

Laboratorinė medicina.  
2014, t. 16, Nr. 4(64), p. 187–193.

# Gyvūnų sklerodermijos modeliai ir jų naudojimo galimybės

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

## Santrauka

Sisteminės sklerozės (SS) patofiziologijos supratimui labai svarbūs gyvūnų modeliai, kurių tinkamas parinkimas yra pagrindinė priemonė nuodugnesnei jos patogenezės ir gydymo būdų paieškai. Gyvūnų modeliai atkuria daugelį histologinių ir biocheminių žmogaus sisteminės sklerozės požymių, o juos tyrinėjant gaunama daug vertingų žinių. Esama nemažai į SS panašių modelių, kai kuriuose iš jų vyrauja uždegimo procesai, vėliau sukeliantys fibrozę, o kituose pirmiausia vystosi autonominė fibroblastų aktyvacija su fibrozės reiškiniais. Trys pagrindiniai SS požymiai – uždegimas, autoimuniniai pokyčiai ir fibrozė – yra būdingi bleomicino, hipochloro rūgšties, vinilo chlorido, topoizomerazės-I ir pilnojo Froindo adjuvanto sukeltiems bei skleroderminės transplantato prieš šeimininką ligos modeliams. Pastaraisiais metais aprašomi keturi nauji eksperimentiniai gyvūnų sisteminės sklerozės modeliai: reaktyvių deguonies rūšių, pilnojo Froindo adjuvanto, angiotenzino II bei topoimerazės I. Plačiai naudojami ir transgeniniai, spontaniniai bei pašalintų genų pelių sklerodermijos modeliai. Tik keletas modelių, tokių kaip UCD-200 ir UCD-206 viščiukų modelis ar Fra-2 pelių modelis, yra tinkami smulkių kraujagyslių vaskulopatijai tirti. Tačiau nė vienas gyvūnų modelis neapima visų žmogaus sisteminės sklerozės požymių. Eksperimentinių sklerodermijos modelių pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslo. Siekiant išsiaiškinti ankstyvus pokyčius, dažnai pasirenkamas bleomicino indukuotas modelis, kuris atkartoja žmogaus SS, būdingą ankstyvai, ypač nuo uždegimo priklausomai, ligos stadijai. Dėl genų defektų išsivystęs Tsk /+ pelių modelis atspindi vėlesnes fibrozines ir mažiau nuo uždegimo priklausomas SS stadijas. Reikia pažymėti, kad antifibroziniai vaistai, priskiriami įrodytam akivaizdžiam A lygiui, privalo būti ištirti naudojant mažiausiai du gyvūnų modelius, atspindinčius skirtingus ligos aspektus, o geriausias atvejis, kai gydymasis poveikis nustatomas skirtingiems organams, kurie pažeidžiami sergant SS.

**Reikšminiai žodžiai:** sisteminė sklerozė, eksperimentiniai gyvūnai, sklerodermijos modeliai.

## IVADAS

Sisteminė sklerozė (SS) yra sudėtinga autoimuninė liga, apibūdinama patologine fiziologine jungiamojo audinio rekonstrukcija, kuriai būdingi tokie pagrindiniai požymiai kaip intensyvi fibrozė, kraujagyslių pažeidimas ir au-

toantikūnai prieš įvairius ląstelinius antigenus [1]. Nors ankstyviausios ir dažniausios apraiškos paliečia kraujagysles ir autoimuninius sutrikimus, šiai sisteminėi progresuojančiai patologijai būdinga sąveika tarp mikrokraujagyslių pažeidimo ir uždegimo, o šie vėliau yra susiję su odos bei įvairių

<sup>1</sup>Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Reumatologijos, traumatologijos-ortopedijos ir rekonstrukcinės chirurgijos klinika, Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius, Lietuva

Vilnius University, Faculty of Medicine, Clinic of rheumatology, traumatology-orthopaedics and reconstructive surgery, Santariskiu str. 2, LT-08661 Vilnius, Lithuania  
El. paštas: karpecdiana@gmail.com

<sup>2</sup>Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras, Žygimantų g. 9, LT-01102 Vilnius  
State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Zygimantu str. 9, LT-01102 Vilnius, Lithuania

vidaus organų fibrozė. Smulkių kraujagyslių pažeidimas, autoimuniniai sutrikimai ir fibrozė yra pagrindiniai SS patologinės požymiai, kurie pasireiškia įvairiais klinikiniais pažeidimais. Kraujagyslių pažeidimas yra ankstyva apraška ir atlieka esminį vaidmenį SS patologijoje [2], o fibroblastų aktyvacija ir jų diferenciacija į miofibroblastus, esant padidėjusiam tarpląstelinio užpildo baltymų išlaisvinimui, yra pagrindinis fibrozinių ligų bruožas. Miofibroblastai – tai „specializuoti“ fibroblastai. Jie sintetina pakitusius kolagenus ir kitus tarpląstelinio užpildo komponentus (angl. *extracellular matrix* – ECM) ir yra pagrindinis transformuojančio augimo faktoriaus (TGF- $\beta$ ) šaltinis fibroblastų atsako metu [3]. Sergant fibrozėmis ligomis, normalus audinys nesugeba atsinaujinti, o pažeidimo vietoje vyrauja miofibroblastai, gali formuotis fibrozė dalyvaujant mechanizmomams, kai kooperuojasi daug tarpląstelinio signalinių molekulių, įskaitant TGF 1, endoteliną-1 (ET-1) ir jungiamojo audinio augimo faktorių (angl. *connective tissue growth factor* – CCN2).

Kai kurių autorių darbuose [4, 5] apžvelgtas oksidacinio streso vaidmuo sklerodermijos patologijoje ir pademonstruota tiesioginė reaktyvių deguonies rūšių (angl. *reactive oxygen species* – ROS) įtaka, parodant, kad ROS prigimtis lemia SS tam tikrų klinikinių požymių raišką [5]. Taip peroksinitritai sukelia odos fibrozę ir serumo antikūnų prieš centromerų B antigeną (anti-CENP-B) radimąsi, kas būdinga ribotai SS, o hipochloritas ar hidroksilo radikalai sukelia odos ir plaučių fibrozę ir žmogaus difuzinei SS būdingų autoantikūnų prieš deoksiribonukleorūgšties topoizomerazę 1 (anti-DNR topoizomerazę 1) radimąsi. Laisvieji radikalai gali būti tiesioginis profibrozinis stimulus fibroblastų ir ECM komponentų gamybai.

