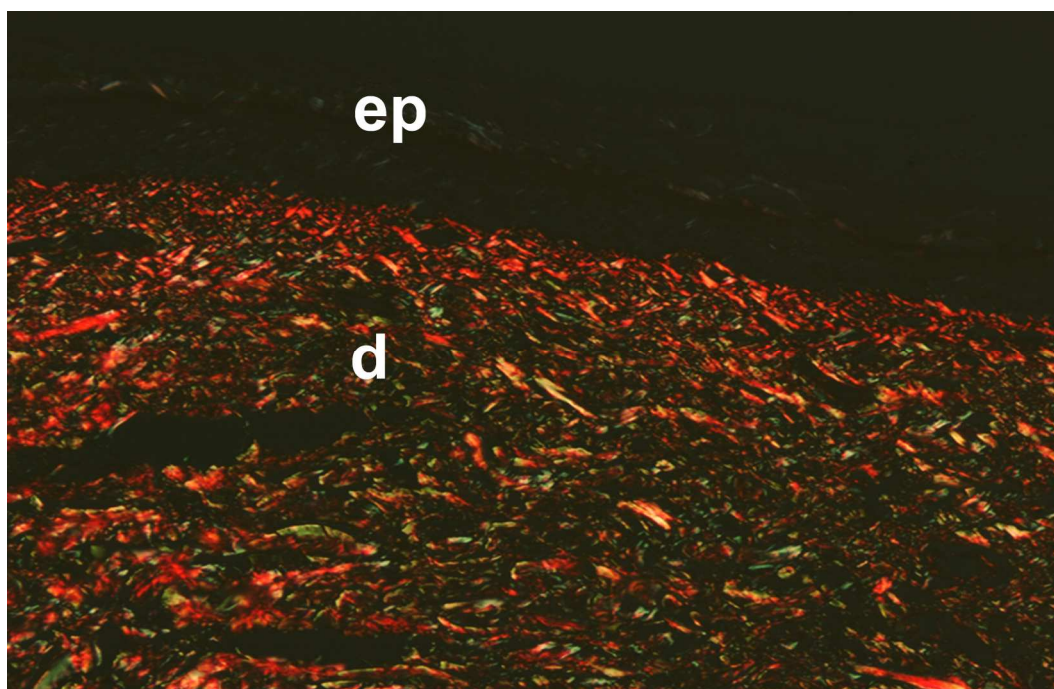
VI.2.1. Fibrozės skirtumai SSc, SRV ir RP ligonių odoje po dažymo pikrosiriusu

Pikrosiriusu dažytuose histologiniuose preparatuose, analizuojamuose poliarizuotoje šviesoje, plonos, neseniai sintezuotos kolageninės skaidulos švyti žalia spalva, o storos bei subrendusios kolageninės skaidulos švyti raudonai.

Ankstyvojoje SSc stadijoje rasdavome daug žaliai švytinčių kolageninių skaidulų (Pav. 15), o vėlesnėse stadijose dominavo raudonos skaidulos (Pav. 16).

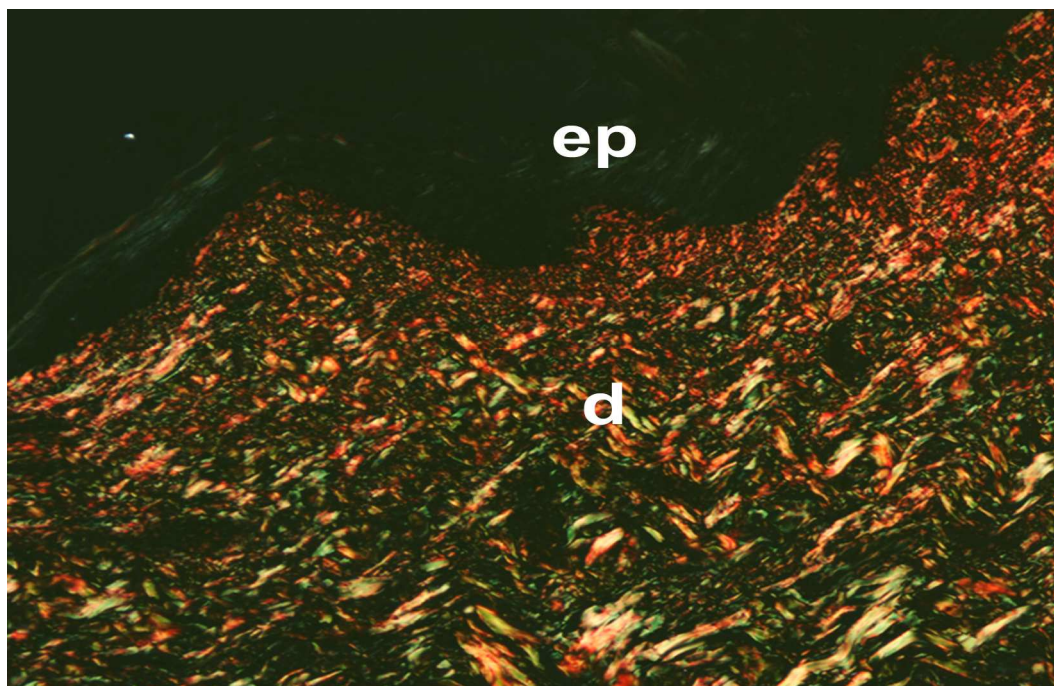


Pav. 15. SSc ankstyvoji stadija. Oda. Dažyta pikrosiriusu. Poliarizuota šviesa. x200 (d- oda, ep- epidermis).

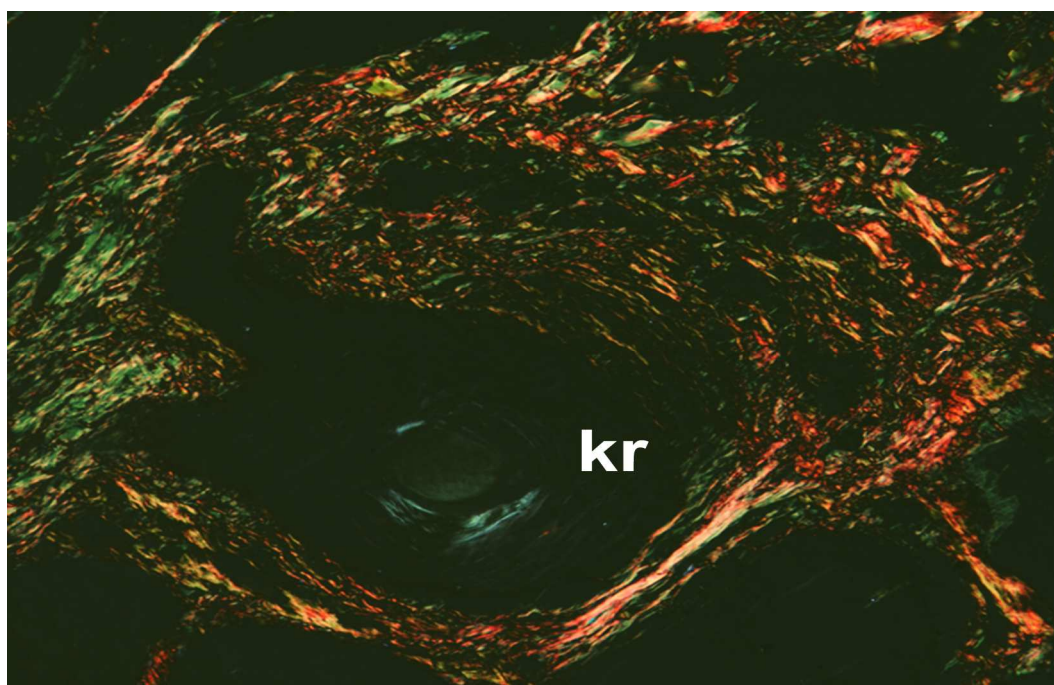


Pav. 16. SSc vėlyvoji stadija. Oda. Dažyta pikrosiriusu. Poliarizuota šviesa. x200 (d- oda, ep- epidermis).

SRV (Pav. 17) bei Reino sindromo atvejais švytėjimas nesiskyrė nuo kontrolės atvejų. Tačiau Reino sindromo atvejais būdavo ryškiai susitraukusių arterijų (Pav. 18).



Pav. 17. SRV. Oda. Dažyta pikrosiriusu. Poliarizuota šviesa. x200 (ep-epidermis)



Pav. 18. Reino sindromas. Oda. Arterijos spazmas. Dažyta pikrosiriusu, poliarizacinė šviesa. x200 (kr- kraujagyslė).

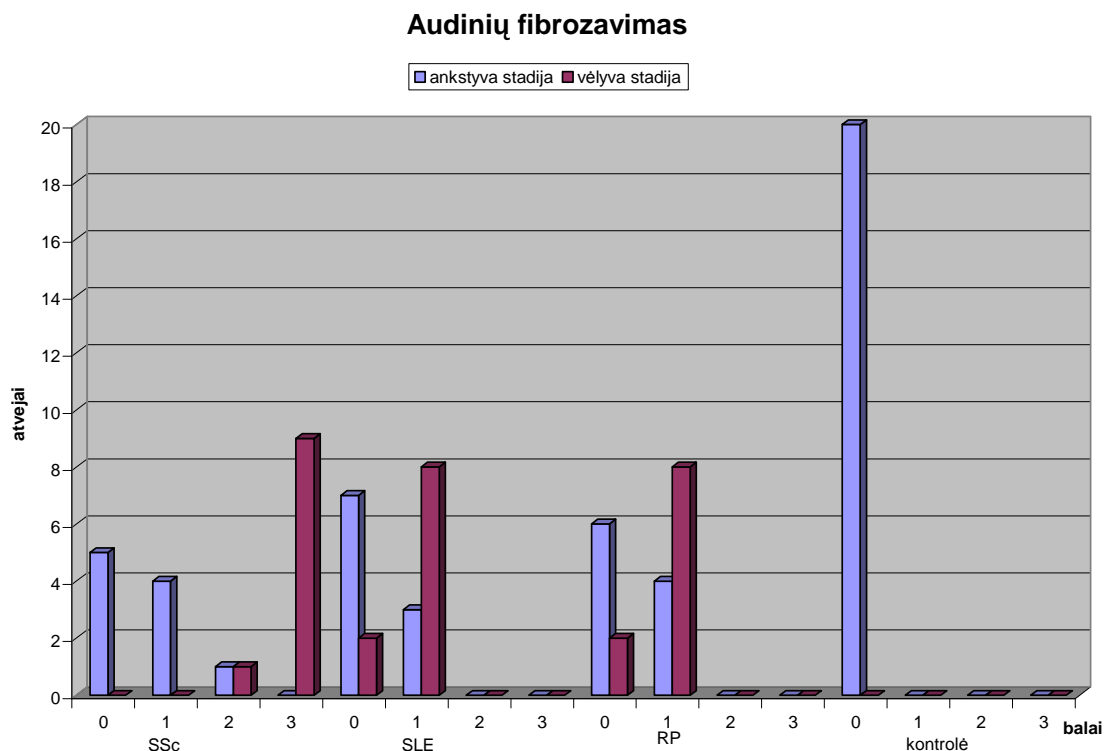
Kraujagyslių fibrozavimas lydymas atrezijos dažniausiai buvo aptinkamas SSc vėlesnėse stadijose, tuo tarpu SRV ir Reino sindromo atveju ryški fibrozė nebuvo neaptinkama (Lentelė 3, Pav. 19).

Lentelė 3. Odos audinių fibrozavimas sergantiems SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	Fibrozavimo laipsnis			
	0	1	2	3
SSc N=20	5/0	4/0	1/1	0/9
SRV N=20	7/2	3/8	0/0	0/0
RP N=20	6/2	4/8	0/0	0/0
Kontrolė N=20	20	0	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,004
SSc- RP	0,006
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV- RP	0,752
SRV- Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	<0,0001

Paaiškinimas: “0” = nėra fibrozavimo požymių; “1” = plonų, pikrosiriusu dažytų, stebint poliarizuotoje šviesoje švytinčių žalia spalva skaidulų nežymus pagausėjimas; “2” = pikrosiriusu dažytų, poliarizuotoje šviesoje švytinčių žalia bei raudona spalva skaidulų pagausėjimas; “3” = gausu storų, raudonai švytinčių kolageninių skaidulų, dažytų pikrosiriusu; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

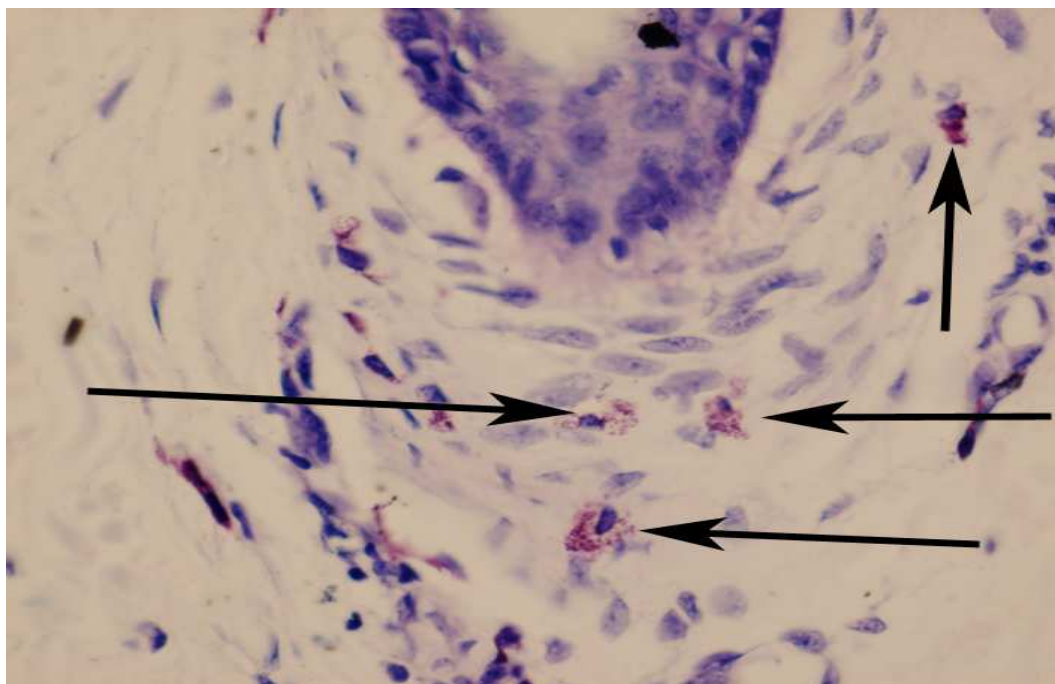


Pav. 19. Odos audinių fibrozavimas sergantiems SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje audinių fibrozavimo laipsnis nei SSc, nei SRV ligoniams nesiskyrė (fibrozavimo arba nebuvo, arba jis buvo nežymus), o vėlyvoje stadijoje tuo metu kai SSc ligoniams vystėsi masyvi fibrozė, SRV ligoniams audinių fibrozavimo laipsnis beveik nesikeitė.

VI.2.2. Odos putliųjų ląstelių nudažytų toluidino mėliu analizė sergančių SSc, SRV ir RP odoje lyginant su kontrole

Toluidino mėlio dažymas išryškino putliasias ląsteles, kurios išsiskirdavo violetine spalva. Lyginant su kontrole, putliųjų ląstelių buvo gausiau ir jos intensyviau degranuliavo ankstyvoje SSc stadijoje, jų ryškiai sumažėjo fibrozės stadijoje. (Pav.20, 21, Lentelė 4).



Pav. 20. SSc ankstyvoji stadija. Putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliavimas (rodyklės). Oda. Dažyta toluidino mėliu (pH 2.0). x200.

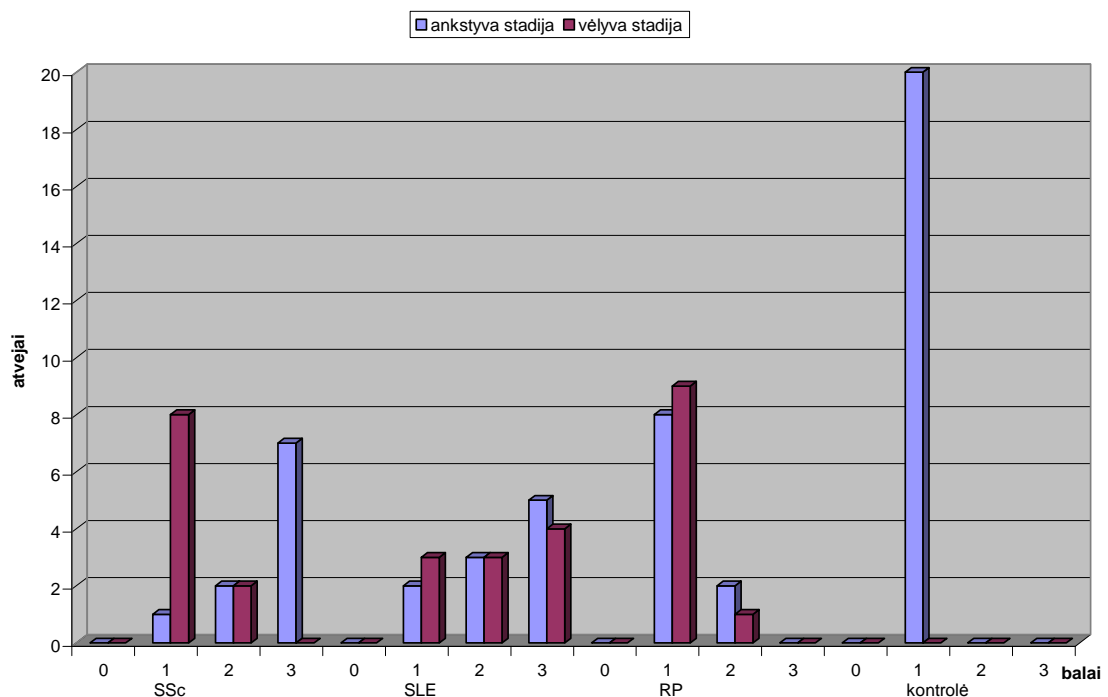
Lentelė 4. Odos putliųjų ląstelių infiltracijos gausa ir degranuliacija sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	Putliųjų ląstelių infiltracija			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/0	1/8	2/2	7/0
SRV N=20	0/0	2/3	3/3	5/4
RP N=20	0/0	8/9	2/1	0/0
Kontrolė N=20	0	20	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,285
SSc- RP	0,004
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	<0,0001
SRV – Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	0.075

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiskai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiskai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiskai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiskai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Putliųjų ląstelių infiltracijos gausa ir degranuliacija



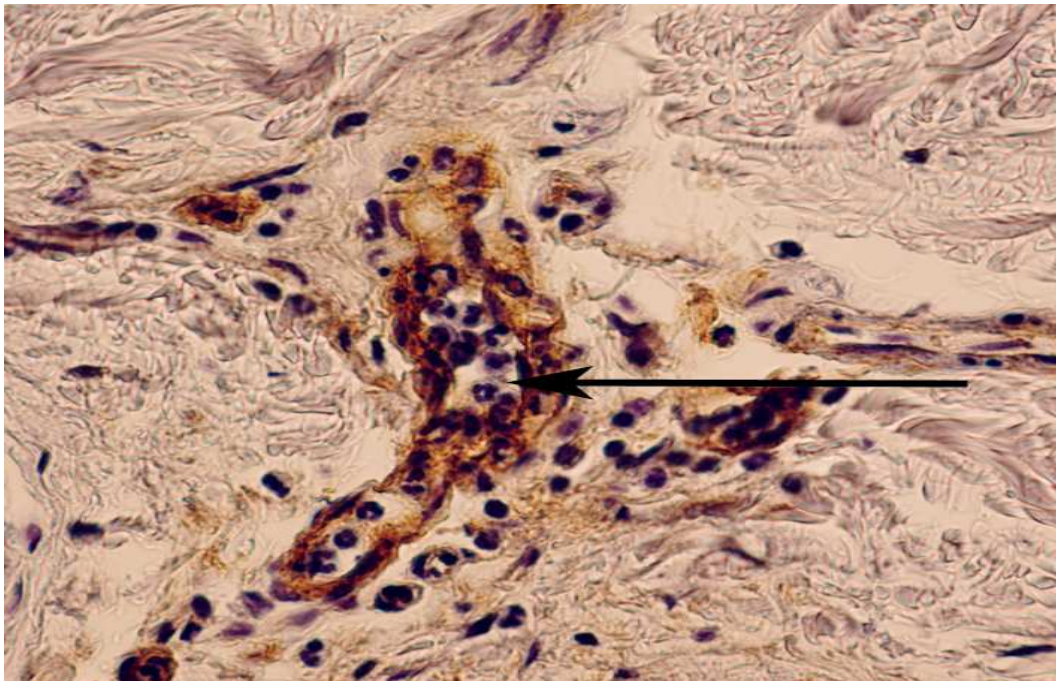
Pav. 21. Odos putliųjų ląstelių infiltracijos gausa ir degranuliacija sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliacija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo gausi), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliacija išliko gausi, o SSc ligoniams – mažėjo.

