

# Siaurajuostės ultravioletinės A1 spinduliuotės poveikis aktyviai kaspazės-3 raiškai sisteminės sklerozės gyvūnų modelyje

Diana Karpec<sup>1,2</sup>  
Romualdas Rudys<sup>2</sup>  
Laima Leonavičienė<sup>2</sup>  
Zygmunt Mackiewicz<sup>2</sup>  
Rūta Bradūnaitė<sup>2</sup>  
Gailutė Kirdaitė<sup>2</sup>  
Algirdas Venalis<sup>1,2</sup>

## Santrauka

**Darbo tikslas.** Įvertinti  $365 \pm 5$  nm ultravioletinės A1 (UVA1) spinduliuotės didelių ir vidutinių dozių poveikį apoptozei ir fibrozei naudojant bleomicinu (BLM) sukeltą sisteminės sklerozės gyvūnų modelį.

**Tyrimo medžiaga ir metodai.** Keturiasdešimt dvi sveikos ir skleroderminės, taikant BLM injekcijas, DBA/2 linijos pelės buvo gydytos didelėmis ir vidutinėmis UVA1 spinduliuotės dozėmis. Kontrolinėms gyvūnų grupėms švitinimas netaikytas. Eksperimentui naudotas fototerapijos prietaisas, skleidžiantis UVA1 spinduliuotę, kurios bangos ilgis  $365 \pm 5$  nm, o galios tankis –  $21 \text{ mW/cm}^2$ . Odos mėginių storis po dažymo hematoksilinu ir eozinu (H&E) įvertintas histologiniu metodu. Aktyvios kaspazės-3 raiška įvertinta atlikus imunohistocheminę analizę su pirminių antikūnų prieš aktyvią kaspazę-3. Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai  $P = 0,05$ .

**Rezultatai.** Taikant fototerapiją didelėmis ir vidutinėmis UVA1 dozėmis, pelių su sisteme skleroze odos storis reikšmingai sumažėjo, palyginus su kontroline BLM grupe. Po UVA1 fototerapijos kurso, sukauptus  $1200 \text{ J/cm}^2$  ir  $600 \text{ J/cm}^2$  spinduliuotės dozes, pelių su sisteme skleroze tikrojoje odoje nustatyta labai padidėjusi ( $P < 0,05$ ) aktyvios kaspazės-3 raiška (atitinkamai  $17,2 \pm 3,3 \%$  ir  $17,1 \pm 4,4 \%$ ), palyginti su kontroline BLM grupe ( $9,8 \pm 1,5 \%$ ). Sveikų pelių be švitinimo ir sveikų gyvūnų, kuriems taikyta siaurajuostė UVA1 spinduliuotė, aktyvios kaspazės-3 raiška nesiskyrė.

**Išvados.**  $365 \text{ nm}$  bangos ilgio UVA1 spinduliuotė reikšmingai sumažina odos storį BLM sukeltame eksperimentiniame pelių sisteminės sklerozės modelyje, o antifibrozinis poveikis tiesiogiai priklauso nuo dozės. Fototerapijos kursas dvigubai padidina kaspazės-3 raišką skleroderminėje gyvūnų odoje.

**Reikšminiai žodžiai:** fototerapija, apoptozė, fibrozė, ultravioletinė A1 spinduliuotė, sisteminė sklerozė.

## ĮVADAS

Sisteminė sklerozė – nežinomos etiologijos autoimuninė liga, pasireiškianti odos ir vidaus organų pažeidimu. Kraujagyslių pažeidimas su endotelio

disfunkcija yra pirminis ir pagrindinis sisteminės sklerozės patogenezės veiksnys [1]. Endotelio aktyvacija pasireiškia padidėjusiu kapiliarų pralaidumu, profibroziniais citokiniais ir augimo faktorių sekrecija bei endotelio lą-

<sup>1</sup>Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Reumatologijos, traumatologijos-ortopedijos ir rekonstrukcinės chirurgijos klinika

The Clinic of Rheumatology, Traumatology Orthopaedics and Reconstructive Surgery, Institute of Clinical Medicine of the Faculty of Medicine of Vilnius University

<sup>2</sup>Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras

State Research Institute Centre for Innovative Medicine

El. paštas: karpecdiana@gmail.com

telį apoptozę, kuri skatina tolesnį uždegimo procesą [2]. Pagrindinis mediatorius, skatinantis fibrogenę, yra transformuojantis augimo faktorius beta (angl. *transforming growth factor*, TGF- $\beta$ ), tačiau tokie citokinai kaip trombocitų kilmės augimo faktorius (angl. *platelet-derived growth factor*, PDGF), jungiamojo audinio augimo faktorius (*connective tissue growth factor*, CTGF), interleukinai (IL-4, IL-6, IL-13), endotelinas-1 (ET-1), serotoninas taip pat skatina fibrozės progresavimą [3–6]. Veikiant fibrozei palankiems faktoriams, ypač TGF- $\beta$ , aktyvuoti fibroblastai virsta miofibroblastais, kurie gausiai gamina tarp-ląstelinio matrikso komponentus [7]. Matrikso metaloproteinazės – tai proteoliziniai fermentai, kurie skaido ir modifikuoja beveik visus tarpląstelinio matrikso komponentus – kolageną, lamininą, fibronektiną, proteoglikanus. Sisteminės sklerozės patogenezėje svarbiausios yra MMP-1 (kolagenazė-1) ir MMP-3 (stromelizinas-1), kurių susilpnėjęs aktyvumas ir sumažėjęs kiekis lemia padidėjusį I ir III tipo kolageno kaupimąsi [8, 9]. Minėtos pagrindinės patogenezės grandys – vaskulopatija su ryškia kraujagyslių spastika, progresuojanti fibrozė dėl padidėjusių kolagenų sancaupų ir pakitęs imuninis atsakas dėl uždegimo ląstelių infiltracijos lemia ligos heterogeniškumą [3]. Progresuojanti odos fibrozė turi kelias fazes: ankstyvoje stadijoje pastebimas patinimas (edeminė fazė), vėliau oda storėja (fibrozinė stadija) ir galiausiai suplonėja (atrofinė stadija) [10]. Ankstyvas odos fibrozės gydymas yra būtinas ne tik dėl paciento diskomforto pojūčio, bet ir vėlyvų komplikacijų: judesių amplitudės sumažėjimo, kontraktūrų, negyjančių žaizdų bei kalcinatų susidarymo. Ligos prognozė ir baigtis priklauso nuo daugelio veiksnių, taip pat ir nuo odos pažeidimo laipsnio bei tipo, todėl ne tik sisteminis, bet ir lokalus gydymas turi būti nepavėluotas ir kompleksinis.

