

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Paulius Venalis

ANTIFIBROZINIŲ PRIEMONIŲ PAIEŠKA PREKLINIKINIUOSE
SYSTEMINĖS SKLEROZĖS MODELIUOSE

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07B)

Vilnius – 2010

Disertacija rengta 2008 – 2010 metais Vilniaus Universiteto Reumatologijos, traumatologijos-ortopedijos ir rekonstrukcinės chirurgijos klinikoje.

Laboratorinė disertacijos dalis atlikta Erlangeno-Niurnbergo Universitete, būnant mokslinės ARTICULUM programos dalyviu.

Darbo vadovas:

Prof. dr. Jolanta Dadonienė (Vilniaus Universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B).

Konsultrantas:

Dr. Jörg Distler (Erlangeno-Niurnbergo Universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B).

1. Tekste vartojamų trumpinių sąrašas

Bleo – bleomicinas

CD – diferenciacijos grupė (*cluster of differentiation*)

cDNR – komplementari DNR

dsDNR – dvispiralė DNR

dUTP – 2'-deoksiuridino 5'-trifosfatas

COL1A1 – kolagenas 1 A1

COL1A2 – kolagenas 1 A2

C_t – ciklo slenkstis (*cycle threshold*)

CTGF – jungiamojo audinio augimo faktorius (*connective tissue growth factor*)

DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle terpė (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO – Dimetilsulfoksidas

EL – endotelio ląstelės

ELM – ekstraląstelinis matriksas

Et-1 – endotelinas-1

FCS – embrioninio galvijų serumas (*fetal calf serum*)

FGF – fibroblastų augimo faktorius (*fibroblast growth factor*)

Fra-2 – su Fos susijęs antigenas 2 (*Fos-related antigen-2*)

HLA – žmogaus leukocitų antigenas (*human leukocyte antigen*)

HMEC-1 – žmogaus mikrovaskulinės endotelio ląstelės – 1

ICAM-1 – tarpląstelinė adhezijos molekulė 1 (*Intercellular adhesion molecule1*)

IL – interleukinas

IM – imatinibo mezilatas

MMP – matrikso metaloproteinazės

MTT - 3, (4,5-dimethyl thiazolyl -2) 2,5-diphenil-tetrazoliumo bromidas

NO – azoto oksidas

nonRT PGR – polimerazės grandžių reakcija be atvirkštinės transkriptazės (*non reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

PDGF – trombocitų išskirtas augimo faktorius (*Platelet derived growth factor*)

PDGFr – PDGF receptorius

PGR – polimerazės grandžių reakcija

PI – propidiumo jodidas

RA – reumatoidinis artritas

SD – standartinis nuokypis

SSc – sisteminė sklerozė

sSS – antrinis Sjögreno sindromas

sSS+RA - antrinis Sjögreno sindromas esant RA

TdT – galine deoksinukleotidiltransferazė (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*)

TGF-β – transformuojantis augimo faktorius beta

TGFβRII – TGF-β receptorius II

TNFα – naviko nekrozės faktorius alfa

Tsk-1 – storos odos mutacija 1 (*tight skin 1*)

TUNEL – galinės deoksinukleotidiltransferazės dUTP liekanos galo žymėjimas (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

VCAM-1 – kraujagyslinė ląstelių adhezijos molekulė (*vascular cell adhesion molecule*)

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo faktorius

VEGFr – VEGF receptorius

αSMA – lygiųjų raumenų alfa aktinas

TURINYS

1. Tekste vartojamų trumpinių sąrašas	3
2. ĮVADAS.....	7
3. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
4. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
4.1 Sisteminė sklerozė.....	12
4.1.1 Endotelio pažeidimas.....	13
4.1.2 Angiogenezė.....	15
4.1.3 Autoimunitetas.....	19
4.1.4 Fibrogenezė.....	20
4.2 Imatinibo mezilatas.....	28
5. METODAI.....	26
5.1 Bendrieji metodai <i>in vivo</i>	27
5.1.1 Eksperimentinis bleomicino sukeltos odos fibrozės modelis.....	27
5.1.2 Eksperimentinis bleomicino sukeltos <i>suformuotos</i> odos fibrozės modelis.....	30
5.1.3 Tsk-1 mutacijos odos fibrozės modelis.....	32
5.1.4 Preparatų paruošimas.....	34
5.2 Apoptozės eksperimentai <i>in vivo</i>.....	34
5.3 Fibrozės analizės eksperimentai <i>in vivo</i>.....	35
5.3.1 Histologinė odos/paodžio storio analizė.....	35
5.3.2 Miofibroblastų nustatymas imunohistochemijos metodu.....	36
5.4. Bendrieji metodai <i>in vitro</i>.....	37
5.4.1 Ląstelių kultūra.....	37
5.4.2 Inkubacija su Imatinibo mezilatu.....	37
5.5. Endotelio Bazinių funkcijų eksperimentai <i>in vitro</i>.....	38
5.5.1.1 Kaspazės-3 aktyvumo eksperimentas.....	38
5.5.1.2 Apoptotinių endotelio ląstelių, dažytų aneksinu V, kiekio skaičiavimas.....	38
5.5.2.1 Proliferacijos kreivių generavimas.....	39
5.5.2.2 MTT eksperimentas.....	40
5.5.3. Aktyvacijos ir pažeidimo žymenų nustatymas realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu.....	41

5. 6. Angiogenezės etapų eksperimentai <i>in vitro</i>.....	44
5.6.1. Proliferacijos eksperimentas.....	44
5.6.2.1. „Brėžio“ eksperimentas.....	44
5.6.2.2. Chemotaksio eksperimentas.....	45
5.6.3. <i>In vitro</i> kapiliarų morfogenezės eksperimentas.....	46
5.7. Statistika.....	47
6. REZULTATAI.....	48
6.1. Imatinibo mezilato poveikis bleomicino sukeltos suformuotos fibrozės modeliui.....	49
6.2. Imatinibo mezilato poveikis Tsk-1 mutacijos odos fibrozės modeliui.....	55
6.3. Imatinibo mezilato poveikis bazinėms endotelio funkcijoms.....	63
6.3.1 Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelių apoptozei <i>in vitro</i> ...	63
6.3.2. Imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių gyvybingumui.....	66
6.3.3. Imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių aktyvacijos bei pažeidimo žymenų sintezei.....	71
6.4. Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelių apoptozei eksperimentinės odos fibrozės modelyje <i>in vivo</i>.....	74
6.5. Imatinibo mezilato įtaka angiogenezės etapams.....	76
6.5.1 Imatinibo mezilato įtaka endotelio proliferacijai.....	76
6.5.2. Imatinibo mezilato įtaka endotelio migracijai.....	76
6.5.3. Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelėms <i>in vitro</i> kapiliarų morfogenezės eksperimente.....	80
7. REZULTATŲ APTARIMAS	85
8. IŠVADOS	99
9. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	100
10. LITERATŪROS SĄRAŠAS	102

2. Jvadas

Sisteminė sklerozė (SSc) – viena sunkiausių ir fatališkiausių autoimuninių sisteminių reumatinių ligų. Didelei daliai ligonių sisteminė sklerozė pasireiškia progresuojančia odos, plaučių, inkstų, širdies, virškinamojo trakto fibroze. SSc patogenezėje galima išskirti tris svarbiausius, tarpusavyje susijusius komponentus: autoimuninį uždegimą, fibrozę ir vaskulopatiją.

Autoimuninio uždegimo požymiai SSc eigoje dažniausiai būna mažai išreikšti. Juos bent kiek patikimiau galima užfiksuoti tik ankstyvose SSc stadijose, kuomet klinikinis ligos vaizdas dar nesusiformavęs ir patikimai nustatyti SSc diagnozę yra praktiškai neįmanoma. Turbūt todėl kontroliuoti ligos eigą tradicinėmis autoimuninių ligų gydymo priemonėmis – steroidiniais hormonais ir imunosupresantais – daugeliu atvejų nepavyksta. Gydant kitas autoimunines reumatines ligas – reumatoidinį artritą, ankilozinį spondilitą, psoriazinį artritą, kai kuriuos vaskulitus pastaraisiais metais pasiekta esminė pažanga, tuo tarpu apie SSc to negalima pasakyti. Klinikinėje praktikoje biologinė terapija – anticitokinai, prouždegiminių citokinų receptorių blokatoriai, monokloniniai antikūnai prieš CD20 ir kt. – daugeliu atvejų leidžia efektyviai slopinti autoimuninį procesą. Deja, šie vaistai SSc gydyti nepritaikyti. Tai turbūt dar kartą patvirtina, kad klasikiniai uždegimo mediatoriai, būdingi kitoms sisteminiams reumatiniams ligoms, SSc metu atlieka tik antraeilį vaidmenį.

Kur kas didesnis vaidmuo SSc klinikoje ir patogenezėje tenka vaskulopatijai bei progresuojančiai fibrozei.

Būtent kraujagyslių sienelių peraugimas jungiamuoju audiniu ir todėl atsiradęs spindžio susiaurėjimas sąlygoja kraujagyslines komplikacijas (plautinė hipertenzija, inkstinė krizė, bei daugelio audinių išemiją). Išemija atgalinio ryšio principu stimuliuoja fibrozės procesą. Susidaro ydingas ratas,

kurį labai sunku paveikti net naujausios terapijos priemonėmis. Tai lemia ligos fatališkumą ir blogą prognozę. Todėl ieškant terapinių sprendimų ir toliau būtina gilintis į ląstelinius ir molekulinis fibrozės veiksnis bei ieškoti specifinių priemonių šiam procesui stabdyti.

Jau gana seniai žinoma, jog už fibrogenezės procesą atsakingi aktyvuoti miofibroblastai, o citokinai – transformuojantis augimo faktorius beta (TGF- β) ir iš trombocitų kilęs augimo faktorius (PDGF) – atlieka svarbiausius vaidmenis šiame procese. Nors TGF- β laikomas pagrindinį vaidmenį fibrogenezės procese atliekančiu citokinu, PDGF gebėjimas aktyvuoti fibroblastus ir inicijuoti kolageno sintezę yra ne ką mažesnis. Būta bandymų blokuoti TGF- β monokloniniais antikūnais ar tirpiaisiais receptoriais, deja, bet klinikinius SSc pacientų tyrimus, laukto antifibrotinio efekto negauta.

Pastaruoju metu į onkologinę praktiką buvo įdiegti tirozinkinazių inhibitoriai, tarp jų ir imatinibo mezilatas (IM). Pastebėtas IM gebėjimas blokuoti ne tik patologinės, Filadelfijos chromosomos sąlygotos kinazės, bet ir nepatologinių tirozinkinazių aktyvumą.

TGF- β intraląstelinis signalas ląstelėje, nuo receptoriaus iki kolageno sintezę inicijuojančių transkripcijos faktorių, perduodamas proteinkinazių dėka, o centrinį vaidmenį atlieka Abelsono kinazė (c-Abl). Į c-Abl panaši kinazė yra ir PDGF receptoriaus sudedamoji dalis. Neseniai tapo žinoma, kad imatinibas gana selektyviai blokuoja c-Abl kinazę. Taigi buvo galima daryti prielaidą, kad imatinibas, slopindamas c-Abl, slopins ir TGF- β bei PDGF signalo perdavimą fibroblastuose, taip pat fibrozės procesą. JH Distler et al pavyko įrodyti, kad imatinibas slopino kolageno sintezę fibroblastų kultūrose, bei sąlygojo fibrozės prevenciją SSc pelių modelyje. Taigi TGF- β ir PDGF intraląstelinio signalo slopinimo fibroblastuose idėja pasiteisino, tačiau iki klinikinių studijų fazės reikėjo išspręsti dar daugelį, praktiškai svarbių klausimų.

Fibrozės prevencija aktuali tik ankstyvoje SSc stadijoje tiems pacientams, kurių ligos eiga agresyvi, vyksta aktyvi ekstraląstelinio matrikso (ELM) akumuliacija audiniuose ir vystosi įvairių organų fibrozė. Tačiau klinikinėje praktikoje SSc pacientai į reumatologo akiratį patenka ne pradiniuose ligos etapuose, kai fibrozės procesas tik prasideda. Dažniausiai audinių ir kai kurių organų fibrozė būna šiek tiek išreikšta. Tuo atveju klinicistui iškyla užduotis ne tik sustabdyti tolesnį jungiamojo audinio išbujojimą, bet ir siekti fibrozės regresavimo. Gydymas turėtų panaikinti egzistuojančią fibrozę bei galimai sumažinti organų disfunkciją. Tai yra labai svarbus reumatologijos uždavinys. Buvo neaišku, ar jį galima pasiekti į praktiką įdiegus imatinibą. Todėl mums buvo svarbu išsiaiškinti, ar imatinibas gali turėti įtakos jau susiformavusiai fibrozei.