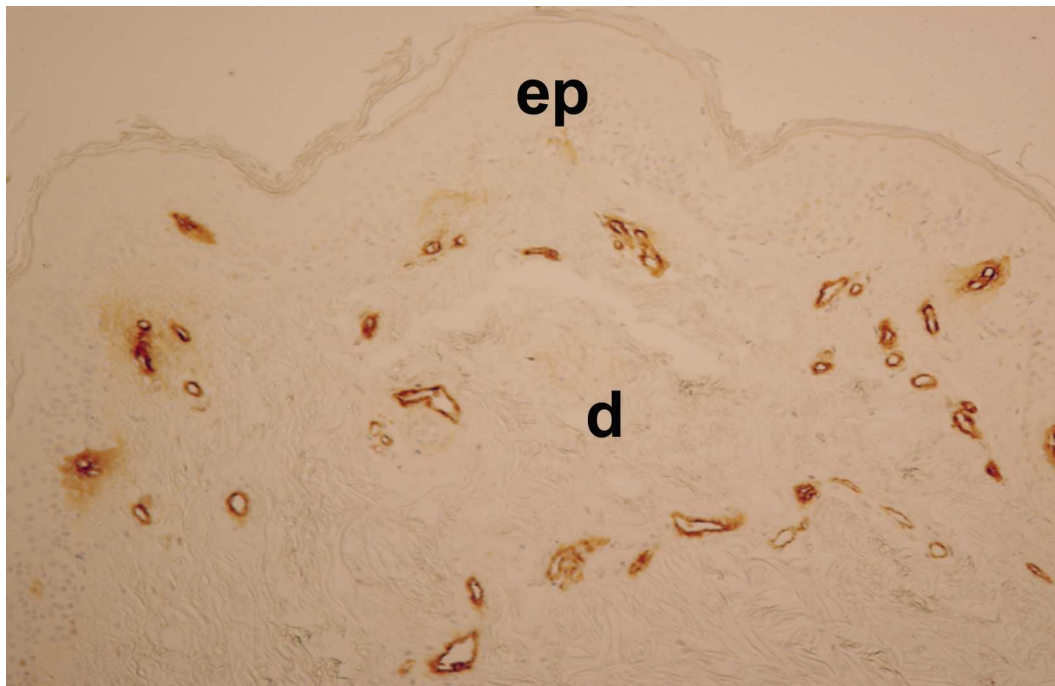
VI.3. Imunohistocheminės analizės duomenys

VI.3.1. von Willebrand'o veiksnio (IHC) lokalizacija SSc ligonių odoje

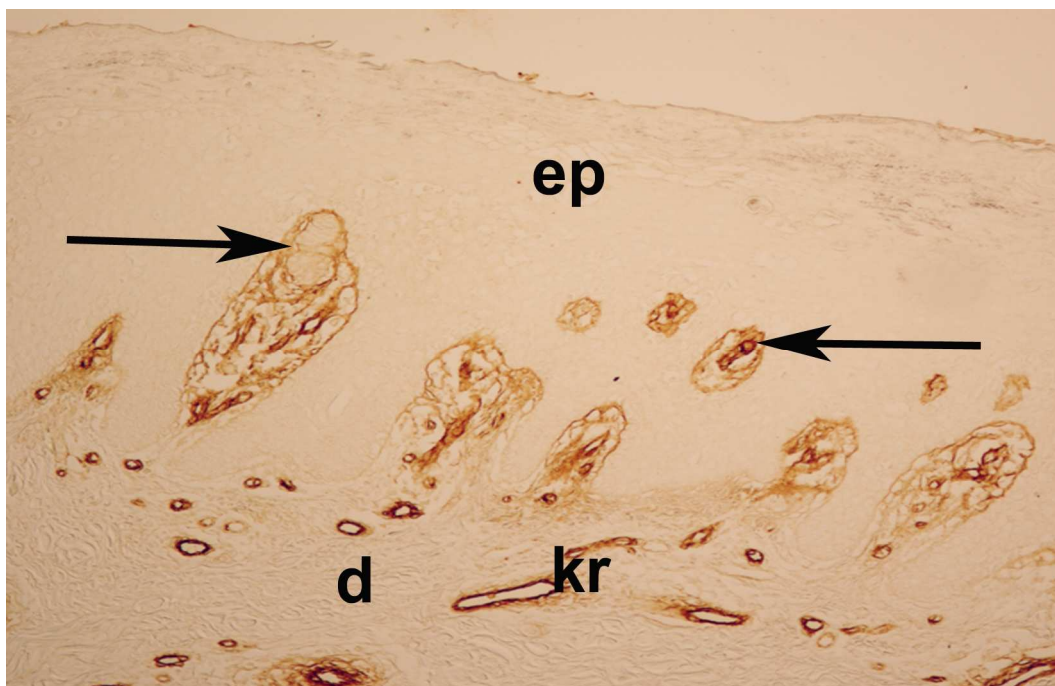
Sveikų odos biopsijų analizės atvejais šis veiksnys buvo stebimas tik kraujagyslių spindžio ribose bei kraujagyslių sienelėse, iš esmės intimoje. Tiriamųjų grupių odos biopsijose vWF skverbėsi į kitus kraujagyslių sienelių sluoksnius ir net išsiliedavo į ekstravaskulinę erdvę (Pav.22, 25, 26, 28, lentelė 5). Pagal vWF lokalizaciją galima buvo spręsti apie kraujagyslių struktūrinius pokyčius (Pav.23, 24, 25, 27)



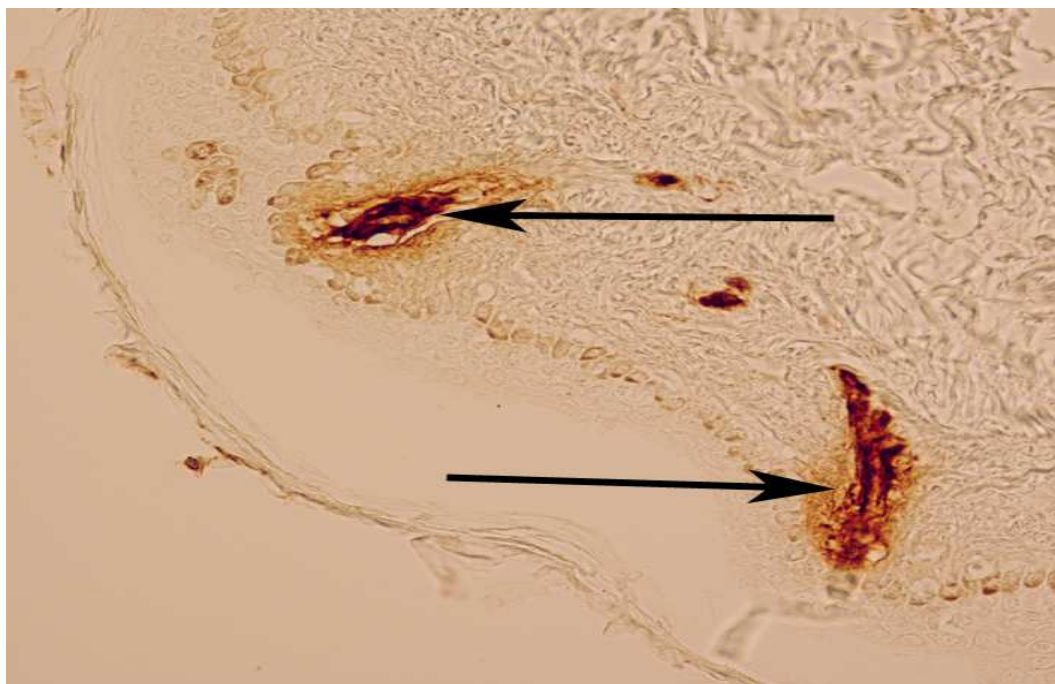
Pav. 22. SSc Ankstyvoji stadija. Oda. IHC- vWF. Papildomai dažyta hematoksilinu. x200 (rodyklė – kraujagyslės endotelis).



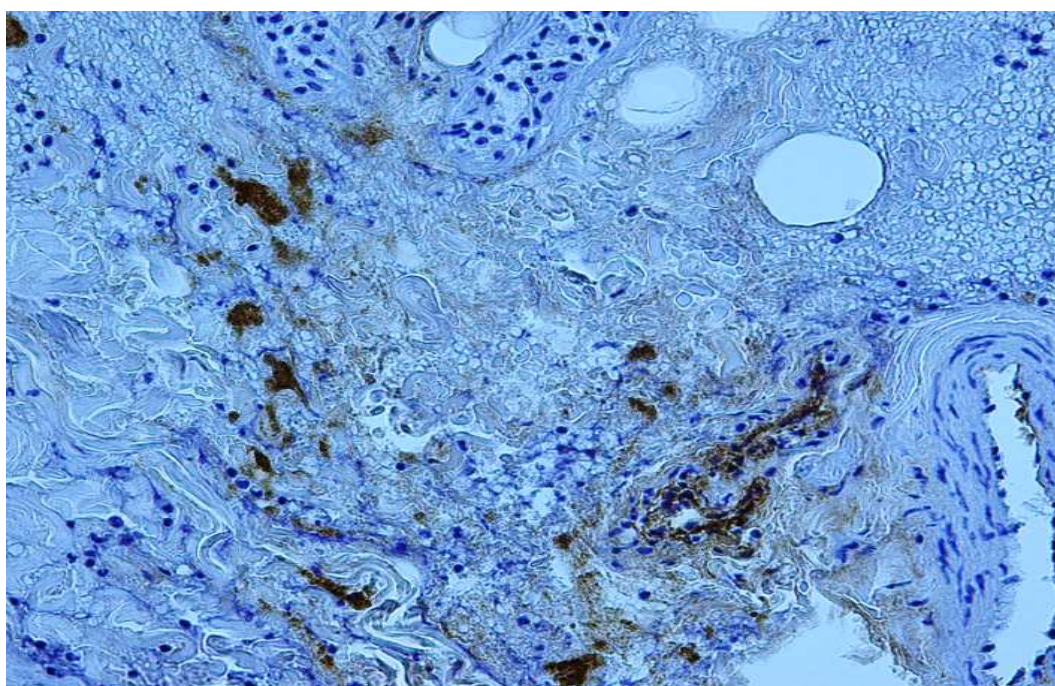
Pav. 23. SSc ankstyvoji stadija. Oda. IHC- vWF. x200 (d- oda, ep- epidermis).



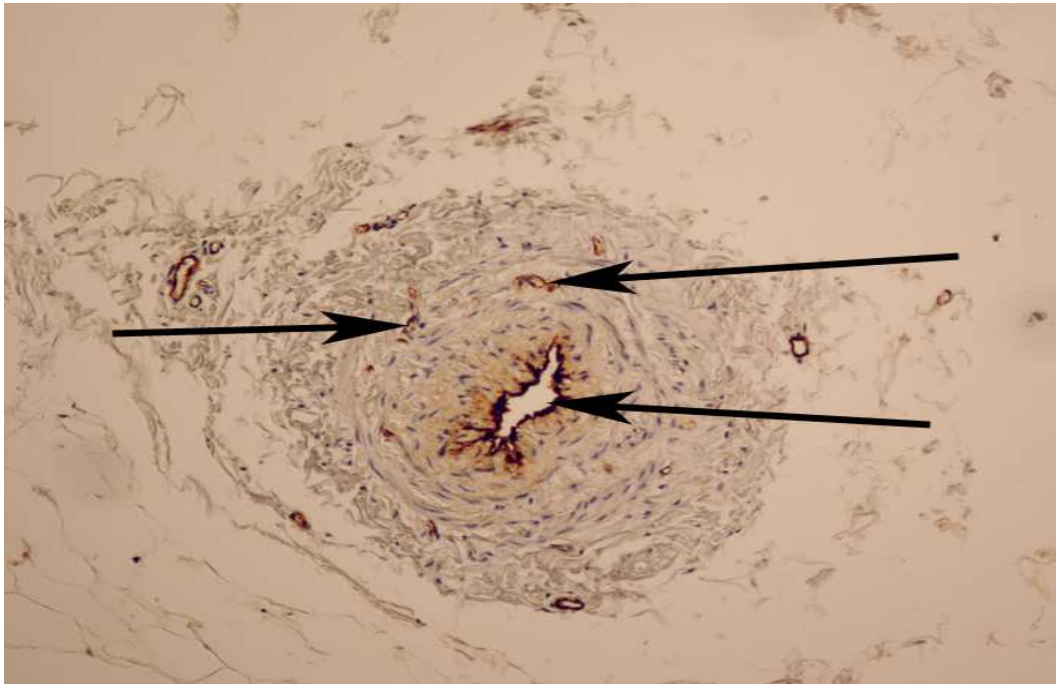
Pav. 24. SSc ankstyvoji stadija. Oda. Krūminių kapiliarų susidarymas (rodyklės). IHC- vWF. x200 (kr- kraujagyslė, d- oda, ep- epidermis).



Pav. 25. SSc vėlyvoji stadija. Oda. vWF lokalizuotas kraujagyslių spindžiuose ir prasisunkęs į intersticiumą (rodyklės). IHC- vWF. x200.



Pav. 26. SSc vėlyvoji stadija. Oda. vWF nutekėjimas į intersticinius audinius. IHC- vWF. Papildomai dažyta hematoksilinu. x200.



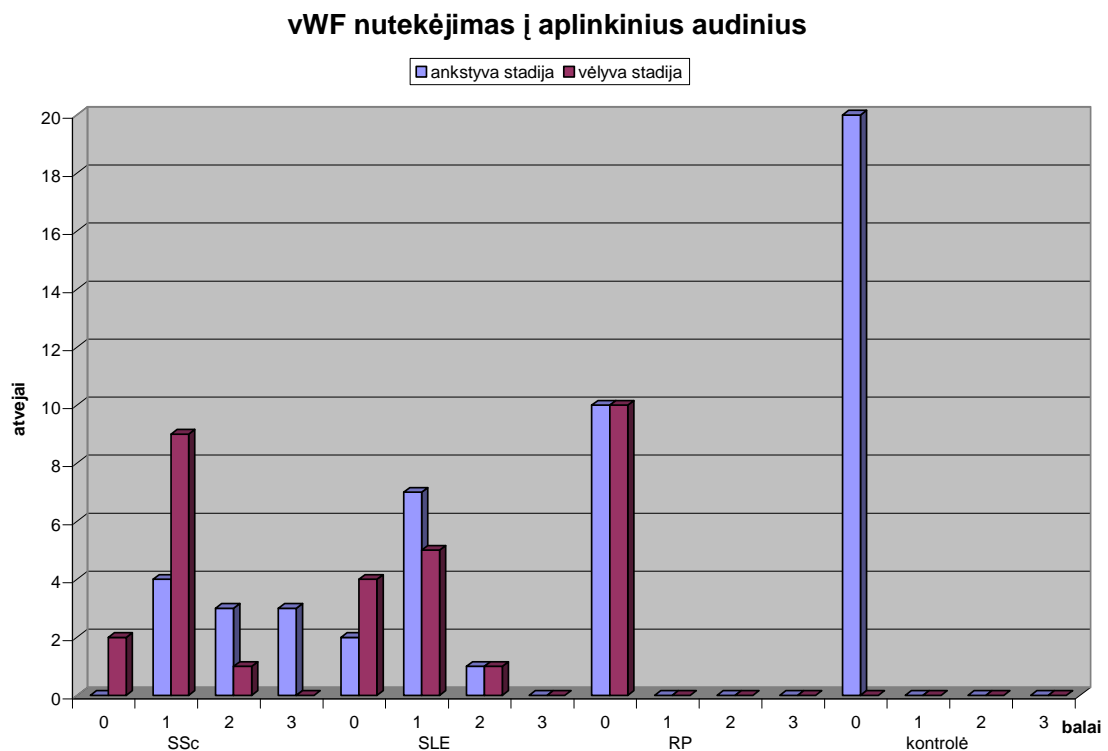
Pav. 27. Reino sindromas. Oda. Spazmuota arterija. IHC - vWF. Papildomai dažyta hematoksilinu. x200 (rodyklės – kraujagyslės ir vasa vasorum spindžiai).

Lentelė 5. vWF nutekėjimas iš kraujagyslių spindžio į aplinkinius audinius SSc, SRV ir RP ligonių odoje, lyginant su kontrole.

Liga	vWF nutekėjimas			
	0	1	2	3
SSc N=20	0/2	4/9	3/1	3/0
SRV N=20	2/4	7/5	1/1	0/0
RP N=20	10/10	0/0	0/0	0/0
Kontrolė N=20	20	0	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,25
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	1.0

Paaiškinimai: „0“ = nėra vWF nutekėjimo; „1“ = negausus vWF nutekėjimas šalia kraujagyslės sienelės; „2“ = negausus vWF nutekėjimas per keliasdešimt mikrometrų nuo kraujagyslės sienelės; „3“ = gausūs vWF išsiliejimai; “/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija



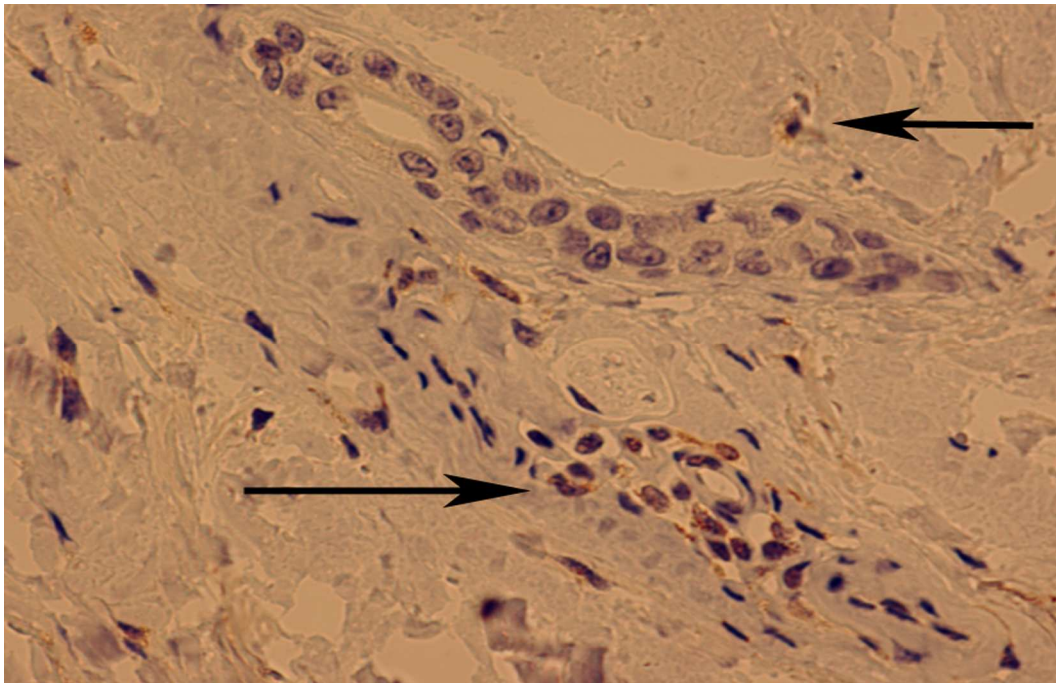
Pav. 28. vWF nutekėjimas iš kraujagyslių spindžio į aplinkinius audinius SSc, SRV ir RP ligonių odoje, lyginant su kontrole.

Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius SSc ligoniams buvo gausesnis, lyginant su

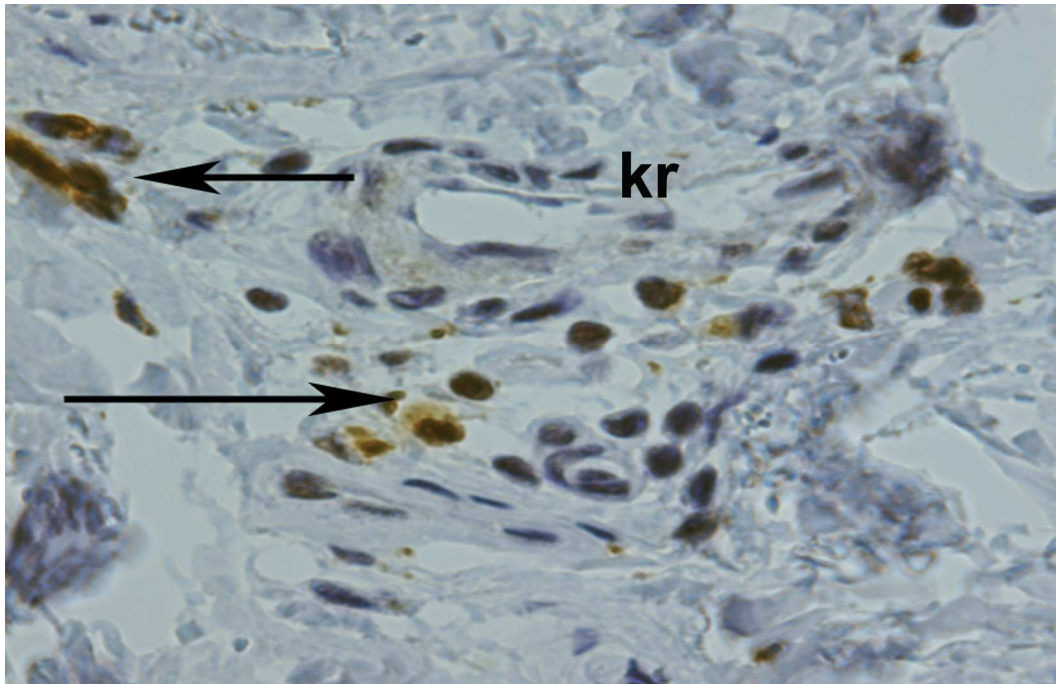
SRV , ir nors vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius mažėjo, jis išliko santykinai gausesnis, negu SRV ligonių.

VI.3.2. CD68 imunohistocheminė lokalizacija SSc, SRV ir RP odoje, lyginant su kontrole

Pavienės ląstelės su CD68 teigiamu IHC žymeniu buvo randamos sveikų odos biopsijose ir Reino sindromo atvejais. Jos buvo lokalizuotos intersticiume kaip įprastiniai intersticiniai makrofagai. Gausus CD68 teigiamų ląstelių infiltratus kraujagyslių sienelėse bei palei kraujagyslius raskome ankstyvose SSc stadijose ir SRV atvejais (Pav.29, 30, 31, lentelė 6).



Pav. 29. SSc ankstyvoji stadija. CD68. Oda. IHC- teigiamos ląstelės (rodyklės). Papildomai dažyta hematoksilinu, x400.