Be tiesioginės fibroblastų aktyvacijos, oksidantai gali prisidėti prie fibrozės patologinės ir jos vystymosi, keisdami proteazių ir antiproteazių pusiausvyrą, taip pat ryšį su citokiniais ir augimo veiksniais, kurie dalyvauja kaip mediatoriai fibrozės patologijoje sergant sklerodermija [4].

Reikia pabrėžti, kad sisteminės sklerozės patofiziologijos supratimui labai svarbūs gyvūnų modeliai, kurie yra būtina priemonė įvairioms žmonių ligoms perprasti, naujiems gydymo metodams įvertinti [2].

Tyrimams naudojami įvairūs spontaniniai (savaiminiai, dėl geneti-

nių defektų besivystantys), indukuoti (tam tikromis medžiagomis sukelti) bei transgeniniai (genetiškai modifikuoti) gyvūnų, daugiausia pelių, SS modeliai, kuriuose pagrindiniai fibrozinių procesų veiksniai yra fibroblastai [6]. Terminas „transgeniniai“ yra vartojamas siekiant apibūdinti gyvūnų modelius, gaunamus modifikuojant genomą ne tik geno perkėlimo būdu, pavyzdžiui, sukėlus mutacijas bei atlikus tarprūšinių kryžminimą. Genetiškai modifikuotų pelių modeliai leidžia daryti svarbias išvadas dėl konkrečių genų ar jų mutacijų vaidmens ligos patologijoje. Šie pelių modeliai svarbūs vertinant atsaką į gydymą. Sudėtingas SS patologinės supratimas iš dalies lėtokai aiškėja, nes trūksta gyvūnų modelių, atkartojančių tris pagrindinius SS požymius, tokius kaip autoimunitetas, vaskulopatija ir fibrozė [7]. Eksperimentinės manipuliacijos su inbredinėmis (angl. *inbreeding*) pelėmis (išvestomis poruojant brolius su seserimis), suteikia galimybę pasiekti rezultatus, atkartojančius SS fibrozę, o genetinės inžinerijos metodai būtini sukurti naujas pelių veisles, kurioms spontaniškai vystytusi fibrozė arba kurios būtų apsaugotos nuo šios patologijos.

Tinkamai parinkti modeliai yra pagrindinės priemonės nuodugnesniems SS patologinės tyrimams, nes jie atkuria daugelį histologinių ir biocheminių bei autoimuninių aspektų, pagilina žinias apie šią ligą. Daugumai SS gyvūnų modelių būdingi uždegiminiai procesai, lydintys fibrozę, o kituose pirmiausia imituojama autonominė fibroblastų aktyvacija, tik kelias modelių tinka smulkiųjų kraujagyslių vaskulopatijai tyrinėti [8]. Tačiau reikia pažymėti, kad nėra idealaus gyvūnų sklerodermijos modelio, kuris atspindėtų visus žmogaus SS ligos požymius, todėl tikslingas ir tinkamas modelio pasirinkimas yra svarbus tyriant šios ligos patologinės mechanizmus ar fibrozę slopinančius naujų vaistų poveikius [2].

Kaip nurodo kai kurie autoriai [9], pasirenkant tinkamą modelį reikia atsakyti į šiuos klausimus: 1. Ar naujame projekte dėmesys bus skiriamas SS patologijai tirti, ar vaistams įvertinti? 2. Kuriam svarbiausiam patologiniam SS komponentui (t. y. autoimunitetas, vaskulopatija ir fibrozė) tirti yra skirtas naujas projektas? 3. Kokie techniniai iššūkiai ir ištekčiai yra būtini? Terapinėms ir farmakologinėms studijoms reikalingi greiti ligos atsiradimo modeliai, nes ilgalaikis gydymas gali sukelti gyvūnams stresą ir būti brangus.

## EKSPERIMENTINIAI GYVŪNŲ MODELIAI IR JŲ TAIKYMO GALIMYBĖS

### Indukuoti gyvūnų SS modeliai

Indukuotiems priskiriami šie gyvūnų modeliai:

1. Bleomicino (BLM) poodinių injekcijų sukelta fibrozė (vyraujantys požymiai – uždegimas, autoimunitetas, fibrozė) [2, 10, 11].

2. Hipochloro rūgšties sukelta fibrozė (vyrauja uždegimas, autoimunitetas, fibrozė).

3. Topoizomerazės-I ir pilnojo Froindo adjuvanto (PFA) sukelta fibrozė (uždegimas, autoimunitetas, fibrozė) [12].

4. Skleroderminės transplantato prieš šeimininką ligos (angl. *sclerodermatous graft-vs-host disease* – Scl-GvHD) pelių modeliai (uždegimas, autoimunitetas, fibrozė) [8]; GVHD I, kuriame blužnies ląstelių perkėlimas iš laukinio tipo B10.B2 pelių į apšvitintas Balb/c peles sukelia odos ir plaučių fibrozę, lydimą vaskulopatijos ir uždegimo, bei GVHD II, kuriame blužnies ląstelių perkėlimas iš laukinio tipo B10.B2 pelių į RAG2 neturinčias peles sukelia odos ir plaučių fibrozę su pasireiškiančia vaskulopatija, uždegimu bei autoimunitetu [6].

Sklerodermijos modeliai gali būti sukelti ir naudojant organinius tirpiklius, tokius kaip vinilo chloridas [13, 14].

### Bleomicino sukeltas sklerodermijos modelis

Vienas tipiškiausių atkartojančių sisteminę sklerozę modelių yra bleomicino sukelta pelių sklerodermija [2, 10, 11].

BLM – tai antibiotikas, gaunamas iš bakterijos *Streptomyces ventricillus*, jis slopina auglius ir dažnai vartojamas vėžiui gydyti. BLM pasižymi daugeliu biocheminių savybių: blokuoja ląstelių ciklą G2, suskaldo viengubą ir dvigubą deoksiribonukleino (DNR) grandį, saugo ląstelinę ribonukleorūgštį (RNR), gamina laisvuosius radikalus ir sukelia apoptozę [15]. BLM įvairiai veikia odoje esančias ląsteles, tokias kaip fibroblastai, keratinocitai ir endotelinės ląstelės bei kitos imuninės ląstelės [16], *in vitro* didina kolageno sankaupą ir TGF- 1 raišką kultivuotuose žiurkių plaučiuose ir žmogaus odos fibroblastuose [17]. Taip pat BLM sustiprina ECM baltymų genų

raišką ir fibrogeninius citokinus, kurie gali prisidėti prie fibrozės sukėlimo [17].