Esminių abejonių kilo ir dėl to, kad imatinibo mezilato sąlygotas TGF- β ir PDGF intraląstelinio signalo slopinimas nėra specifinis fibrogenezei, nei fibroblastams. Žinoma, kad TGF- β ir PDGF yra multipotentiniai, daugelį ląstelių veikiantys citokinai. Tai reiškia, jog imatinibas galėtų blokuoti TGF- β ir PDGF vaidmenį ne tik fibrogenezėje, bet ir angiogenezėje, ne tik fibroblastuose, bet ir endotelio ląstelėse.

Neoangiogenezės slopinimas onkologijoje gali turėti svarbią teigiamą reikšmę, bet sisteminės sklerozės atveju tie patys procesai gali reikšti vaskulopatijos – vieno svarbiausių patogenezės veiksnių gilėjimą ir taip riboti daug žadančio fibrozės inhibitoriaus Imatinibo mezilato naudojimą gydant SSc.

Mums atrodė labai svarbu įvertinti imatinibo mezilato įtaką susiformavusiai fibrozei bei patikrinti, ar antifibrozinis IM efektyvumas nėra lydimas proangiogenetinių ir bazinių endotelio funkcijų slopinimo.

3. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tikslas

Įvertinti imatinibo mezilato poveikį fibrozės procesui ir endoteliui sisteminės sklerozės eksperimentiniuose modeliuose ir ląstelių kultūrose.

Uždaviniai

1. Įvertinti imatinibo efektyvumą neuždegiminiame SSc modelyje ir patikrinti imatinibo mezilato efektyvumą gydant *suformuotą* fibrozę.
2. Iširti, ar terapinės imatinibo mezilato koncentracijos daro neigiamą poveikį gyvybinėms endotelio funkcijoms in vitro ir in vivo.
3. Įvertinti imatinibo mezilato poveikį angiogenezės etapams in vitro

Ginamieji teiginiai

1. Terapinės imatinibo mezilato koncentracijos daro priešfibrotinį poveikį Tsk-1 ir bleomicino sukeltos, suformuotos fibrozės modelio pelėms.
2. Terapinės imatinibo mezilato koncentracijos nedaro neigiamo poveikio nei endotelio gyvybingumui, nei angiogenezei.

Mokslinis naujumas

1. Pirmą kartą buvo įrodyta, kad IM ne tik slopina fibrozės formavimąsi, bet ir sąlygoja jau susiformavusios fibrozės regresiją.
2. Buvo gauti moksliniai įrodymai, leidžiantys teigti, kad IM nedaro neigiamo poveikio nei bazinėms, nei proangiogenetinėms endotelio funkcijoms.

Praktinė nauda

Atlikti tyrimai yra būtinas etapas prieš pradėdant IM kliniškes studijas. Jeigu šis vaistas bus vartojamas reumatologijos kliniškinėje praktikoje, tai bus svarbus žingsnis sprendžiant labai sudėtingas SSc gydymo problemas. Baigiant rašyti disertaciją mus pasiekė žinia, kad mūsų atliktų projektų pagrindu, pradėtos net kelios kliniškinės studijos, skirtos IM efektyvumo ir toksiškumo tyrimams, gydant SSc.

Net jeigu dėl kurių nors priežasčių (pvz. didelio toksiškumo) IM nebūtų įdiegtas į kliniką, mūsų tyrimas sukuria teorines prielaidas ieškoti kitų, dvigubu poveikiu (TGF- β ir PDGF) pasižyminčių, intraląstelines kinazes slopinančių, preparatų.

Darbo rezultatai buvo pristatyti šešiose mokslinėse konferencijose. Skaityti trys žodiniai pranešimai. Pristatyti du stendiniai pranešimai.

Disertacijos tema parengti 6 moksliniai straipsniai, iš kurių 5 paskelbti žurnaluose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) duomenų bazę *Web of Science*.

4. LITERATŪROS APŽVALGA

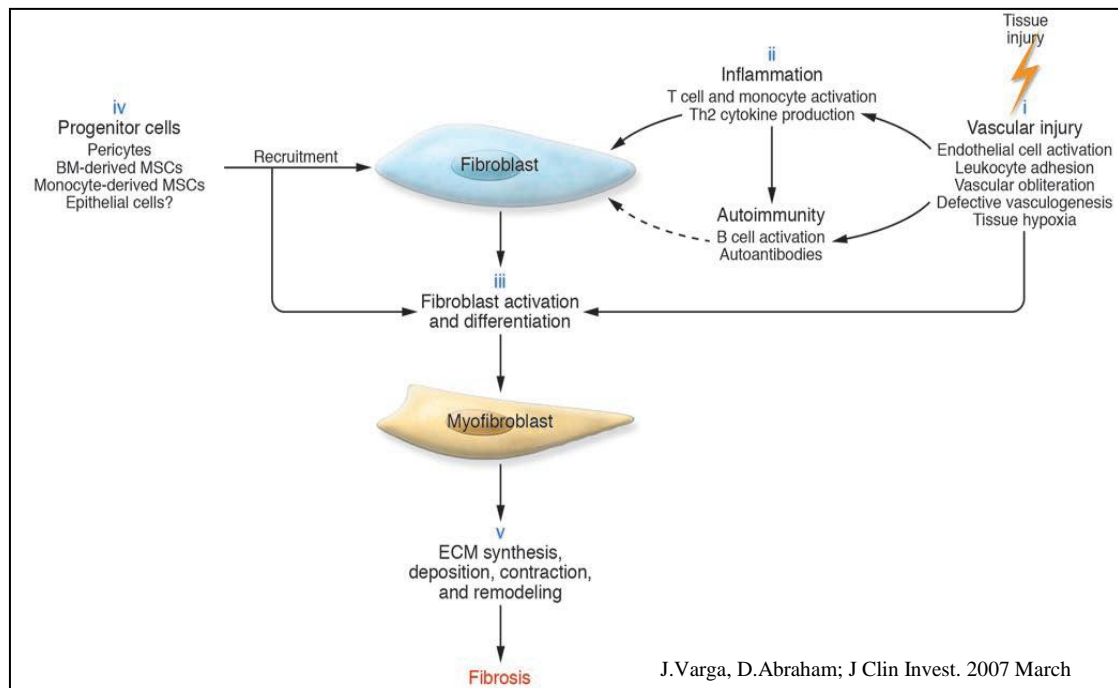
4.1 Sistemine skleroze

Sistemine skleroze (SSc) – viena iš sudėtingiausių sisteminių jungiamojo audinio ligų, pažeidžianti daugelį organų sistemų. SSc apibūdina trys patogenezės grandys (autoimuninis uždegimas, endotelio pažeidimas, lydimas vaskulopatijos, bei progresuojanti audinių fibrozė). Kliniškai stebimas daugelio organų ir sistemų pažeidimas (odos fibrozė, plaučių hipertenzija, inkstų krizės, širdies fibrozė, mikro- ir makrovaskulopatijos). SSc yra sąlyginai reta liga. SSc paplitimas siekia 0,01 %, t. y. 1 atv. 10 000 gyv. Lietuvoje pacientų, sergančių SSc, yra apie 200. Tai – tik sunkesnės eigos SS. Kai kurios ribotos SS formos gali būti lengvos eigos ir joms nebūtinai reikalingas gydymas, todėl tikrasis SS paplitimas nėra žinomas. Kitose pasaulio šalyse SSc paplitimas yra kiek didesnis. Manoma, kad JAV paplitimas yra apie 2,4 atv. 10 000 gyv.¹ Liga dažniau pasireiškia moterims nei vyrams (4,6:1), juodaodžiams nei baltaodžiams (1,4:1). Vidutinis išgyvenamumas yra apie 11 metų. Pastarųjų metų studijos rodo, kad išgyvenamumas nuo diagnozės nustatymo yra 78 % – 5 metai, 55 % – 10 metų, 37 % – 15 metų, 27 % – 20 metų. Nors inkstų pažeidimas yra viena iš svarbiausių ankstyvo mirtingumo priežasčių, tačiau plaučių hipertenzija yra atsakinga už daugumą letalių baigčių.²

Nors gydant sistemine skleroze pasiekta tam tikra pažanga, tačiau bazinių vaistų stygius, palyginti su kitomis reumatologijos sritimis, itin didelis.

4.1.1. Endotelio pažeidimas

Sisteminės sklerozės patogenezė aprėpia obliteruojančią vaskulopatiją, uždegimą, autoimuninį procesą bei progresuojančią fibrozę. Supaprastinta patogenezės schema pavaizduota 1 paveiksle.



1 pav. Sisteminės sklerozės patogenezės schema: kraujagyslių pažeidimas ir autoimuninis procesas veda prie fibrogenzės. SSc patogenezę inicijuoja kapiliarų pažeidimas (i). Tai skatina uždegimą ir autoimuninį procesą(ii), kuris daro tiesioginį ir netiesioginį poveikį fibroblastų aktyvacijai, esminiam įvykiui fibrozės vystymesi (iii), miofibroblastų skaičius padidėja ir dėl jų pirmtakų migracijos, ir dėl *in situ* diferenciacijos(iv). Aktyvuoti fibroblastai – miofibroblastai pažeistame audinyje atlieka dugelį funkcijų vedančių prie fibrozės(v). MSC – mezenchiminės kaimienės ląstelės.

Kraujagyslių pažeidimas ir endotelio aktyvacija yra anksčiausias ir galbūt pirminis įvykis sklerodermos patogenezėje.³

Histopatologiniai kraujagyslių pažeidimo požymiai stebimi prieš atsirandant fibrozei ar vienam iš pirmųjų klinikinių požymių – Raynoud fenomenui. Kitos su skleroderma susijusios vaskulopatijos išraiškos yra odos teleangiektazijos, nagų volelio kapiliaroskopijos radiniai, plautčių arterinė

hipertenzija, skleroderminio inksto krizės.⁴ Vėlesnėse sklerodermos stadijose stebimas ryškus mikrovaskulatūros nepakankamumas pažeistoje odoje ir vidaus organuose. Kas atsakingas už pirminį endotelio pažeidimą, tiksliai nėra žinoma. Egzistuoja keletas, įrodymais pagrįstų, teorijų. Endotelio ląstelių pažeidimas gali būti sąlygotas granzimų, endoteliui specifinių antikūnų, virusinės infekcijos, uždegiminių citokinių, išemijos/reperfuzijos sąlygotų deguonies radikalų.²

Endotelio pažeidimas sukelia seką procesų, kurie veda prie sisteminės sklerozės patogenezės proceso iniciacijos. Pažeidimas sukelia endotelio aktyvaciją ir disfunkciją, kuri pasireiškia padidėjusiu kapiliarų pralaidumu, padidėjusia kraujagyslinės ląstelių adhezijos molekulės-1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulės-1 (ICAM-1) ekspresija, padidėjusia vazoaktyviųjų mediatorių sekrecija, apoptoze^{5,6}. Aktyvuotos endotelio ląstelės sintetina ir atpalaiduoja endotelino-1, aktyvų vazokanstriktorių, kuris didina leukocitų adheziją, kraujagyslių lygiųjų raumenų proliferaciją, fibroblastų aktyvaciją. Padidėjusi endotelino-1 koncentracija yra randama SSc pacientų tiek kraujo plazmoje, tiek bronchoalveoliniame lavaže^{7,8}.

Egzistuoja ir kiti endotelio pažeidimo svarbos SSc patogenezėje įrodymai - Kalifornijos universitete atlikti tyrimai su Davis-200 linijos (UCD-200) viščiukais parodė, kad šiame eksperimentiniame modelyje endotelio ląstelių apoptozė įvyksta anksčiau, nei atsiranda perivaskulinė infiltracija ar ELM akumuliacija.⁹ Šie radiniai patvirtinti ir eksperimentiniame modelyje, ir SSc pacientų odos biopsijose. Autoantikūniai prieš EC taip pat turi svarbų vaidmenį SSc patogenezėje. Jų Padidėjusios koncentracijos randamos tiek UCD-200, tiek SSc pacientų serume.