Per paskutinius du dešimtmečius fototerapija ultravioletiniais spinduliais (UV) tapo viena iš tam tikrų odos ligų neinvazinio gydymo galimybių. Pagal bangos ilgį, biologines ir fizikines savybes UV spinduliuotė skirstoma į: ultravioletinę C (UVC, bangos ilgis – 200–290 nm), ultravioletinę B (UVB, bangos ilgis – 290–320 nm) ir ultravioletinę A (UVA, bangos ilgis – 320–400 nm) spindulius. UVA skirstoma į ultravioletinę A2 (UVA2, 320–340 nm) ir ultravioletinę A1 (UVA1, 340–400 nm). Nustatyta, kad ilgesnio bangos ilgio UVA1 spinduliuotė į odą skverbiasi giliai, net iki po-

odžio, skirtingai nei didesnės energijos UVA2 ir UVB spinduliai, kurie pasiekia tik viršutinius tikrosios odos sluoksnius, sukeldami epidermio ląstelių pažeidimus [11]. Atliktais tyrimais parodyta, kad UVA1 340–400 nm bangos ilgio spinduliai pasižymi uždegimą slopinančiu, antifibrozinu ir imunomoduliaciniu poveikiu [12, 13]. Dėl specifinio biologinio poveikio keratinocitams, Langerhanso ląstelėms, T ląstelėms, eozinofilams, putliosiosms ląstelėms UVA1 spinduliuotė skirta atopiniam dermatitui, dilgėlinei ir odos T ląstelių limfomai gydyti [14–16]. Atliktais *in vivo* ir *in vitro* tyrimais nustatyta, kad UVA1 slopina fibroblastų proliferaciją, blokuoja kolageno gamybą, skatina kolageno skaidymą, sukelia T ląstelių apoptozę ir reguliuoja tokių veiksnių kaip TGF- $\beta$ , interferonas gama, MMPs raišką [17–21]. Atsižvelgiant į šį veikimo mechanizmą, UVA1 fototerapija būtų viena iš indikacijų lokaliai sklerodermos ar sisteminės sklerozės gydymui. Remiantis literatūros duomenimis, šiuo metu nėra atlikta atsitiktinių imčių, placebo kontroliuojamų, dvigubai aklų tyrimų siekiant nustatyti UVA1 fototerapijos efektyvumą sklerodermai gydyti. Su lokalia skleroderma ar sisteminė sklerozė sergančiais pacientais atlikta keliolika studijų, iš kurių tik trys kontrolinės ir jose įvertintas UVA1 antifibrozinis poveikis [22–24]. Pateiktose studijose buvo naudojamas platus UVA1 spinduliuotės spektras (340–400 nm), kartais apimantis tiek UVA2 (< 340 nm), tiek regimosios spinduliuotės sritis (bangos ilgis > 400 nm). Platus UVA1 spinduliuotės spektro naudojimas gali būti susijęs su didesne šalutinių reakcijų rizika, silpnėjančiu terapiniu poveikiu bei mažesne spinduliuotės skvarba į audinius.

Ultravioletinės spinduliuotės skverbimosi į audinius gylys priklauso nuo odos esančių šviesą sugėriamųjų chromoforų ir fluoroforų. Didžiausia UVA1 sugėriamųjų fotojautriųjų medžiagų koncentracija yra mitochondrijose, tad šios organelės yra ypač jautrios ultravioletiniams spinduliams [25]. Viena iš pagrindinių mitochondrijų funkcijų yra apoptozės (ląstelių žūties) aktyvavimas. Nustatyta, kad sisteminės sklerozės patogenezėje vyrauja epidermio ir endotelio ląstelių žūtis, kuri sukelia uždegimą ir paskatina tolesnį fibrozės vystymąsi [26, 27]. Giliai dermoje (tikrojoje odoje) esantys sisteminės sklerozės fibroblastai yra atsparūs apoptozei, dėl to fibroblastų kiekis didėja, jie tampa aktyvūs, gamina ekstraląstelinio matrikso komponentus, didėja kolageno sancaupos [28].

Mes išskėlėme hipotezę, kad siaurajuostė 365 ± 5 nm UVA1 spinduliuotė aktyvuoja giliajame dermos sluoksnyje esančių ląstelių apoptozę ir sumažina odos fibrozę. Tad šio darbo tikslas buvo įvertinti siaurajuostės UVA1 didelių ir vidutinių dozių poveikį apoptozei ir fibrozei, taikant BLM sukeltą gyvūnų sisteminės sklerozės modelį. Prieš gydymą ir po fototerapijos kurso įvertinta aktyvios kaspazės-3 raiška ir dermos storis sveikoje ir skleroderminėje pelių odoje.

## TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

### Gyvūnai

Gavus Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimą atlikti bandymus su gyvūnais (Nr. G2-15), tyrimui pasirinktos 42 DBA/2 linijos 6–8 savaičių amžiaus pelių patelės. Viso eksperimento metu gyvūnai buvo laikomi numatyta tvarka, remiantis ES direktyva ir kitais norminiais bandomųjų gyvūnų naudojimo eksperimentams aktais (Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES, VMVT direktoriaus įsakymas 2012-10-31 Nr. B1-866 „Dėl mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“).