Kadangi fibrozė yra gerai žinomas šalutinis BLM poveikis, jis yra naudojamas graužikų eksperimentinei fibrozei sukelti. Kasdienės BLM injekcijos daugiau kaip 4 savaites [11] sukelia sklerozinius pokyčius, kurie išlieka mažiausiai 6 savaites nustojus leisti BLM. Odos fibrozė išryškėja ribotame plote, supančiame injekcijos vietą. Šis modelis atspindi uždegiminius pokyčius, kurie vyksta esant ankstyvai SS ligos stadijai, taip pat vyrauja autoimuniniai pokyčiai ir fibrozė. Histopatologiškai matoma aiški odos fibrozė, apibūdinama sustorėjusiomis kolageno skaidulomis, homogeninės medžiagos sancaupomis sustorėjusioje odoje su lašteliniais infiltratais, kurie atkartoja žmogaus SS histologinius požymius. Be to, daugelyje tyrimų nustatyta, kad BLM stimuliuoja endotelines lasteles ir fibroblastus, aktyvina pro-uždegiminius ir fibrogeninius citokinus, apoptozę, sukelia aktyvių deguonies radikalų gamybą, endotelinių ir kitų laštelių pažeidimą ir adhezijos molekulių raišką [10], o uždegiminės lastelės infiltruoja pažeistą odą ir aktyvina fibroblastus [11]. Aktyvinti fibroblastai gamina ir išlaisvina didelius ECM kiekius, o tai sukelia fibrozę BLM injekcijos vietoje. Matoma leukocitų infiltracija, aktyvinama profibrozinė TGF veikla. Be TGF, labai stipri raiška ir kitų profibrozinų mediatorių, įskaitant monocitų chemoatranktantinį proteiną 1, trombocitų kilmės augimo faktorių (PDGF) bei interleukinus (IL-4, IL-6 ir IL-13) [9].

Antitopoizomerazė-I bei antikūnai prieš uridiną turinčius ribonukleoproteinus (anti-U1-RNP) ir antikūnai prieš histonus aptinkami BLM sukeltame modelyje [18, 19]. Nustatyta, kad BLM sukelti sklerodermijos modeliai sėkmingai ir palyginti lengvai sukeliama ir atgaminami [20] daugumai pelių rūšių, nors odos fibrozės stiprumas skirtingoms pelių veislėms įvairuoja; labai jautrios BLM sukeltai fibrozei yra C3H/He, DBA/2, B10D2 ir B10.A pelės [15].

Kaip parodė pirmieji Yamamoto su bendraautorais atlikti darbai [11], leidžiant kasdien 4 savaites po 100 l BLM (dozė 1 mg/ml) BALB/c veislės 6 savaičių amžiaus patelėms išsivysto ryški odos sklerozė, apibūdinama sustorėjimu ir homogeninėmis kolageno skaidulomis, perivaskuliariniais uždegiminiais infiltratais, sustorėjusiomis kraujagyslių sienelėmis. Odos sklerozė gali būti sukeliamas ir vartojant mažesnes 10 g/ml ir 100 g/ml BLM dozes bei suleidžiant BLM kas

antrą dieną. Kitais tyrimais [21] nustatyta, kad kasdienės 100 l BLM injekcijos C3H pelių patelėms per tris dienas sukelia ryškia odos infiltraciją makrofagais, kuri po savaitės šiek tiek sumažėja, o po trijų savaičių išlieka minimalūs požymiai. Vertinant fibrozės raišką, reikia pažymėti, kad per dvi savaites išsivysto progresuojančios fibrozės požymiai, nes 150 % padidėjęs odos sustorėjimas atsiranda po savaitės, ir 250 % – po trijų savaičių. Infiltruoti makrofagai ir fibroblastai ekspresuoja Smad3 baltymą. Nustatyta, kad Smad proteinai yra vidulasteliniai signalo perdavikliai, kurie lemia fibroblastų aktyvaciją ir kitus profibrozinus atsakus, sukeliamus TGF-*in vitro*. Žinoma, kad TGF- faktorius yra atsakingas už skleroderminei fibrozei būdingų įvykių kaskadą. Fibroblastų ekspresija fosforilintu Smad2/3 labai ryški po savaitės nuo injekcijų pradžios, o po trijų savaičių šiek tiek sumažėja. Taigi, BLM sukelta pelių sklerodermija susijusi su greita ir ilgalaikė TGF- /Smad signalinio indukcija odos fibroblastuose ir santykinu Smad7 trūkumu bei dėl to susidariusios vidulastelinės pusiausvyros pokyčių tarp aktyvuojančių ir slopančių Smad. Nustatyta, kad didelė Smad7 baltymų raiška sustabdo TGF- atsakus ir užkerta kelią fibrozei *in vivo* [21]. Taigi Smad baltymai yra svarbūs fibrozės patogenezėje ir jie gali būti selektyvių antifibrozinų intervencijų taikiniai.

Odoje, paveiktoje BLM, be TGF-, kurio veikla aktyvinama, dalyvauja didelė įvairovė kitų uždegiminių ir profibrozinų mediatorių, įskaitant monocitų chemotaksio baltymą-1, PDGF, IL-4, IL-6 ir IL-13, kurių raiška smarkiai padidėja [10].

Taigi, BLM sukeltai sklerodermijai būdinga daugelis laštelinių ir molekulinų mechanizmų. ECM padidėjusi gamyba, sukelta aktyvintų fibroblastų, lemia visą kompleksą sąveikų tarp endotelinių laštelių limfocitų, makrofagų ir fibroblastų, dalyvaujant daugeliui mediatorių. Svarbų vaidmenį sklerodermijos fibroziniuose procesuose atlieka citokinai, chemokinai ir augimo faktoriai, išskiriami iš uždegiminių ir mezenchiminių laštelių (fibroblastų ir miofibroblastų).

Gyvūnų odos pokyčiai atspindi SS būdingus ypatumus ir, kaip jau buvo minėta, išlieka apie 6 savaites po sukėlimo: tai ankstyvas mononuklearinių laštelių kaupimasis, kurį lydi padidėjusi TGF reguliacija, chemokinių raiška, odos fibrozė su ekspresuojančiais -SMA miofibroblastais. Plaučiuose matoma sustorėjusi alveolių membrana su mononuklearinių

laštelių infiltracija, tačiau labai didelės BLM dozės reikalingos norint sukelti plaučių fibrozę su lašteliniais infiltratais ir pažeista plaučių struktūra.