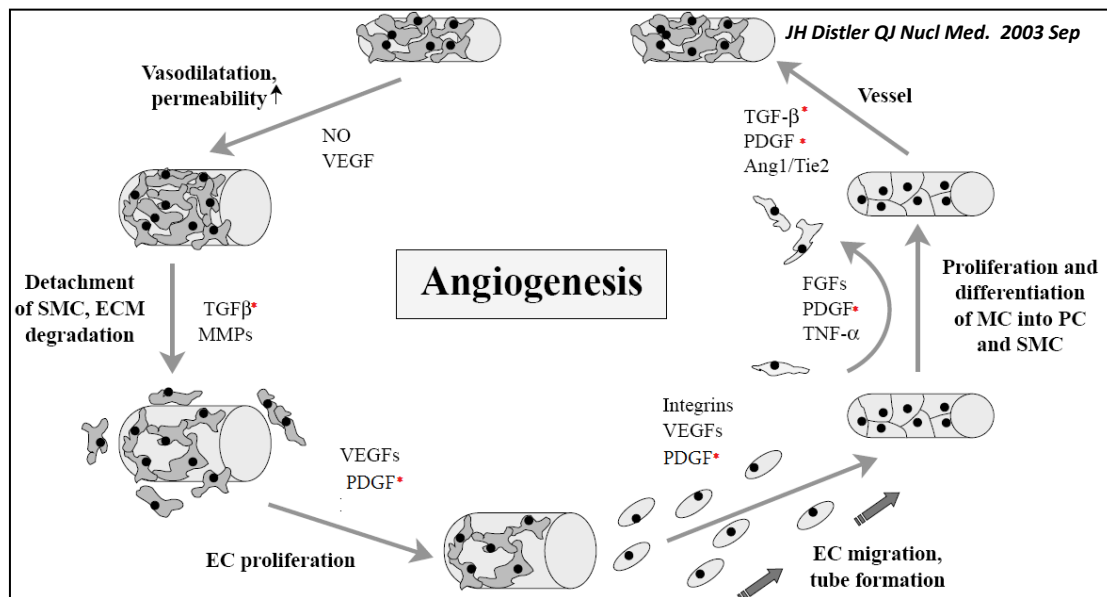
Dėl endotelio bei mikrovaskulatūros pažeidimo persitvarko kraujagyslės: intima ir medija išvešėja bei adventicijos fibrozuoja, o tai sąlygoja progresuojantį spindžio siaurėjimą ir obliteraciją.¹⁰ Obliteracija bei

suintensyvėjusi endotelio ląstelių apoptozė veda prie ryškaus kraujagyslių netekimo, stebimo vėlyvos sklerodermos pacientų angiogramose. Kraujagyslių netekimas sąlygoja audinių hipoksiją bei sekančią labai ryškią VEGF ir VEGFr ekspresiją.^{11,12} Paradoksas yra tai, kad nepaisant stipriausių proangiogeninių veiksnių (hipoksijos ir VEGF), sklerodermai būdingas angiogenezės neefektyvumas bei progresuojantis kraujagyslių netekimas. Vaskulogenezės nepakankamumas gali būti sąlygotas ir iš kaulų čiulpų kilusių CD34+ cirkuliuojančių progenitorinių ląstelių kiekio sumažėjimo bei sutrikusios jų diferenciacijos į subrendusius endotelioцитus.^{13,14}

4.1.2. Angiogenezė

Angiogenezė – naujos kraujagyslės formavimasis, atsišakojimas nuo jau egzistuojančios kraujagyslės. Tai svarbus bei sudėtingas procesas, reikalaujantis koordinuotos įvairių ląstelių bei gausybės citokinų veiklos (2 pav.).

Angiogenezė – pakopinis procesas. Pagrindiniai angiogenezės etapai: a) vazodilatacija ir kraujagyslės sienelės laidumo padidėjimas, kraujagyslės bazinės membranos degradacija, b) endotelio ląstelių proliferacija, c) endotelio migracija, d) tubulių bei spindžio formavimas ir naujos kraujagyslės stabilizavimas.



2 pav. Pirmas angienezės žingsnis yra vazodilatacija ir padidėjęs endotelio laidumas bei padidėjusi didelės molekulinės masės plazmos baltymų, tokių kaip fibrinogenas, eksudacija. Po kraujagyslės lygiųjų raumenų ląstelių atsiskyrimo (atsikabinimas), vyksta sienelės destabilizacija bei perivaskulinio jungiamojo audinio degradacija. Tai leidžia pasidauginusioms endotelio ląstelėms migruoti pagal chemoatraktantų gradientą į hipovaskuliarizuotą sritį. Ten endotelio ląstelės tarpusavyje sąveikauja ir formuoja tubules – kraujagyslės pirmtakus. Galiausiai mezenchiminės ląstelės diferencijuojasi į lygiųjų raumenų ląsteles ar pericitus, šios ląstelės apsupa endotelioцитus ir stabilizuoja naujai suformuotą kraujagyslę.

Pirmas angienezės žingsnis yra kraujagyslės vazodilatacija. Šiame procese svarbiausią vaidmenį atlieka VEGF ir NO .¹⁵ VEGF aktyvina NO sintazę, padaugėjus intraląstelinio NO lygieji raumenys atsipalaiduoja, o tai leidžia kraujagyslei išsiplėsti. Kita VEGF funkcija – didinti endotelio ląstelių pralaidumą. Tai vyksta dėl vesico-vakuolinių organelių sintezės. Keletas tokių vesico-vakuolinių organelių jungiasi į vieną ir formuoja kanalėlį, jungiantį endotelio ląstelės luminalinę ir abluminalinę plazminę membranas. Per susidariusį kanalėlį vyksta plazmos baltymų ekstravazacija. Dalinai ekstravazacija vyksta ir per tarpendotelines jungtis.¹⁶

Prieš formuojantis naujai kraujagyslės atšakai, sienelės ląstelės turi būti pašalintos, bazinė membrana suskaidyta, perivaskulinė stroma remodeliuota. Dalyvauja angiopoetinas-2 ir keletas proteazių, įskaitant plazminogeno aktyvatorius, chimazės¹⁷, matrikso metalo proteinazės (MMP).¹⁸ Tik suskaidžius bazinę membraną ir perivaskulinį jungiamąjį audinį, sudaromos sąlygos endotelio ląstelėms judėti į būsimo kapiliaro vietą.

Kitas angiogenezės žingsnis yra endotelio proliferacija bei migracija. Tam reikia daugybės citokinų ir įvairių veiksnių. Vykstant angiogenezei proangiogeniniai stimulai nusveria angiostatinius. Angiogeneziniams faktoriams priskiriamas VEGF, angiopoetinas-1, angiopoetinas-2, PDGF, chemokinai, TGF- β , FGF (3 pav.). Šie veiksniai ir sukelia endotelio proliferaciją bei migraciją. Proliferavę endoteliocitai migruoja pagal chemokinų gradientą per suardytą bazinę membraną į remodeliuotą perivaskulinę sritį.

Angiogeniniai veiksniai		Angiostatiniai veiksniai	
Veiksny	Funkcija	Veiksny	Funkcija
VEGF-šeima	Pralaidumas ↑, plazminogeno aktyvatoriai ↑, EL proliferacija ↑, EL apoptozė ↓, EL migracija ↑, angiogenezė ↑	Endostatinas	EL proliferacija ↓, EL apoptozė ↑, EL migracija ↓, angiogenezė ↓, MMPs inhibavimas,
FGF-šeima	EL proliferacija ↑, plazminogeno aktyvatoriai ↑, adhezijos molekulės ↑, EL migracija ↑, angiogenezė ↑	TGF-β	EL proliferacija ↓, EL migracija ↓, plazminogeno aktyvatoriai ↓, TIMPs ↑, EL apoptozė ↑
Angiopoetinas-1	EL šakojimasis, kraujagyslių stabilizavimas	Angiopoetinas 2	Kraujagyslių destabilizavimas, EL apoptozė ↑,
Angiopoetinas-2	EL migracija, EL proliferacija,	TNF-α	EL proliferacija ↓, EL apoptozė ↑,
PDGF	Tubulių formavimasis, EL ir pericitų proliferacija, kraujagyslių stabilizavimas	Angiostatinas	EL proliferacija ↓, EL apoptozė ↑, EL migracija ↓, angiogenezė ↓
TGF-β	Tubulių formavimas, kraujagyslių stabilizacija, angiogenezė	MMPs	Angiostatino sintezė ↑
TNF-α	EL migracija, tubulių formacija,		
EGF	EL proliferacija, angiogenezė		
CSF	EL proliferacija, EL migracija		
Angiogeninas	EL proliferacija		
Angiotropinas	EL migracija, tubulių formavimas, angiogenezė		
MMPs	ELM degradavimas		
NO	Pralaidumas ↑, EL proliferacija, FGF išskyrimas		

3 pav. Pagrindiniai angiogenezę stimuliuojantys ir slopinantys faktoriai bei jų reikšmė angiogenezės procesui.

EL – endotelio ląstelės; ELM – ekstraląstelinis matriksas; NO – azoto oksidas; VEGF – kraujagyslinis endotelio augimo faktorius; MMPs – matrikso metaloproteinazės; FGF – fibroblastų augimo faktorius; EGF – epiderminis augimo faktorius; PDGF – trombocitų išskirtas augimo faktorius; TNF-α – tumoro nekrozės faktorius α; TGF-β – transformuojantis augimo faktorius β; CSF – kolonijas stimuliuojantys faktorius; TIMPs – audinių matrikso metaloproteinazių inhibitorius.

Endotelio ląstelės, pasiekusios sritį su mažu kraujagyslių tankiu pradeda formuoti naująjį kapiliarą. Ląstelės išsidėsto monosluoksniu bei pradeda formuoti tubulines struktūras – būsimo kapiliaro pirmtaką ir galiausiai stabilizuojasi susiformavęs kraujagyslės pirmtakas. Aplinkoje esančios mezenchiminės ląstelės migruoja į naujai susidariusią kraujagyslę ir diferencijuojasi į pericitus, esančius bazinėje membranoje, ir lygiųjų raumenų ląsteles, supančias naują kraujagyslę.¹⁹

Kaip matyti, angiogenezė sudėtingas, daugiapakopis procesas, o citokinai TGF-β ir PDGF vaidina svarbų vaidmenį ne tik fibrozės procese, bet ir angiogenezėje. Kaip minėta, defektyvi angiogenezė bei angiopatija turi svarbų

vaidmenį SSc klinikoje bei išėityse. TGF-β ir PDGF blokavimas galėtų reikšti tiek profibrozinių, tiek proangiogeninių šių citokinių funkcijų netekimą. Galimas antiangiogeninis imatinibo poveikis apribotų šio inhibitoriaus naudojimą klinikinėje praktikoje SSc gydymui. Tokia laboratorinė ir klinikinė patirtis, kuomet fibrozės inhibitorius slopina ir angiogenezę, jau žinoma. Pavyzdžiu galėtų būti mūsų tyrinėtasis Src kinazių inhibitorius. Šis projektas plačiau aptartas diskusijų skyrelyje.

4.1.3. Autoimunitetas

Kaip žinoma, SSc yra sisteminė autoimuninė liga. Ilgą laiką uždegimas bei autoimunitetas laikyti svarbiausiu SSc patogenezės momentu. Pastaruoju metu klinikinėje praktikoje atsirado stipriu priešuždegiminiu efektu pasižyminčių preparatų. Deja, šie preparatai nepadarė pažangos gydant sklerodermą. Turbūt todėl pastaruoju metu uždegiminis SSc komponentas sulaukia mažesnio tyrėjų dėmesio.