### Eksperimentinis pelių sisteminės sklerozės modelis

Bleomicinas (BLM) yra antibiotikas, gaunamas iš bakterijos *Streptomyces venticillius*. Jis slopina auglius ir dažnai naudojamas vėžiui gydyti. Odos ir plaučių fibrozė yra gerai žinomas šalutinis BLM poveikis, todėl poodinis BLM yra naudojamas eksperimentinei fibrozei sukelti [29]. Histologiškai matoma pakitusi audinių struktūra, uždegimo ląstelių infiltracija, padidėjęs jungiamojo audinio ląstelių – fibroblastų kiekis. Tad šis sisteminės sklerozės modelis atspindi uždegimo pokyčius, kurie vyksta esant ankstyvai ligos stadijai. Šiame eksperimente odos fibrozė buvo sukurta vietinėmis BLM injekcijomis į apibrėžtą zoną pelių nugaroje [29]. Iš pradžių nuo pažymėtos 1 cm<sup>2</sup> srities pašalinti plaukai naudojant depiliacinį kremą (Veet®, Anglija). BLM tirpintas 0,9 % natrio chlorido tirpale, gauta 0,5 mg/ml koncentracija. Poodinės 100 l BLM injekcijos buvo leistos į penkis taškus pažymėtoje nugaros srityje kas antrą dieną 25 dienas. Kontrolinių grupių gyvūnams skirtos poodinės 100 l 0,9 % natrio chlorido tirpalo injekcijos.

## Fototerapija

Eksperimente naudotas fototerapijos prietaisas, sudarytas iš 20 šviesos diodų (angl. *Light Emitting Diode*, LED), sklaidžiančių UVA1 spinduliuotę, kurios bangos ilgis –  $365 \pm 5$  nm, o galios tankis –  $21 \text{ mW/cm}^2$ . Švitinimo procedūros buvo atliekamos specialioje metalinėje dėžėje su atskirais narveliais kiekvienai pelei. Fototerapijos kursas – 15 procedūrų (3 kartai per savaitę, trukmė – 5 savaitės). Vienos procedūros metu skiriama vidutinė  $40 \text{ J/cm}^2$  arba didelė  $80 \text{ J/cm}^2$  UVA1 dozė (suminės dozės –  $600 \text{ J/cm}^2$  arba  $1200 \text{ J/cm}^2$ ). Tokia gydymo schema pasirinkta pagal atliktus sisteminę sklerozę sergančių pacientų tyrimus. Remiantis literatūros apžvalga, rekomenduojama  $20\text{--}50 \text{ J/cm}^2$  UVA1 dozė, skiriant ją 3–4 kartus per savaitę (gydymo kursas – 30 procedūrų) [30].

## Studijos dizainas

DBA/2 linijos pelės suskirstytos į 6 grupes po 7 gyvūnus kiekvienoje. I grupė – kontrolinė, šios grupės sveikoms pelėms 8 savaites buvo leidžiamas 0,9 % natrio chlorido tirpalas. II, III ir IV grupių gyvūnams sukeltas eksperimentinis sisteminės sklerozės modelis, taikant BLM injekcijas pagal aprašytą metodiką. Sukėlus fibrozę, III grupės pelėms buvo skirtas gydymas didelėmis  $80 \text{ J/cm}^2$ , o IV grupės pelėms – vidutinėmis  $40 \text{ J/cm}^2$   $365 \text{ nm}$  UVA1 dozėmis kas antrą dieną penkias savaites (fototerapijos kurso suminės dozės – atitinkamai  $1200 \text{ J/cm}^2$  ir  $600 \text{ J/cm}^2$ ). II grupė – kontrolinė BLM grupė be gydymo. Siekiant įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės poveikį sveikai odai, V ir VI grupių sveikiems gyvūnams skirtos didelės ir vidutinės UVA1 dozės pagal aprašytą schemą. Eksperimento pabaigoje, kita dieną po paskutinės fototerapijos procedūros, visi gyvūnai buvo numarinti ir iš pažymėtos nugaros sritys paimta biopsinės medžiagos.

## Histologinė analizė

Biopsinė medžiaga buvo fiksuojama 10 % buferiniame formalino tirpale ir įlieta į parafiną. Odos storiui įvertinti pjūviai buvo nudažyti pagal standartinį protokolą hematoksilinu ir eozinu (H&E).

Mėginiai nufotografuoti naudojant „Olympus BX51“ mikroskopą (*Olympus Corporation, Inc.*, Tokijas, Japonija) su „Nikon DXM 1200“ kamera (*Nikon Instruments, Inc.*, Niujorkas, JAV) esant  $40\times$  didinimui. Dermos storis išmatuotas vertinant maksima-

lų atstumą tarp epidermio ir dermos jungties bei dermos ir poodžio riebalinio sluoksnio keturiuose kiekvieno mėginio laukuose. Kiekybinė odos storio analizė atlikta naudojant programinę įrangą „NIS-Elements software“ v.BR 2.30 (*Nikon Instruments*, Olandija). Rezultatuose pateikta matavimų vidurkis ir standartinis nuokrypis, išreikšti m.

## Imunohistocheminė analizė

Imunohistocheminis dažymas su pirminiu antikūnu prieš aktyvią kaspazę-3 (triušio polikloninis antikūnas, 1:500, *Abcam*, ab44976, Kembridžas, Jungtinė Karalystė) atliktas pagal gamintojo nurodytą protokolą, panaudojant „En-Vision“ vizualizacijos rinkinį (*DAKO*, Glostrupas, Danija). Pirmiausia odos pjūviai deparafinizuoti ksilolu, 100 %, 96 % ir 80 % etanoliumi. Antigenams atstatyti deparafinizuoti pjūviai buvo apdorojami 20 minučių citrato buferyje (pH 6,0) mikrobangų krosnelėje (*HISTOS REM*®, Milestone Medical, Mičiganas, JAV)  $+98 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje, paskui aušinami iki kambario temperatūros ir plaunami fosfato buferiu (*Phosphate Buffered Saline*, PBS). Endogeninės peroksidazės aktyvumas blokuotas preparatus inkubuojant 30 minučių 3 % vandenilio peroksido tirpale (*DAKO REAL En-vision Kit* peroksidazės blokatorius). Praplauti distiliuotu vandeniu pjūviai pazardinti į šviežio buferio vonelę ir inkubuoti praskiestais (1:500) pirmiais antikūnais prieš aktyvią kaspazę-3 tamsioje drėgnoje kameroje  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje per naktį. Vėliau pjūviai praplauti PBS ir 30 minučių kambario temperatūroje inkubuoti antrinių (peroksidaze žymėtų) antikūnų tirpale. Po plovimo PBS pjūviai buvo veikiami DAB (3,3-diaminobenzidino tetrahydrochloridas) substrato chromogeno tirpale (*DAKO En-vision Kit*) 5 minutes. Naudojant DAB substrato chromogeną gaunamas rudai auksinės spalvos reakcijos galutinis produktas tiksulinio antigeno (aktyvios kaspazės-3) vietoje. Švelniai praplauti distiliuotu vandeniu pjūviai nudažyti Mayerio hematoksilinu, nuskaidrinti ir padengti dengiamaisiais stikleliais, naudojant ilgalaikio saugojimo dengiamąją terpę. Imunohistocheminė reakcija atlikta kartu su teigiama audio kontrolė – žmogaus tonzile, o neigiamai reagento kontrolei įvertinti vietoje tiriamojo antikūno buvo pasirinktas atitinkamas kiekis PBS. Mėginiai nufotografuoti panaudojant Nikon „Eclipse TE2000“ mikroskopą (*Nikon*, Tokijas, Japonija) su „Nikon DS-Fi2“ kamera (*Nikon*, Tokijas, Ja-