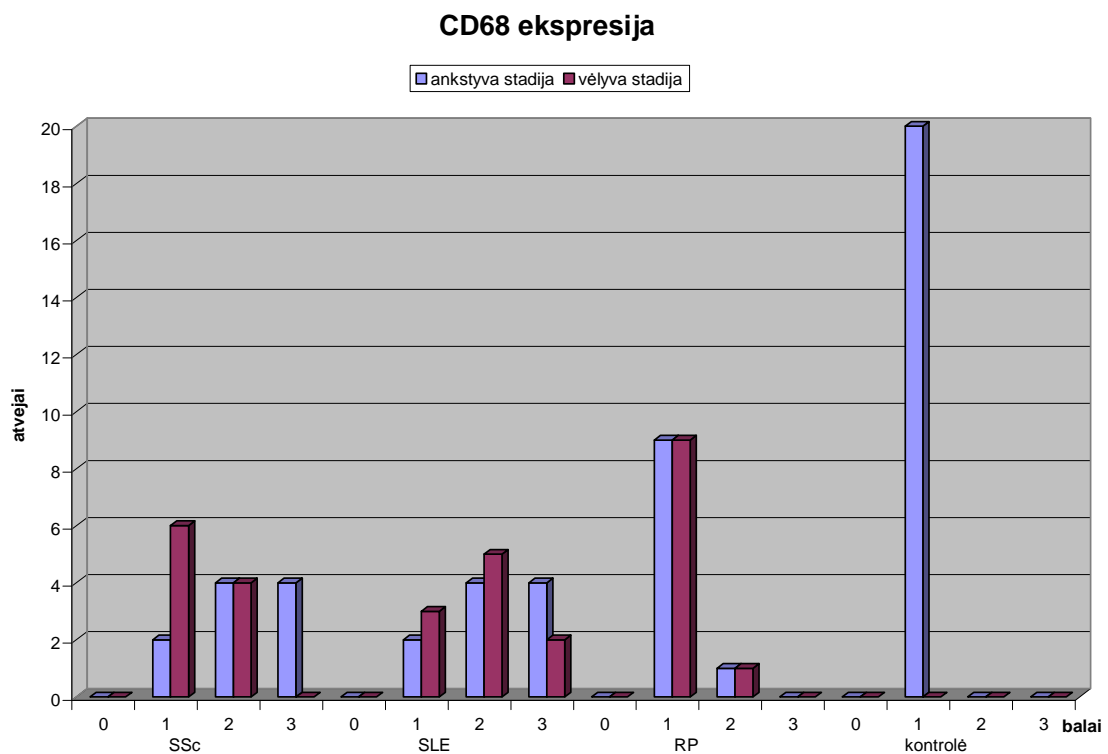
Pav. 30. SRV. Oda. CD68 – teigiamos ląstelės (rodyklės) . Papildomai dažyta hematoksilinu. x400. (kr- kraujagyslė)

Lentelė 6. Audinių makrofagai.

Liga	CD68 ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	2/6	4/4	4/0
SRV n=20	0/0	2/3	4/5	4/2
RP n=20	0/0	9/9	1/1	0/0
Kontrolė n=20	0	20	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,298
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	1.0

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

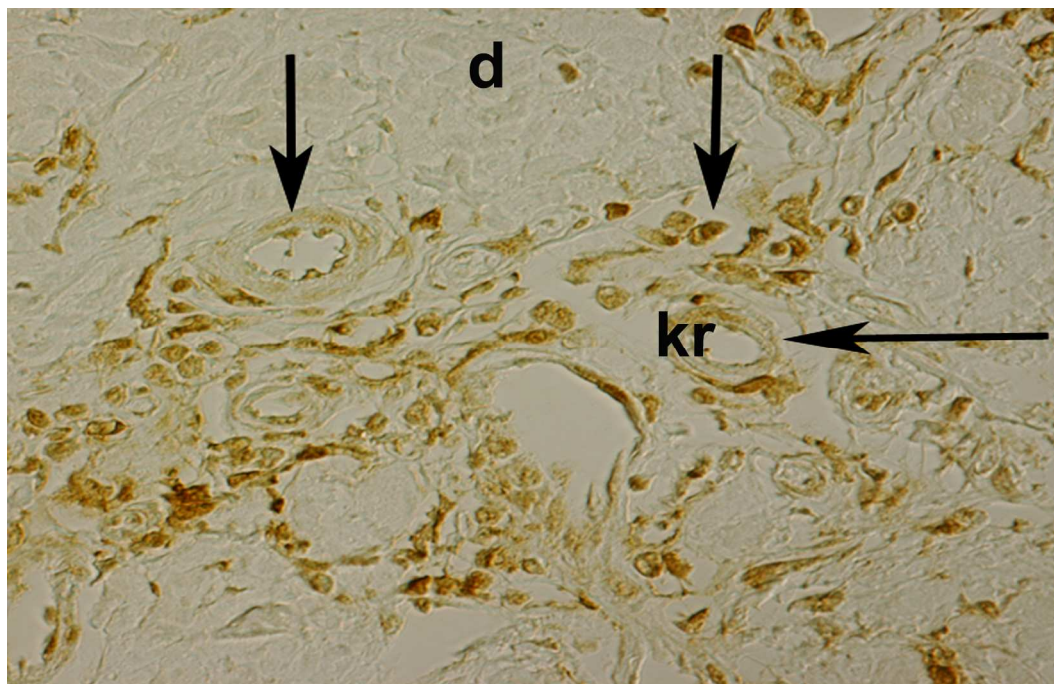


Pav. 31. Audinių makrofagai SSc, SRV ir RP ligonių ir kontrolinės grupės odoje.

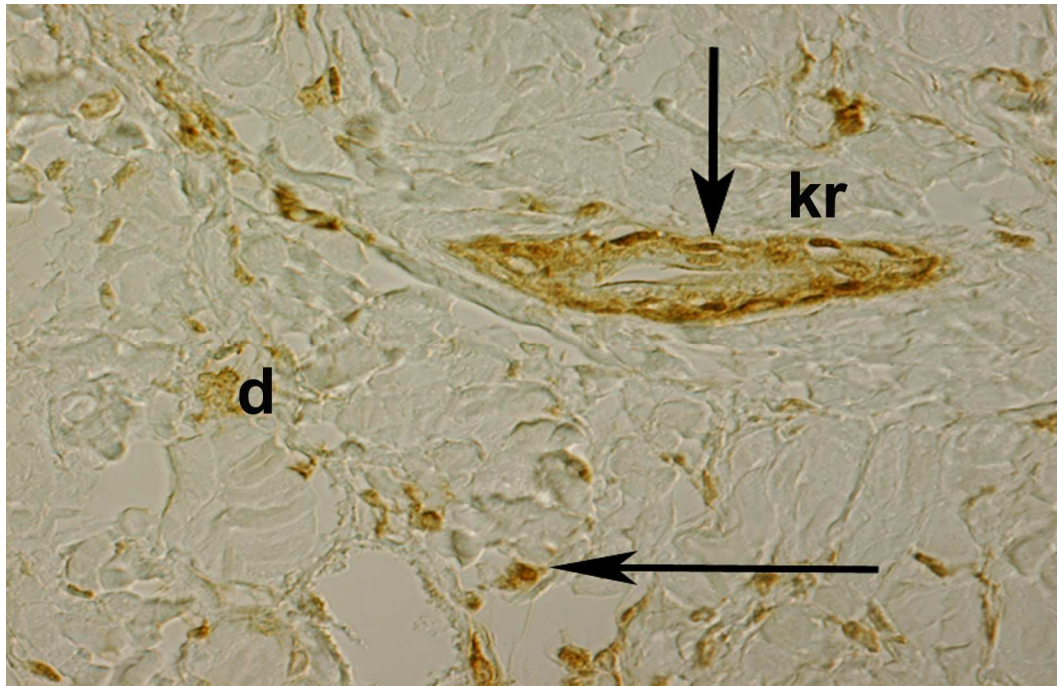
Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje audinių makrofagų infiltracija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams audinių makrofagų infiltracija mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje.

VI.3.3. Endotelio azoto oksido sintazės imunohistocheminė lokalizacija SSc, SRV ir RP ligonių ir kontrolinės grupės odoje

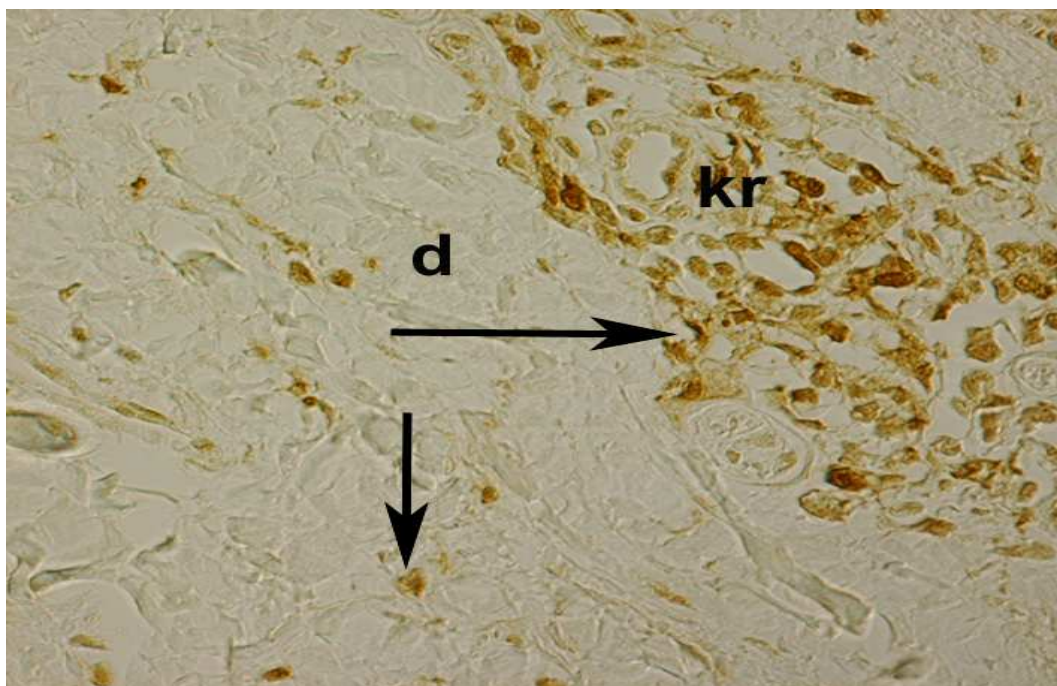
Endotelinė azoto oksido sintazė buvo nežymiai išreikšta sveikų žmonių odos biopstatuose, tačiau jos ekspresija buvo daug ryškesnė SSc, ypač ligos vėlyvoje stadijoje bei SRV atvejais (Pav. 32, 33, 34, 35, lentelė 7).



Pav. 32. Ankstyvoji SSc. Oda. IHC- eNOS. X400 (rodyklės – eNOS ekspresija, kr- kraujagyslė, d- oda)



Pav. 33 Velyvoji SSc. Oda. IHC-eNOS. X400 (rodyklēs – eNOS ekspresija kr-kraujagyslē, d- oda).



Pav. 34. SRV. Oda. IHC - eNOS. X400 (rodyklēs – eNOS ekspresija kr-kraujagyslē, d- oda).

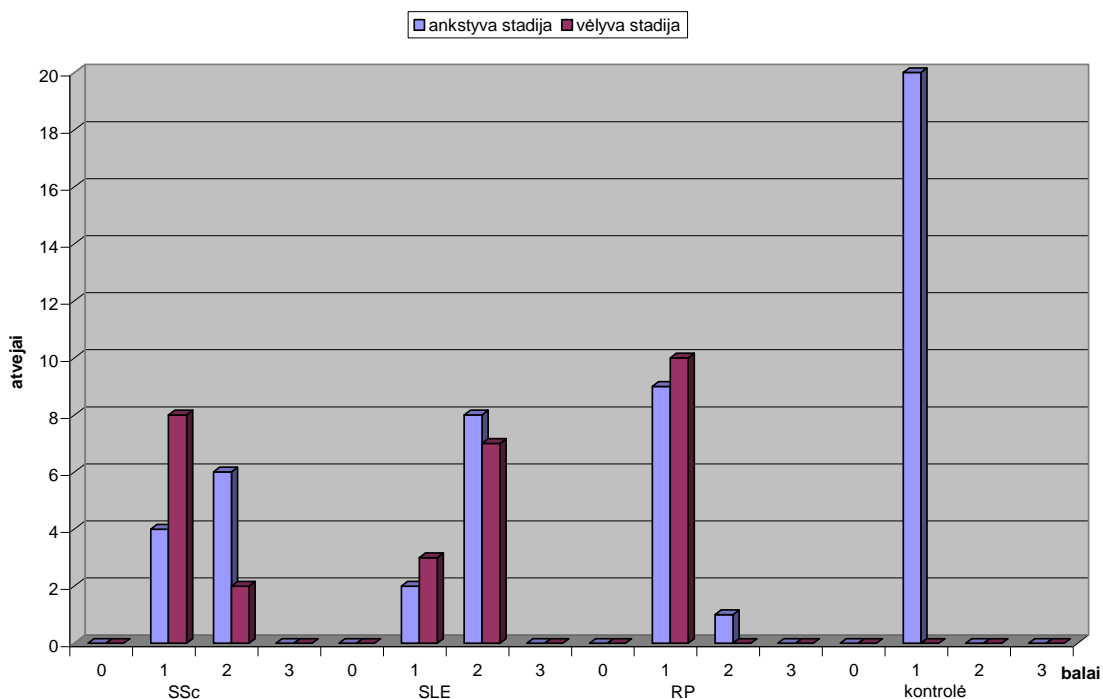
Lentelē 7. Endotelio azoto oksido sintazēs ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	Endotelinēs azoto oksido sintazēs III (eNOS) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	4/8	6/2	0/0
SRV n=20	0/0	2/3	8/7	0/0
RP n=20	0/0	9/10	1/0	0/0
Kontrolē n=20	0	20	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,27
SSc- RP	0,009
SSc- Kontrolē	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolē	<0,0001
RP- Kontrolē	0.317

Paaiškinimas: „0“ = nēra specifiskai nudažytų profilių; „1“ = pavieni specifiskai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiskai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiskai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vēlyvoji ligos stadija

Endotelinės azoto oksido sintazės III (eNOS) ekspresija

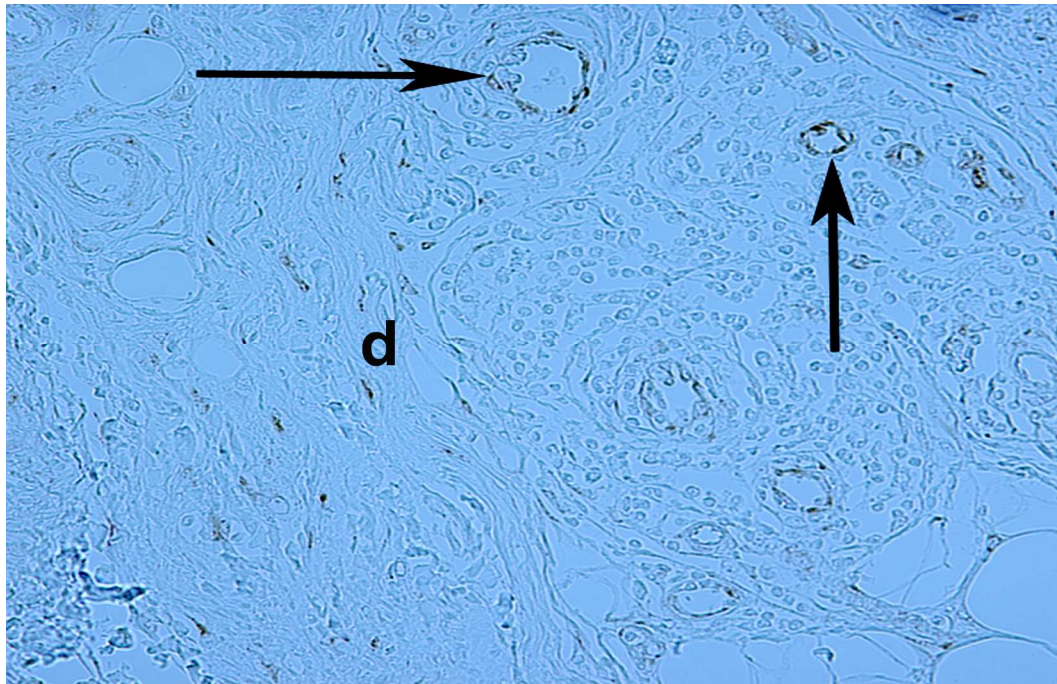


Pav. 35. Endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP palyginus su kontrole

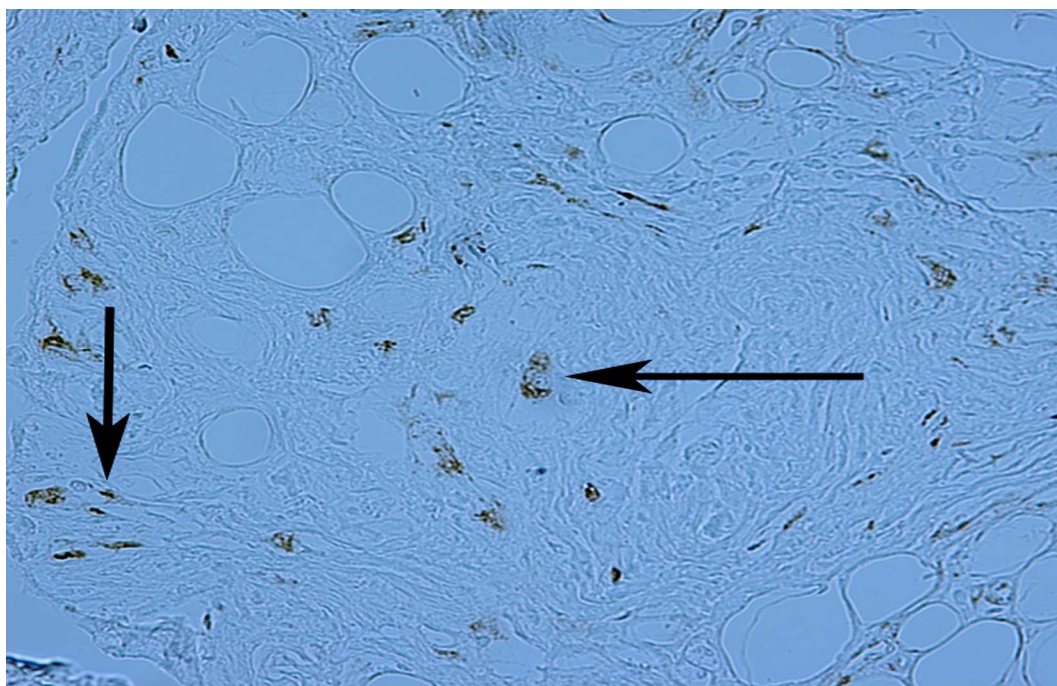
Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje.

VI.3.4. Terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija odoje sergantiems SSc, SRV ir RP palyginus su kontrole

Nežymi terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija buvo nustatyta 25% sveikų žmonių odos biopsijose. Žymesnė HSP-47 ekspresija odoje buvo randama SRV atvejais, tačiau labiausiai HSP-47 pasireiškė SSc eigoje, ypač ankstyvoje ligos stadijoje (Pav. 36, 37, 38, lentelė 8).



Pav. 36. SSc ankstyvoji stadija. HSP-47 IHC žymens ekspresija odoje labiausiai išreikšta odos kraujagyslių sienelėse (rodyklės). HSP-47. x200.



Pav. 37. SSc vėlyvoji stadija. HSP-47 IHC žymuo labiausiai išreikštas fibroblastuose (rodyklės). Oda. IHC- HSP-47. x400.

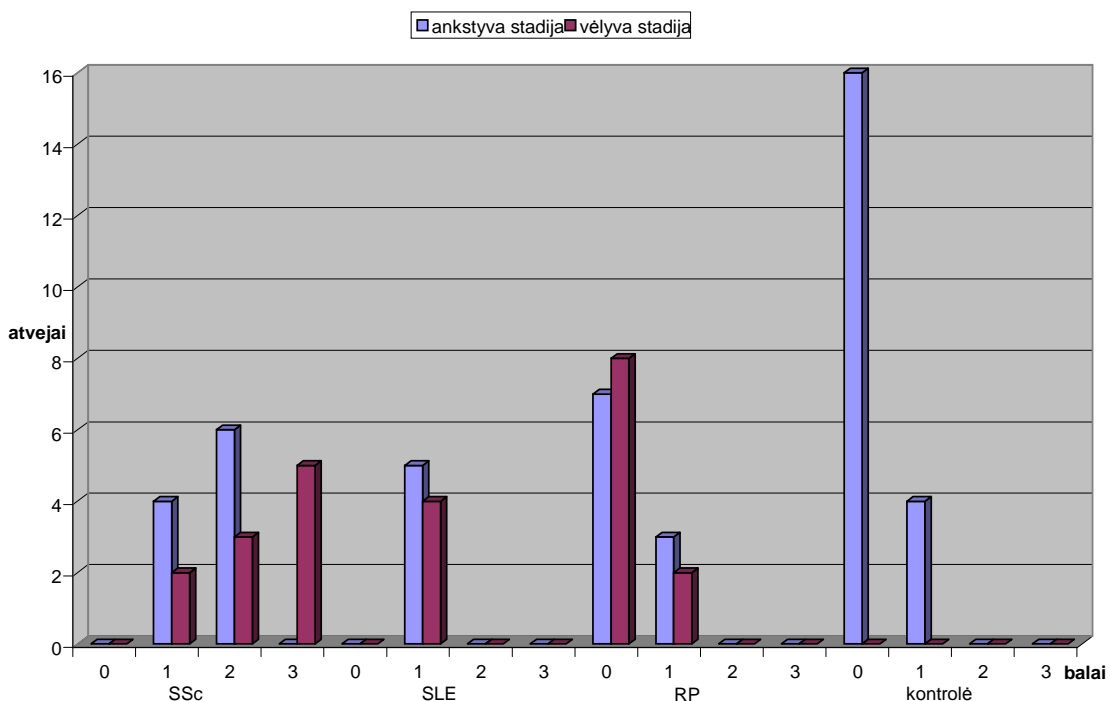
Lentelė 8. Terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija SSc, SRV ir RP ligonių odoje lyginant su kontrole.

Liga	Terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	4/2	6/3	0/5
SRV n=20	0/0	5/4	5/6	0/0
RP n=20	7/8	3/2	0/0	0/0
Kontrolė n=20	16	4	0	0

Lyginimas	p
SSc – SRV	0,086
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	<0,0001
SRV - Kontrolė	<0,0001
RP- Kontrolė	0.708

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiskai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiskai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiskai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiskai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija.

Terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija

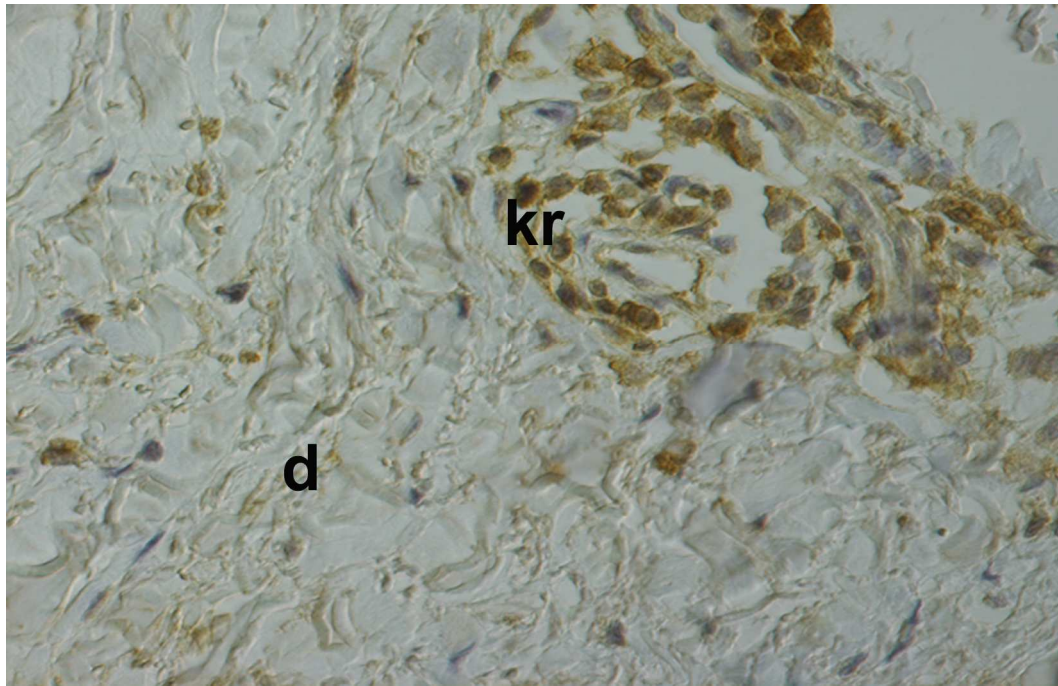


Pav. 38. Terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija

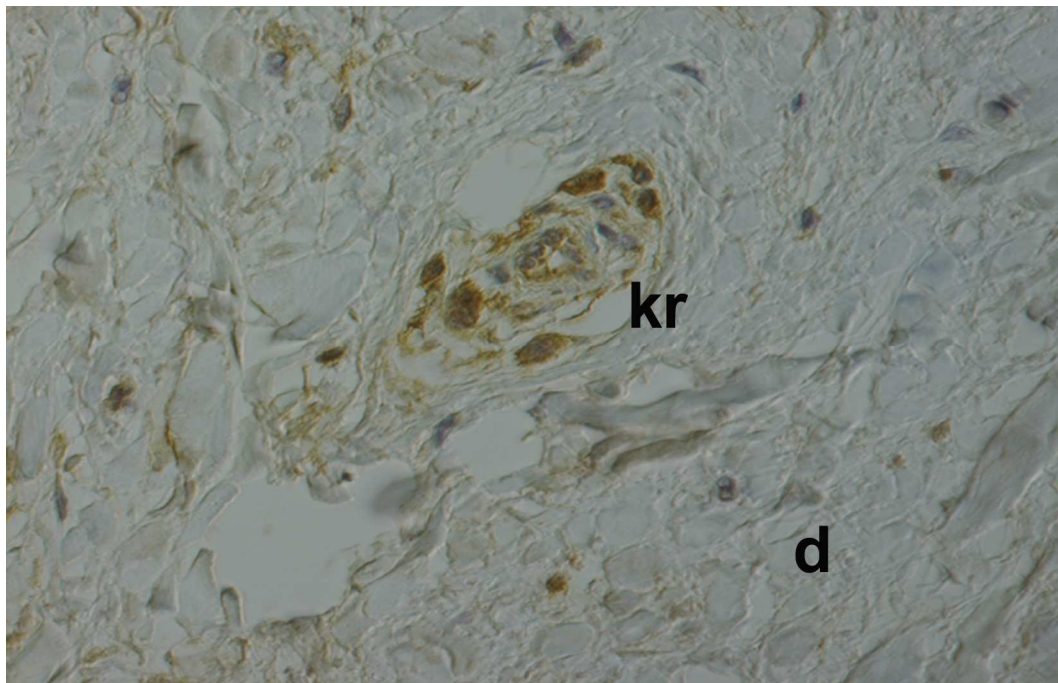
Iš duomenų palyginimo matome, kad ankstyvoje ligos stadijoje terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutinio gausumo), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams HSP-47 ekspresija išliko panaši kaip ir ankstyvoje, o SSc ligoniams – pagausėjo. Be to, SSc ligoniams keitėsi terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresijos lokalizacija – ankstyvoje stadijoje labiausiai išreikšta odos kraujagyslių sienelėse, vėlyvoje – fibroblastuose.

VI.3.5. CD34 imunolokalizacija SSc, SRV ir RP ligonių odoje lyginant su kontrole

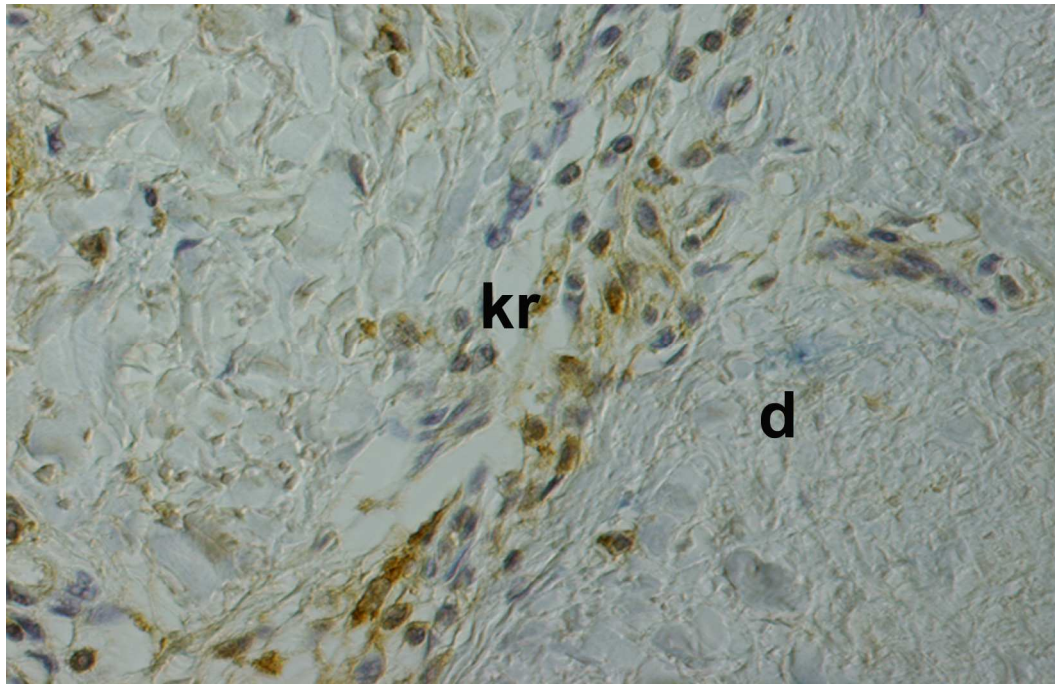
CD34 buvo randamas daugumoje sveikų žmonių odų biopsijose, tačiau jo ekspresija buvo ryškesnė SRV atvejais. Labiausiai CD 34 buvo išreikštas SSc metu, ligos ankstyvojoje stadijoje (Pav.39, 40, 41, 42, lentelė 9).



Pav. 39. CD34 anstyvojoje sisteminės sklerozės stadijoje. Oda. IHC- CD34. x400 (kr- kraujagyslė, d- oda).



Pav. 40. CD34 vėlyvojoje SSc stadijoje. Oda. IHC- CD34. x400 (kr- kraujagyslė, d- oda).



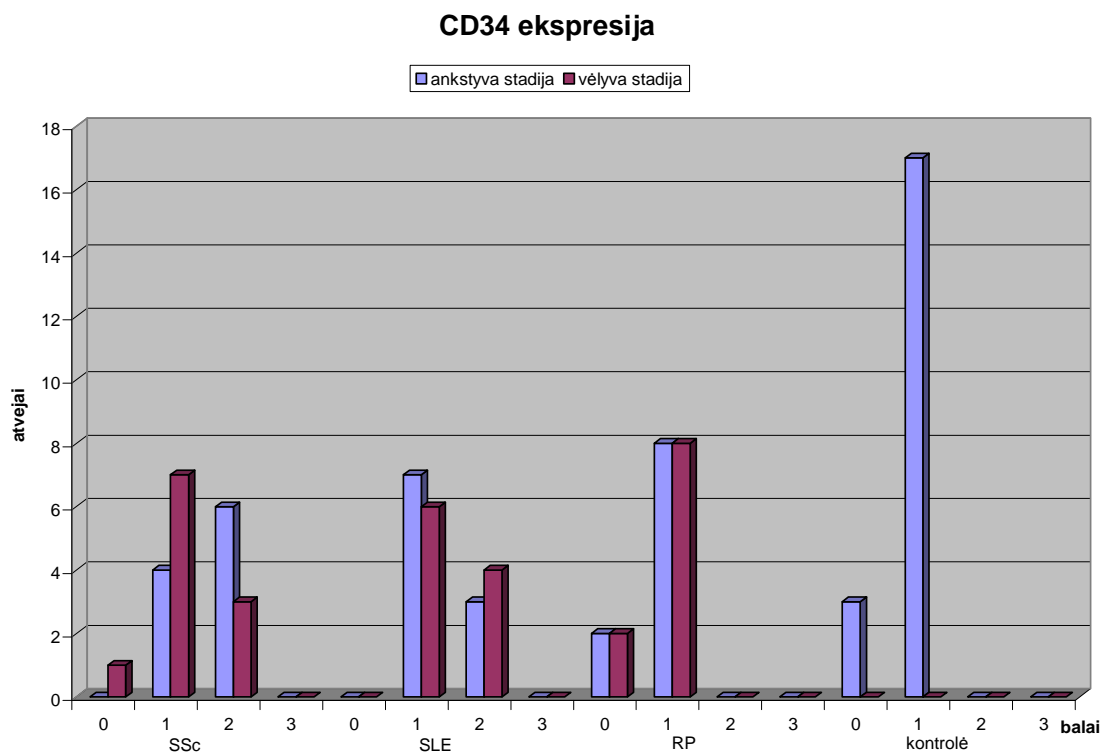
Pav. 41. CD 34 SRV metu. Oda. IHC- CD34. x400 (kr- kraujagyslė, d- oda).

Lentelė 9. CD34 ekspresija odoje sergantiems SSc, SRV ir RP, palyginus su kontrole.

Liga	CD34 ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/1	4/7	6/3	0/0
SRV n=20	0/0	7/6	3/4	0/0
RP n=20	2/2	8/8	0/0	0/0
Kontrolė n=20	3	17	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,524
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	0,001
SRV - Kontrolė	0.001
RP- Kontrolė	0.681

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

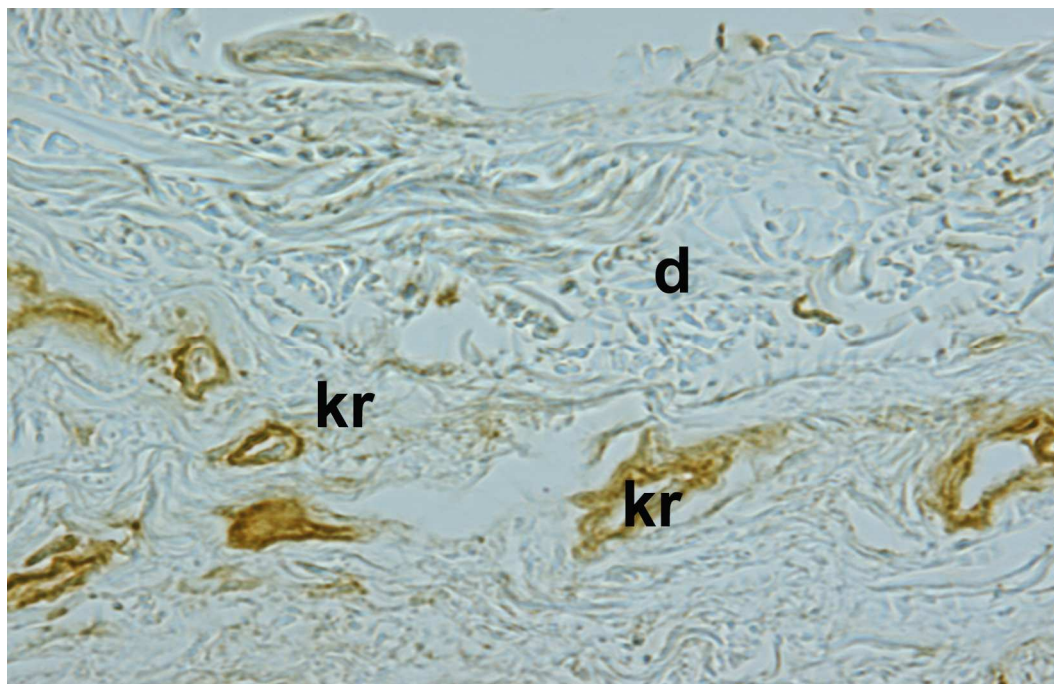


Pav.42. CD34 ekspresija odoje sergantiems SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

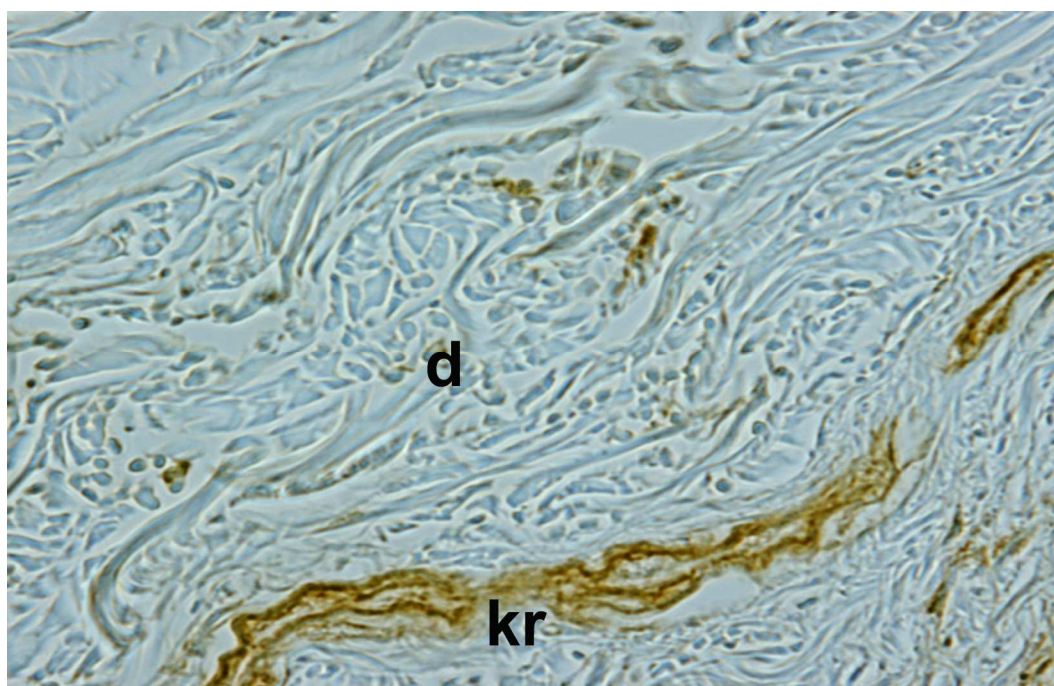
Iš duomenų palyginimo matome, kad ir ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje CD34 ekspresija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė, ankstyvoje stadijoje buvo santykinai gausesnė, vėlyvoje – santykinai mažesnė.

VI.3.6. Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF-A) ekspresija odoje sergantiems SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Nežymi kraujagyslių augimo veiksnio ekspresija buvo aptinkama dalies sveikų žmonių odos biopsijose. Didžiausia VEGF-A ekspresija pasireiškė ankstyvoje SSc stadijoje (Pav.43, 44, 45, lentelė 10).



Pav. 43. VEGF-A ekspresija ankstyvojoje SSc stadijoje. Oda. IHC- VEGF-A. x200, (kr- kraujagyslės, d- oda).



Pav. 44. VEGF-A ekspresija vėlyvojoje SSc stadijoje. Oda. IHC- VEGF-A. x400, (kr – kraujagyslė, d- oda).

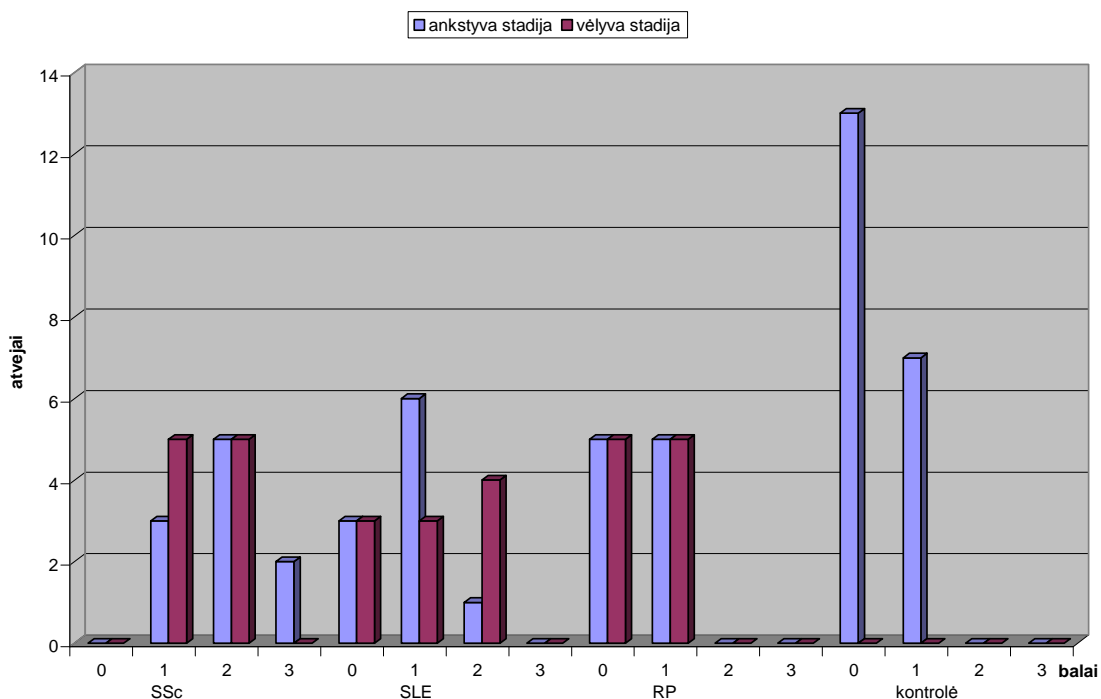
Lentelė 10. Kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

Liga	Kraujagyslių augimo veiksnio (VEGF-A) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	3/5	5/5	2/0
SRV n=20	3/3	6/3	1/4	0/0
RP n=20	5/5	5/5	0/0	0/0
Kontrolė n=20	13	7	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,04
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	0,009
SRV – Kontrolė	0.198
RP- Kontrolė	0.061

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

Kraujagyslių augimo faktoriaus (VEGF-A) ekspresija



Pav. 45. Kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

Iš duomenų palyginimo matome, kad ir ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija SSc ligoniams buvo gausesnė nei SRV ligoniams. SSc ligoniams kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva.

VI.3.7. Kraujagyslių augimo veiksnio receptorių (VEGFRs) imunolokalizacija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Kraujagyslių augimo veiksnio receptorių 1 (FLT-1) buvo nežymiai išreikštas sveikų žmonių odos biopsijose. Ryškiausia šio receptoriaus ekspresija buvo stebima odoje SSc ankstyvojoje stadijoje (Pav. 46, lentelė 11).