Sisteminės sklerozės patogenezėje svarbos turi tiek įgimtas, tiek įgytas imunitetas. Ankstyvoje stadijoje stebima leukocitų aktyvacija, tiek pažeistame audinyje, tiek periferiniame kraujyje, o tai ir daro tiesioginį poveikį audinių pažeidimui. Perivaskuliniai infiltratai, daugiausia yra CD3+ ir CD4+ mononuklearinės ląstelės, turinčios aktyvacijos žymenis CD45, HLA-DR ir IL-2 receptorius bei sekretuojančios profibrotinius citokinus ir chemokinus.²⁰ T ląstelių žymenis leidžia įtarti oligokloninę aktyvaciją²¹, tačiau nėra žinoma ar šie klonai aktyvuoti nespecifiškai (citokiniais, chemokiniais), ar specifiškai (nežinomas antigenas, virusas). Taip pat matyti disbalansas tarp Th1 ir Th2 išskiriamų citokinių. Sklerodermos pacientams vyrauja Th2 išskiriami citokinai.^{22,23}

Daugumos sisteminės sklerozės pacientų kraujyje randami itin specifiški autoantikūnai. Stebima stipri antikūnų ir ligos pasireiškimo, jų koncentracijos

ir ligos aktyvumo asociacija.²⁴ Autoantikūnų sintezę paaiškina keletas teorijų: tai molekulinė mimikrija, lėtinė B ląstelių aktyvacija bei padidėjusi autoantigenų ekspresija.²⁵ Nors autoantikūnai itin svarbūs sklerodermos diagnostikoje, daugumos jų patogenetinė reikšmė išlieka neaiški, nors kai kurių autoantikūnų reikšmė SSc yra žinoma. Fibroblastams, endoteliui ir PDGF specifiški autoantikūnai gali tiesiogiai aktyvuoti endoteliocitus ar fibroblastus, taip prisidedant prie audinių pažeidimo. Pvz. endoteliui specifiški autoantikūniai sukelia adhezijos molekulių ekspresiją, o antikūnai prieš PDGF jungiasi PRGF receptoriui, taip sukeldami kolageno genų aktyvaciją.^{26,27,28}

4.1.4. Fibrogenėzė

Audinių fibrozė – svarbiausia sisteminės sklerozės patogenezės grandis. Ji ypač išreikšta difuzinės sisteminės sklerozės atveju.²⁹ Progresuojantis normalios audinių architektūros keitimas kolagenu turtingu ekstraląstelinio matriksu, veda prie pažeistų organų funkcijų sutrikimo. Fibrozė ryškiausiai pažeidžia odą, plaučius, gastrointestinalinį traktą, širdį, saugysles ir raiščius. Perivaskulinė fibrozė irgi gana plačiai išreikšta, o tai prisideda prie vaskulinių SSc manifestacijų. Dėl minėtų organų pažeidimo atsiranda sudėtinga klinika bei mirtis.

Ekstraląstelinį matriksą sudaro ląstelinis bei jungiamojo audinio komponentai. Jungiamasis audinys susideda iš kolageno, proteoglicanų, fibrilino ir adhezijos molekulių.³⁰ Ekstraląstelinis matriksas atlieka ir rezervuaro vaidmenį, tokiems citokinams kaip TGF β , CTGF, taip dalyvaudamas mezenchiminių ląstelių diferenciacijoje, funkcionavime, gyvybingume. Perteklinis jungiamasis audinys kaupiasi dėl padidėjusios jo sintezės fibroblastuose, kurie aktyvuojami autokrininiu ar parakrininiu būdu, bei dėl

ląstelė-ląstelė ar ląstelė-ELM sąveikos. Sutrikusi jungiamojo audinio degradacija taip pat prisideda prie ELM kaupimosi.³⁹

Gausiausias jungiamojo audinio komponentas yra kolagenas. Kolageno molekulių šeimai priklauso 20–30 struktūrinių baltymų, dalyvaujančių organų vystymesi, augime, diferenciacijoje.

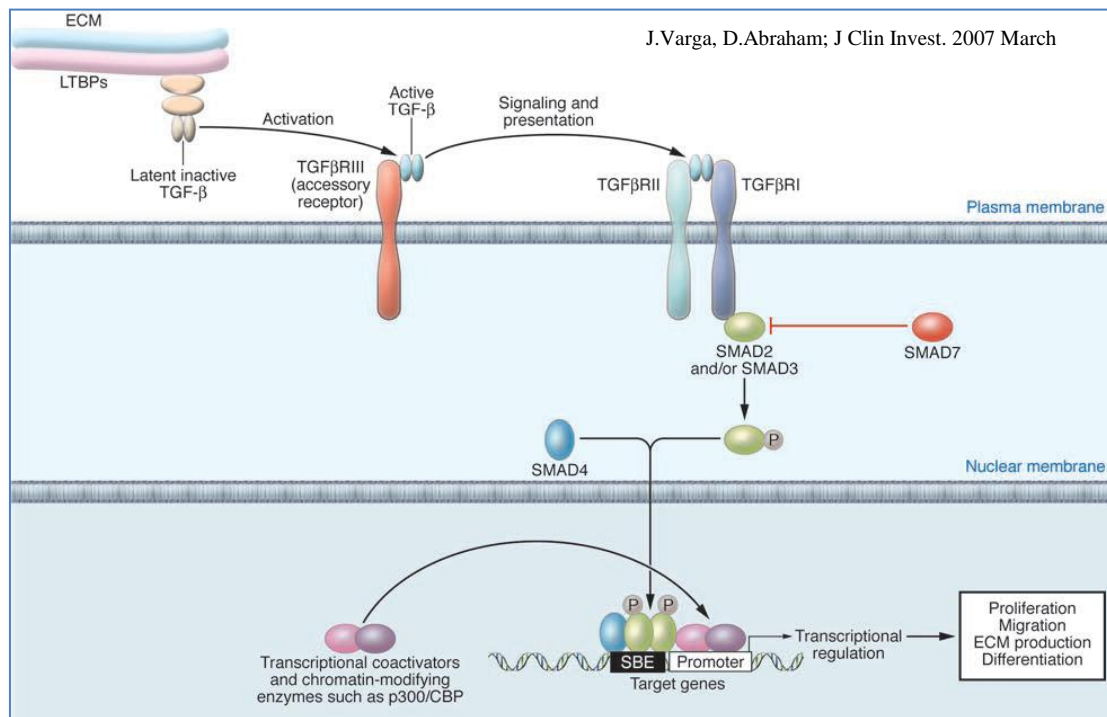
Fibroblastas – svarbiausia fibrogenezės procese dalyvaujanti ląstelė. Trombocitų, endotelio, uždegiminių ląstelių išskirti tirpūs mediatoriai skatina fibroblastus išskirti kolageną ir kitas jungiamojo audinio makromolekules, remodeluoti aplinkinį jungiamąjį audinį, išskirti augimo faktorius, diferencijuotis į miofibroblastus.³¹ Tai leidžia fibroblastams dalyvauti efektyviai gyjant žaizdoms. Normaliomis aplinkybėmis fibroblastams būdinga savireguliacija, bet patologinėmis sąlygomis gali įsivyrėti nuolatinė fibroblastų aktyvacija. Neadekvati fibroblastų aktyvacija ir sukuria sąlygas audinių fibrozei sklerodermos metu. Prie perteklinės jungiamojo audinio sintezės prisideda ir fibroblastų proliferacija, ir migracija, bei kitų mezenchiminių ląstelių *in situ* diferenciacija, taip pat mezenchiminių progenitorinių ląstelių antplūdis iš cirkuliacijos.³² Fibroblastai diferencijuojasi į miofibroblastus veikiant TGF- β . Lygiųjų raumenų alfa aktino (α -SMA) buvimas yra miofibroblastus skiriantis ir diferencijuoti leidžiantis bruožas.³³

ELM sintezė priklauso nuo parakrininio/autokrininio tirpių mediatorių poveikio, tarpląstelinių ryšių, hipoksijos, fibroblastų kontakto su aplinkiniu ELM.³⁴ Tarp daugybės fibrogenezės procese dalyvaujančių citokinų TGF- β laikomas svarbiausiu šio proceso reguliatoriumi. TGF- β dalyvauja tiek fiziologinėje (žaizdų gyjimas, audinių reparacija), tiek patologinėje (randas) fibrogenezėje.⁴⁰ Be to, TGF- β dalyvauja ir audinių atsinaujinime, angiogenezėje, imuninės sistemos reguliacijoje, ląstelių proliferacijoje bei diferenciacijoje.³⁵ Šį citokiną išskiria trombocitai, monocitai/makrofagai, T ląstelės ir fibroblastai. Dauguma šių ląstelių turi specifinį paviršiaus receptorių šiam citokinui ir sekretuoja TGF- β kaip latentinį kompleksą, kuris

inkorporuojamas į ekstraląstelinį matiksą, dalinai dėl jungimosi su fibrilinu-1.³⁶ TGF- β sukiamas efektas ląstelei priklauso nuo mikroaplinkos ir nuo pačios ląstelės. Mezenchiminėse ląstelėse TGF- β veikia kaip profibrotinis stimulus, didinantis kolageno sintezę, ląstelių proliferaciją, migraciją, adheziją ir diferenciaciją į miofibroblastus.⁴⁴

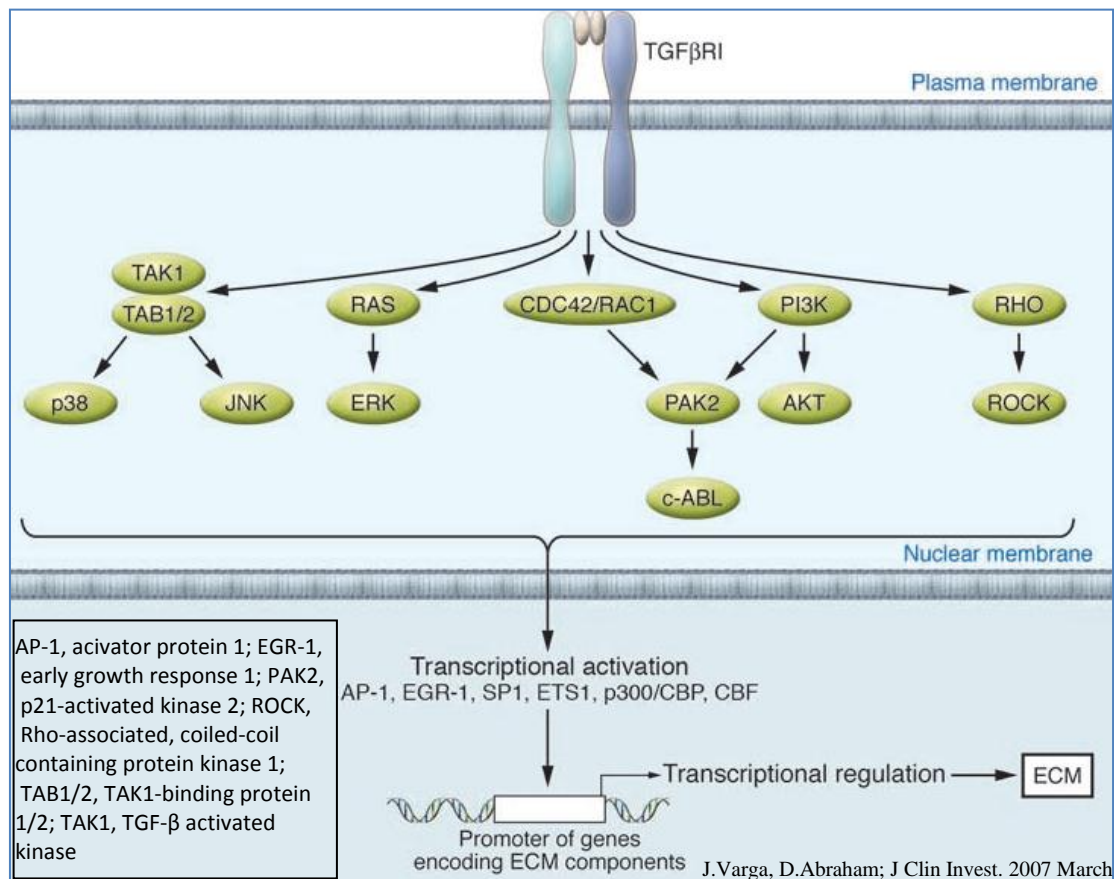
TGF- β jungimasis prie receptoriaus TGF- β RII paleidžia intraląstelinio signalo perdavimo kaskadą bei veda prie geno-taikinio indukcijos.³⁷ Egzistuoja klasikinis (kanoninis) bei alternatyvusis intraląstelinio signalo perdavimo keliai.

Klasikinis yra nuo transkripcijos faktorių – Smad šeimos priklausomas kelias. Signalas perduodamas fosforilinant TGF- β receptorių (dar vadinamą ALK5) – transmembraninę serintreoninkinazę, kuri savo ruožtu fosforilina Smad 2 ir Smad 3 (4 pav.). Tai leidžia jiems sudaryti kompleksą su Smad 4 ir translokuotis iš citoplazmos į branduolį. Branduolyje kompleksas, jungdamasis su transkripcijos kofaktoriais, indukuoja geno transkripciją. Taip indukuojami kolageno I, plazminogeno aktyvatorių inhibitoriaus 1, α -SMA ir CTGF genai. Ši, nuo Smad priklausomą, procesą glaudžiai reguliuoja endogeniniai inhibitoriai, tokie kaip Smad 7.^{39,38}



4 pav. Profibrotinio TGF- β signalo perdavimas nuo Smad priklausomu keliu. ELM vaidina TGF- β sandėlio vaidmenį, kur šis citokinas yra neaktyvioje formoje susijungęs su latentinį TGF- β rišančiu proteinu (LTBPs). Aktyvuotas TGF- β jungiasi su ląstelės paviršiaus receptoriais ir paleidžia nuo Smad priklausomą signalo perdavimo kaskadą. Aktyvūs Smad kompleksai kaupiasi branduolyje, bei kartu su koaktyvatoriais inicijuoja geno transkripciją. Inhibitorius Smad 7 blokuoja Smad 2,3 fosforilinimą, bei tolesnį signalo perdavimą.