ponija) esant  $400\times$  didinimui. Kiekybinė aktyvios kaspazės-3 raiškos analizė atlikta naudojant atvirojo kodo programinę įrangą (*ImageJ*® *Fiji software*, *National Institutes of Health*, NIH, Merilandas, JAV) [31]. Rudai nusidažiusi citoplazma vertinama kaip aktyvios kaspazės-3 teigiama imunohistocheminė reakcija. Optinis vaizdas kompiuterinėje programoje buvo apdorotas pagal spalvos (hematoksilino ir DAB – diaminobenzidino) atskyrimo metodiką [21]. Pasirinkus teigiamos imunohistocheminės reakcijos spalvinį slenkstį, buvo įvertinta aktyvios kaspazės-3 raiškos procentinė dalis visame optinio vaizdo lauko plote (pikselių, atitinkančių teigiamą reakciją/bendras pikselių skaičius). Matavimai atlikti keturiuose kiekvieno mėginio vaizduose ir rezultatas pateiktas matavimų vidurkiu, išreikštu procentais (%).

## Statistinė analizė

Rezultatų statistinė analizė buvo atlikta naudojant SPSS v. 16.0 programą. Duomenys išreikšti kaip vidurkis  $\pm$  standartinis nuokrypis (SD). Tolydžiųjų kintamųjų palyginimui naudotas Mano ir Vitnio (*Mann-Whitney*) U testas. Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai  $P < 0,05$ .

## TYRIMO REZULTATAI

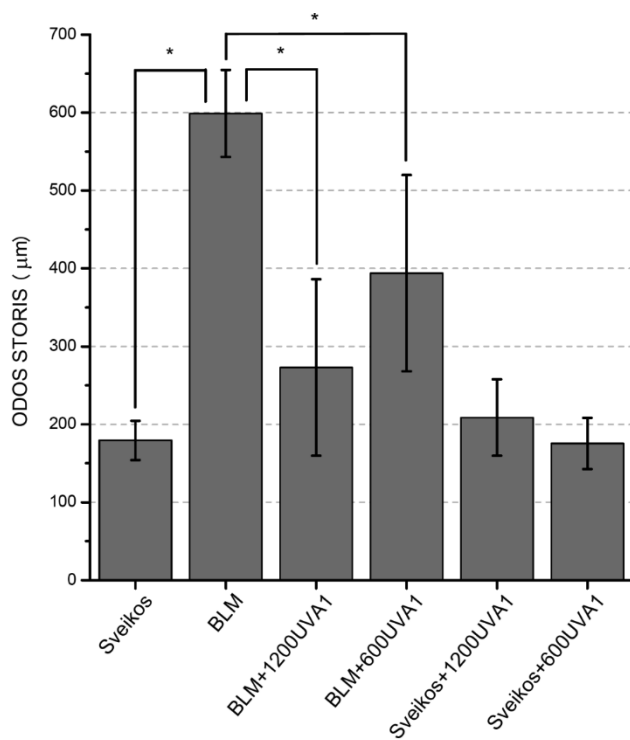
### Odos storis

Atlikę histologinę analizę nustatėme, kad kontrolinės grupės (I) sveikų pelių odos storis –  $179,3 \pm 25,3 \text{ } \mu\text{m}$ . Po BLM injekcijų odos storis statistiškai reikšmingai ( $P < 0,05$ ) padidėjo iki  $599,0 \pm 55,7 \text{ } \mu\text{m}$  BLM grupėje (II). Po didelių ir vidutinių UVA1 dozių fototerapijos pelių su eksperimentine sisteminę sklerozę (III ir IV grupėse) odos storis sumažėjo atitinkamai iki  $272,9 \pm 113,2 \text{ } \mu\text{m}$  ir  $394,0 \pm 125,9 \text{ } \mu\text{m}$ , lyginant su kontroline BLM (II) grupe ( $P < 0,05$ ). Sveikų gyvūnų odos storis po didelių ir vidutinių UVA1 spinduliuotės dozių nesiskyrė ( $P > 0,05$ ) nuo I grupės pelių, kurios nebuvo švitintos (1 pav.).

### Aktyvios kaspazės-3 raiška

Imunohistocheminė analizė su pirmiais antikūnais prieš aktyvią kaspazę-3 parodė, kad sveikų pelių dermos sluoksnyje aktyvios kaspazės-3 raiška buvo  $4,2 \pm 1,45 \%$ . Sveikų pelių, švitintų didelėmis ar vidutinėmis UVA1 spinduliuotės dozėmis, aktyvios kaspazės-3 raiška odoje išliko panaši –





1 pav. Eksperimento grupių gyvūnų odos storio pokyčiai. Kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip odos storio (m) vidurkiai ± standartinis nuokrypis. BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sveikos ir pelės su BLM sukelta sisteminė skleroze – kontrolinės grupės; BLM+1200UVA1 – pelės su BLM sukelta sisteminė skleroze, gydytos didelėmis 1200 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis; BLM+600UVA1 – pelės su BLM sukelta sisteminė skleroze, gydytos vidutinėmis 600 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis; Sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis 1200 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis; Sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis 600 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis. \* – Skirtumai statistiškai reikšmingi esant P < 0,05.