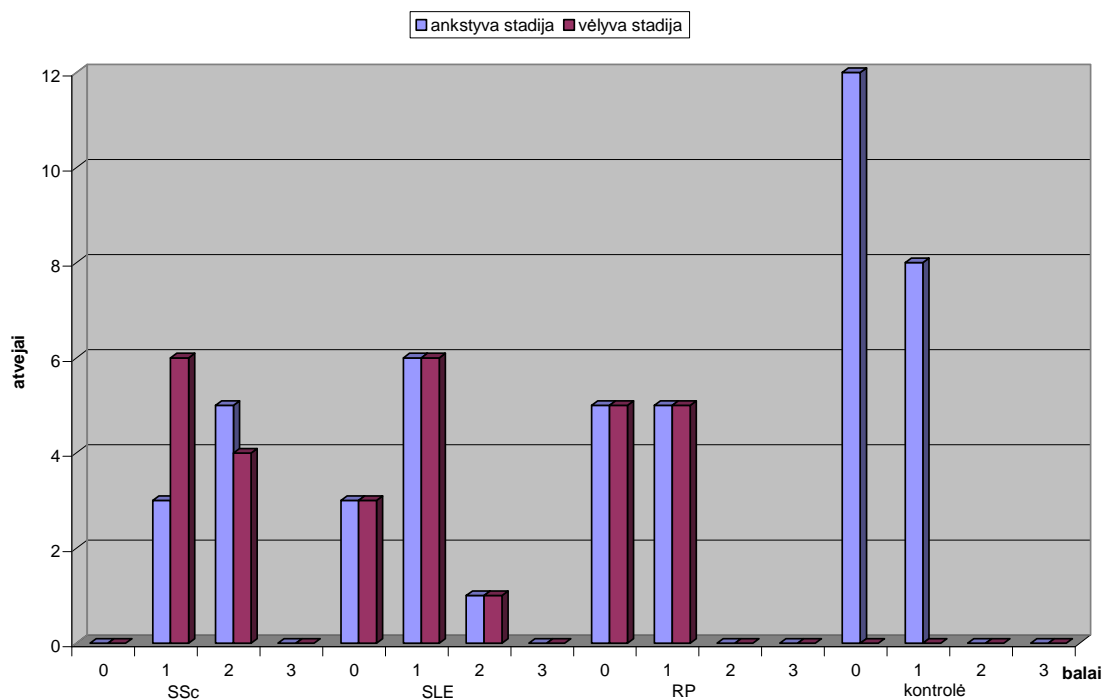
Lentelė 11. VEGFR-1 receptoriaus-1 (FLT-1) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Liga	VEGFR-1 (FLT-1) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	3/6	5/4	2/0
SRV n=20	3/3	6/6	1/1	0/0
RP n=20	5/5	5/5	0/0	0/0
Kontrolė n=20	12	8	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	<0,0001
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV – RP	0,220
SRV – Kontrolė	0.077
RP- Kontrolė	0.530

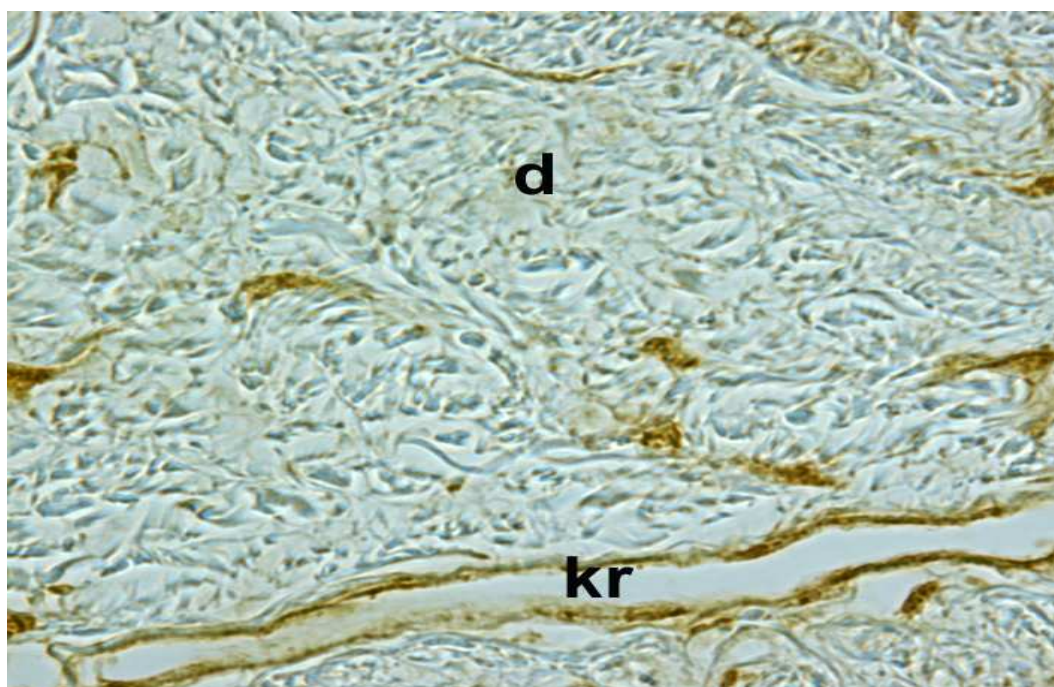
Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiskai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiskai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiskai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiskai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

VEGFR-1 (FLT-1) ekspresija



Pav. 46. VEGFR-1 receptoriaus-1 (FLT-1) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus 2 (FLK-1) nežymi ekspresija buvo aptinkama sveikų žmonių odos biopsiatuose. Ryškiausia FLK-1 ekspresija buvo stebima ankstyvojoje vėlyvojoje SSc stadijoje (Pav. 47, 48, lentelė 12)



Pav. 47. Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus 2 (FLK-1) ekspresija ankstyvojoje vėlyvojoje SSc stadijoje. VEGFR-2 (FLK-1) x 200.(kr- kraujagyslė, d- oda).

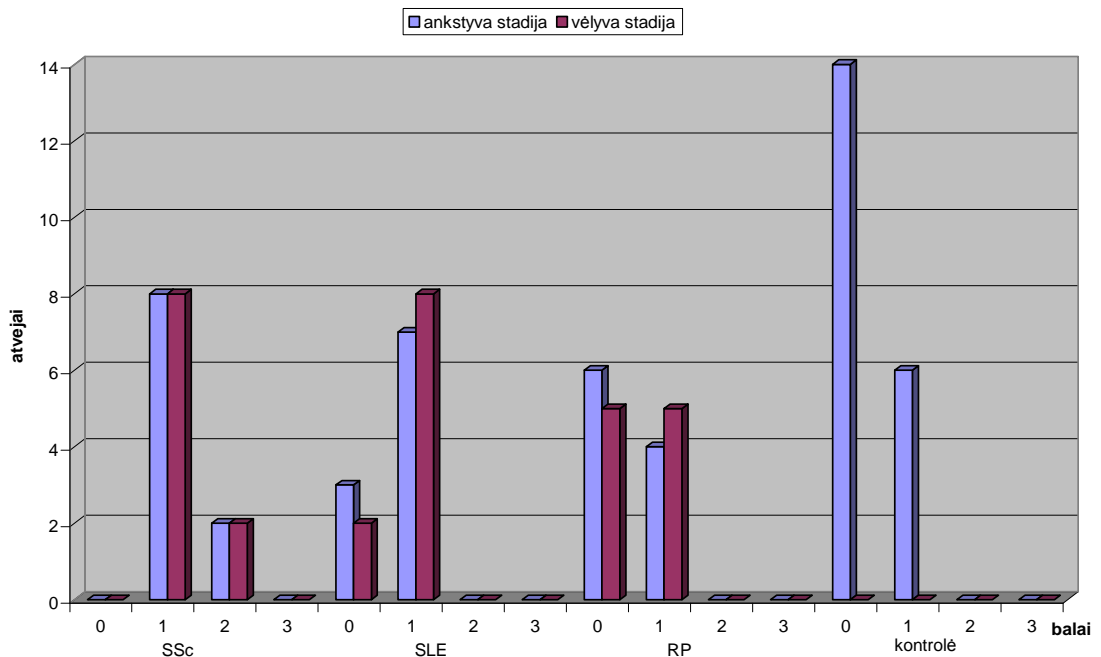
Lentelė 12. Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

Liga	VEGFR-2 (FLK-1) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	8/8	2/2	0/0
SRV n=20	3/2	7/8	0/0	0/0
RP n=20	6/5	4/5	0/0	0/0
Kontrolė n=20	14	6	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	0,005
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	0,056
SRV - Kontrolė	0.005
RP- Kontrolė	0.333

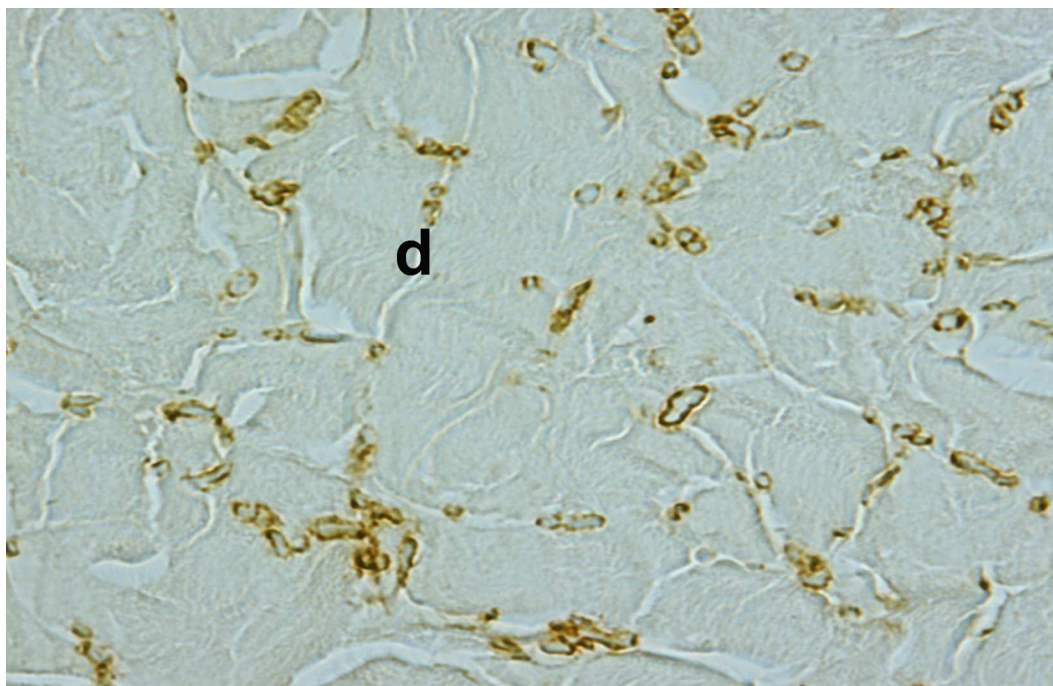
Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

VEGFR-2 (FLK-1) ekspresija



Pav. 48. Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus 3 (FLT-4) nežymi ekspresija buvo aptinkama dalyje sveikų žmonių odos biopsijų. Žymiausia šio veiksnio ekspresija buvo stebima ankstyvojoje vėlyvojoje SSc stadijoje (Pav.49, 50, lentelė 13).



Pav. 49. FLT-4 ekspresija ankstyvojoje ir vėlyvojoje SSc stadijose. Oda. IHC-VEGFR-3 (FLT-4) x400, (d- oda).

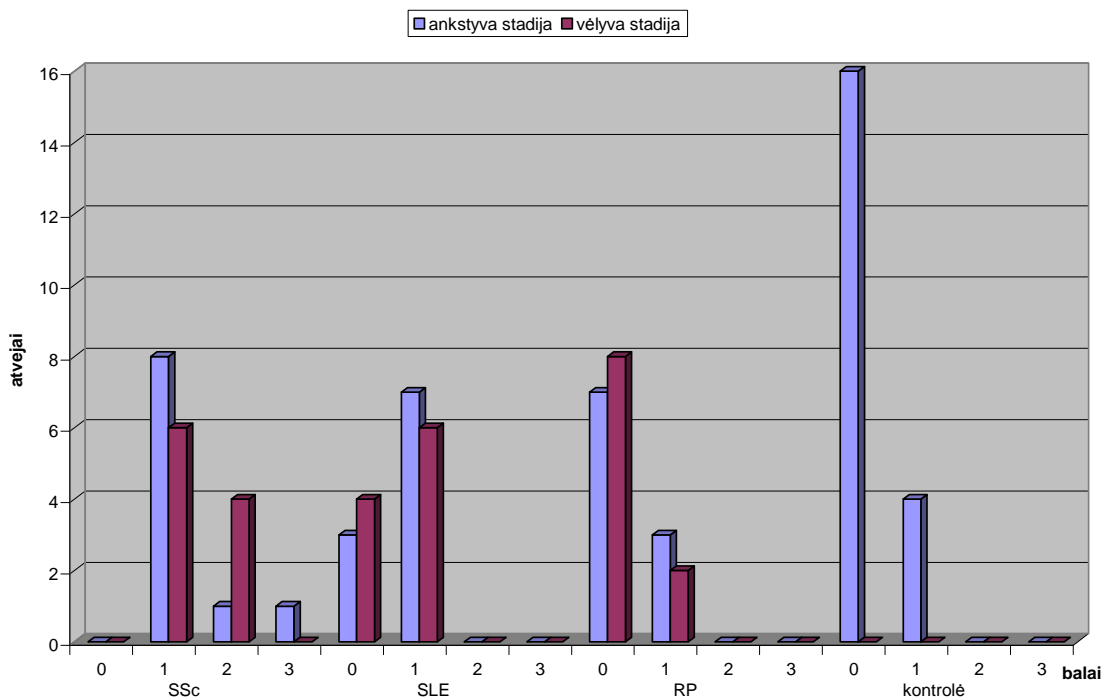
Lentelė 13. Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-3 (FLT-4) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole.

	VEGFR-3 (FLT-4) ekspresija			
	0	1	2	3
SSc n=20	0/0	8/6	1/4	1/0
SRV n=20	3/4	7/6	0/0	0/0
RP n=20	7/8	3/2	0/0	0/0
Kontrolė n=20	16	4	0	0

Lyginimas	P
SSc – SRV	<0,0001
SSc- RP	<0,0001
SSc- Kontrolė	<0,0001
SRV - RP	0,012
SRV - Kontrolė	0.004
RP- Kontrolė	0.708

Paaiškinimas: „0“ = nėra specifiškai nudažytų profilių; „1“ = pavieniai specifiškai nudažyti profiliai; „2“ = dažni specifiškai nudažyti profiliai; „3“ = gausūs specifiškai nudažyti profiliai; „/“ = ankstyvoji/vėlyvoji ligos stadija

VEGFR-3 (FLT-4) ekspresija



Pav. 50. Kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-3 (FLT-4) ekspresija odoje sergant SSc, SRV ir RP lyginant su kontrole

Iš duomenų palyginimo matome, kad ir ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio VEGFR-1 (FLT-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergančių SRV ir kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva.

Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergantiems SRV. SSc ligoniams kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija ankstyvoje ir vėlyvoje stadijoje nesiskyrė.

Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-3 (FLT-4) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė ir kiek gausesnė vėlyvoje stadijoje, lyginant su ankstyva nei sergantiems SRV.

VII. Rezultatų aptarimas

Mūsų darbo rezultatuose stebima, kad ankstyvoje ligos stadijoje vaskulito aktyvumas (pagal histopatologinius požymius) SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė, o vėlyvoje stadijoje SRV ligonių odoje vaskulito aktyvumas išliko aukštas, o SSc – mažėjo. Vaskulitą, endotelio disfunkciją SSc bei SRV atvejais stebėjo daugelis kitų autorių (Westerweel et al., 2009). Infiltrato sudėčiai buvo būdinga, kad ankstyvoje ligos stadijoje putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliacija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo gausi), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams putliųjų ląstelių infiltracija ir degranuliacija išliko gausi, o SSc ligoniams – mažėjo. Putliųjų ląstelių dalyvavimą sisteminių uždegiminių jungiamojo audinio ligų patogenezėje patvirtina daugelis tyrėjų (Jeremia et al., 2007). Audinių makrofagų infiltracija SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams audinių makrofagų infiltracija mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje. Yra žinoma, kad makrofagai, gaminantys didelį kiekį vietiniai biologiškai aktyvių medžiagų įtakoja reumatinių ligų patogenezę (Yamamoto 2009). Mūsų atlikti tyrimai parodė kaip kinta uždegiminių ląstelių infiltracija skirtingose tyriamųjų ligų stadijose, kai stebimi netapatūs pažeidimai kraujagyslėse ir odos stromoje. Tiriant fibrozės vystymąsi, gauti duomenys, kad ankstyvoje ligos stadijoje audinių fibrozavimo laipsnis nei SSc, nei SRV ligoniams nesiskyrė (fibrozavimo arba nebuvo, arba jis buvo nežymus), o vėlyvoje stadijoje tuo metu kai SSc ligoniams vystėsi masyvi fibrozė, SRV ligoniams audinių fibrozavimo laipsnis beveik nesikeitė. Fibrozavimo raida skirtingų reumatinių ligų patogenezėje žymiai skiriasi (Chujo et al., 2009; Yamamoto 2009; Wynn 2008). vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius SSc ligoniams buvo gausnis, lyginant su SRV, ir nors vėlyvoje ligos stadijoje SSc ligoniams vWF nutekėjimas į aplinkinius audinius mažėjo, jis išliko santykinai gausnis, negu SRV ligonių. vWF nutekėjimas iš kraujagyslių spindžio į aplinkinius audinius nebuvo stebėtas kitų autorių. Ankstyvoje ligos stadijoje endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje SSc

ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutiniškai gausi), o vėlyvoje ligos stadijoje SSc endotelio azoto oksido sintazės ekspresija odoje mažėjo, o SRV ligoniams išliko panaši kaip ankstyvoje stadijoje. Yra žinoma azoto oksido reikšmė kraujagyslių būklėi (Blaise et al.,2009;Richard et al.,2008;Cerinic-Matucci et al.,2007). Tuo tarpu terminio šoko baltymo HSP-47 ekspresija ankstyvoje ligos stadijoje SSc ir SRV ligoniams nesiskyrė (buvo vidutinio gausumo), o vėlyvoje stadijoje SRV ligoniams putliųjų HSP-47 ekspresija išliko panaši kaip ir ankstyvoje, o SSc ligoniams – pagausėjo. Be to, SSc ligoniams keitėsi terminio šoko proteino HSP-47 ekspresijos lokalizacija – ankstyvoje stadijoje labiausiai išreikšta odos kraujagyslių sienelėse, vėlyvoje – fibroblastuose. HSP-47 kitų autorių reumatinių ligų atvejais nebuvo tirtas.

Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija SSc ligoniams buvo gausesnė nei SRV ligoniams. SSc ligoniams kraujagyslių augimo veiksnio VEGF-A ekspresija kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva. Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio VEGFR-1 (FLT-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergančių SRV ir kiek gausesnė ankstyvoje stadijoje, lyginant su vėlyva. Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė nei sergantiems SRV. SSc ligoniams kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-2 (FLK-1) ekspresija ankstyvoje ir vėlyvoje stadijoje nesiskyrė. Ankstyvoje ir vėlyvoje ligos stadijoje kraujagyslių augimo veiksnio receptoriaus-3 (FLT-4) ekspresija SSc ligonių odoje buvo gausesnė ir kiek gausesnė vėlyvoje stadijoje, lyginant su ankstyva nei sergantiems SRV. Sisteminių uždegiminių jungiamojo audinio patogenezeje kraujagyslių pakitimai turi svarbią, kartais lemiamą reikšmę (Beyer et al.,2009;Fleming et al.,2009;Avouac et al.,2008).

Fibrozę apibūdinama kaip jungiamojo audinio perteklinis augimas, audinių standėjimas ir/arba randėjimas (Wynn 2008). Ji dažniausiai būna lėtinės uždegiminės reakcijos pasekmė. Nors fibrozė ir neatsiejama nuo lėtinio uždegimo, ją reguliuoja kiti mechanizmai. Fibrozę gali sukelti daugelis

stimulų: persistuojanti infekcija, autoimuninės reakcijos, alerginis atsakas, cheminių medžiagų poveikis, radiacija bei kitoks audinių pažeidimas. Priešingai nei ūmi uždegiminė reakcija, kuriai būdingi greitai atsistatantys kraujagyslių pakitimai, pabrinkimas ir neutrofilų infiltracija, fibrozė atsiranda dėl mėnesiais persistuojančio lėtinio uždegimo, lydimo audinių reparavimo ir remodeliavimo pažeidimų, kai gausiai gaminami augimo veiksniai, proteoliziniai enzymai, angiogeniniai veiksniai, bei kai fibrogeniniai citokinai stimuliuoja jungiamojo audinio komponentų gamybą ir kaupimąsi, pažeisdami įprastinę audinių architektoną (Wynn 2007; Tomasek et al. 2002). Fibrozė paprastai siejama su kolageno pertekliu kaupimu. Kolagenas - tai labiausiai paplitęs žinduolių baltymas, atliekantis įvairias tarpląstelinės medžiagos (ekstraląstelinio matriks) funkcijas. Yra žinomi 27 kolageno tipai, kuriuos koduoja virš 40 genų (Boot-Handford et al., 2003).

SSc - tai sudėtingas daugiasisteminis susirgimas su nepilnai iširta patogenezė. Uždegiminės reakcijos pasekoje vystosi kolageno ir kitos jungiamojo audinio ekstraląstelinės medžiagos padidinta gamyba ir kaupimasis. Nėra tiksliai žinoma, kodėl sergant SSc atsiranda daugiau gaminamų tarpląstelinės medžiagos komponentų. Be vidinių priežasčių, tokių kaip genetinis polimorfizmas, eilė fibrozinių mediatorių: PDGF, TGF- β , CTGF dalyvauja SSc patogenezėje.

Nustatyta, kad pažeistos epitelio ir/ar endotelio ląstelės išskiria uždegimo mediatorius ir inicijuoja antifibrinolizinę grandinę, kuri paleidžia kraujo krešėjimo mechanizmą bei ekstraląstelinės medžiagos komponentų laikiną pagausėjimą (Kumar et al. 2005). Trombocitų degranuliacija sukelia vazodilataciją ir padidina kraujagyslių pralaidumą. Tokį reiškinį mes stebėjome mūsų tyrimuose, kai vWF teigiami komponentai iš pradžių kaupėsi smulkių kraujagyslių spindžiuose, vėliau prasisunkdavo į ekstravaskulinius audinius. Kitų autorių tyrimai (Hettema et al. 2008) rodo padidintą kraujagyslių pralaidumą SSc ankstyvoje stadijoje, o vėlyvoje pralaidumas mažėja, ir mažėja smulkių kraujagyslių tinklo tankumas, kas taip pat matoma ir mūsų tyrimo medžiagoje. Esant padidintam kraujagyslių pralaidumui,

miofibroblastai (aktyvuoti, fibroblastai gausiai gaminantys kolageną α -SMA+) bei epitelio ir endotelio ląstelės gamina membranas ardančias metaloproteinazes (MMPs), to pasekoje kraujagyslių pralaidumas dar padidėja. Aplinkiniai limfocitai bei kitos ląstelės pradeda gaminti profibrozinius citokinus, tokius kaip TGF- β , IL-13 bei PDGF, kurie toliau aktyvuoja esančius aplinkoje makrofagus bei fibroblastus. Vietoje pagaminti citokinai bei chemokinai pritraukia naujų endotelio ląstelių. Kai miofibroblastai pagamina daugiau kolageno nei jo degraduojama, kolagenas kaupiasi ir vystosi fibrozė. Tokiomis sąlygomis pažeidimo vietoje kolageno vis gausėja (Pardo, Selman 2006). Mūsų tyrime analogišką situaciją atkartoję ligonių odos biopsijų pjūviai dažyti histochemiškai picrosirium ir tirti poliarizuotu mikroskopu: ankstyvai ligos stadijai buvo būdingas šviežiai sintezuoto kolageno kaupimasis. Ligonų, sergančių vėlyva SSc stadija, odos biopsiatų pjūviai dažyti histochemiškai picrosiriumu ir tirti poliarizuotu mikroskopu demonstravo masyvias storų, mazguotų, senai sintezuotų kolageno skaidulų sankaupas. SSc židinyje miofibroblastai pasižymi gausia ekstraląstelinio matrikso sinteze, gausia konstitutyvine citokinių bei chemokinių sekrecija ir padidinta ląstelės paviršinių receptorių šiems citokinams ekspresija (Abraham, Varga 2005; Strehlow, Korn 1998; Varga, Abraham 2007). Pažengusi fibrozė paprastai būna jau hipoląstelinė, todėl manoma, kad ji negrįžtama, nes nebelieka MMPs gaminančių ląstelių. Nors yra hipotezių apie fibrozės grįžtamumą (Fallowfield et al. 2006), matomai, pažengusi fibrozė fiziologinėmis sąlygomis lieka negrįžtama. Fibrozės grįžtamumui pirmiausiai reikėtų tiesiogiai nuslopinti citokinus: TGF- β 1, IL-13, chemokinus, adhezijos molekules, integrinus ir angiogenezės induktorius, tokius kaip VEGF (Rattner, Nathans 2006), bei aktyvuoti metaloproteinazes. Mūsų SSc tyrimuose pažengusi fibrozė buvo hipoląstelinė, ir, manome, kad negrįžtama. Odos biopsijos histologiniai radiniai vėlyvoje SSc stadijoje buvo storos mazguotos kolageno skaidulos, supančios ląsteles ir visas išlikusias odos struktūras. Epidermis ir odos priedai buvo atrofuoti. Tai sutampa su kitų autorių (Czirjak et al. 2008) duomenimis. Skaidulų kiekis bei skersmuo priklausė nuo ligos stadijos.