Nuo Smad priklausomas signalo perdavimo kelias laikomas klasikiniu, tačiau egzistuoja ir alternatyvus – nuo Smad nepriklausomas kelias.³⁹ Nuo Smad nepriklausomame signalo perdavime dalyvauja įvairūs intraląsteliniai fermentai, tai proteinkinazės, lipidkinazės (5 pav.). Neseniai atlikti tyrimai parodė vienos iš tirozinkinazių – Abelsono kinazės (c-Abl) svarbą nuo TGF- β priklausomame profibrotiniame fibroblastų aktyvavime⁴⁰. Šie, naujieji, signalo perdavimo keliai sąveikauja ir tarpusavyje, ir su klasikiniu, nuo Smad priklausomu, TGF- β intraląstelinio signalo perdavimo būdu.



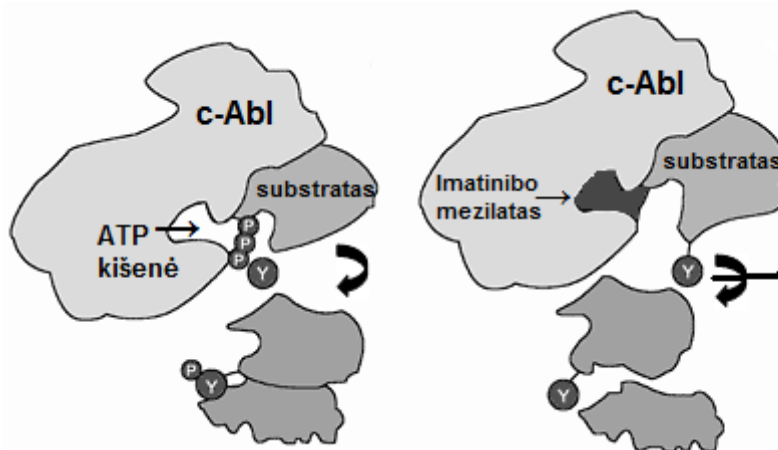
5 pav. Profibrotinio TGF- β signalo perdavimas nuo Smad nepriklausomu keliu. Nuo Smad nepriklausomu keliu vyksta ląstelių proliferacijos, citoskeleto organizacijos, ELM sintezės, bei apoptozės reguliavimas. Lipidkinazių ir proteinkinazių aktyvinimas veda prie transkripcijos faktorių aktyvinimo bei geno ekspresijos reguliavimo. Šie signalo perdavimo keliai gali susilieti su kanoniniu signalo perdavimu ar veikti nepriklausomai nuo Smad.

Kitas svarbus, fibrogenezėje dalyvaujantis, citokinas yra PDGF. Šį citokiną sintezuoja makrofagai, endotelis, fibroblastai, taip pat išskiria ir trombocitai. PDGF yra mitogenas bei chemoatraktantas fibroblastams ir pasižymi stipriu profibrotiniu veikimu. Jis indukuoja kolageno, fibronektino, proteoglikanų sintezę, verčia fibroblastus sintetinti TGF- β , monocitų chemoatraktantą proteiną1 (MCP-1), IL-6. PDGF ir jo receptorių kiekis yra padidėjęs skleroderminiuose fibroblastuose, bei pažeistame audinyje⁴¹, taip pat sklerodermos pacientų bronchoalveoliniame skystyje⁴². Antikūnai prieš PDGF receptorių randami skleroderma sergančiųjų kraujyje. Šie antikūnai aktyvuoja

PDGF receptoriai sukelia profibrotinį efektą. Yra dvi PDGF receptorių rūšys – PDGF receptoriai A ir B. Abiejų PDGF receptorių intraląstelinės dalys yra vienodos ir sudarytos iš į imunoglobulinus panašių baltymų bei fermento tirozinkinazės.

4.2. Imatinibo mezilatas

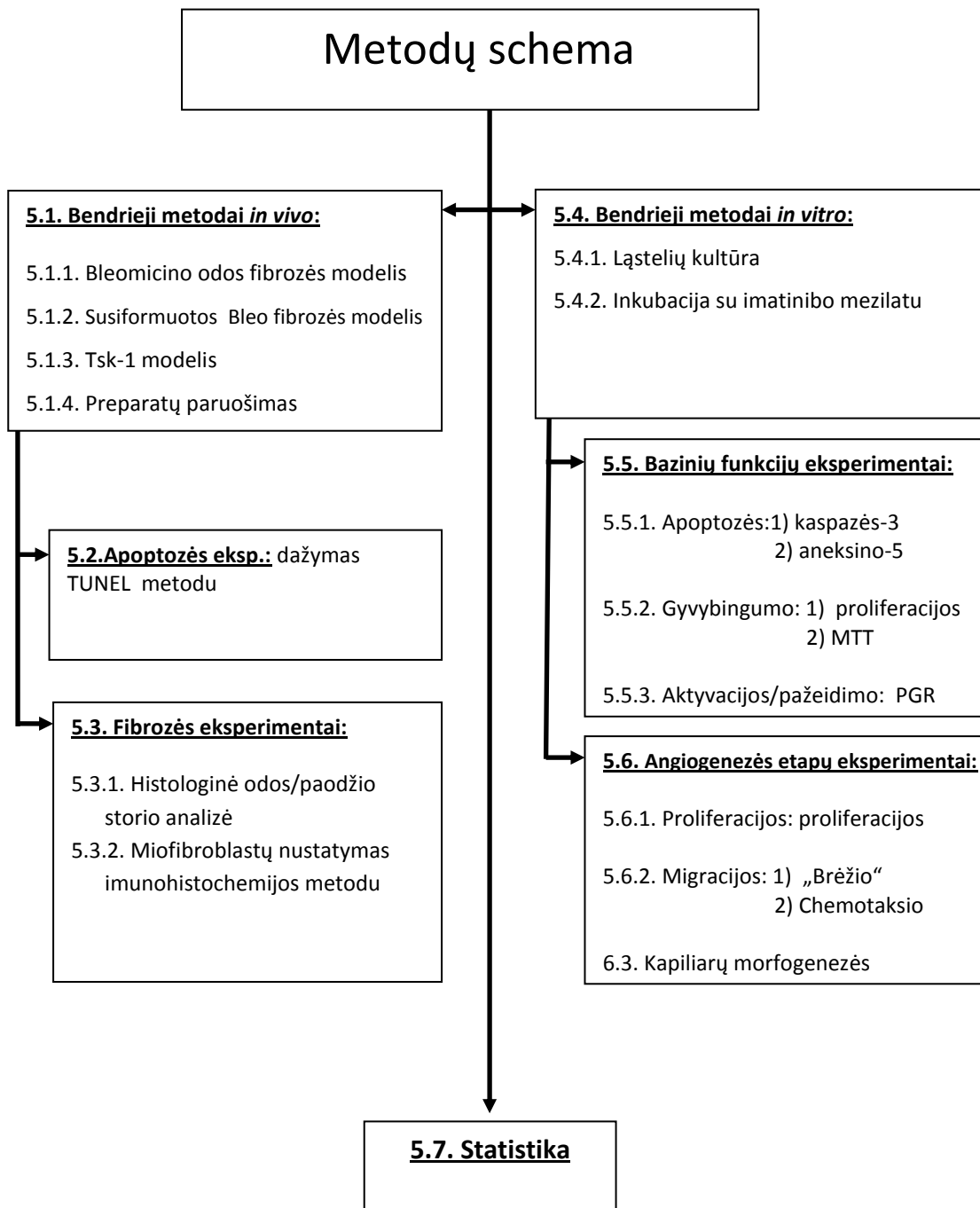
Disertacijoje nagrinėjamas imatinibo mezilatas yra tirozinkinazės inhibitorius. Jis jungiasi prie Abelsono kinazės (c-Abl) ATP kišenės, taip blokuodamas fermento aktyvumą. Todėl šios kinazės substratas neverčiamas produktu ir taip išjungiamas profibrotinė TGF- β funkcija. Be to, imatinibo mezilatas blokuoja ir PDGF receptorių tirozinkinazę (6 pav.), taip blokuojamas PDGF citokino intraląstelinis signalo perdavimas.



6 pav. PDGF receptoriaus schema. Matyti, kaip imatinibo mezilatas jungiasi prie receptoriaus kinazės ATP kišenės, taip sustabdydamas fermento aktyvumą, bei tolesnį signalo perdavimą.

Taigi, imatinibas selektyviai blokuoja dviejų sklerodermos patogenezeje svarbiausių citokinių profibrotines funkcijas. Nors klinikinėje praktikoje pradėti sėkmingai taikyti prostaciklino grupės preparatai, endotelino receptorių antagonistai, tačiau vis dar išlieka bazinės terapijos, veikiančios patį fibrozės procesą, stygius. Imatinibo mezilatas dėl savo antifibrotinio poveikio ir galėtų užpildyti šią spragą.

5. Metodai



5.1. Bendrieji metodai *in vivo*

5.1. Eksperimentiniai sisteminės sklerozės modeliai

Iki šiol nesukurta eksperimentinės sklerodermos gyvūnų modelio, kuris atspindėtų visus šios ligos aspektus ir tiktų antifibrozinių medžiagų efektyvumui įvertinti. Žinomiausi yra bleomicino sukeltos odos fibrozės, pelių Tsk-1 mutacijos, transplanto prieš šeimininką, TGF- β injekcijos sukeltos odos fibrozės, UCD-200 linijos viščiukų modeliai. Kiekvienas modelis turi savų trūkumų ir privalumų. Praktiniame laboratoriniame darbe dažniausiai naudojami laboratorinių pelių modeliai.

Pelių transplanto prieš šeimininką (*Graft versus host*) ligos modelis pasižymi išreikšta odos fibroze, odos riebalinio audinio netekimu, paodžio atrofija, odos uždegimine infiltracija.^{43,44} Šio modelio naudojimą riboja sudėtingumas bei mažas pelių išgyvenamumas. TGF- β injekcijos sukeltos odos fibrozės modelis pasižymi išreikšta odos fibroze, miofibroblastų skaičiaus padidėjimu.^{45,46} Šio modelio trūkumas – TGF- β kaštai.

Šiame darbe buvo naudoti bleomicino sukeltos odos fibrozės, Tsk-1 mutacijos bei modifikuotas bleomicino sukeltos suformuotos odos fibrozės modeliai.

5.1.1 Eksperimentinis bleomicino sukeltos odos fibrozės modelis

Eksperimentinis bleomicino sukeltos odos fibrozės modelis – klasikinis, dažniausiai naudojamas sisteminės sklerozės modelis.

Seniai žinoma, jog parenteralinis bleomicinas sukelia odos bei plaučių fibrozę. Histologiškai stebimi audinių architektūros pokyčiai, mononuklearinė infiltracija, fibroblastų akumuliacija, bei ilgai išsivystanti audinių fibrozė.^{47,48}

Egzistuoja keletas mechanizmų, aiškinančių profibrotinį bleomicino efektą. Tai uždegiminės infiltracijos sąlygota fibrozė, pačių eksperimentinių gyvūnų polinkis fibrozei, radikalų sukelta fibrozė. Nė vienas minėtas mechanizmas bleomicino sukeltos fibrozės visiškai nepaaiškina. Tai leidžia įtarti, kad egzistuoja mums dar nežinomi bleomicino sukeltos fibrozės mechanizmai.

Plaučių parenchimos infiltracija uždegiminėmis ląstelėmis parodo, jog fibrozė išsivystė ir dėl ląstelinio imuniteto. Tačiau fibrozės išsivystymas atyminių pelių plaučiuose rodo, kad šiuo atveju imuninis atsakas nėra vienintelis veiksnys.⁴⁹ Taigi plaučių fibrozės išsivystyme uždegimas nėra vienintelis profibrotinis stimulus.

Yamamoto *et al* įrodė, jog vietinė bleomicino injekcija sukelia kolageno kaupimąsi bei uždegiminę infiltraciją odoje, infiltraciją bei fibrozę plaučiuose, ANA ir padidėjusią TGF- β sintezę.⁵⁰ Šiuo atveju odos fibrozė yra nuo T-ląstelių priklausoma.^{51,52} Tačiau fibrozės lygis yra priklausomas nuo eksperimentinių pelių linijos^{53,54} ir yra genetiškai determinuotas.^{55,56} Taigi vien uždegimo buvimas neapsprendžia fibrozės lygio, tam reikšmės turi ir genetiniai faktoriai.