Kaip jau buvo minėta, šio modelio pranašumas tas, kad jis lengvai sukeliamas ir atkartojamas, nėra jokių histologinių skirtumų tarp patinų ir patelių. Tačiau reikia pažymėti ir tam tikrus šio modelio trūkumus [9]:

1. Fibrozė apribota tik injekcijos vietoje, o SS yra sisteminė liga, kuri pažeidžia odą bei vidaus organus. Didesnė kaip 10 g/ml BLM dozė sukelia histologinius odos sklerozės pokyčius, bet ne fibrozę, o sklerozę akivaizdi tik vertinant histologiškai, bet sunkiai atpažįstama kliniškai. Histologiniai tyrimai rodo, kad nutolusiose nuo injekcijos vietoje kūno dalyse ir organuose, pavyzdžiui, galūnėse, inkstuose ar skrandyje, sklerozės požymių nėra ir tik plaučiuose randama fibrozei būdingų pakitimų.

2. Nors ir matomas modelio kraujagyslių sienelių sustorėjimas giliuose odos sluoksniuose, tačiau nėra tipiškos generalizuotos mikroangiopatijos, kuri prasideda sergant SS dar iki išsivystant fibrozei.

3. Bleomicino modelis pasiduooda gydymui nuo uždegimo, tačiau šis gydymas neveiksmingas žmonėms.

Didžiausia šio nesutapimo priežastis gali būti ta, kad pacientai paprastai stebimi esant išsivysčiusiai fibrozės stadijai, kai dominuoja tik fibrozė, o reikšmingi uždegiminiai infiltratai yra nustatomi tik ankstyvose ligos stadijose [22]. Taigi, BLM sukeltame odos fibrozės pelių modelyje pakartotinės jo injekcijos sukelia lokalią odos fibrozę, atspindinčią uždegiminius pokyčius, kurie dažnai būna ankstyvoje ligos stadijoje [23] ir kurios molekuliniai mechanizmai panašūs į matomus SS atvejais, kai vyksta T laštelių bei makrofagų infiltracija pažeistoje odoje ir nuo TGF ir PDGF priklausoma fibroblastų aktyvacija [24]. Naudojant modelį sukeliama tokie požymiai kaip aiški odos sklerozė su odos sustorėjimu, plaučių fibrozė ir liekamieji autoantikūnai serume [15].

## Organinių tirpiklių sukelti sklerodermijos modeliai

Daugelis organinių tirpiklių gali sukelti skleroderminius odos pokyčius, panašius į būdingus SS. Tai žibalas, *n*-heksanas, heksachloroetanas, bis(4-amino-3-metil-cikloheksil)metanas ir vinilo chloridas.

Egzogeninės substancijos vinilo chlorido penkių dienų per savaitę trijų



savaičių trukmės injekcijos į pelių pilvaplovės sritį sukelia odos uždegimą su gausiais fibroblastų ir mononuklearinųjų ląstelių infiltratais, tankiai suspaudusiomis ir dezorganizuotomis kolageno skaidulomis su nedideliu fibroblastų skaičiumi [14]. Nors plaučiuose ir nematoma akivaizdžių pokyčių, bet blužnis yra labai padidėjusi, o jos centrinėje dalyje aptinkama didelių ląstelių infiltratų bei fibrozė. Tirpiklis sukelia mikrochimerizmą, kuris suprantamas kaip nedidelis (<1 % donoro ląstelių) genetiškai nuo šeimininko (kūno savininko) besiskiriančių ląstelių kiekis organizme. Tai gali būti susiję su autoimuninėmis ligomis. Ši mikrochimerizmo aktyvacija siejasi su akivaizdžiu odos uždegimu ir fibroze, panašia į matomą GvHD modelyje [13]. Nustatomas kraujagyslių pažeidimas, uždegimas, fibrogenėzė. Reikia pažymėti, kad vinilo chlorido sukeltame pelių sklerozės modelyje odos fibrozė labai panaši į patologinius histologinius SS sergančių žmonių pokyčius.

## Angiotenzino II sukeltas odos fibrozės modelis

Įrodyta renino-angiotenzino sistemos įtaka patologinei odos fibrozei bei širdies, inkstų, plaučių ir kepenų fibrozei. Angiotenzino II (Ang II) sukeltas pelių SS modelis gaunamas per 2 savaites nepertraukiamai poodinės osmosinės pompos būdu leidžiant Ang II [25]. Angiotenzino II infuzijos C57BL/6 pelių odoje sukelia uždegimą ir fibrozę, nes padidėja MCP1 (angl. *monocyte chemoattractant protein-1*) reguliacija ir kaupiasi aktyvios fibroblastų populiacijos, kilusios iš cirkuliuojančių kraujo ląstelių. Odos fibrozei būdinga tai, kad padidėja kolageno gamyba ir jo kaupimasis su tankiai suspaustomis kolageno skaidulomis, išauga CTGF, kuris žinomas kaip jungiamojo audinio augimo faktorius, padidėja matricinės ribonukleorūgšties (mRNR) bei kolageno apykaitos produkto hidroksiprolino kiekiai. Angiotenzinas II padidina miofibroblastų kiekį pelių odoje, aktyvina TGF-veiklą, uždegimą, fibrocitų infiltraciją viršutiniame odos sluoksnyje, endotelinio audinio perėjimą į mezenchiminį [25]. Dėl odos fibrozės daugėja SMA teigiamų ląstelių ir infiltruojančių fibrocitų aplink smulkias kraujagysles tiek viršutiniame tiek apatiniuose odos sluoksniuose [25, 26].

Nors šiam modeliui būdingi požymiai – fibrozė ir uždegimas, tačiau nėra vaskulopatijos bei sisteminių autoimuninių pokyčių. Autoriai mano, kad

odos fibrozės modelis, sukeltas Ang II, turėtų būti labai naudingas tolesniems SS patogenezės tyrimams ir naujų antifibrozinių gydymo priemonių vertinimui.