Fig. 1. Changes of the skin thickness in all experimental groups

atitinkamai 3,99 ± 1,21 % ir 4,17 ± 1,18 %. BLM sukeltame sisteminės sklerozės modelyje (II grupė) aktyvios kaspazės-3 raiška odoje padidėjo iki 9,8 ± 1,5 % ir statistiškai reikšmingai skyrėsi (P < 0,05) nuo sveikų gyvūnų grupės. Po UVA1 fototerapijos kurso, sukaupus 1200 J/cm<sup>2</sup> ir 600 J/cm<sup>2</sup> spinduliuotės dozes, pelių su sisteminė skleroze dermoje nustatyta gerokai padidėjusi (P < 0,05) aktyvios kaspazės-3 raiška (atitinkamai 17,2 ± 3,3% ir 17,1 ± 4,4 %), palyginti su kontroline BLM (II) grupe (2 pav.).

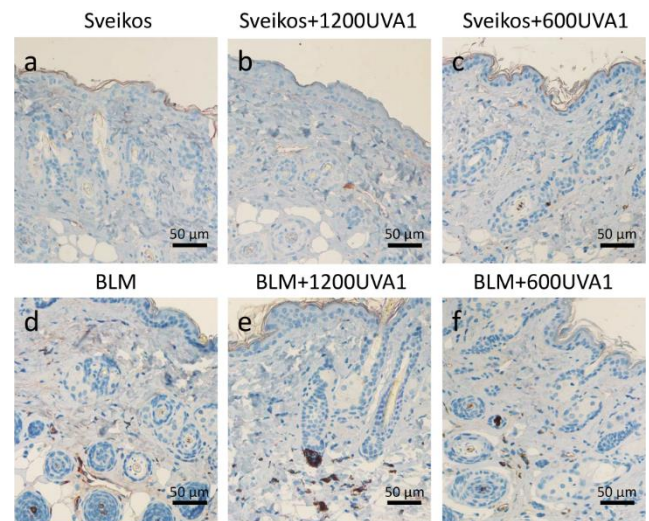
## REZULTATŲ APTARIMAS IR DISKUSIJA

Šio darbo tikslas buvo įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės poveikį odos fibrozei ir apoptozei BLM sukeltame pelių sisteminės sklerozės modelyje.

Epitelio sluoksnio ląstelės sisteminės sklerozės atveju dėl išemijos ar kitos pažaidos praranda tarpląstelines

roblastus. Aktyvuoti miofibroblastai uždegimo aplinkoje gausiai gamina tarpląstelinio matrikso komponentus, ypač I ir III tipo kolagenus [32]. Ligai išgalint, fibroblastai proliferuoja, jų fibrozinis aktyvumas didėja, tačiau dėl progresuojančio uždegimo išsivysto fibroblastų atsparumas apoptozei, kas skatina tolesnį fibrozės vystymąsi. Mes iškėlėme hipotezę, kad UVA1 spinduliuotė, pasiekdama tikrosios odos sluoksnį, sukelia čia esančių ląstelių apoptozę.

Apoptozės proceso reguliavimo sutrikimas – viena iš sisteminės sklerozės patogenezės grandžių. Apoptozėje dalyvauja fermentai, prikausantys peptidazių šeimai. Kaspazės – tai peptidazės, kurių aktyviajame centre yra aminorūgštis cisteinas ir kurios skelia asparto rūgšties karboksilinės grupės sudaromą peptidinį ryšį (angl. *caspase-cysteine aspartate specific peptidase*) [33, 34]. Pagal veikimo mechanizmą, kaspazės yra skirstomos į iniciacines (kaspazė-2, -8, -9, -10) ir vykdomąsias (kaspazė-3, -6, -7) [35]. Kaspazė-3



2 pav. Aktyvios kaspazės-3 imunohistocheminė analizė. Padidinimas × 200

BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė. a) sveikos ir d) pelės su BLM sukelta sisteminė skleroze – kontrolinės grupės; b) sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis 1200 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis; c) Sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis 600 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis; e) BLM+1200UVA1 – pelės su BLM sukelta sisteminė skleroze, gydytos didelėmis 1200 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis; f) BLM+600UVA1 – pelės su BLM sukelta sisteminė skleroze, gydytos vidutinėmis 600 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozėmis.

Fig. 2. Immunohistochemistry of active caspase-3

jungtis ir transformuojasi į mezenchimines ląsteles arba miofibroblastus.

yra pagrindinė ir dominuojanti vykdomoji peptidazė, kuri gali būti aktyvuojama tiek per išorinį, tiek per vidinį apoptozės reguliavimo kelius [36, 37]. Išorinis kelias yra susijęs su Fas arba TNF faktoriaus receptoriais ir prie jų prisijungiančiais tirpiaisiais baltymais (pvz., Fas ligandu, TNF), aktyvuojančiais kaspazę-8 [38]. Vidiniame apoptozės aktyvacijos kelyje dalyvauja mitochondrijos [39, 40]. Atsiradus DNR pažaidoms, iš mitochondrijų į citozolį patenka citochromas c. Padidėjęs mitochondrijos membranos laidumas ir citochromo c patekimas į citozolį skatina kaspazių šeimos aktyvavimą [38]. Citochromas c ir proteazės aktyvuojantis faktorius (angl. *apoptosis proteases activating factor*, Apaf-1) suformuoja apoptosomą – baltymų kompleksą, aktyvuojantį kaspazę-9 [41]. Apoptozę skatinančių (Bax, Bak ir Bid) ir apoptozę slopinančių (Bcl-2 ir Bcl-x) Bcl šeimos baltymų pusiausvyrą nulemia apoptozės proceso pradžią arba sustabdymą [42].