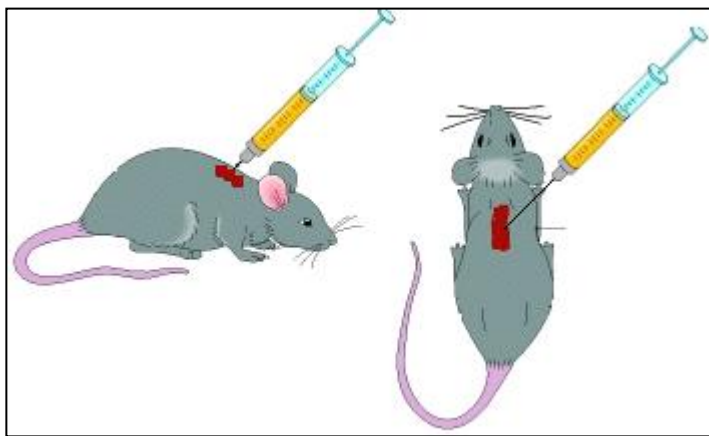
Yamamoto *et al* parodė jog bleomicinu veiktų gyvūnų odos fibroblastuose yra padidėjusi lygiųjų raumenų alfa aktino (α SMA) ekspresija, o tai rodo jų transformaciją į miofibroblastus.⁵⁷ Fibroblastų proliferaciją skatina didelės, mononuklearų išskirtų tirpių faktorių (PDGF, bFGF, TGF- β , IL-1, IL-6), koncentracijos.⁵⁸

Fermentas superoksido dismutazė ryškiai sumažino odos fibrozės lygį, o tai taip pat parodo laisvųjų radikalų vaidmenį bleomicino sukeltaje odos fibrozėje.⁵⁹

Taigi bleomicino sukeltos odos fibrozės modelis savo uždegiminiu komponentu primena ankstyvą sisteminę sklerozę, nes ankstyvose sisteminės sklerozės stadijose matyti audinių uždegiminė infiltracija bei padidėjusi

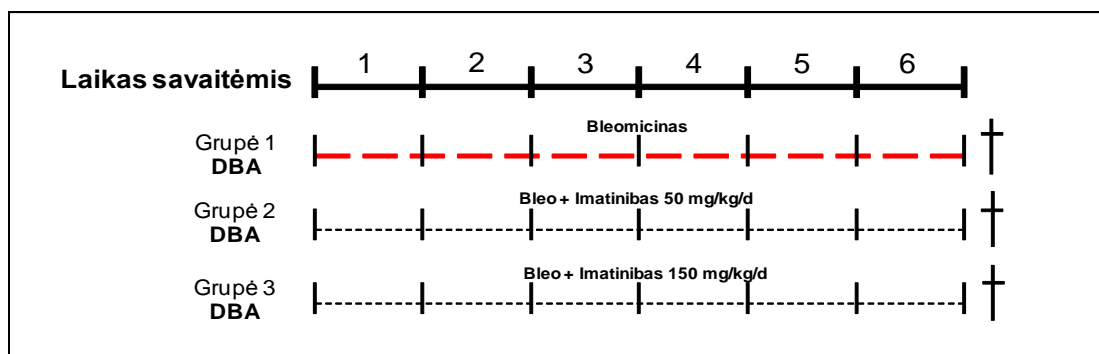
uždegimo mediatorių koncentracija. Vėlesnėse sklerodermos stadijose tiek uždegiminė infiltracija, tiek citokinų koncentracija ryškiai mažėja.

Ekspertimentuose odos fibrozė buvo sukelta vietinėmis bleomicino injekcijomis 6 savaičių DBA linijos pelėms.^{8,60} Bleomicinas tirpintas 0,9 % NaCl tirpale, gauta 0,5mg/ml koncentracija. Bleomicinas į paodį leistas kas antrą dieną, 24 dienas, į apibrėžtą odos zoną laboratorinės pelės nugaros viršuje (7 pav.).



7 pav. Vietinė bleomicino injekcija pelei. Bleomicinas nuolat leidžiamas į apibrėžtą odos zoną pelės nugaroje. Odos mėginiai imami tik iš apibrėžtosios zonos.

Dvi laboratorinių pelių grupės veiktos imatinibo mezilatu. Imatinibas tirpintas 0,9 % NaCl ir kartą per dieną leistas į pilvaplėvės ertmę (dozės 50 mg/kg/d ir 150 mg/kg/d). Imatinibas ir bleomicinas pradėti leisti vienu metu. Ekspertimento struktūra bei injekcijų schema parodyta 8 pav. Pirmos grupės pelėms, kurios neveiktos imatinibo mezilatu, į pilvaplėvės ertmę leistas fiziologinis tirpalas. Po 24 dienų laboratoriniams gyvūnams įvykdyta CO₂ asfiksija. Kiekvienoje grupėje buvo po 6 peles, iš viso 18 pelių.



8 pav. Bleomicino sukeltos fibrozės eksperimento dizainas.

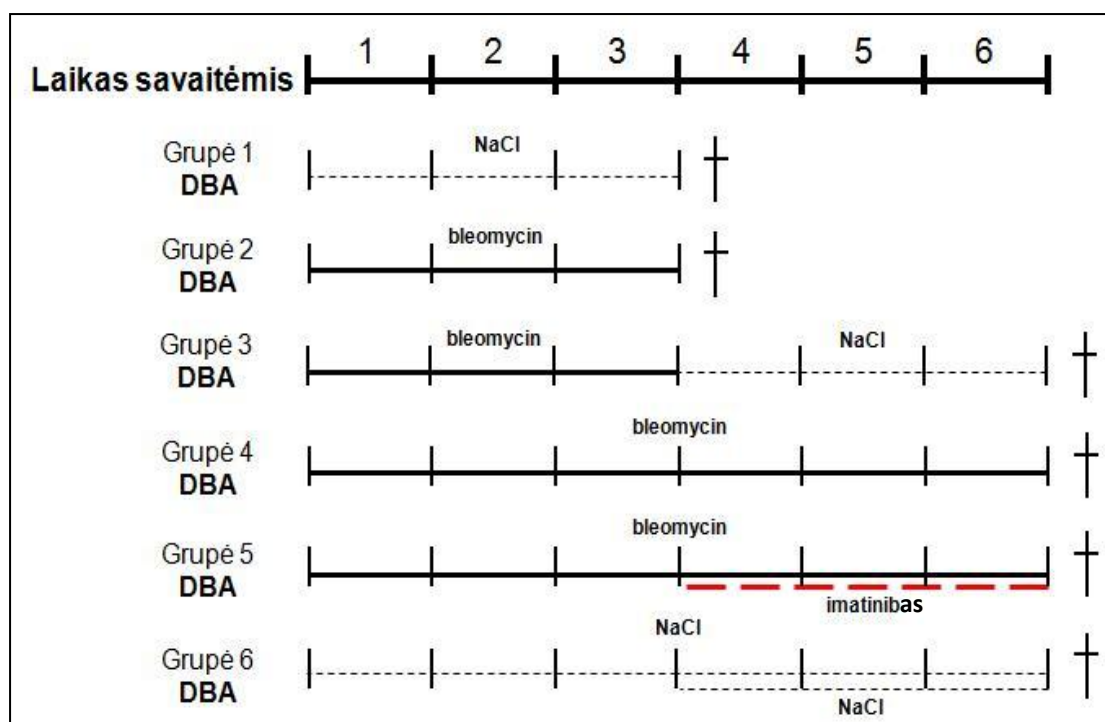
Bleo – bleomicinas; DBA – DBA linijos pelės.

Šių pelių odos mėginiai naudoti vertinant imatinibo mezilato poveikį endotelio ląstelių apoptozei *in vivo* – TUNEL metodu tyrimuose (aprašyta metodų 5.2 skyriuje).

5.1.2. Eksperimentinis bleomicino sukeltos *suformuotos* odos fibrozės modelis

Norėdami ištirti imatinibo mezilato poveikį suformuotai fibrozei, modifikavome bleomicino sukeltos odos fibrozės modelį taip, kad imatinibo mezilatas būtų leidžiamas pelėms, odos fibrozei jau susiformavus.

Eksperimentuose odos fibrozė buvo sukelta 6 savaičių amžiaus DBA linijos pelėms, į apibrėžtą odos zoną laboratorinės pelės nugaros viršuje leidžiant, kaip aprašyta ankstesniame skyriuje. Eksperimento struktūra bei injekcijų schema parodyta 9 pav.



9 pav. Bleomicino sukeltos suformuotos fibrozės eksperimento planas.
DBA – DBA linijos pelės

Siekiant įvertinti imatinibo mezilato poveikį susiformavusiai fibrozei, 5 grupės pelėms 6 savaites leistas bleomicinas ir lygiagrečiai, paskutines 3 savaites, į pilvaplėvės ertmę, leista po 150 mg/kg/d imatinibo mezilato. Tai reiškia, jog imatinibas pradėjo veikti, kai jau egzistavo odos fibrozė atsiradusi per pirmas tris bleomicino leidimo savaites. Kad būtų išmatuotas jau egzistavusios odos fibrozės lygis, 2 grupės eksperimentinėms pelėms 3 savaites leistas bleomicinas. Jų odoje egzistavo tokio lygio fibrozė, kaip ir 5 grupės pelių, prieš pradėdant pastarosioms leisti imatinibo mezilatą. Trečios grupės eksperimentinėms pelėms 3 savaites leistas bleomicinas ir kitas 3 savaites – fiziologinis tirpalas. Jų oda vertinta dėl galimos spontaninės fibrozės regresijos. Ketvirtos grupės eksperimentinėms pelėms 6 savaites leistas bleomicinas. Pirmos ir šeštos grupių pelėms į odą leistas fiziologinis tirpalas, šios, kontrolinės, grupės naudotos vertinant bleomicino poveikį odos storiui. Visoms 4 ir 6 grupių eksperimentinėms pelėms, kurios neveiktos imatinibo mezilatu, į pilvaplėvės ertmę leistas fiziologinis tirpalas.

5.1.3. Tsk-1 mutacijos odos fibrozės modelis

Įvertinti imatinibo mezilato efektyvumą nuo uždegimo mažiau priklausomame sisteminės sklerozės modelyje, nei bleomicino sukelta odos fibrozė, buvo pasirinktas storos odos (*tight skin* – Tsk-1) modelis.

Dėl fibrilino 1 geno mutacijos heterozigotinėms Tsk-1 pelėms būdingas padidėjęs odos ir poodžio storis. Oda bei poodis yra tvirtai suaugę su poodiniu bei gilioju raumeniniu sluoksniu.^{61,62} Ši mutacija įvyksta spontaniškai ir yra dominantinė.⁶³ Esant šiai mutacijai homozigotiniai embrionai žūsta 8–10 gestacijos dieną. Fibrilinas-1 yra mikrofibrilių komponentas ir randamas daugumoje organų. Jis atlieka svarbų vaidmenį tarpląstelinio matrikso sintezėje. Egzistuoja keletas teorijų aiškinančių Tsk-1 mutacijos ir pelių fenotipo ryšį:

1. Ši mutacija turi įtakos nuo Ca^{2+} priklausomai proteino-proteino sąveikai, tai veikia kolagenų skaidulų formavimąsi
2. Fibrilinas dalyvauja tropoelastinui virtant elastinu, Tsk-1 pelėse nustatomas elastinių skaidulų pagausėjimas
3. Mutavęs fibrilinas-1 sujungia/deponuoja daugiau svarbiausio profibrotinio citokino – TGF- β .⁶⁴

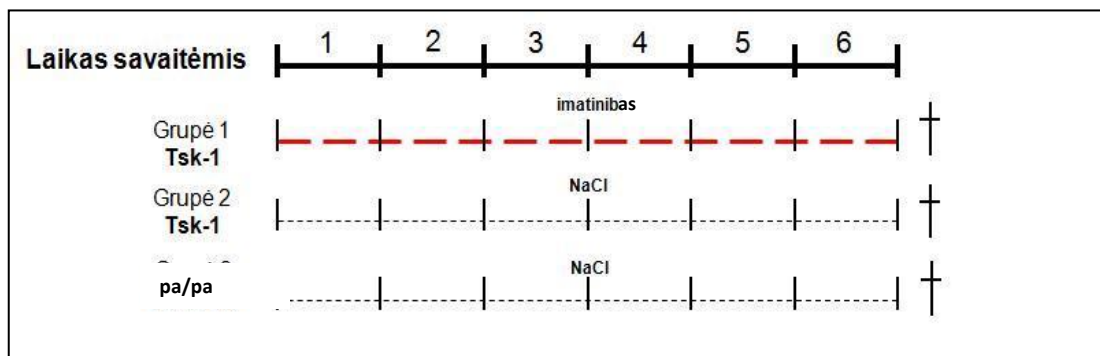
Tsk-1 yra sisteminis sklerodermijos modelis. Jam būdingas plaučių bei širdies pakenkimas, tačiau ne vaskulopatija. Plaučių pakenkimas primena emfizemą bei fibrozę⁶⁵, širdyje stebima hipertrofija bei fibrozė.⁶⁶

Ekspimente Tsk-1 pelės kryžmintos su pa/pa pelėmis, kurių recesyvinis pa genas lemia blyškų pelių kailį, bei raudonas akis. Kadangi fibrilino-1 genas susijęs su pa genu, atsivestos naujos pelytės, turinčios mutaciją, nesudėtingai atskiriamos pagal jų fenotipą. Visoms heterozigotinėms Tsk-1 mutaciją turinčioms pelėms (Tsk-1/pa) būdingas juodas kailis ir juodos akys. O homozigotinės (pa/pa) pelės Tsk-1 mutacijos neturi (10 pav.).