## Aktyvių deguonies radikalų sukeltas pelių SS modelis

ROS – chemiškai aktyvios deguonies molekulės. Jos prisideda prie SS vystymosi [4], nes aktyvinti odos fibroblastai spontaniškai gamina didelius ROS kiekius. Šis modelis sukeliamas naudojant chemines medžiagas, tokias kaip hipochloro rūgštis (HOCl), kurios kasdienės injekcijos lemia hidroksilo radikalų gamybą ir vietinį bei sisteminį poveikį [26]. Visas spektras žmogaus ligos požymių, tokių kaip fibrozė, uždegimas, autoimuniniai pokyčiai ir vaskulopatija, atsispindi hipochloro rūgšties sukeltame modelyje [23].

Kiti autoriai nurodo, kad ROS modelyje matoma odos ir plaučių fibrozė bei inkstų pažeidimas, uždegimas, autoimuniniai pokyčiai, gaminasi antitopo I antikūnai, tačiau nėra vaskulopatijos [26].

## Topoizomerazės-1 ir pilnojo Froindo adjuvanto sukeltas pelių sklerodermijos modelis

Prie naujesnių SS modelių priklauso topoizomerazės 1 (topo I) ir PFA-indukuotas pelių sklerodermijos modelis, sukeliamas žmogaus topo-I su PFA injekcijomis dukart per savaitę [12]. Matoma pelių odos ir plaučių fibrozė, padidėjusi IL-6, TGF- $\beta$ , IL-17 bei sumažėjusi IL-10 gamyba. Padidėja ir Th2 ir Th17 ląstelių kiekiai bronchoalveolinio lavažo skystyje [26]. Šis modelis pranašesnis tuo, kad yra panašus į difuzinę odos SS su vidaus organų pažeidimais. Matomi pokyčiai yra fibrozė, uždegimas, autoimunitetas, tačiau ir šiame modelyje nėra vaskulopatijos.

## Transgeniniai, spontaniniai ir pašalintų genų pelių sklerodermijos modeliai

Literatūroje aprašomi transgeninių ir pašalintų genų (angl. *knockout*) pelių sklerodermijos modeliai [27].

Transgeniniams modeliams priskiriamas DN TGF RII, kuriame naudojamos transgeninės DN TGF RII pelės, kurioms vystosi uždegimas ir fibrozė, tačiau nėra nei vaskulopatijos, nei autoimuniteto pokyčių, bei sąlyginis (angl. *conditional*) TGF RI, kuria-

me vyrauja fibroblastų apribota sąlyginė transgeninė TGF RI raiška ir kuris pasižymi vaskulopatija, uždegimu ir fibroze, tačiau autoimuninių pokyčių nėra [6].

Natūraliai atsirandantiems, arba spontaniniams, sklerodermijos modeliams priskiriami sustandėjusios odos (*tight skin* – Tsk1/+, Tsk2/+) pelių modeliai ir UCD-200, UCD-206 inbreditinių viščiukų veislės modeliai [6, 9, 13, 28].

Pagrindiniai pirmųjų dviejų modelių požymiai yra genų defektai ar mutacijos. Tsk1/+ modelyje nustatytos mutacijos gene, koduojančiame fibrilina-1, kuris lemia fibrozės vystymąsi, o pagrindiniai šio SS modelio patogenezės aspektai – tai kraujagyslių pažeidimas, autoimuniniai pokyčiai ir fibrogenėzė; taigi, šiame modelyje pokyčiai apsiriboja oda, būtent hipoderminio sluoksnio sustorėjimu [6]. Nėra jokios plaučių ar inkstų fibrozės bei vaskulopatijos ar uždegimo. Tsk1/+ pelėms būdingas kolageno skaidulų kaupimasis hipodermyje, dėl to progresuoja podžio storėjimas. Šioms pelėms nėra uždegiminių infiltratų, o pakitusi fibroblastų aktyvacija neišlaisvina uždegiminių mediatorių iš leukocitų, priešingai nei BLM indukuotos fibrozės modelyje. Vertinant Tsk1/+ ir BML sukeltos sisteminės sklerozės panašumus ir skirtumus, reikia pažymėti, kad Tsk1/+ pelių modelyje fibroblastai yra endogeniškai aktyvuojami, matoma padidėjusi kolageno gamyba ir išlaisvinimas, ši savybė išlieka ir išskirtose ląstelių kultūrose, persėjamosose net keletą kartų *in vitro*. BLM modelyje sukelta fibrozė būdinga ankstyvoms nuo uždegimo priklausantioms SS stadijoms [22].

Antrajame Tsk-2/+ modelyje yra nežinomas genetinis defektas, lemiantis audinių fibrozę su ankstyvais uždegiminių ląstelių infiltratais ir pagrindiniais patogenezės aspektais – uždegimu, autoimuniteto pokyčiais, fibrogenėze. Šiuo atveju irgi nėra jokios plaučių ar inkstų fibrozės bei vaskulopatijos vidaus organuose. Nors abu Tsk-1/+ ir Tsk-2/+ modeliai imituoja kai kuriuos SS požymius odoje ir podyje, nė vienas tiksliai neatspindi ligos [28]. Manoma, kad šie abu modeliai gali būti svarbūs analizuojant įvairius molekulinis ir fiziologinius procesus, sukeliančius audinių fibrozę, bei gilinant žinias apie fibrozės ir autoimuninių pokyčių sąveiką.

Spontaniniame inbreditinės viščiukų veislės sisteminės sklerodermijos modelyje ryškiai matomas kraujagyslių pažeidimas su uždegimu, autoimuniniais pokyčiais ir išplitusia fibroze. Reikia pažymėti, kad tik keletas mo-

delių, tokių kaip UCD-200 ir UCD-206 viščiukų modelis ar transgeninis Fra-2 pelių modelis, yra tinkami smulkių kraujagyslių vaskulopatijai tirti [9].

Tyrinėjant SS eigą, naudojamos pelės, kurioms pašalinti genai (angl. *knock-out* – KO pelės). Nustatyta, kad transkripcijos faktorius PPAR (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor*) yra svarbus kontroliuojant ląstelių diferenciaciją, o PPAR ligandai gali modifikuoti uždegimą ir fibrozinį procesus. Tiriant PPAR -KO peles ir peles be pašalinto PPAR geno, nustatyta, kad PPAR -KO pelės jautresnės BLM sukeliama odos fibrozei [29], taigi PPAR slopina fibrogenę.