Atlikę tyrimą mes nustatėme padidėjusią aktyvios kaspazės-3 raišką dermoje po BLM injekcijų, kas rodo patogenezinį ir uždegiminį BLM veikimo mechanizmą, sukeliant fibrozinį

procesą. Yamamoto su bendraautoriais [36] tyrė apoptozės procesus BLM sukeltame sklerodermos modelyje C3H/HeJ linijos pelėms. Apoptozinių ląstelių kiekis vertintas (galinės deoksiribonukleotidiltransferazės deoksiuridintrifosfato liekanos žymėjimo) (TUNEL) ir DNR elektroforezės gelyje metodais. Po BLM injekcijų nustatytas padidėjęs kaspazės-3 aktyvumas ir mRNR raiška. Apoptozinės ląstelės ir padidėjęs Fas/Fas ligando kiekis rasta keratinocituose ir mononuklearuose, bet ne fibroblastuose ir endotelio ląstelėse. Skiriant neutralizuojanti antikūną prieš Fas ligandą kartu su BLM injekcijomis, nustatytas sumažėjęs odos fibrozės išsivystymo laipsnis kartu su silpnesniu kaspazės-3 aktyvumu ir nedideliu apoptozės laipsniu. Tad Fas/Fas ligando apoptozės kelias yra svarbus sisteminės sklerozės patogenezėje [36]. Įrodyta, kad sisteminės sklerozės fibroblastai yra atsparūs nuo Fas ligando priklausomai apoptozei [28, 43, 44]. Kitų autorių tyrimų duomenimis, sisteminės sklerozės fibroblastams būdinga padidėjusi Bcl-2 ir sumažėjusi Bax baltymų raiška, kas lemia sumažėjusį apoptozinį aktyvumą [28, 45]. Manoma, kad TGF- gali būti pagrindinis veiksnys, sukiantis šiai ligai būdingas fibroblastų populiacijas, atsparias ląstelių žūčiai [46].

Įvertinus, kad fibroblastų atsparumas apoptozei priklauso ne tik nuo Fas/Fas ligando grandies, bet ir nuo vidiniame apoptozės kelyje dalyvaujančių Bax ir Bcl baltymų, efektyvi fototerapija turėtų veikti abu ląstelių žūties kelius. Plačiajuostės UVA1 veikimo sukiant apoptozę mechanizmas buvo tirtas polimorfonukleaurų kultūroje (iš sveiko žmogaus kraujo mėginio) [47]. Siekiant įvertinti apoptozės vidinio kelio aktyvaciją, buvo tirti antikūnai prieš citochromą c ir aktyvią kaspazę-9, o išorinio kelio aktyvacija – antikūnai prieš aktyvią kaspazę-8 ir Bid baltymą. Žūvančių ląstelių kiekis įvertintas tėkmės citometrijos būdu. Po 30 J/cm<sup>2</sup>, 50 J/cm<sup>2</sup> ir 80 J/cm<sup>2</sup> UVA1 (340–440 nm) spinduliuotės dozių, bendras žūvančių ląstelių kiekis padidėjo atitinkamai 1,8, 2,7 ir 4,5 karto. Kaip ir anksčiau atliktuose tyrimuose, buvo patvirtinta, kad UVA1 sukelia apoptozę tiek vidiniu, tiek išoriniu apoptozės aktyvacijos keliu [25, 47].

Mūsų tyrime po didelių ir vidutinių UVA1 dozių fototerapijos aktyvios kaspazės-3 raiška dvigubai padidėjo suplonėjusioje skleroderminėje odoje. Atliktais tyrimais nustatyta, kad sisteminė skleroze sergančių pacientų T ląstelės yra mažiau jautrios apoptozės procesui ir jose sumažėja aktyvios

kaspazės-3 raiška [48]. Siekiami įvertinti UVA1 poveikį T ląstelių apoptozei, Yamauchi su bendraautoriais atliko *in vitro* tyrimą su sveikomis CD4<sup>+</sup> ir T limfomos ląstelėmis [49]. Pašvitinus ląsteles 20 J/cm<sup>2</sup> UVA1 paaikšėjo, kad ląstelių jautrumas apoptozei priklauso nuo aktyvios kaspazės-3 raiškos. Didesnis šio fermento kiekis ląstelių aplinkoje lemia geresnį apoptozinį atsaką į UVA1 spinduliuotę. Mūsų atliktame tyrime aktyvios kaspazės-3 raiška galbūt taip pat padidina čia esančių T ląstelių jautrumą UVA1 sukeltai apoptozei, todėl mažėja uždegiminė infiltracija ir gaunamas antifibrozinis fototerapijos poveikis. Okazaki su bendraautoriais [50] nustatė, kad pacientų serume yra padidėjusi autoantikūnų prieš aktyvią kaspazę-3 koncentracija. Šių antikūnų kiekis buvo tiesiogiai susijęs su kraujagysliniu pažeidimu, ilgesne ligos trukme, padidėjusiais uždegimo rodikliais bei ryškia plaučių fibroze. Manoma, kad antikūnai prieš kaspazę-3 yra susiję su sutrikusiu apoptozės reguliavimo procesu ir sumažėjusiu kaspazės-3 fermento aktyvumu [50]. Taigi siaurajuostė UVA1 spinduliuotė, sukianti padidėjusią aktyvios kaspazės-3 raišką, reguliuoja sisteminę sklerozę būdingą pakitusių apoptozės veiklą.

UVA1 spinduliuotė, pasiekdama tikrosios odos sluoksnius, veikia ne tik čia esančius fibroblastus ir uždegimo ląsteles, bet ir kraujagyslių endotelį. Breuckman su kolegomis [51] įvertino UVA1 (340–400 nm) spinduliuotės poveikį endotelinių ląstelių apoptozei. Sisteminė skleroze sergančių pacientų galūnių odai skirta suminė 1500 J/cm<sup>2</sup> UVA1 dozė. Imunohistocheminė analizė su antikūnais prieš M30 baltymą (kaspazės skilimo produktas) parodė, kad endotelinių ląstelių, turinčių M30<sup>+</sup>, kiekis dermoje sumažėjo, palyginti su kontroline grupe be fototerapijos (atitinkamai 8,7 ± 5,2 % ir 18,1 ± 10,9 %, P = 0,025). Šie rezultatai patvirtina, kad UVA1 turi įtakos endotelinių ląstelių proliferacijai. Yra žinoma, kad endotelinių ląstelių apoptozė yra vienas iš pradinių sisteminės sklerozės patogenezę skatinančių veiksnių [52]. Fibroblastai, patekę į apoptozę patiriančių endotelinių ląstelių aplinką, pasikeičia į miofibroblastus [53]. Taip pat įrodyta, kad endotelinių ląstelių žūtis sukelia fibroblastų atsparumą apoptozei per PI3K priklausomą kelią [54]. Tad kraujagyslėse vykstančios apoptozės mažinimas yra svarbus UVA1 veikimo mechanizmas.