10 pav. Tsk-1 mutaciją turinti (kairėje) ir pa/pa (dešinėje) pelės.

Pa genas lemia tik kailio spalvą, o odos fiziologijos ar fibrogenezės nekeičia. Eksperimentas atliekamas su heterozigotinėmis Tsk-1/pa pelėmis, kurios paprastumo dėlei vadinamos - Tsk-1. Homozigotinės pa/pa pelės naudojamos kontrolei. 0,9 % NaCl imatinibo tirpalas kartą per parą (150 mg/kg/d) leistas į pilvaplėvės ertmę. Analizuotos trys pelių grupės, iš viso 27 pelės. Eksperimento planas parodytas 11 pav.



11 pav. Tsk-1 mutacijos eksperimento planas

Pirmos grupės Tsk-1 pelėms į pilvaplėvės ertmę leista 150 mg/kg/d imatinibo mezilato dozė, 2 grupės Tsk-1 pelėms į pilvaplėvės ertmę leistas fiziologinis tirpalas. Trečios grupės pa/pa pelėms (kontrolinė grupė), taip pat leistas fiziologinis tirpalas. Imatinibas bei fiziologinis tirpalas pradėtas leisti 5 savaičių pelėms, leistas 6 savaites.

5.1.4. Preparatų ruošimas

Bleomicino sukeltos odos fibrozės modeliuose mėginiams imta oda iš apibrėžtos zonos, laboratorinės pelės nugaros viršuje, kur buvo leidžiamas bleomicinas.

Tsk-1 modelio eksperimentuose dalyvavusių pelių mėginiams oda imta irgi iš pelės nugaros viršaus.

Odos mėginiai buvo fiksuoti 10 % buferiniame formalino tirpale ir įlieti į parafiną. Pjaustyti 5 µm storio pjūviais. Paruošti mėginiai naudoti histocheminiams, imunohistocheminiams ir tyrimams TUNEL metodu.

5.2. Apoptozės eksperimentai in vivo - tyrimas galinės

deoksinukleotidiltransferazės deoksiuridintrifosfato liekanos žymėjimo (TUNEL) metodu

Imatinibo mezilato poveikį endotelio ląstelėms vertinome ne tik in vitro, bet ir bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje pelėms, kurios buvo veiktos imatinibu. Todėl pelės, gavusios bleomicino injekcijas, bet imatinibu neveiktos, pasirinktos kaip kontrolė.

Formaline fiksuoti ir į parafiną įlieti bleomicinu veiktos pelių odos mėginiai naudoti apoptozinių ląstelių kiekiui nustatyti. Eksperimente naudoti bleomicino sukeltos fibrozės modelio pelių odos mėginiai (bet ne Bleo sukeltos *suformuotos* fibrozės). TUNEL eksperimentas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas, naudojant *In Situ Cell Death Detection Kit*[®] (Roche, Vokietija). TUNEL yra patikimas metodas DNR fragmentacijai nustatyti.

Vykstant ląstelių apoptozei aktyvuojamos nukleazės, kurios branduolio DNR skaldo į 200 bazių ilgio fragmentus. Vykstant DNR degradacijai, atsidengia dideli kiekiai 3'-hidroksilo liekanų. Šios hidroksilo grupės yra substratas fermentui – galinei deoksinukleotidiltransferazei (TdT), kuri prijungia dezoksiribonukleotidines bazes atsitiktine tvarka. Į TdT reakciją

pridėjus fluoresceinu žymėto 2'-deoksiuridino 5'-trifosfato (fluoresceinas-dUTP) pažymimos DNR fragmentacijos vietos. Į DNR įstačius fluoresceino-dUTP kompleksą pastarasis vizualizuotas atliekant standartinį imunohistochemijos eksperimentą, panaudojus antikūnus prieš fluoresceiną.

Eksperimente vertinti pelių, veiktų bleomicinu bei imatinibo mezilatu (dozėmis 50 mg/kg/d arba 150 mg/kg/d) odos mėginiai. Pelių, veiktų tik bleomicinu, odos mėginiai naudoti kaip kontrolinė grupė.

Dažyti mėginiai fotografuoti naudojant Nikon Eclipse 80i mikroskopą. Kiekvienas mėginys fotografuotas trijose vietose. Šiuo metodu išryškinamos visos apoptozinės ląstelės. Nuotraukose skaičiuoti tik nusidažę kapiliarai (struktūros su spindžiu ar matomu eritrocitu viduje).

Skaičiuoti kiekvieno mėginio trijų nuotraukų kapiliarai bei apskaičiuoti mėginio nusidažusių kapiliarų vidurkiai.

5.3. Fibrozės analizės eksperimentai *in vivo*

5.3.1. Histologinė odos/poodžio storio analizė

Audinio struktūros išryškinimui odos pjūviai dažyti hemalaunu ir eozinu. Atlikus deparafinizaciją pjūviai plauti, 5 min. dažyti hemalaunu, pakartotinai plauti, dažyti eozinu dar 5 min. Po pakartotinio plovimo vandeniui skaidrės dehidruotos 70 %, 96 % ir 100 % etanoliu ir skaidrintos ksilolu prieš padengiant jas stikleliu.

Dažyti mėginiai fotografuoti naudojant Nikon Eclipse 80i mikroskopą. Odos storis matuotas vertinant maksimalų atstumą tarp epidermio-dermos jungties ir dermos-poodžio riebalinio sluoksnio.

Analizuoti kiekvienos pelės 4 odos pjūviai. Poodžio storis vertintas matuojant poodžio jungiamojo audinio (po *panniculus carnosus*) storį keturiuose odos pjūviuose.

5.3.2. Miofibroblastų nustatymas imunohistochemijos metodu

Miofibroblastai vizualizuoti atlikus lygiųjų raumenų alfa aktino dažymus (α SMA). α SMA yra randamas arterijų/aortos lygiųjų raumenų ląstelėse, miofibroblastuose ir su karcinomom susijusiuose fibroblastuose.

Odos pjūviai deparafinizuoti ksilolu, 100 %, 96 % ir 80 % etanoliu, plauti fosfato buferiniu fiziologiniu tirpalu (*Phosphate Buffered Saline* – PBS). Endogeninės peroksidazės aktyvumas blokuotas (kadangi antriniai antikūnai konjuguoti su peroksidaze) preparatus inkubuojant 15 min. vandenilio peroksido 3 % PBS tirpale, plauta PBS. Serumu blokuota inkubuojant preparatus 60 min. su 5 % galvijų serumo albuminu. Preparatai 2 h, kambario temperatūroje inkubuoti su pirminiais – monokloniniais anti α SMA antikūnais (klonas 1A4 Sigma-Aldrich, Vokietija). Su antriniais – ožkos prieš triušį peroksidaze žymėtais antikūnais (Dako, Vokietija) preparatai inkubuoti 30 min. kambario temperatūroje.

Vizualizacija atlikta naudojant 3,3-diaminobenzidino tetrahydrochloridą (Sigma-Aldrich).

Eksperimente naudoti Tsk-1 pelių odos pjūviai. Miofibroblastai skaičiuoti kiekvieno mėginio trijose nuotraukose. Tsk-1 pelių, veiktų imatinibo mezilatu, preparatai lyginti su Tsk-1 pelių, negavusių imatinibo, ir pa/pa linijos pelių odos preparatais.

5.4. Bendrieji metodai *in vitro*

5.4.1. Ląstelių kultūra

Žmogaus smulkių kraujagyslių endotelio ląstelių naudojimą eksperimentuose riboja šių ląstelių apsunkintas išskyrimas, sudėtingos augimo *in vitro* sąlygos, trumpa gyvavimo trukmė. Todėl eksperimentuose buvo naudotos ilgaamžės žmogaus mikrovaskulinės endotelio ląstelės (*Immortalized human microvascular endothelial cells* – HMEC-1), išskirtos iš žmogaus odos, plaučių, kepenų.

Šios ląstelės imortalizuotos perkeltant į jas dalį polyomos viruso SV40 genomo. Tai suteikia ląstelėms ypatingų savybių – po 50 pasažų HMEC-1 nerodo senėjimo požymių, tuo tarpu normalios endotelio ląstelės pradeda senti po 8–10 pasažų. Tai labai palengvina darbą su šiomis ląstelėmis.

Nors ir prailginto amžiaus HMEC-1 ląstelės sugeba išlaikyti mikrovaskulinių endotelinių ląstelių charakteristikas. HMEC-1 turi tipingą endotelio morfologiją, kultūroje auga monosluoksniu, ekspresuoja ir sekretuoja von Willebrand's faktorių, kultivuojamos ant Matrigelio formuoja tubules. HMEC-1 auga ir be žmogaus serumo, ekspresuoja tik endoteliui būdingas ir adhezijos molekules.

Disertacijoje aprašomame projekte HMEC-1 kultivuotos Dulbecco modifikuotoje Eagle'o terpėje (*Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM) su 10 % karščiu inaktyvuoto embrioninio galvijų serumo (*fetal calf serum* – FCS), 25 mM HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfoninė rūgštis*), 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino, 2 mM L-glutamino ir 2,5 µg/ml amfotericino B (Invitrogen, Karlsruhe, Vokietija).

5.4.2. Inkubacija su imatinibo mezilatu

Su imatinibo mezilatu HMEC-1 buvo inkubuojamos naudojant skirtingų koncentracijų tirpalus (nuo 0,001 iki 1,0 µg/ml). Vertinant tiek trumpos, tiek

ilgos inkubacijos poveikį endoteliui, ląstelės inkubuotos įvairiuose tyrimuose nuo 24 iki 96 h. Minėtosios koncentracijos atitinka imatinibo mezilato koncentracijas lėtine mieloleukemija sergančių pacientų kraujo plazmoje. Naudojant 400 mg tabletes, po 24 h vidutinė žmonių plazmos koncentracija yra 0,72 µg/ml.

5.5. Endotelio bazinių funkcijų eksperimentai *in vitro*

5.5.1. Apoptozės eksperimentai

5.5.1.1. Kaspazės-3 aktyvumo eksperimentas

Kaspazės šeimos proteazės yra identifikuotos kaip esminiai, sudėtingų su apoptoze susijusių procesų, mediatoriai. Iš jų kaspazės-3 – svarbiausio šios šeimos atstovo – atsiradęs aktyvumas reiškia neišvengiamai įvyksiančią apoptozę.

Kaspazės-3 aktyvumas buvo nustatytas naudojant „EnzChek® Caspase-3 Assay Kit (R-35100)“. Šis eksperimentas paremtas nefluorescuojančio rodamino-110 bis-N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartato rūgšties amino (Z-DEVD-R110) skaidymu į fluorescuojantį rhodaminą-100. Skaidymą atlieka į kaspazę-3 panašios proteazės. Fluorescencijai matuoti naudotas skaičiuoklis Tecan GENios Microplate Fluorescence Reader® (Tecan, Salzburg, Austrija). Fluorescencija matuota 485 nm bangų ilgyje. Eksperimente naudoti HMEC ląstelių, 24 h inkubuotų su imatinibo mezilatu nuo 0.001 iki 1.0 µg/ml, lizatai. Tik DMEM terpėje, be imatinibo, inkubuotos ląstelės naudotos kaip kontrolinė grupė. Su dimetilsulfoksidu (DMSO) inkubuotos ląstelės naudotos kaip eksperimento neigiama kontrolė.