Transkripcijos faktorius STAT-4 (angl. *signal transducer and activator of transcription-4*) neseniai identifiкуotas kaip genetiškai jautrus faktorius sergant SS. Jis pasižymi stipriu profibroziniu poveikiu, kontroliuojamas T ląstelių aktyvacija ir proliferacija bei citokinų išsilaisvinimu [30]. STAT-4 trūkumas (*stat4*<sup>-/-</sup>) apsaugo abiejų lyčių BALB/c peles nuo BLM sukeltos odos fibrozės. *Stat4*<sup>-/-</sup> pelėms odos sustorėjimas yra 65 % mažesnis negu *stat4*<sup>+/+</sup> pelėms. Mažesnės ir kolageno sankaupos, pažeistoje odoje yra sumažėjęs hidroksiprolino ir miofibroblastų kiekis, mažesnis uždegimas bei T ląstelių kiekis (CD4 ir CD8). *Stat4*<sup>-/-</sup> pelėms, paveiktoms BLM, mažesnis ir citokinų, susijusių su uždegimu ir fibroze, kiekis: 58 % mažiau IFN- $\gamma$ , 71 % – TNF- $\alpha$ , 50 % – IL-6, ir 63 % – IL-2. Tačiau, reikia pažymėti, kad STAT-4 stoka neturi reikšmingos įtakos fibrozei Tsk-1 pelių modelyje [30].

IL-6 pašalintų genų (IL6-KO) pelės. C57BL/6 pelėms su BLM sukelta sklerodermija yra padidėjusi IL-6 koncentracija ir daug stipresnė odos sklerozė nei IL-6KO pelėms [31].

Atskirai reikėtų aptarti CD19 deficitines peles. Nustatyta, kad odos ir plaučių fibrozė su autoantikūnų gamyba, hiperpergamaglobulinemija, padidėjusia serumo ir odos įvairių citokinų raiška (įskaitant fibrogeninį IL-4, IL-6 ir TGF- $\beta$  1 poveikį), kuri nustatoma laukinėms pelėms, buvo slopinama CD19 deficitinėms pelėms. BLM indukuotame sklerodermijos modelyje CD19 reguliuoja odos ir plaučių fibrozę per *Toll-like* receptoriaus veiklą. Nustatyta, kad esant CD19 trūkumui slopinama fibrozė ir antikūnų gamyba [19]. BLM padidina hialurono gamybą odoje, plaučiuose ir serume. Hialuronas bei *Toll-like4* receptoriaus aktyvumas stimuliuoja B ląsteles gaminti įvairius citokinus, o

esant CD19 trūkumui ši stimuliacija slopinama. Pažymėtina, kad reikalingos labai didelės BLM dozės norint sukelti plaučių fibrozę su ląsteliniiais infiltratais ir pažeista plaučių struktūra. Sistemine ligą šiame modelyje atspindi antinukleariniai antikūnai, pavyzdžiui, anti-Scl-70, anti-U1 RNP, ir antihistoniniai antikūnai [18, 19]. Taigi, naudojant tik dideles BLM dozes, CD19 trūkumą turinčių pelių vidaus organuose galima sukelti sisteminius autoimuninius bei fibrozės pokyčius, kurie būdingi sergant SS.

### **Eksperimentinių sisteminės sklerozės modelių taikymas gydymo tikslais**

Antifibrozinis vaistų poveikis ikiklinikiniuose fibrozės modeliuose skirtingas į tris įrodymo lygius (lygiai nuo C iki A) [24]. Vaistai, kurie apibūdinami akivaizdžiu C įrodymo lygiu, pasižymi antifibrozine savybėmis tik *in vitro* tyrimuose. Reikia pažymėti, kad teigiamas poveikis *in vitro* nebūtinai gali būti veiksmingas *in vivo*. Akivaizdus B įrodymo lygis – antifibrozinis efektas, kuris yra įvertinamas *in vivo*, naudojant gyvūnų SS modelius. Tačiau vaistai, priskiriami akivaizdžiam A įrodymo lygiui, privalo būti ištirti naudojant mažiausiai du gyvūnų modelius, atspindinčius skirtingus ligos aspektus. Geriausias atvejis, kai antifibrozinis poveikis įrodomas skirtingiems organams, kuriuose vyksta pokyčiai sergant SS, t. y. plaučiuose ir odoje, nes organų profibrozinių mechanizmai gali iš esmės skirtis.

BLM-indukuotas SS modelis gana plačiai taikomas ieškant veiksmingų gydymo priemonių. Kai gydymas nukreiptas prieš profibrozinį stimulią, vienas iš preparatų gali būti imatinibas, kuris yra maža tirozino kinazės inhibitoriaus molekulė, sugebanti selektyviai, dvejopai slopinti TGF $\beta$  ir PDGF kelius, mažinti eksperimentinę fibrozę. C3H/HeJ veislės pelių patelėms sukėlus lokalia odos fibrozę BLM injekcijomis ir gydant imatinibo mesilatu, kasdien jo sušvirkščiant po 50 mg/kg/d. ar 150 mg/kg/d. į pilvaplėvės sritį, nuslopinamas BLM indukuotos odos fibrozės progresavimas *in vivo* [32, 33]. Nurodoma, kad minėtas preparatas slopina ECM baltymų gamybą, nemažina metabolinio SS fibroblastų aktyvumo, nes nepasižymi toksiniu poveikiu fibroblastams, neslopina mikrokraujagyslinių endotelinių ląstelių proliferacijos, nesukelia apoptozės *in vitro* ir *in vivo* [33].

Tsk-1/+ ir DBA pelėms, kurioms 6 savaites buvo darytos BLM injekcijos po gydymo imatinibu per paskutines 3 savaites, odos sustorėjimas buvo reikšmingai mažesnis negu kontrolinėms pelėms, gavusioms BLM 3 savaites. Taigi, imatinibas ne tik užkerta kelią fibrozės vystymuisi, bet ir gali sukelti esamo fibrozinio pažeidimo regresiją [34].

Gydymas dasatinibu (3 ar 10 mg/kg) ir nilotinibu (12,5 ar 37,5 mg/kg) 100 l du kartus per dieną *per os* sumažina BLM sukeltą odos fibrozę C57BL/6 pelėms. Abu vaistai priklausomai nuo dozės mažina odos sustorėjimą (dasatinibas sumažina 37 % ir 64 %, o nilotinibas – 68 % ir 87 %), visiškai sustabdo miofibroblastų diferenciaciją (dasatinibas – 10 mg/kg, nilotinibas – 37,5 mg/kg koncentracijos), slopina kolageno proteino gamybą, nekeičia patsiausvyros tarp tarpląstelinio užpildo degraduojančių fermentų bei jų inhibitorių ir nesukelia ląstelių žūties fibroblastuose [35]. Be to, dasatinibas sumažina ECM baltymų mRNR kiekius, o nilotinibas – ECM baltymų gamybą.