Šiame tyrime taip pat įvertinome siaurajuostės UVA1 didelių ir vidutinių dozių poveikį sveikai gyvūnų odai.

Po fototerapijos kurso, odos storis ir kaspazės-3 raiška nesiskyrė nuo nešvitintos sveikų pelių kontrolinės grupės. Ju su kolegomis [55] ištyrė plataus spektro UVA1 (bangos ilgis 340–400 nm) spinduliuotės mažų, vidutinių ir didelių (suminės dozės atitinkamai 20 J/cm<sup>2</sup>, 60 J/cm<sup>2</sup> ir 100 J/cm<sup>2</sup>) dozių poveikį fibroblastams, gautiems iš sveiko žmogaus odos. Tiriant ląstelių gyvybingumą MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido) dažų nustatyta, kad fibroblastų pažeidimas atsirado iš karto po švitinimo, tačiau didžiausi proliferacijos sutrikimo pokyčiai buvo po 24 val. Fibroblastų struktūra buvo edeminė, iš dalies suardyta, apvali, tarpląstelinis tarpas praplatėjęs. Ląstelių gyvybingumas sumažėjo priklausomai nuo skirtos dozės (ypač dideli pakitimai nustatyti didelės dozės UVA1 grupėje). Tad fibroblastai, išskirti iš sveikos odos, yra jautrūs UVA1 spinduliuotės sukeltai apoptozei [55]. Tame pačiame tyrime buvo įvertintas plačiajuostės UVA1 spinduliuotės poveikis BALB/c linijos pelių odos storiui BLM sukeltame sklerodermos modelyje. Nustatyta, kad didelė (3000 J/cm<sup>2</sup>) UVA1 spinduliuotės dozė sumažina skleroderma turinčių pelių odos storį 1,5 karto, vidutinė (1800 J/cm<sup>2</sup>) – 1,14, o maža (600 J/cm<sup>2</sup>) – tik 1,03 karto, palyginti su BLM kontrolinės grupės odos storiu. Mūsų tyrime siaurajuostė UVA1 (1200 J/cm<sup>2</sup>) sumažino dermos storį net 2,19, o 600 J/cm<sup>2</sup> – 1,52 karto, palyginti su kontroline BLM grupe. Tad siauras 365 nm bangos spektras yra efektyvesnis mažinant odos fibrozę eksperimentiniame pelių sklerodermos modelyje.

## IŠVADOS

Siaurajuostė 365 nm bangos ilgio UVA1 spinduliuotė reikšmingai sumažina odos storį BLM sukeltame eksperimentiniame sisteminės sklerozės modelyje, o antifibrozinis poveikis tiesiogiai priklauso nuo dozės. Fototerapijos kursas dvigubai padidina kaspazės-3 raišką skleroderminėje gyvūnų odoje. Sveikų gyvūnų grupėse UVA1 spinduliuotė neturi įtakos odos storiui ir kaspazės-3 raiškai.

## Finansavimas

Pasaulio mokslininkų federacijos Lietuvos nacionalinė stipendija (dalinis finansavimas). ◆

Gauta: 2017 05 12  
Priimta spaudai: 2017 09 25



Summary

**THE IMPACT OF NARROWBAND ULTRAVIOLET A1 ON ACTIVE CASPASE-3 EXPRESSION IN SCLERODERMA ANIMAL MODEL**

**Diana Karpec, Romualdas Rudys, Laima Leonavičienė, Zygmunt Mackiewicz, Rūta Bradūnaitė, Gailutė Kirdaitė, Algirdas Venalis**

**Background.** To define the impact of 365±5 nm ultraviolet A1 (UVA1) radiation for the dermal fibrosis and apoptosis in bleomycin (BLM)-induced mouse model of scleroderma.

**Materials and methods.** Forty two DBA/2 strain healthy mice and mice with bleomycin-induced scleroderma were treated with high and medium doses of UVA1. The average cumulative doses were 1200 J/cm<sup>2</sup> for high and 600 J/cm<sup>2</sup> for medium dose treatments. Non-treated groups served as the control.

Light source emitting a narrowband UVA1 365±5 nm and radiation of 21 mW/cm<sup>2</sup> power density was used in the study. Histological analysis with H&E staining for dermal thickness measurement and immunohistochemical staining for active caspase-3 proteins were performed. Statistical significance was expressed by a P value 0.05.

**Results.** The dermal thickness of mice treated with high and medium doses of UVA1 was significantly lower in comparison to the control BLM group (P<0.05). Af-

ter irradiation with cumulative doses of 1200 J/cm<sup>2</sup> and 600 J/cm<sup>2</sup> of UVA1 on mice with scleroderma, the expression of active caspase-3 was significantly (P<0.05) higher (17.2±3.3% and 17.1±4.4%, respectively) as compared with that in the BLM control group (9.8±1.5%) The expression profile of active caspase-3 in the skin did not differ between healthy and UVA1-treated healthy mice groups.

**Conclusions.** Narrowband UVA1 phototherapy effectively reduced the dermal thickness, and the impact was dose-dependent. UVA1 radiation caused the double increase of the active caspase-3 expression in the skin of mice with scleroderma.