SSc metu masyvi I tipo kolageno sintezė vykdoma pirmiausiai perivaskuliniame regione ir riboje tarp giliosios odos ir paodžio. Tose vietose taip pat randama padidinta sintezė III, V, VI, VII tipo kolagenų, fibronektino ir tenascino (Sollberg et al. 1994; Varga, Bashey 1995; Peltonen et al. 1990). Tenascinas gali slopinti fibroblastų prisitvirtinimą ir plitimą. Glikozaminoglikanai ir dekorinas, kurie nuolat yra odoje, gali atlikti citokinų receptorių ir kolageno skaidulų skersmens moduliatorių funkcijas. Sergant SSc, pakitę proteoglikanai dermatansulfatai gali veikti matrikso skaidulų stuktūros organizavimą (Westergreen-Thorsson et al. 1996). Be to, sergant SSc būna sumažinta kolagenazės ekspresija. Šiaip ji būna gausi daugumoje sveikų fibroblastų. Dėl padidintos kolageno sintezės ir sumažintos kolagenazės ekspresijos susidaro masyvios kolageno sankaupos. Tai padaro šį sutrikusį sintezės ir ardymo procesų santykį kritiniu, pakankamu pradėti negrįžtamą fibrozės procesą. Šis santykis galėtų būti moduluojamas TIMP-1 ekspresija (Takeda et al. 1994), tačiau hipoląstelinės aplinkos sąlygomis modifikacija tampa neįmanoma.

Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, kad odos fibroblastų kultūros iš SSc ligonių in vitro sintezuoja daugiau kolageno, nei sveikų žmonių analogiški fibroblastai (LeRoy, 1972; 1974). Buvo nustatyta, kad be padidintos ekspresijos genų, susietų su kolageno sinteze, padidėja kitų genų ekspresija bei užpildų sintezė. Ląstelių paviršiuje sutrinka integrinų bei jų receptorių TGF-beta, PDGF ekspresija, sutrinka citokinų bei chemokinų gamyba, atsiranda rezistencija apoptozei ir prasideda jungiamojo audinio matriksų remodeliacija (Varga, Abraham 2007). Tokie fenotipiniai pakeitimai išlieka fibroblastų kultūroje per keletą pasažų in vitro. Manoma, kad in situ tuos fenotipinius pakeitimus sukelia ekstraląstelinų veiksnių poveikis (Abraham, Varga 2005; Chizzolini 2007; Pannu, Trojanovska 2004).

Hipotezė apie nefibrozinų ląstelių linijų diferenciaciją į profibrozines mezenchimines ląsteles randa vis platesnį pripažinimą aiškinant SSc patogenezę. Naujausieji tyrimai suteikia nemažai duomenų apie intraląstelinės

signalizacijos kelius, reguliuojančius fibrozės procesą ir audinių pažeidimą SSc metu.

Vėlesnėse SSc stadijose dermoje mažėja putliųjų ląstelių, kai ankstyvojoje stadijoje jų būna daugiau negu sveikoje odoje (Jeremia et al. 2007). Mūsų stebėjimai patvirtina, kad putliųjų ląstelių yra daugiau ir jos intensyviau degranuliuoja ankstyvojoje SSc stadijoje. SSc metu mastocitų degranuliacija sukelia intersticiumo edemą (Akimoto et al. 1998), ką ir mes stebėjome mūsų tyrimuose. Vėliau, SSc metu išnyksta elastinės skaidulos papiliariniame dermos sluoksnyje, taip pat ten jau nebūna retikulinių skaidulų, kolageninės skaidulos tampa heterogeniškos. Mūsų elektroninės mikroskopijos tyrimai parodė kolageninių skaidulų heterogeniškumą, skaidulos buvo storesnės vėlyvoje SSc stadijoje.

Daugybė ląstelių dalyvauja SSc vystymosi procese: endoteliocitai, pericitai, limfocitai, dendritinės ląstelės, monocitai, makrofagai, mastocitai, neutrofilai, eozinofilai, fibroblastai, miofibroblastai ir kaulų čiulpų mezenchiminiai pirmtakai (Trojanowska, Warga, 2007; Rimkevicius 2006). Bazinės įvairių ląstelių savybės gaminti citokinus, augimo veiksnys ir adhezijos molekulės buvo ne kartą studijuotos gyvūnų SSc modeliuose. Kiekviename modelyje buvo atkartota kuri nors žmogaus SSc būdinga grandis, bet ne visos ligos patogenezė. Mūsų tyrimuose stebėjome kraujagyslių pažeidimus, vaskulitus bei ivairaus laipsnio fibrozę.

Jau ankstyvojoje SSc stadijoje stebimi ryškūs endotelio pažeidimai (Sgonc et al. 1996; Mackiewicz et al. 1999; 2001). Be fibroproliferacijos ir ekstraląstelių matriksų sancaupų, SSc metu stipriai remodeluojama kraujotaka, palaipsniui ir nuosekliai išnyksta smulkios kraujagyslės (Abraham, Varga 2005; Varga, Abraham 2007). Mūsų tyrimai parodė ankstyvus kraujagyslių pažeidimus sergant SSc. Vėliau, progresuojant fibrozei ir mažėjant aplinkoje ląstelių tankiui, mažėjo pratekamų kraujagyslių kiekis bei retėjo smulkių kraujagyslių tinklas. Endotelinų ląstelių reikšmė SSc patogenezėje iki šiol nepakankamai aiški. Iš vienos pusės – endotelinės ląstelės SSc metu tampa imuninio aktyvumo taikiniu, taip pat jos gali veikti kaip

papildomi imuniniai stimulatoriai (Kahaleh 1995). Kraujagyslių pažeidimas SSc metu veda prie hipoksijos, ischemijos ir kraujagyslių okliuzijos. Mūsų tyrimuose ankstyvojoje SSc stadijoje stebėjome aukštą eNOS aktyvumą, silpnėjantį progresuojant fibrozei.

47-kDa terminio šoko baltymas (HSP-47), tai specifinis kolageniui molekulinis šaperonas, lokalizuotas endoplazminiame tinkle ir vaidina svarbią rolę odos fibroblastų kolageno sintezėje (Nagata 1998; Chen et al. 2007). HSP-47 būtinas tam, kad nesiformuotų prokolageno agregatai endoplazminiame tinkle ir kad galėtų susidaryti storos skersai dryžuotos kolageno fibrilės. SSc metu HSP-47 ekspresijos padidėjimas sutampa su kolageno sintezės padidėjimu (Kuroda et al. 1998, 2008; Yang et al. 2008), ką patvirtina mūsų gauti imunohistocheminiai duomenys. Manoma, kad HSP-47 yra patikimas aktyvuotų fibroblastų IHC žymuo naudojant rutininius histologinius pjūvius (Kuroda, Tajima 2004). HSP-47 fibroblastuose sukelia padidintą kolageno sintezę, sekreciją bei kaupimąsi, taip pat didina laisvųjų radikalų gamybą (Miletić et al. 2007). Neutrofilų defensinas-alpha taip pat gali sukelti HSP-47 ekspresiją ir fibrozę (Yoshioka et al. 2007). Mūsų tyrimuose HSP-47 aktyvumo padidėjimą konstatavome fibroblastuose vėlyvoje SSc stadijose. Tai reiškia, kad žymus fibrozavimas atsiranda ligai progresuojant, o ne ligos pradžioje. Tuo tarpu ankstyvoje SSc stadijose HSP47 aktyvumas buvo žymiai didesnis ant endoteliocitų. Turint omeny, kad HSP47 yra kolagenams specifinis baltymas, skatinantis fibrozę, jo lokalizacijos skirtumas ant endoteliocitų ankstyvoje SSc ir ant fibroblastų vėlyvoje SSc stadijose mūsų požiūriu yra labai reikšmingas.

Mūsų stebėjimai patvirtina tų autorių darbus kurie rodo, kad SSc prasideda kraujagyslėse visų pirma nuo pakitimų kapiliaruose, per kraujagyslių okliuziją ir vėliau vystosi fibrozė. Iš dalies nebūtina nagrinėti kokios priežastys paleidžia SSc būdingų pažeidimų grandinę endoteliocituose. Daugelio autorių dėmesys nukreiptas į ET-1, TGF-beta, MMPs, metaloproteinazių inhibitorius (TIMPs) bei uždegimo mediatorius, interleukinus ir chemokinus, molekules

kurios mūsų tyrimuose nebuvo tirtos, mes rėmėmės kitų autorių atitinkamais duomenimis.

Sveikas endotelis atlieka patikimo barjero tarp cirkuliuojančio kraujo ir aplinkinių audinių funkciją, užtikrina medžiagų apsikeitimo galimybę ir neleidžia kraujui krešėti. Kraujagyslėse endotelio citų sluoksnis - tai pusiau pralaidus barjeras, lokalizuotas pasienyje tarp kraujagyslės spindžio ir perivaskulinių audinių (Bazzoni 2006; Mackiewicz et al. 2002 a). SSc metu kraujagyslių patologija yra susijusi su pažeistomis kraujagyslių funkcijomis: padidintu vazospazmu, sumažinta vazodiliacija, padidėjusiu sienelių adhezivumu trombocitams ir limfocitams. Sergant SSc, endotelinio selektyvaus filtro savybės kinta (Mackiewicz et al. 2002 a). SSc atveju atsiranda disbalansas tarp endotelio signalų: padidinto vazokonstriktinį poveikį turinčio Endotelino-1 atpalaidavimo ir susilpninto vazodilacinio mechanizmo (azoto monoksido - NO, su endotelium susijusio atpalaidavimo veiksnio EDRF). SSc metu taip pat būna padidinta trombocitų agregacija. Mes tai stebėjome per imunohistocheminį vWF ekspresijos padidėjimą kraujagyslių spindžiuose SSc ankstyvoje stadijoje. Von Willebrand'o veiksnys (vWF) yra didelis multimerinis glikoproteinas, gaminamas endotelio Weibel – Palade kūneliuose. Mūsų duomenys patvirtino ryškų Von Willrebrando veiksnio patekimą į išorinę kraujagyslių aplinką ir rodo kraujagyslės sienelės pralaidumo padidėjimą ypač SSc ligonių odoje.

Literatūroje aprašomi ir kiti veiksniai, kaip proteazės (granzyme 1), lipoperoksidazės ir IgG antiendoteliniai autoantikūnai, veikiantys šį procesą. Pokyčiai nago guolio kapiliaruose gali būti vieni iš pirmųjų SSc požymių (Maricq 1986; Scheja et al. 1996). Kraujagyslių pažeidimas yra SSc klinikinių požymių pagrindas vystantis plautinei hipertenzijai, miokardo disfunkcijoms, inkstų pažeidimui.

SSc metu, greta ryškios kraujagyslių redukcijos yra naujų kraujagyslių formavimosi pastangų požymių (Mackiewicz et al. 2002c; Konttinen et al. 2003). Įdomu, kad VEGF yra stipri angiogeninė molekulė, SSc metu pasižymi hiperekspresija (ką matėme ir mūsų tyrimo rezultatuose), nepaisant

nepakankamos angiogenezės. Matomai, ilgalaikė VEGF ekspresija turi paradoksalų, priešingą nei įprastą, poveikį naujų kraujagyslių formavimuisi. Prie defektyvios angiogenezės SSc metu prisideda defektyvi vaskulogenezė (Distler et al. 2004). Vaskulogenezė - tai visiškai naujų kraujagyslių formavimasis iš atskirų ląstelių, o angiogenezė – pumpuravimasis iš jau egzistuojančių kraujagyslių. Šiame procese stebimi vazodiliatacija, padidintas kraujagyslės pralaidumas, sienelės destabilizavimas, ekstraląstelinio matrikso degradacija. Po to seka endotelinių ląstelių proliferacija bei migracija. Ischemijos vietose migravusieji endoteliocitai formuoja vamzdelius, stabilizuojamus lejomocitų bei pericitų. Procesą kontroliuoja daugelis angiogeninių bei angiostatinių veiksnių (Maurer et al. 2007). Kaip ir kituose procesuose (Mackiewicz et al. 2001; 2002 b) SSc metu ląstelių žūtis ir naujų kraujagyslių formavimasis - tai sudėtingas ir įvairialypis procesas. Manoma, kad jau ankstyvojoje SSc stadijoje sumažėja kilusių iš kaulų čiulpų, cirkuliuojančių CD34+ endotelinių ląstelių pirmtakų bei sutrinka jų diferenciacija į funkcionuojančius endoteliocitus (Del Papa et al. 2006). Yra duomenų apie reaktyvią vaskulogenezę sergant SSc (Mackiewicz et al. 2002). Endotelinių ląstelių pirmtakai - tai cirkuliuojančios kraujyje nesubrendusios ląstelės, galinčios diferencijuotis į miokardines ar endotelines ląsteles (Serrano et al. 2008). Todėl SSc gydymui numatoma taikyti CD133+, VEGFR2+ bei CD34-pozityvias kamienines ląsteles (Distler et al. 2008; van Laar, Tyndall 2008; Gomer 2008).

Yra žinoma, kad hipoksija sukelia kraujagyslių endotelio remodeliavimą (Faller, 1999). Ultrastruktūriniame lygyje ankstyviausi pokyčiai pasireiškia didelių tarpų tarp endoteliocitų susidarymu, endotelinių ląstelių citoplazmos vakuolizacija, bazalinių ir plokštes panašių struktūrų kiekio padidėjimu ir endoteliocitų citoplazminės membranos įtrūkimais (Fleischmayer et al. 1976).

Tai, kad uždegimas įtakoja ir moduliuoja angiogenezę pastebėta įvairiuose organuose. Uždegiminės ląstelės įtakoja šį procesą: limfocitai dažniausiai jį slopina, o monocitai/makrofagai skatina (Wagner et al. 2007).

Kraujagyslių pamatinių membranų sudėtyje yra IV, XV ir XVIII tipų kolagenų, būtinų išgyventi endoteliocitams ir reguliuoti angiogenezei. Fibroblastų augimo veiksniai taip pat sąveikauja su atitinkamais endotelinių ląstelių receptoriais ir inicijuoja intraląstelių signalų grandines dalyvaujančius kraujagyslių augimo moduliacijoje. Po kontakto su FGFb ląstelės patiria galias funkcines permainas, priklausomai nuo jų jautrumo šiuo momentu, įjungia genų ekspresiją ir naujų baltymų sintezę (Ulbrich et al. 2008).

Angiogenezė bei limfangiogenezė tai sudėtingi procesai apjungiantys sąveikavimą keleto augimo veiksnių bei receptorių. Dalyvaujant padidinantam kaulo čiulpų makrofagų skaičiui, VEGFR-1 signalizavimas skatina limfangiogenezę ir angiogenezę (Murakami et al. 2008).

Ryškiausiai SSc kraujagyslių pažeidimai stebimi kapiliaruose ir smulkiose kraujagyslėse (Hummers 2006). Kapiliarų pažeidimas apibūdinamas deformuotomis ir netaisyklingomis kilpomis. Mūsų tyrime šio proceso išraiška matoma krūminiams kapiliarams susidarant ankstyvoje SSc stadijoje.

Tokie pokyčiai kaip kapiliarų tankio sumažėjimas ir net avaskulinės zonos, atliekant nago guolio kapiliaroskopiją stebimos dar preklinikinėse SSc stadijose (Maricq et al. 1980). Kraujagyslių pažeidimai SSc metu pasireiškia formuojant megakapiliarus ir avaskulines zonas. Sumažintas kapiliarų tankis odoje kliniškai pasireiškia pirštų opomis. Ilgainiui kraujagyslių pažeidimas progresuoja. Daugumai SSc pacientų išsivysto Reino sindromas, hipoksiniai vidaus organų pažeidimai (Guiducci et al. 2007).

Reino sindromo metu stebimi kraujagyslių sienelių sustorėjimas, pamatinės membranos sustorėjimas, kraujagyslių okliuzija, vėliau - nežymi devaskuliarizacija. SSc 95% būna lydima Reino sindromo. Paprastai Reino sindromas pasireiškia pradžioje, o vėliau pasirodo kiti SSc požymiai. Reino sindromas gali būti pirminis, su niekuo nesusijęs, arba susijęs su mišria jungiamojo audinio liga, SRV, reumatoidiniu artritu, krioglobulinemija.

Mūsų duomenys parodė, kad dauguma mononuklearų infiltruojančių odą SSc metu yra CD68+ teigiami makrofagai. Monocitai ir makrofagai

pasižymi fenotipų įvairove (Gordon 2003; Gordon, Taylor 2005; Mosser 2003), atsakant į mikroaplinkos pasikeitimus. SSc patogenezeje makrofagų veikla nukreipta vaskulopatijai ir fibrozavimui (Becker et al. 2008). IL-10, svarbus imunoreguliacinis makrofagų citokinas vykdo apoptozinių ląstelių klirensą, palaiko homeostazę ir slopina autoimunitetą. Reguliacinis mechanizmas veikia per transkripciją, o ne per fagocitozę ir reikalauja betarpiško ląstelių kontakto, (Chung et al. 2007).

Monocitų ir endoteliocitų sąveikavimas yra svarbus kraujagyslių ligų patogenezeje (Artigues et al. 1998). Mononuklearai gali įtakoti endoteliocitus tiesiogiai ar per citokinus, kolageną, glikozaminoglikanus (Kahaleh 1994). Odos histologinė analizė mūsų medžiagoje parodė endotelio pažeidimą ir mononuklearų infiltraciją jau ankstyvosiose SSc stadijose (Prescott et al. 1992). Mononuklearai rasti dermoje ir aplink kraujagysles (Roumm et al. 1984), taip pat buvo ir mūsų tyrimų rezultatuose. Endotelinių ir imuninių ląstelių sąveikavimas gali angiogenezę skatinti arba ją slopinti, priklausomai nuo aplinkos veiksnių (Noonan et al. 2008). Antigenų sukelta T ląstelių aktyvacija aptinkama ankstyvose SSc stadijose, dar prieš atsirandant mikroskopiniams fibrozavimo požymiams. Aktyvuotos T ląstelės daugumoje būna antrojo tipo T helperiai gaminantys IL-4 ir IL-13, kurie ir indukuoja fibrozę. B ląstelės taip pat aktyvuojamos anksti SSc patogenezeje, ir gaminant autoantikūnus yra pajėgios sukelti fibroblastuose pasikeitimus į profibrozinį fenotipą. Makrofagai perivaskuliniuose infiltratuose būna aktyvuojami ir gamina CC-chemokino ligandą 2, TGF- β ir PDGF. Visi šitie veiksniai skatina fibroproliferaciją bei fibrozę (Sakkas et al. 2006).

Specifinių antigenų, komplemento ar kito transmembraninio stimulo aktyvuotos putliosios ląstelės gamina tris eukozanoidus: prostaglandiną (PG)(D)₂, leukotrienus (LT)B(4) bei LTC(4) ir pagrindinę cisteinil leukotrienu molekule (cysLTs). Visos tos molekulės gali inicijuoti, padidinti ar slopinti uždegiminį atsaką ir moduluoti jo eigą (Boyce 2007).

SSc metu hipoksijos paveiktose ląstelėse, kai streso sąlygomis baltyminiai šaperonai tampa nebepajėgūs ištaisyti naujai sintezuotų baltymų

netaisyklingų erdviųjų struktūrų, ir tų baltymų nesuardo su ubikvitinu susietos proteosomos, endoplazminiame tinkle gali kauptis ydingai suformuoti baltymai, kurie nukreipia ląstelę apoptozės arba specifinės patologijos kryptimi (Glembotski 2007;2008).

Kraujagyslių susiaurėjimo ir išnykimo mechanizmas SSc metu iki šiol nėra gerai ištirtas. Buvo parodyta, kad cirkuliuojantys mononuklearai ir aktyvuoti endoteliocitai pasižymi aukšta AIF-1 ekspresija, kuri gali skatinti adhezinių molekulių ekspresiją. Alografto uždegiminis veiksnys (AIF-1), baltymas randamas lėtinės širdies transplantato atmetimo reakcijos metu, dalyvauja imuniniame atsake ir proliferacinėje vaskulopatijoje. Sergantiems SSc AIF-1 baltymas buvo aptiktas plaučių ir pakenktos odos kraujagyslėse. Manoma, kad AIF-1 yra svarbus SSc patogenezėje, kai jis stimuliuojamas TGF- β (Del Galdo et al. 2006). Toliau TGF- β indukuoja citokinų ir augimo veiksnių sekreciją bei kraujagyslių lejomocitų ir miofibroblastų aktyvaciją, migraciją bei proliferaciją. To pasekoje vystosi fibrozė ir kraujagyslių spindžių susiaurėjimas - pagrindiniai SSc požymiai.