Kadangi fibroblastų aktyvacija, nulemta TGF $\beta$ , yra vienas iš svarbiausių veiksnų SS patogenezėje, TGF $\beta$  veiklos blokvimas naudojant transkripcijos faktoriaus PPAR- receptorių (angl. *peroxisome proliferator-activated receptor*) galėtų būti nauja patologinės fibrogenės gydymo priemonė. Nustatyta, kad rosiglitazonas yra stipriausias farmakologinis PPAR- agonistas, kurio 5 mg/kg dozė slopina fibrozės vystymąsi pelių BLM sukeltame sklerodermijos modelyje [36].

Kitas preparatas rapamicinas slopina Tsk/+ pelių fibrozės vystymąsi, CD3+ ląstelių infiltraciją bei mažina citokinų (IL-4, IL-6, TGF 1, IL-17, IL-10) raišką pelių odoje, fibroblastų proliferaciją ir TGF 1 mRNR raišką fibroblastuose, slopina autoantikūnų gamybą [37]. Odos sustorėjimas ir plaučių fibrozė, sukelta BLM, po gydymo rapamicinu išnyko C57BL/6 pelėms, buvo slopinama leukocitų infiltracija odoje ir plaučiuose bei padidėjusi citokinų gamyba serume ir minėtuose audiniuose.

**Galimi sklerodermijos gydymo taikiniai modeliuose.** Kaip jau buvo minėta, viduląsteliniai signalo perdavikliai, kurie lemia fibroblastų aktyvaciją ir kitus profibrozinis atsakus, sukeliame TGF $\beta$  *in vitro*, yra Smad baltymai, atliekantys svarbų vaidmenį fibrozės patogenezėje. BLM sukelta pelių sklerodermija susijusi su greita ir ilgalaikė TGF $\beta$ /Smad signalinio kelio veikla odos fibroblastuose ir santy-

kinu Smad/7 trūkumu bei iš to išplaukiančiu vidulastelinės pusiausvyros tarp aktyvuojančių ir slopinančių Smad poryčių. Nustatyta, kad didelė Smad/7 raiška susilpnina TGF- atsakus ir užkerta kelią fibrozei *in vivo* [21]. Taigi, Smad baltymai yra svarbūs fibrozės patogenezėje ir gali būti selektyvių antifibrozinų intervencijų taikiniai.

Sergant SS TGF- reguliuoja ir selektyvų baltymo 1 aktyvklį (*activator protein 1* (AP-1)). Nustatyta, kad AP-1 slopiklis T-5224 selektyviai sumažina kolageno sintezę sergančiųjų SS fibroblastuose ir efektyviai užkerta kelią eksperimentinei odos fibrozei, sukeltai BLM. Gydant T5224 reikšmingai sumažėja odos sustorėjimas, hidrokspirolo kiekis, miofibroblastų skaičius pažeistoje odoje [38]. Taigi, AP-1 gali būti svarbus molekulinis taikynys gydant SS.

Nustatyta, kad adhezijos faktorius DNAM-1 yra kostimuliacinė molekule, kuri reikalinga visiškai T ląstelių aktyvacijai. Šios molekulės raiška ypač stipri SS sergančių pacientų pažeistoje odoje ir lemia fibrozės progresavimą. Eksperimentiniai tyrimai rodo, kad Dnam1-/- pelės yra apsaugomos nuo BLM sukeltos odos fibrozės: joms sumažėja odos sustorėjimas, hidrokspirolo kiekis, miofibroblastų skaičius, T ląstelių skaičius, pažeistoje odoje aptinkami mažesni TNF- ir IL-6 kiekiai [8]. Taigi, genų inaktyvacijos strategija rodo, kad DNAM-1 pasižymi fibrozei palankiu poveikiu, kontroliuodamas T ląstelių aktyvaciją ir citokinų išsilaisvinimą. DNAM-1 neutralizuojantys monokloniniai antikūnai (mAb) galėtų būti naujas, daug vilčių teikiantis SS gydymo būdas.

IL-6 receptoriui specifiniai monokloniniai antikūnai taip pat gali sumažinti sklerodermijos simptomus, slopindami fibroblastų aktyvaciją. Nustatyta, kad C57BL/6 pelėms, sergančioms BLM sukelta sklerodermija, yra padidėjusi IL-6 koncentracija ir daug stipresnė odos sklerozė nei IL-6KO pelėms [31].

**Nemedikamentinės gydymo perspektyvos: sklerodermija ir šviesos poveikis.** Mažos ultravioletinės (UVA1) fototerapijos dozės pažeidžia ląsteles *in vitro*, tačiau didelės UVA1 fototerapijos dozės pasižymi reikšmingu terapiniu poveikiu BALB/c pelių BLM sukeltame modelyje.

Ultravioletinė fototerapija 3 kartus per savaitę 10 savaičių laikotarpiu slopina fibrozę, kolageno sintezę, sukelia kolageno degradaciją, sužadina T ląstelių apoptozę [20]. Kitoje eksperimentinėje studijoje, tyrusioje nuo dozės priklausomą UVA1 spindulių poveikį BLM indukuotos sklerodermijos pelių modelyje, nustatyta, kad fototerapija pagerina odos elastingumą, sumažina dermos sluoksnio storį ir padidina CD34 raišką, kuri paprastai būna sumažėjusi sergant sklerodermija. Minėti pokyčiai ypač ryškūs didelių UVA1 dozių (100 J/cm<sup>2</sup>) grupėje [39].