**Keywords:** phototherapy, apoptosis, fibrosis, ultraviolet A1, scleroderma.

LITERATŪRA

- Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 1979; 149(6): 1326–35.
- Altork N, Wang Y, Kahaleh B. Endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26(6): 615–20.
- Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 557–67.
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2): 199–210.
- Manetti M, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. The origin of the myofibroblast in fibroproliferative vasculopathy: does the endothelial cell steer the pathophysiology of systemic sclerosis? *Arthritis Rheum* 2011; 63(8): 2164–7.
- Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis – a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(7): 390–402.
- Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9(2): 136–43.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21491–4.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6(5): 199–213.
- Blagojevic J, Matucci-Cerinic M. Systemic sclerosis: clinical manifestations. *Curr Rheumatol Rev* 2010; 6(4): 295–304.
- Anderson RR, Parrish JA. The optics of human skin. *J Invest Dermatol* 1981; 77(1): 13–9.
- Kerr AC, Ferguson J, Attili SK, Beattie PE, Coleman AJ, Dawe RS, et al. Ultraviolet A1 phototherapy: a British Photodermatology Group workshop report. *Clin Exp Dermatol* 2012; 37(3): 219–26.
- Gambichler T, Terras S, Kreuter A. Treatment regimens, protocols, dosage, and indications for UVA1 phototherapy: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2013; 31(4): 438–54.
- Krutmann J, Czech W, Diepgen T, Niedner R, Kapp A, Schopf E. High-dose UVA1 therapy in the treatment of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(2 Pt 1): 225–30.
- Stege H, Schopf E, Ruzicka T, Krutmann J. High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa. *Lancet* 1996; 347(8993): 64.
- Plettenberg H, Stege H, Megahed M, Ruzicka T, Hosokawa Y, Tsuji T, et al. Ultraviolet A1 (340–400 nm) phototherapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41(1): 47–50.
- Morita A, Werfel T, Stege H, Ahrens C, Karmann K, Grewe M, et al. Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J Exp Med* 1997; 186(10): 1763–8.
- Gruss C, Reed JA, Altmeyer P, McNutt NS, Kerscher M. Induction of interstitial collagenase (MMP-1) by UVA-1 phototherapy in morphea fibroblasts. *Lancet* 1997; 350(9087): 1295–6.
- Grewe M, Gyufko K, Schopf E, Krutmann J. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* 1994; 343(8888): 25–6.
- Grabbe J, Welker P, Humke S, Grewe M, Schopf E, Henz BM, et al. High-dose ultraviolet A1 (UVA1), but not UVA/UVB therapy, decreases IgE-binding cells in lesional skin of patients with atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1996; 107(3): 419–22.
- Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Breuksch S, Altmeyer P, Kreuter A. Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *Br J Dermatol* 2007; 156(5): 951–6.
- de Rie MA, Enomoto DN, de Vries HJ, Bos JD. Evaluation of medium-dose UVA1 phototherapy in localized scleroderma with the cutometer and fast Fourier transform method. *Dermatology* 2003; 207(3): 298–301.
- Durand F, Staumont D, Bonneville A, Hachulla E, Hatron PY, Thomas P. Ultraviolet A1 phototherapy for treatment of acrosclerosis in systemic sclerosis: controlled study with half-side comparison analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23(6): 215–21.
- Kreuter A, Hyun J, Stucker M, Sommer A, Altmeyer P, Gambichler T. A randomized controlled study of low-dose UVA1, medium-dose UVA1, and narrowband UVB phototherapy in the treatment of localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(3): 440–7.
- Godar DE. UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol* 1999; 112(1): 3–12.
- 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): 785–92.
- Aden N, Nuttall A, Shiwen X, de Winter P, Leask A, Black CM, et al. Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2010; 130(9): 2191–200.
- Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2001; 44(7): 1667–76.

29. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112(4): 456–62.
30. Hassani J, Feldman SR. Phototherapy in scleroderma. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2016; 6(4): 519–53.
31. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 676–82.
32. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(5): R1113–23.
33. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87(2): 171.
34. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 725–31.
35. Nadiri A, Wolinski MK, Saleh M. The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol* 2006; 177(7): 4239–45.
36. Yamamoto T, Nishioka K. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004; 122(1): 44–50.
37. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(10): 7320–6.
38. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86(1): 147–57.
39. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1533–44.
40. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6(5): 513–9.
41. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5): 405–13.
42. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3(6): 614–20.
43. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(10): 2230–9.
44. Yamamoto T, Yokozeki H, Nishioka K. Fas- and FasL-deficient mice are resistant to the induction of bleomycin-induced scleroderma. *Arch Dermatol Res* 2007; 298(9): 465–8.
45. Kim JY, Kwok SK, Hur KH, Kim HJ, Kim NS, Yoo SA, et al. Up-regulated macrophage migration inhibitory factor protects apoptosis of dermal fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2008; 152(2): 328–35.
46. Chabaud S, Moulin VJ. Apoptosis modulation as a promising target for treatment of systemic sclerosis. *Int J Rheumatol* 2011; 2011: 13.
47. Tuchinda C, Lim HW, Strickland FM, Guzman EA, Wong HK. Comparison of broadband UVB, narrowband UVB, broadband UVA and UVA1 on activation of apoptotic pathways in human peripheral blood mononuclear cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23(1): 2–9.
48. Cipriani P, Fulminis A, Pingiotti E, Marrelli A, Liakouli V, Perricone R, et al. Resistance to apoptosis in circulating alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006; 33(10): 2003–14.
49. Yamauchi R, Morita A, Yasuda Y, Grether-Beck S, Klotz LO, Tsuji T, et al. Different susceptibility of malignant versus non-malignant human T cells toward ultraviolet A-1 radiation-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* 2004; 122(2): 477–83.
50. Okazaki S, Ogawa F, Iwata Y, Hara T, Muroi E, Komura K, et al. Autoantibody against caspase-3, an executioner of apoptosis, in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2010; 30(7): 871–8.
51. Breuckmann F, Stuecker M, Altmeyer P, Kreuter A. Modulation of endothelial dysfunction and apoptosis: UVA1-mediated skin improvement in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 2004; 296(5): 235–9.
52. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11): 2550–62.
53. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, et al. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell Death Differ* 2010; 17(2): 291–303.
54. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005; 174(9): 5740–9.
55. Ju M, Chen K, Chang B, Gu H. UVA1 irradiation inhibits fibroblast proliferation and alleviates pathological changes of scleroderma in a mouse model. *Journal of Biomedical Research* 2012; 26(2): 135–42.