Kraujagyslių sienelėse SSc metu randamos C5b-9 sankaupos parodo humoralinį imuninį procesą, galimai susietą su virusų sukeltu endotelio neoantigenišku (Magro et al. 2004).

Sergantiems SSc buvo rasta ultrastruktūrinių pokyčių, bylojančių apie aksonų degeneraciją ir citoskeleto pažeidimus nemielinizuotose nervų skaidulose. Taip pat buvo rastos fokalinės lygiųjų raumenų ląstelių degeneracijos, dažniausiai kartu su degranuliojančiomis putliosiomis ląstelėmis. Putliosios ląstelės aktyviai dalyvauja alerginių, reumatinių ligų patogenezėje (Takemoto et al. 2008). Dauguma mastocitų buvo išsidėstę arti nervų bei kraujagyslių. Pamatinės membranos buvo reduplikotos, endoteliocitai hipertrofiški, kraujagyslių spindžiai obliteruoti (Malandrini et al. 2000). Mūsų darbo duomenimis SSc ankstyvajai stadijai buvo būdingas aktyvus vaskulitas ir ir putliųjų ląstelių infiltracija, ką patvirtina ir kitų autorių duomenys (Kato et al. 2006). Vaskulitai paprastai lydi SSc bei kitas uždegiminius jungiamojo audinio sisteminės ligas (Dadoniene et al. 2005;

Mackiewicz et al. 2005). Putliųjų ląstelių infiltracija padidėja pažeistoje odoje ankstyvosiose SSc stadijose (4 lentelė). Kamieninių ląstelių veiksnio (SCF), kuris yra ir mastocitų augimo veiksnys, pagausėja SSc pakenktoje odoje. SCF vaidina svarbią rolę fibrozavimo procese ankstyvoje SSc stadijoje (Yamamoto et al. 1998).

Padidintas kraujo klampumas dėl pakitimų kraujo ląstelėse ir plazmos komponentuose gali sukelti mikrocirkuliacijos pažeidimus. Endotelio atpalaiduojamas NO yra reikšmingas vazodiliacijai, siejamai su kraujo srovės pagerinimu. Endotelinės (eNOS) azoto sintazės polimorfizmas gali įtakoti eritrocitų deformacijos galimybes ir didinti kraujo klampumą. eNOS – 786 ir 894T žymiai dažniau aptinkamos sergant SSc nei sveikiems žmonėms. Tai parodo, kad SSc metu kraujo klampumas padidintas (Mannini et al. 2007). NO gamyba dermos endoteliocituose SSc metu yra sutrikusi (Romero et al. 2000), kaip ir SRV bei RA metu (Nagy et al. 2007). Žemas parcialinis deguonies slėgis *in vitro* ir *in vivo* sukelia genų ekspresijos pakitimus. Žemas parcialinis deguonies slėgis (hipoksija) per transkripciją sukelia vazoaktyvių medžiagų ir ekstraląstelinio matriksio baltymų gamybą, tuo pačiu moduluojant kraujagyslių tonusą ir remodeliuojant perivaskulinę aplinką. Transkripcijos būdu hipoksija aktyvuoja vazokonstriktinius genus ir lejomocitų mitogenus (PDGF- β , endoteliną-1, VEGF, trombospondiną-1 bei kolageną remodeliuojančias molekules (collagenase IV (MMP-9), ir slopina vazodilatatorių bei antimitogeną eNOS. Trumpalaikė hipoksija pasižymi vazokonstriktiniu poveikiu, o ilgalaikė - sukelia lygiųjų raumenų proliferaciją ir remodeliaciją (Faller 1999).

Mūsų duomenimis SSc metu dermoje eNOS ekspresija būna padidinta tik pradinėse ligos stadijose, o vėlyvose dominuoja iNOS. Tokiu būdu, laikui bėgant, vyksta persijungimas nuo endoteliocitų aktyvavimo į citokinų gamybą. iNOS - tai galinga laisvųjų radikalų gamintoja, o laisvieji radikalai SSc metu pažeidinėja audinius (Cotton et al. 1999). Endotelio azoto sintazė iš esmės prisideda prie laisvųjų radikalų gamybos kraujagyslių sienelėje ischemijos/reperfuzijos metu (Hallström et al. 2008). Kraujagyslių endotelio

disfunkcija - tai sudėtingas fenomenas, kurį gali inicijuoti azoto oksido deficitas esant tuo pačiu metu peroksinitrito pertekliui (Heeba et al. 2007). Nustatyta, kad sveikų žmonių ir sergančių SSc mezenchiminės kamieninės ląstelės (MSC) gali diferencijuotis į endotelines ląsteles. Mūsų duomenimis SSc metu randama mažiau VEGFR-2+ ląstelių ir stebimas ankstyvas ląstelių senėjimas. In vitro randama padidinta VEGFR1 ir VEGFR-2 ekspresija, bet nėra CD31 ir aneksino V ekspresijos, bei sumažinta migracija, netgi po stimuliacijos. Sergant SSc, pažeistų endoteliocitų savaiminis atsistatymas apsunkintas (Cipriani et al. 2007).

Mūsų tyrimo duomenimis ankstyvos SSc stadijos pasižymi perdėtai gausia VEGF ekspresija, ką patvirtina ir kiti autoriai (Chitale et al. 2008), cirkuliuojančių kamieninių proendoteliocitų gausa (Avouac et al. 2008) ir angiogeneze, vėliau stebimas defektyvus žaizdų gyjimas bei audinių fibrozė. SSc pasižymi angiogeniniu disbalansu (Mulligan-Kehoe, Simons 2007).

VIII. Išvados

1. Sergantiems sisteminė skleroze odoje ankščiau, negu išreikšta fibrozė pasireiškia kraujagyslių endotelio pažeidimai ir padidėjęs kraujagyslių sienelės pralaidumas. Odos kraujagyslių fibrozavimas bei kraujagyslių atrezija aptinkamos vėlesnėse sisteminės sklerozės stadijose, tuo tarpu sergantiems sisteminė raudonaja vilklige ir Reino sindromu šie požymiai neryškūs.
2. Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio (VEGF-A) ir jo receptoriaus FLT-1 ir ypač terminio šoko baltymo, kolagenams specifinio šaperono skatinančio fibrozę (HSP-47), bei endotelio azoto sintazės (eNOS) gausi ekspresija yra ankstyvos sisteminės sklerozės stadijos endotelio pakenkimo imunohistocheminiai žymenys. CD34 (endotelio žymuo) ekspresuojamas santykinai vienodai sisteminės skleroze ir sisteminė raudonaja vilklige sergančių ligonių odoje, bet stipriau ankstyvose abiejų ligų stadijose.
3. Padidėjusį odos kraujagyslių sienelės pralaidumą rodo von Willebrand'o veiksnio žymens išplitimas perivaskuliniuose audiniuose pasireiškiantis jau ankstyvoje sisteminės sklerozės stadijoje ir tik nežymiai sumažėjantis vėlyvoje, bet išliekantis gausesnis nei sisteminė raudonaja vilklige sergantiems ligoniams.
4. Odos trečio laipsnio vaskulitas su uždegiminiu infiltratu būdinga makrofagų gausa (CD68) koreliavo su von Willebrand'o veiksnio nutekėjimu į aplinkinius perivaskulinius audinius, ir su putliųjų ląstelių infiltracija bei degranuliacija. Ankstyvose sisteminės sklerozės ir sisteminės raudonosios vilkligės stadijose histologiniai vaskulito požymiai nesiskyrė, bet jie ryškiai mažėjo sisteminės sklerozės vėlyvoje stadijoje, tačiau liko labai išreikšti vėlyvos stadijos sisteminė raudonaja vilklige sergančių ligonių odoje.
5. von Willebrand'o veiksnio agregatai kraujagyslių spindžiuose, HSP-47 ekspresija poodžio fibroblastuose ir aktyvuotų fibroblastų artimi

kontaktai su degranuliuojančiomis putliosiomis ląstelėmis - tai imunohistocheminiai ir ultrastruktūriniai fibroblastų pakenkimo ir vėlyvos sisteminės sklerozės stadijos žymenys patvirtinantys masyvų odos ir jos kraujagyslių fibrozavimą bei atreziją, atskiriančią sisteminę sklerozę nuo sisteminės raudonosios vilkligės.

IX. Praktinės rekomendacijos

1. Odos biopsija kaip pagalbinis diagnostinis metodas tinka diferencijuoti tarp ankstyvos SSc, SRV ir RP stadijų.
2. Ankstyvosios SSc stadijos patogenezėje odoje vyrauja smulkių kraujagyslių pažeidimai. Į tą tikslingą atsižvelgti skiriant patogenezę pagrįstą SSc gydymą.

X. Disertacijos autoriaus publikacijos disertacijos tema

1. Mackiewicz Z, Stepaniuk M, Mackevicius Z, Jr, Rimkevičius A. Apoptosis and aging. *Gerontologija* 2001; 2(3): 170-5.
2. Mackiewicz Z, Povilenaitė D, Minderis M, Gražienė V, Rimkevičius A, Konttinen Y. Angiogenic stimuli in cystic tumoral calcinosis (Teuschländer Disease). *Case Rep Clin Pract Rev* 2002; 3(2): 76-81.
3. Mackiewicz Z, Rimkevičius A, Petersen J, Dudek E, Andersen CM, Vytrasova M, Konttinen YT. Macrophages overloaded with tissue debris in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1229-32. (ISI).
4. Dadonienė J, Kirdaitė G, Mackiewicz Z, Rimkevičius A, Venalis A, Haugeberg G. The incidence and clinical manifestations of primary systemic vasculitides in Vilnius: a university hospital population based study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(2): 335-6. (ISI).
5. Rimkevičius A, Mackiewicz Z. Mast cells in the inflammatory connective tissue diseases. *Acta medica Lituanica* 2006;13(2):77-82.
6. Pranešimai:
7. Mackiewicz Z, Petersen J, Rimkevičius A, Dudek E, Andersen C, Vytrasova M, Konttinen YT. Scavenging of macrophages in Wegener's granulomatosis. Annual EULAR Congress. Berlin, Germany, June 9-12, 2004. Abstract FRI 0201.

Kiti straipsniai:

1. Mackiewicz Z, Stepaniuk M, Mackevicius Z Jr, Rimkevičius A. Age-related sarcopenia. *Gerontologija* 2002; 3(4):192-196.
2. Mackiewicz Z, Rimkevičius A, Dudek E, Konttinen YT. Skeletal muscle regeneration in chronic critical limb ischemia. *Acta med Lituanica* 2003;10(3):147-151.(Engl., abstr.Lithuanian).

3. Šalkus G, Rimkevičius A, Mickys U, Gubaras K. Renal cell carcinoma and angiomyolipoma occurring in one kidney: the report of two cases. *Medicinos teorija ir praktika* 2003; 3: 194-196.
4. Lelkaitis G, Mickys U, Rimkevičius A. Angiomyolipoma arising in the nasa cavity. *Medicinos teorija ir praktika* 2003; 3: 201-202.
5. Lastas A, Graziene V, Barkauskas E, Salkus G, Rimkevičius A. Carotid artery atherosclerotic plaque: clinical and morphological-immunohistochemical correlation. *Medical Science Monitor*, 2004, 11 (10), CR606-CR614.(ISI).
6. Kirdaitė G, Petkevičiūtė M, Leonavičienė L, Bradūnaitė R, Bagdonas S, Rimkevičius A. Fotodinaminės terapijos poveikis eksperimentinio antigenų sukkelto artrito eigai. *Laboratorinė medicina* 2006; 3(31): 18-25.
7. Z. Mackiewicz, A. Rimkevičius. Skin aging. *Gerontologija*, 2008;9(2):103-8.

Pranešimai:

1. Staponas A, Gražiene V, Leonavičienė L, Rimkevičius A. Repairment of the knee joint hyaline cartilage surgical defect by intraarticular Papain depends on the deepness of injury. *Proceedings of 5th Symposium of the International Cartilage Repair Society- ICRS 2004; Ghent, Belgium, Medimond, E526C0186.*

XI. Literatūros sąrašas

1. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007;9 Suppl 2:S2.
2. Abraham D, Lupoli S, McWhirter A. Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1991;34:1164-1172.
3. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005; 26(11):587–595.
4. Akimoto S, Ishikawa O, Igarashi Y, Kurosawa M, Miyachi Y. Dermal mast cells in scleroderma: their skin density, tryptase/chymase phenotypes and degranulation. *Br J Dermatol* 1998;138(3):399-406.
5. Alexander EL, Firestein GS, Weiss JL. Reversible cold-induced abnormalities in myocardial perfusion and function in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1986;105:661-668.
6. Allende HD, Ona FV, Noronha AI. Bleeding gastric teleangiectasia. Complication of Raynaud's phenomenon, esophageal motor dysfunction, sclerodactyly and teleangiectasia (REST) syndrome. *Am J Gastroenterol* 1981;75:354-356.
7. Altman RD, Medsger TA Jr, Bloch DA, Beat AM. Predictors of survival in systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1991;34:403-413.
8. Artigues C, Richard V, Thuillez C. Evaluation of the effects of experimental hypertension on monocyte–endothelial cell interactions. *Arch Mal Cœur Vaiss* 1998;8:1031–1034.
9. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338:1186–1191.

10. Arlett CM, Welsh KI, Black CM, Jimenez SA. Fetal-maternal HLA compatibility confers susceptibility to systemic sclerosis. *Immunogenetics* 1997;47:17-22.
11. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 2005; 175:7708–7718.
12. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Increased expression levels of integrin alphavbeta5 on scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol* 2004; 164:1275–1292.
13. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Tamaki K. Increased expression of integrin alphavbeta5 induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts. *Am J Pathol* 2006; 168:499–510.
14. Avouac J, Uzan G, Kahan A, Boileau C, Allanore Y. Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine* 2008;75(2):131-137.
15. Avouac J, Wipff J, Goldman O, Ruiz B, Couraud PO, Chiocchia G, Kahan A, Boileau C, Uzan G, Allanore Y. Angiogenesis in systemic sclerosis: impaired expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in endothelial progenitor-derived cells under hypoxic conditions. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(11):3550-61.
16. Bazzoni G. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost* 2006; 95(1):36-42.
17. Becker H, Willeke P, Schotte H, Domschke W, Gaubitz M. Macrophage migration inhibitory factor may contribute to vasculopathy in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2008;27(10):1307-1311.
18. Belch JJ, McSwiggan S, Lau C. Macrovascular disease in systemic sclerosis: the tip of an iceberg? *Rheumatology (Oxford)* 2008;47 Suppl 5:v16-17.

19. Beyer C, Schett G, Gay S, Distler O, Distler JH. Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(2):220.
20. Black CM, Stevens WM. Scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 1989;15:193-212.
21. Black CM, Welsh KI. Genetics of scleroderma. *Clin Dermatol* 1994;12:337-347.
22. Blaise S, Maas R, Trocme C, Kom GD, Roustit M, Carpentier PH, Cracowski JL. Correlation of biomarkers of endothelium dysfunction and matrix remodeling in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2009; 36(5):984-8.
23. Belch, JJP. Raynaud's phenomenon: its relevance to scleroderma. *Ann Rheum Dis* 1991;50:839-845.
24. Berth-Jones J, Coates PAA, Graham-Brown RAC. Neurological complications of systemic sclerosis: a report of three cases and review of the literature. *Clin Exp Dermatol* 1990;15:91-94.
25. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:705-708.
26. Bijl M. Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. *Neth J Med*. 2003;61(9):273-277.
27. Block KL, Bassett LW, Furst DE. The arthropathy of advanced progressive systemic sclerosis: a radiographic survey. *Arthritis Rheum* 1981;24:874-884.
28. Boot-Handford RP, Tuckwell DS, Plumb DA, Rock CF, Poulsom R. A novel and highly conserved collagen (pro(alpha)1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J Biol Chem* 2003;278:31067-31077.

29. Boyce JA. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* 2007;217:168-185.
30. Carette S, Turcotte J, Mathon G. Severe myositis and myocarditis in progressive systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1985;12:997-999.
31. Cerinic Matucci M, Del Rosso A, Federico P, Livi R, Fiori G, Bartoli F, Blagojevic J, Tempestini A, Pignone A. Therapeutic challenges for systemic sclerosis: facts and future targets. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1110:448-54.
32. Chen JJ, Zhao S, Cen Y, Liu XX, Yu R, Wu DM. Effect of heat shock protein 47 on collagen accumulation in keloid fibroblast cells. *Br J Dermatol* 2007;156(6):1188-1195.
33. Chitale S, Al-Mowallad AF, Wang Q, Kumar S, Herrick A. High circulating levels of VEGF-C suggest abnormal lymphangiogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(11):1727-1728.
34. Chizzolini C. Update on pathophysiology of scleroderma with special reference to immunoinflammatory events. *Ann Med* 2007; 39:42–53.
35. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, Facchini A, Del Papa N, Borghi MO, Dayer JM, Meroni PL. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1602–1613.
36. Chung EY, Liu J, Homma Y, Zhang Y, Brendolan A, Saggese M, Han J, Silverstein R, Selleri L, Ma X. Interleukin-10 Expression in Macrophages during Phagocytosis of Apoptotic Cells Is Mediated by Homeodomain Proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 2007;27(6):952-964.
37. Cipoletti JF, Buckingham RB, Barnes EL. Sjögren's syndrome in progressive systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1977;87:535-541.
38. Cipriani P, Guiducci S, Miniati I, Cinelli M, Urbani S, Marrelli A, Dolo V, Pavan A, Saccardi R, Tyndall A, Giacomelli R, Cerinic MM. Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-

- derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;56(6):1994-2004.
39. Claman HN. Mast cell changes in a case of rapidly progressive scleroderma: ultrastructural analysis. *J Invest Dermatol* 1989;92:290-295.
40. Clarke AK, Galbraith RM, Hamilton EBD, Williams R. Rheumatic disorders in primary biliary cirrhosis. *Ann Rheum Dis* 1978;37:42-47.
41. Clements PJ, Furst DE, Cabeen W. The relationship of arrhythmias and conduction disturbances to other manifestations of cardiopulmonary disease in progressive systemic sclerosis (PSS). *Am J Med* 1981;71:38-46.
42. Clements PJ, Furst DE, Campion DS. Muscle disease in progressive systemic sclerosis: diagnostic and therapeutic considerations. *Arthritis Rheum* 1978;21:62-71.
43. Cobden I, Axon AT, Ghoneim AT, McGoldrick J, Rowell NR. Small intestinal bacterial growth in systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 1980;5:37-42.
44. Cohen S. The gastrointestinal manifestations of scleroderma: pathogenesis and management (clinical conference). *Gastroenterology* 1980;79:155-166.
45. Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI, Freemont AJ. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J Pathol* 1999;189(2):273-278.
46. Chujo S, Shirasaki F, Kondo-Miyazaki M, Ikawa Y, Takehara K. Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis. *J Cell Physiol*. 2009; 220(1):189-95.
47. Czirják L, Foeldvari I, Müller-Ladner U. Skin involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 Suppl 5:v44-45.

48. Dadonienė J, Kirdaitė G, Mackiewicz Z, Rimkevičius A, Haugeberg G. The incidence of primary systemic vasculitides in Vilnius: a university hospital population based study. *Ann Rheum Dis* 2005;64(2):335-336.
49. Del Galdo F, Maul GG, Jiménez SA, Artlett CM. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2616-2625.
50. Del Papa N, Quirici N, Soligo D, Scavullo C, Cortiana M, Borsotti C, Maglione W, Comina DP, Vitali C, Fraticelli P, Gabrielli A, Cortelezzi A, Lambertenghi-Delilieri G. Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(8): 2605-2615.
51. Denton CP. Renal manifestations of systemic sclerosis-clinical features and outcome assessment. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 Suppl 5:v54-56.
52. Distler JH, Jüngel A, Pileckyte M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, Kowal-Bielecka O, Matucci-Cerinic M, Schett G, Marti HH, Gay S, Distler O. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(12):4203-4215.
53. Distler JH, Kalden JR, Gray S, Distler O. Changes in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Z Rheumatol* 2004;63(6):446-450.
54. Distler JH, Allanore Y, Avouac J, Giacomelli R, Guiducci S, Moritz F, Akhmetshina A, Walker UA, Gabrielli A, Müller-Ladner U, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Distler O. EUSTAR statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):163-168.
55. Doran JP, Veale DJ. Biomarkers in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008 ;47 Suppl 5:v36-38.

56. Eckes B, Zigrino P, KesSRVr D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T. Fibroblast–matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol* 2000; 19:325–332.
57. Enerback L, Lowhagen GB. Long term increase of mucosal mast cells in the rat induced by administration of compound 48/80. *Cell Tissue Res* 1979;198:209–215.
58. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26(1):74-84.
59. Fallowfield JA, Kendall TJ, Iredale JP. Reversal of fibrosis: no longer a pipe dream? *Clin Liver Dis* 2006; 10(3): 481-497.
60. Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 1996;55:7–20.
61. Feghali CA, Bost KL, Boulware DW. Control of IL-6 expression and response in fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 1994;17:309-318.
62. Fleischmajer R, Perlish JS, Shaw KV, Pirozzi DJ. Skin capillary changes in early systemic scleroderma. Electron microscopy and "in vitro" autoradiography with tritiated thymidine. *Arch Dermatol* 1976;112:1553-1557.
63. Fleming JN, Nash RA, Mahoney WM Jr, Schwartz SM. Is scleroderma a vasculopathy? *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11(2):103-10.
64. Follansbee WP. The cardiovascular manifestations of systemic sclerosis (scleroderma). *Curr Probl Cardiol* 1986;11:241-298.
65. Follansbee WP, Curtiss EI, Rahko PS. The electrocardiogram in systemic sclerosis (scleroderma): a study of 102 consecutive cases with functional correlations and review of literature. *Am J Med* 1985;79:183-192.
66. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Pomponio G, Santillo M, Avvedimento EV. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Semin Immunopathol* 2008;30(3):329-337.