## IŠVADOS

1. BLM sukeltas pelių sklerodermijos modelis neabejotinai atkartoja žmogaus SS būdingą odos sklerozę su visais uždegiminiais, fibroziniais ir autoimuninių pokyčių elementais, kurie būdingi ankstyvai, ypač nuo uždegimo priklausomai, ligos stadijai.
2. Tsk/+ pelių modelis, kuris išsivysto dėl tam tikrų genų defektų, atspindi fibrozines bei vėlyvesnes ir mažiau nuo uždegimo priklausomas SS stadijas.
3. Tsk/+ ir BLM sukeltos pelių SS modeliai atkartoja autoimuninius ir (ar) fibrozinus SS požymius, tačiau juose nėra kraujagyslių pažeidimų, jokios periferinės vaskulopatijos ir angiogenezės.
4. Hipochloro rūgšties sukeltame modelyje išryškėja visas spektras žmogaus SS požymių (fibrozė, uždegimas, autoimunetas ir vaskulopatija).
5. Smulkiųjų kraujagyslių pažeidimui sergant SS tirti gali būti naudojami inbrendinių viščių veislių UCD-200 ir UCD-206 ir transgeniniai Fra-2 pelių modeliai.
6. Eksperimentinių SS modelių pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslo. Vaistai, priskiriami akivaizdžiam A įrodymo lygiui, privalo būti ištirti naudojant mažiausiai du gyvūnų modelius, atspindinčius skirtingus ligos aspektus, o geriausias atvejis, kai gydymasis poveikis nustatomas skirtingiems organams, kurie pažeidžiami sergant SS. ◆

Gauta: 2014 11 24  
Priimta spaudai: 2014 12 30

## Summary

### ANIMAL MODELS OF SCLERODERMA AND THEIR APPLICATION FACILITIES

**Diana Karpec, Laima Leonavičienė, Rūta Bradūnaitė, Algirdas Venalis, Gailutė Kirdaitė**

Relevant animal models are essential tools to investigate in depth the pathogenesis of systemic sclerosis and search of new therapeutic interventions. Several models of scleroderma are currently available but, unfortunately, none of these reflects all features of the human disease. Some of these models present inflammation followed by fibrosis, whether some others primarily mimic autonomous fibroblast activation. Only few models are available and suitable to study small vessels vasculopathy. Hence, we provide an overview of the most important models of systemic sclerosis. There are bleomycin-, hypochlorous acid-, vinyl chloride-, topoisomerase I and complete Freund's adjuvant-induced systemic sclerosis models, sclerodermatous chronic graft-versus-host mice disease model, with prevailing features of inflammation, autoimmunity and fibrosis. Recently three new inducible animal models have been revealed: reactive oxygen species-, angiotensin II- and topoisomerase I and complete Freund's adjuvant-induced scleroderma models. Transgenic, spontaneous, and knockout gene mice models of scleroderma also widely used. Only some models such as UCD-200 and UCD-206 chickens model, or Fra-2 mice model are relevant for investigation of small vascular damage. The choice of experimental model of systemic sclerosis depends on the aim of investigation. Drugs that fulfil evidence level A should be tested in at least two of the animal models mentioned earlier addressing different aspects of the disease. Moreover, the therapeutic effect should be shown in different organs involved in systemic sclerosis. In this article we discuss about widely used animal models of systemic sclerosis and its application facilities for the search of therapeutic tools.

**Keywords:** systemic sclerosis, experimental animals, models of scleroderma.



## LITERATŪRA

1. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009; 360(19): 1989–2003.
2. Yamamoto T, Katayama I. Vascular changes in bleomycin-induced scleroderma. *Int J Rheumatol* 2011; 2011: 270938.
3. 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.
4. 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): 329–37.
5. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol* 2009; 182(9): 5855–64.
6. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 557–66.
7. Wu M, Varga J. In perspective: murine models of scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2008; 10(3): 173–82.
8. Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2013; 23–8.
9. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum* 2010; 62(10): 2831–44.
10. Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol* 2005; 14(2): 81–95.
11. 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.
12. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum* 2011; 63(11): 3575–85.
13. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005; 26(11): 587–95.
14. Christner PJ, Artlett CM, Conway RF, Jiménez SA. Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11): 2598–605.
15. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010; 37(1): 26–41.
16. Yamamoto T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res* 2006; 297(8): 333–44.
17. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000; 292(11): 535–41.
18. Ishikawa H, Takeda K, Okamoto A, Matsuo S, Isobe K. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol* 2009; 129(7): 1688–95.
19. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, et al. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* 2008; 172(6): 1650–63.
20. Ju M, Chen K, Chang B, Gu H. UVA1 irradiation inhibits fibroblast proliferation and alleviates pathological changes of scleroderma in a mouse model. *J Biomed Res* 2012; 26(2): 135–42.
21. Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Yamamoto T, Nishioka K, Varga J. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 2003; 121(1): 41–50.
22. Avouac J. Mouse model of experimental dermal fibrosis: the bleomycin-induced dermal fibrosis. *Methods Mol Biol* 2014; 1142: 91–8.
23. Batteux F, Kavian N, Servettaz A. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23(6): 511–8.
24. Distler JH, Distler O. Criteria to select molecular targets for anti-fibrotic therapy. *Rheumatology* 2008; 47(Suppl 5): v12–3.
25. Stawski L, Han R, Bujor AM, Trojanowska M. Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(4): R194.
26. Asano Y, Sato S. Animal models of scleroderma: current state and recent development. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15(12): 382.
27. Derrett-Smith EC, Denton CP, Sonnyal S. Animal models of scleroderma: lessons from transgenic and knockout mice. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21(6): 630–5.
28. Gentiletti J, McCloskey LJ, Arlett CM, Peters J, Jimenez SA, Christner PJ. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol* 2005; 175: 2418–26.
29. Kapoor M, McCann M, Liu S, Huh K, Denton CP, Abraham DJ, et al. Loss of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mouse fibroblasts results in increased susceptibility to bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(9): 2822–9.
30. Avouac J, Fürnrohr BG, Tomcik M, Palumbo K, Zerr P, Horn A, et al. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011; 63(3): 800–9.
31. Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol* 2012; 80(1): 165–76.
32. Distler JH, Jüngel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, et al. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(1): 311–22.
33. Venalis P, Maurer B, Akhmetshina A, Busch N, Dees C, Stürzl M, et al. Lack of inhibitory effects of the anti-fibrotic drug imatinib on endothelial cell functions *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Mol Med* 2009; 13(10): 4185–91.
34. Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G, et al. Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(1): 219–24.
35. Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, Maurer B, Axmann R, Jüngel A, et al. Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. *FASEB J* 2008; 22(7): 2214–22.
36. Wu M, Melichian DS, Chang E, Warner-Blankenship M, Ghosh AK, Varga J. Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Am J Pathol* 2009; 174(2): 519–33.
37. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(8): 2476–87.
38. Avouac J, Palumbo K, Tomcik M, Zerr P, Dees C, Horn A, et al. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(5): 1642–52.
39. Ju Mei, Chen Kun, Chang Bao-zhu, Gu Heng. Effects of different doses of UVA1 irradiation on the expressions of CD34 and M30 in skin homogenate from a mouse model of scleroderma. *Chinese Journal of Dermatology* 2011; 44(3): 178–81.