67. Garnarczyk A, Jurzak M, Gojniczek K. Characteristic of the endogenous peptides--endothelins and their role in the connective tissue fibrosis. *Wiad Lek* 2008;61(4-6):126-134.
68. Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res* 2007;101(10):975-984.
69. Glembotski CC. The role of the unfolded protein response in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(3):453-459.
70. Gomer RH. Circulating progenitor cells and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10(3):183-188.
71. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35.
72. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-964.
73. Gospodarowicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 1986;128:475-484.
74. Gruschwitz MS, Vieth G. Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts and endothelial cell by interferon- γ and tumor necrosis factor α in the early disease stage. *Arthritis Rheum* 1997;40:540-550.
75. Guiducci S, Giacomelli R, Cerinic MM. Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun Rev* 2007;6(8):520-523.
76. Guiducci S, Distler O, Distler J, Matucci-Cerinic M. Mechanisms of vascular damage in SSc—implications for vascular treatment strategies. *Rheumatology* 2008;47,Suppl.5: v18-20.
77. Gutierrez-Roelens I, Lauwerys BR. Genetic susceptibility to autoimmune disorders: clues from gene association and gene expression studies. *Curr Mol Med* 2008;8:551-561.
78. Hamel-Roy J, Devroede G, Arhan P. Comparative esophageal and anorectal motility in scleroderma. *Gastroenterology* 1985;88:1-7.

79. Hall FC. Cold hands -strained heart? Advances in the management of Raynaud's phenomenon and pulmonary hypertension. *Arthritis Res Ther* 2005;7(3):126-128.
80. Hallström S, Franz M, Gasser H, Vodrazka M, Semsroth S, Losert UM, Haisjackl M, Podesser BK, Malinski T. S-nitroso human serum albumin reduces ischaemia/reperfusion injury in the pig heart after unprotected warm ischaemia. *Cardiovasc Res* 2008;77(3):506-514.
81. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (MCP-1, MIP-1 (and MIP-1) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1 may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999;117:159-165.
82. Hausteil UF, Albrecht M. Zur Epidemiologie und Klinik der systemischen Sklerodermie. *Z Hautkrankh (H+G)* 1993;10:651-658.
83. Heeba G, Hassan MK, Khalifa M, Malinski T. Adverse balance of nitric oxide/peroxynitrite in the dysfunctional endothelium can be reversed by statins. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50(4):391-398.
84. Herrick AL. Systemic sclerosis: an update for clinicians. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2008 ;69(8):464-470.
85. Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis* 1998;57:682-686.
86. Hettema ME, Zhang D, Stienstra Y, Oomen PN, Smit AJ, Kallenberg CG, Bootsma H. Decreased capillary permeability and capillary density in patients with systemic sclerosis using large-window sodium fluorescein videodensitometry of the ankle. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1409-1412.
87. Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2006;146(2):362-370.

88. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8(2):131-137.
89. Ieremia G, Raica M, Cîmpean AM, Bocan V. Morphologic and histochemical changes in the skin of patients with scleroderma. *Rom J Morphol Embryol* 2007;48(4):361-367.
90. Ihn H. Scleroderma, fibroblasts, signaling, and excessive extracellular matrix. *Curr Rheumatol Rep* 2005;7:156–162.
91. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum* 2001; 44:474–480.
92. Ishikawa O, Ishikawa H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992;19(8):1202-1206.
93. Jennette CJ, Milling DM, Falk RJ. Vasculitis affecting the skin. A review. *Arch Dermatol* 1994;130:899–906.
94. Jimenez SA, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 2004;140:37–50.
95. Kahaleh B. Lymphocyte interactions with the vascular endothelium in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994;12:361–367.
96. Kahaleh MB. The vascular endothelium in scleroderma. *Int Rev Immunol* 1995;12:227-245.
97. Kahaleh MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2006;16:718-722.
98. Kahari V-M, Multimaki P, Vuorio E. Elevated pro-alpha-2 (I) collagen mRNA levels in cultured scleroderma fibroblasts results from an increased transcription rate of the corresponding gene. *FEBS Lett* 1987;215:331-334.

99. Karassa FB, Ioannidis JP. Mortality in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(Suppl. 51):S85-S93.
100. Kato Y, Aoki M, Kawana S. Urticarial vasculitis appearing in the progression of systemic sclerosis. *J Dermatol* 2006;33(11):792-797.
101. Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007;9(Suppl. 2):S3.
102. Konttinen YT, Mackiewicz Z, Ruuttila R, Čeponis A, Sukura A, Povilėnaitė D, Hukkanen M, Virtanen I. Vascular damage and lack of angiogenesis in systemic sclerosis skin. *Clin Rheumatol* 2003; 22(3):196-202.
103. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. In: *Pathologic Basis of Disease*. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds). Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, 2005; 87-118.
104. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I. Increased IL-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2455–2463.
105. Kuroda K, Tajima S. Proliferation of HSP47-positive skin fibroblasts in dermatofibroma. *J Cutan Pathol* 2008;35(1):21-26.
106. Kuroda K, Tajima S. HSP47 is a useful marker for skin fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 241-246.
107. Kuroda K, Tsukifuji R, Shinkai H. Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1023-1028.
108. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;1:75-83.

109. Laing TJ, Gillespie BW, Toth MB. Racial differences in scleroderma among woman in Michigan. *Arthritis Rheum* 1997;40:734-742.
110. Lee P, Bruni J, Sukenik S. Neurological manifestations in systemic sclerosis (scleroderma). *J Rheumatol* 1984;11:480-483.
111. Lee P, Langevitz P, Alderdice CA, Aubrey M. Mortality in systemic sclerosis (scleroderma). *Q J Med* 1992;298:139-148.
112. LeRoy EC. Connective tissue synthesis by scleroderma skin fibroblasts in cell culture. *J Exp Med* 1972; 135:1351–1362.
113. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 1974; 54:880–889.
114. LeRoy EC. The control of fibrosis in systemic sclerosis: a strategy involving extracellular matrix, cytokines, and growth factors. *J Dermatol* 1994;21:1-4.
115. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-205.
116. Mackiewicz Z, Konttinen Y.T, Povilėnaitė D, Virtanen I. Leakage of von Willebrand factor and mast cell degranulation in the skin of patients with systemic sclerosis. *Acta medica Lituanica* 2002; 9(4):221-225. a
117. Mackiewicz Z, Povilėnaitė D, Konttinen Y.T, Ma J. Vascular component in pathogenesis of systemic sclerosis. *Seminars in Rheumatology* 2001; 4: 32-35.
118. Mackiewicz Z, Tamulaitienė M, Kirdaitė G, Woolley D. Early vascular damages in systemic sclerosis. *Acta medica Lituanica* 1999; 6(1):3-6.
119. Mackiewicz Z, Povilėnaitė D, Minderis M, Gražienė V, Rimkevičius A, Konttinen Y. Angiogenic stimuli in cystic tumoral calcinosis (Teutschländer Disease). *Case Rep Clin Pract Rev* 2002; 3(2): 76-81. b
120. Mackiewicz Z, Rimkevičius A, Petersen J, Andersen CB, Dudek E, Vytrasova M, Konttinen YT. Macrophages overloaded with tissue

- debris in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2005;64(8):1229-1232.
121. Mackiewicz Z, Stepaniuk M, Mackevičius Z Jr, Rimkevičius A. Apoptosis and aging. *Gerontologija* 2001; 2(3): 170-175.
122. Mackiewicz Z, Sukura A, Povilėnaitė D, Čeponis A, Virtanen I, Hukkanen M, Kontinen Y.T. Increased but imbalanced expression of VEGF and its receptors has no positive effect on angiogenesis in systemic sclerosis skin. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20(5): 641-646. c
123. Magro CM, Nuovo G, Ferri C, Crowson AN, Giuggioli D, Sebastiani M. Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: a possible pathogenetic role in scleroderma. *J Cutan Pathol* 2004;31(1):43-50.
124. Makinen D, Fritzler JM, Davis P, Sherlock S. Anticentromere antibodies in primary biliary cirrhosis. *Arthritis Rheum* 1983;26:914-917.
125. Malandrini A, Selvi E, Villanova M, Berti G, Sabadini L, Salvadori C, Gambelli S, De Stefano R, Vernillo R, Marcolongo R, Guazzi G. Autonomic nervous system and smooth muscle cell involvement in systemic sclerosis: ultrastructural study of 3 cases. *J Rheumatol* 2000;27(5):1203-1206.
126. Manetti M, Neumann E, Müller A, Schmeiser T, Saar P, Milia AF, Endlicher E, Roeb E, Messerini L, Matucci-Cerinic M, Ibba-Manneschi L, Müller-Ladner U. Endothelial/lymphocyte activation leads to prominent CD4+ T cell infiltration in the gastric mucosa of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2866-2873.
127. Mannini L, Cecchi E, Fatini C, Marcucci R, Alessandriello Liotta A, Matucci-Cerinic M, Abbate R, Gensini GF. Clinical haemorheology and microcirculation. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43(2):144-155.
128. Maricq H. Comparison of quantitative and semiquantitative estimates of nailfold capillary abnormalities in scleroderma spectrum disorders. *Microvasc Res* 1986;32:271-276.

129. Maricq HR, Harper FE, Khan MM. Microvascular abnormalities as possible predictors of disease subsets in Raynaud's phenomenon and early connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* 1983;1:195-205.
130. Maricq HR, Leroy EC, D'Angelo WA, Medsger TA Jr, Rodnan GP, Sharp GC, Wolfe JF. Diagnostic potential of in vivo capillary microscopy in scleroderma and related disorders. *Arthritis Rheum* 1980;23:183-189.
131. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE. Prevalence of Raynaud's phenomenon in the general population. *J Chronic Dis* 1986;39:423-427.
132. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum* 1989;32:998-1006.
133. Maurer B, Distler JH, Moritz F, Gay S, Distler O. Angiogenesis. Possibilities for therapeutic intervention in rheumatic diseases. *Z Rheumatol* 2007;66(4): 306-310.
134. Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, Schottenfeld D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2246-2255.
135. Mayes MD, Trojanowska M. Genetic factors in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007;9 Suppl 2:S5.
136. Medsger TA, Masi AT, Rodnan GP, Benedek TG, Robinson H. Survival with systemic sclerosis (scleroderma): a life-table analysis of clinical and demographic factors in 309 patients. *Ann Intern Med* 1971;75:369-376.
137. McCaffrey TA, Falcone DJ, Brayton CF. Transforming growth factor-B activity is potentiated by heparin via dissociation of the transforming growth factor B/(2 macroglobulin inactive complex. *J Cell Biol* 1989;109:441-448.

138. McCarthy DS, Baragar FD, Dhingra S. The lungs in systemic sclerosis (scleroderma): a review and new information. *Semin Arthritis Rheum* 1988;17:271-283.
139. Medsger TA Jr. Epidemiology of progressive systemic sclerosis. In: Black CM, Myers AR, eds. *Systemic sclerosis (scleroderma)*. New York: Gower, 1985:53-59.
140. Medsger TA Jr, Masi AT. Survival with scleroderma-II: a life-table analysis of clinical and demographic factors in 358 male US veteran patients. *J Chron Dis* 1973;26:647.
141. Michael J, Markewitz B. Endothelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 555-581.
142. Miletić T, Kovacević-Jovanović V, Vujić V, Stanojević S, Mitić K, Lazarević-Macanović M, Dimitrijević M. Reactive oxygen species (ROS), but not nitric oxide (NO), contribute to strain differences in the susceptibility to experimental arthritis in rats. *Immunobiology* 2007;212(2):95-105.
143. Mittag M, Haustein UF. Die progressiv systemische Sklerodermie - prognosebestimmender Befall innerer Organsysteme. *Hautarzt* 1998;49:545-551.
144. Morel PA, Chang HJ, Wilson JW. Severe systemic sclerosis with anti-topoisomerase I antibodies is associated with an HLA-DRw 11 allele. *Human Immunol* 1994;40:101-110.
145. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 209-212.
146. Mulligan-Kehoe MJ, Drinane MC, Mollmark J, Casciola-Rosen L, Hummers LK, Hall A, Rosen A, Wigley FM, Simons M. Antiangiogenic plasma activity in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;56(10):3448-3458.
147. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Current concepts in normal and defective angiogenesis: implications for systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9(2):173-179.

148. Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, Suda T, Morita Y, Ooehara J, Ema H, Fong GH, Shibuya M. VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(4):658-664.
149. Nagata K. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol* 1998; 16: 379-386.
150. Nagy G, Clark JM, Buzás EI, Gorman CL, Cope AP. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunol Lett* 2007;111(1):1-5.
151. Nelson JL, Furst DE, Maloney S. Microchimerism and HLA-compatible relationship of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998;351:559-562.
152. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006;69:614–624.
153. Nishioka K, Kobayashi Y, Katayama I. Mast cell numbers in diffuse scleroderma. *Arch Dermatol* 1987;123:205-208.
154. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albin A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(1):31-40.
155. Olsen N, Neilsen SL. Prevalence of primary Raynaud phenomena in young females. *Scand J Clin Invest* 1978;37:761-764.
156. Osial TA Jr, Whiteside TL, Buckingham RB. Clinical and serologic study of Sjögren's syndrome in patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1983;26:500-508.
157. Pannu J, Trojanowska M. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:739–745.
158. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodelling. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(4): 383-388.

159. Peltonen J, Kahari I, Uitto J. Increased expression of type VI collagen genes in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1829-1835.
160. Pignone A, Scaletti C, Matucci-Cerinic M, Vazques-Abad D, Meroni PL, De-Papa N, Falcini F, Generini S, Rothfield N, Cagnoni M. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis: significant association with vascular involvement and alveolo-capillary impairment. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:527-632.
161. Postlethwaite AE. Connective tissue metabolism including cytokine in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:535-540.
162. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992;166:255-263.
163. Randone SB, Guiducci S, Cerinic MM. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev.* 2008;8(1):36-40.
164. Rattner A, Nathans J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(11): 860-872.
165. Reichenbach DD, Benditt EP. Myofibrillar degeneration: a response of the myocardial cell to injury. *Arch Pathol* 1968;46:189-199.
166. Renaudineau Y. Anti-Endothelial Cell Antibodies in Systemic Sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:156-160.
167. Reveille JD. Molecular genetics of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:522-528.
168. Richard V, Solans V, Favre J, Henry JP, Lallemand F, Thuillez C, Marie I. Fundam. Role of endogenous endothelin in endothelial dysfunction in murine model of systemic sclerosis: tight skin mice 1. *Clin Pharmacol.* 2008; 22(6):649-55.
169. Rimkevičius A, Mackiewicz Z. Mast cells in the inflammatory connective tissue diseases. *Acta medica Lituanica* 2006;13(2):77-82.
170. Rodnan GP, Myerowitz RL, Justh GO. Morphologic changes in the digital arteries of patients with progressive systemic sclerosis (scleroderma) and Raynaud phenomenon. *Medicine* 1980;59:393-408.

171. Romero LI, Zhang DN, Cooke JP, Ho HK, Avalos E, Herrera R, Herron GS.
172. Differential expression of nitric oxide by dermal microvascular endothelial cells from patients with scleroderma. *Vasc Med* 2000;5(3):147-158.
173. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA Jr, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1984;27:645–653.
174. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(12):679-685.
175. Sargent JL, Milano A, Connolly MK, Whitfield ML. Scleroderma gene expression and pathway signatures. *Curr Rheumatol Rep* 2008;10:205-211.
176. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated B cells. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1918–1927.
177. Scheja A, Akesson A, Niewierowicz I. Computer based quantitative analysis of capillary abnormalities in systemic sclerosis and its relation to plasma concentration of von Willebrand factor. *Ann Rheum Dis* 1996;55:52-56.
178. Schroder J, Tiilikainen A, De la Chapelle A. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. I. Cytological aspects. *Transplantation* 1974;17:346-354.
179. E Selvi, S Tripodi, M Catenaccio, S Lorenzini, D Chindamo, S Manganelli, R Romagnoli, F Ietta, L Paulesu, C Miracco, M Cintorino, R Marcolongo. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(5): 460–464.
180. Serrano MC, Pagani R, Ameer GA, Vallet-Regí M, Portolés MT. Endothelial cells derived from circulating progenitors as an effective

- source to functional endothelialization of NaOH-treated poly(epsilon-caprolactone) films. *J Biomed Mater Res A* 2008;87(4):964-971.
181. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest.* 1996;98(3):785-792.
182. Silman AJ. Epidemiology of scleroderma. *Ann Rheum Dis* 1991;50:846-853.
183. Silman AJ. Scleroderma - Demographics and survival. *J Rheumatol* 1997;24:58-61.
184. Silman AJ, Jannini S, Symmons D, Bacon P. An epidemiological study of scleroderma in the West Midlands. *Br J Rheumatol* 1988;27:286-290.
185. Sitia S, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Di Bello V, Tomasoni L, Delfino L, Antonini-Canterin F, Di Salvo G, De Gennaro Colonna V, La Carrubba S, Carerj S, Turiel M. Cardiovascular involvement in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2008 Sep 22. [Epub ahead of print]
186. Sollberg S, Mauch C, Eckes B. The fibroblast in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994;12:279-285.
187. Steen VD. Scleroderma renal crisis. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:861-878.
188. Steen VD, Conte C, Owens GR, Medsger TA. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37:1283-1289.
189. Steen VD, Powell DL, Medsger T Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:196-203.
190. Stone JH, Nousari HC. "Essential" cutaneous vasculitis: what every rheumatologist should know about vasculitis of the skin. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:23-34.

191. Strehlow D, Korn JH. Biology of the scleroderma fibroblast. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10(6): 572-578.
192. Strehlow D, Jelaska A, Strehlow K, Korn JH. A potential role for protease nexin 1 overexpression in the pathogenesis of scleroderma. *J Clin Invest* 1999;103:1179.
193. Subba Rao PV, Friedman MM, Atkins FM. Phagocytosis of mast cell granules by cultured fibroblasts. *J Immunol* 1983;130:341-349.
194. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581-590.
195. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994;103:359-363.
196. Takemoto CM, Lee YN, Jegga AG, Zablocki D, Brandal S, Shahlaee A, Huang S, Ye Y, Gowrisankar S, Huynh J, McDevitt MA. Mast cell transcriptional networks. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41(1):82-90.
197. Takeuchi F, Kuwata S, Nakano K. Association of TAP1 and TAP2 with systemic sclerosis in Japanese. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:513-521.
198. Thornten SC, Robbins JM, Shelley L. Fibroblast growth factors in connective tissue disease associated interstitial lung disease: association with disease activity and identification as TNF-a, PDGF, and fibronectin. *Clin Exp Immunol* 1992;90:447-452.
199. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(5): 349-363.
200. Traub YH, Shapiro AP, Rodnan GP. Hypertension and renal failure (scleroderma renal crisis) in progressive systemic sclerosis: review of a 25-year experience with 68 cases. *Medicine* 1983;62:335-352.

201. Trojanowska M, Varga J. Molecular pathways as novel therapeutic targets in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(6):568-573.
202. Ulbrich C, Westphal K, Baatout S, Wehland M, Bauer J, Flick B, Infanger M, Kreutz R, Vadrucchi S, Egli M, Cogoli A, Derradji H, Pietsch J, Paul M, Grimm D. Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity. *J Cell Biochem* 2008;104(4):1324-1341.
203. van Laar JM, Tyndall A. Cellular therapy of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2008 ;10(3):189-194.
204. Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2008;66(3):198-202.
205. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117:557–567.
206. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995;12:187-199.
207. Vargas-Alarcon G, Granados J, Ibanez de Kasep G. Association of HLA-DR5 (DR11) with systemic sclerosis (scleroderma) in Mexican patients. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:11-16.
208. Wagner EM, Sanchez J, McClintock JY, Jenkins J, Moldobaeva A. Inflammation and ischemia-induced lung angiogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(2):L351-L357.
209. Weedon D. The vasculopathic reaction pattern. In: Weedon D, ed. *Skin Pathology*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 2002:221–280.
210. Westerweel PE, Verhaar MC. Endothelial progenitor cell dysfunction in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:332-340.
211. Westergren-Thorsson G, Csuster L, Akesson A. Altered dermatan sulfate proteoglycan synthesis in fibroblast cultures established from skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1996;23:1398-1406.

212. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 524-529.
213. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214(2):199-210.
214. Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2):199-210.
215. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, Niederegger H, Sundick RS, Gershwin ME, Wick G. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorioallantonic membrane assay. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2605–2614.
216. Yamamoto T. Scleroderma--pathophysiology. *Eur J Dermatol*. 2009; 19(1):14-24.
217. Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Expression of stem cell factor in the lesional skin of systemic sclerosis. *Dermatology* 1998;197(2):109-114.
218. Yang SF, Tsai CH, Chang YC. The upregulation of heat shock protein 47 expression in human buccal fibroblasts stimulated with arecoline. *J Oral Pathol Med* 2008;37(4):206-210.
219. Yoshioka S, Mukae H, Ishii H, Kakugawa T, Ishimoto H, Sakamoto N, Fujii T, Urata Y, Kondo T, Kubota H, Nagata K, Kohno S. Alpha-defensin enhances expression of HSP47 and collagen-1 in human lung fibroblasts. *Life Sci* 2007;80(20):1839-1845.
220. Youinou P, Revelen R, Bordron A. Is antiendothelial cell antibody the murder weapon in systemic sclerosis? *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:35-36.
221. Young MA, Rose S, Reynolds JC. Gastrointestinal manifestation of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 1996;22:797-823.
222. Zuber JP, Spertini F. Immunological basis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(Suppl. 3): S23-S25.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju už paramą ir pagalbą rengiant disertaciją:

Vilniaus universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos instituto

Direktoriui prof. habil. dr. Algirdui Venaliui

Direktoriaus pavaduotojai mokslui prof. habil. dr. Jolantai Dadonienei

Mokslinei sekretorei dr. Birutei Butkienei

Eksperimentinių tyrimų skyriaus vedėjui prof. habil. dr. Zygmunt Mackiewicz

dr. Vidai Gražienei

Laborantėms: Daivai Budriutei, Romai Grinienei, Irenai Žalakevičienei,

Salomėjai Stanaitienei.

Reumatologijos skyriaus vedėjai prof. dr. Irenai Butrimienei

Reumatologams: dr. Gailutei Kirdaitei, dr. Danutei Povilėnaitei, dr. Sigitai

Stropuvienei, , dr. Daliai Adomavičiūtei-Miltinienei.