5.5.1.2. Apoptotinių endotelio ląstelių, dažytų aneksinu V, kiekio skaičiavimas

Gyvybingoje ląstelėje membranos fosfolipidas fosfatidilserinas yra vidinėje plazminės membranos pusėje. Šio fosfolipido palaikymas ląstelės

viduje yra aktyvus ir energijos reikalaujantis procesas. Apoptotinėse ląstelėse įvyksta membranos fosfolipido fosfatidilserino translokacija iš vidinės pusės į išorinę plazminės membranos pusę, kur jis tampa pasiekiamu aneksinui V.

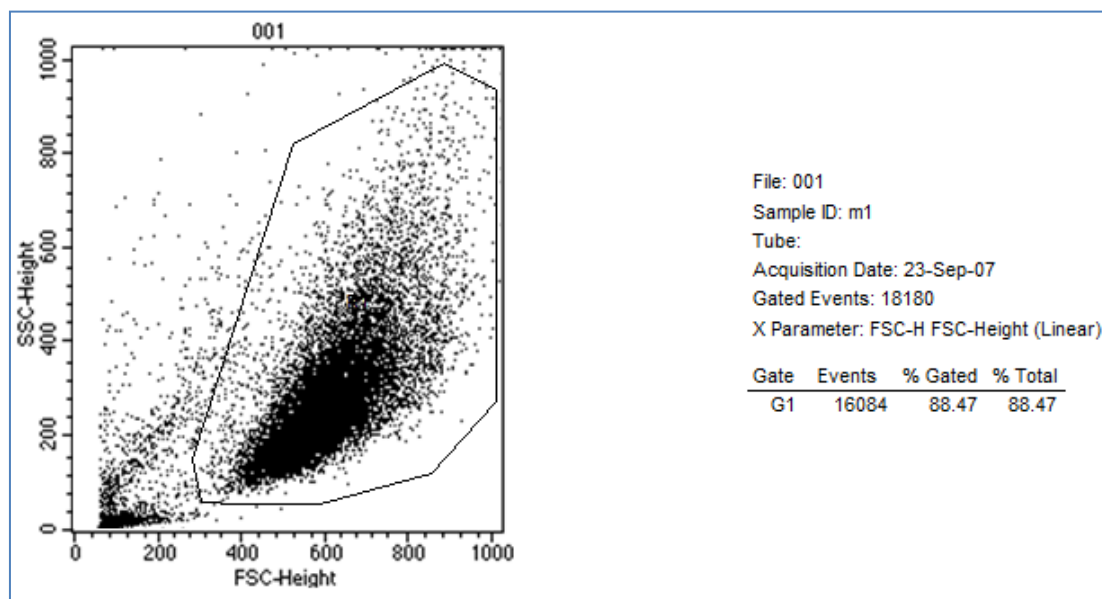
Aneksinas V yra (veikia tik Ca^{2+} turinčioje terpėje) fosfolipidus rišantis baltymas, turintis didelį afinitetą fosfolipidui fosfatidilserinui, todėl naudojamas nustatant apoptozę. HMEC buvo dažytos izothiocyanatu žymėtu aneksinu V (BD Bioscience, Heidelberg, Vokietija). Dažymas aneksinu V be Ca^{2+} buvo naudotas foninio švytėjimo lygiui nustatyti (*background*). Aneksinui V teigiamų ląstelių kiekis skaičiuotas naudojant FACSCalibur tėkmės citometrą.

Eksperimente naudotos HMEC-1 ląstelės 24 h inkubuotos su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0.001 iki 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). DMEM terpėje, be imatinibo, inkubuotos ląstelės naudotos kaip kontrolinė grupė. Su DMSO inkubuotos (žuvusios) ląstelės naudotos kaip eksperimento teigiama kontrolė.

5.5.2. Gyvybingumo eksperimentai

5.5.2.1. Proliferacijos kreivių generavimas

HMEC buvo kultivuojamos 6 šulinėlių lėkštelėse. Į kiekvieną lėkštelę patalpinta $1,3 \times 10^4$ endotelio ląstelių. Ląstelės inkubuotos su imatinibo mezilatu (koncentracija nuo 0,1 iki 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nauja terpė bei imatinibas buvo keičiami kas antrą dieną. Tik terpėje kultivuotos ląstelės naudotos kaip kontrolinė grupė. Vieno šulinėlio ląstelės (mėginys) tripsino pagalba „atkabintos“ nuo lėkštelių, po 48, 72 ir 96 h. Mėginio ląstelių kiekis skaičiuotas atliekant tėkmės citometriją 20 s, naudojant FACSCalibur tėkmės citometrą (12 pav.).



12 pav. HMEC-1 populiacija pažymėta mėginyje, tėkmės citometrijos metu.

5.5.2.2. MTT eksperimentas

Metabolinis HMEC-1 inkubuotų su imatinibo mezilatu aktyvumas nustatytas 3, (4,5-dimetil thiazolil-2) 2,5-difenil-tetrazolio bromido metodu (MTT).

Šis metodas paremtas gyvybingų ląstelių mitochondrijų dehidrogenazių, verčiančių MTT į formazano kristalus, aktyvumu. Formazano kristalai, duodantys violetinę spalvą, yra netirpūs vandenyje. Kristalai tirpsta parūgštintame izopropanolyje, todėl ląstelių lizei sukelti naudotas parūgštintas izopropanolis (maišyta 2 ml koncentruotos HCl su 500 ml izopropanolio). Lizatai su izopropanoliu buvo inkubuoti 1 h. Ląstelių lizatai analizuoti MRX Microplate skaitytuvu esant 570nm bangų ilgiui.

Ląstelės augintos 96 šulinėlių lėkštelėse, kol visiškai padengs šulinėlio dugną. Tuomet pridėta imatinibo mezilatas (koncentracijomis nuo 0.001 iki 1.0 µg/ml) ir ląstelės inkubuotos 24 ir 96 h. Terpėje, be imatinibo, inkubuotos ląstelės naudotos kaip kontrolinė grupė. Su DMSO inkubuotos, žuvusios, ląstelės naudotos kaip eksperimento neigiama kontrolė. Po MTT pridėjimo ląstelės papildomai inkubuotos 4h 37°C temperatūroje.

5.5.3. Aktyvacijos ir pažeidimo žymenų nustatymas realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu

Siekiant įvertinti, ar imatinibas inicijuoja endotelio pažeidų ir aktyvacijos žymenų sintezę, atlikta realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (PGR).

Pirmiausia izoliuota endotelio ląstelių mRNR naudojant *NucleoSpin RNA II extraction system (Machery-Nagel, Düren, Vokietija)*. Į mėginius pateko visų aktyvuotų genų mRNR. Mus, šiuo atveju, domino VEGF, VCAM-1, ICAM-1, endotelino-1 mRNR lygis endotelio ląstelių branduoliuose. Į izoliuotos mRNR mėginius, patenka nedaug mRNR. Kito etapo tikslas ir yra padidinti ribonukleinių rūgščių kiekį mėginiuose iki nesudėtingai fiksuojamo lygio.

Antrame etape į izoliuotos HMEC-1 mRNR mėginius buvo pridėta atsitiktinių heksameryų bei atlikta atvirkštinė transkripcija į komplementarią viengrandę DNR (cDNR). Šio proceso metu ribonukleino rūgščių kiekis mėginiuose padidėja keletą kartų. Pažymėtina, kad atvirkštinė transkripcija vyko nuo visų mėginyje buvusių mRNR (tiek mus dominančių, tiek ne). Trečias etapas – pažeidų žymenų genų ekspresijos kiekybinis vertinimas. Tam atliktas realaus laiko PGR eksperimentas. Naudota: dažas *SYBR Green*, ciklometras *ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Forster City, CA, JAV)*. Kiekvienam genui nustatyti buvo naudotos specifinių pradmenų (praimerių) poros (adeninas (A), guaninas (G), citozinas (C) ir timinas (T))

VEGF pirminiai pradmenys: 5-AGGAGG GCAGAATCAT CACG-3;
atvirkštiniai pradmenys: 5-CAAGGCCCA CAGGGATTT TCT-3

ICAM-1 pirminiai pradmenys 5'-GGC TGG AGC TGT TTG AGA AC;
atvirkštiniai pradmenys: 5'-ACT GTG GGG TTC AAC CTC TG

VCAM-1 pirminiai pradmenys 5'-CTCACCTTAATTGCTATG-3'; atvirkštiniai pradmenys: 5'-GTTTTTACCTTCTAAGAC-3';

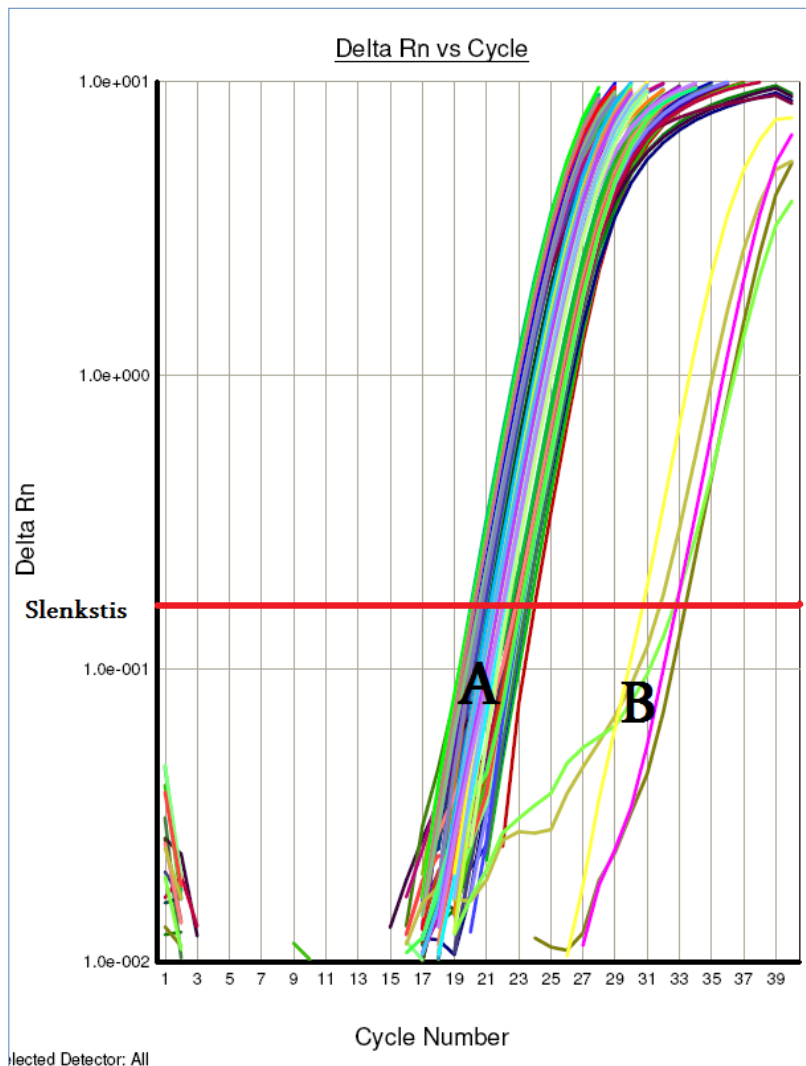
Endotelinas-1, pirminiai pradmenys 5'-GATGCCAATGTGCTAGCCAA-3';
atvirkštiniai pradmenys: 5'-CTGATGGAAGCCAGTGAAGA-3'

Atvirkštinės transkripcijos reakcijoje be enzimų (neturintys savyje cDNR) inkubuoti (nonRT PGR) mėginiai naudoti kaip neigiama kontrolė.

Eksperimentai su konstitutyviu 18s genu (*PE Applied Biosystems*) atlikti kaip endogeninė kontrolė. Šio geno aktyvacija visose ląstelėse yra vienoda ir pastovi, todėl vėliau jis bus naudojamas kaip atskaitos taškas.

Vykstant polimerazės grandžių reakcijai naudojama mėginių cDNR yra komplementari pirmame etape izoliuotai mRNR. Polimerazės pagalba nuo cDNR yra kopijuojama jai komplementarios trumpos dvispiralės DNR (dsDNR) atkarpos. Kadangi reikalingi substratai (pradmenys), tai polimerazė kopijuoja tik tas cDNR, kurių specifinius pradmenis mes pridėjome. Dažas SYBR Green jungiasi tik prie dsDNR ir duoda švytėjimą. Pagal švytėjimo intensyvumą mes ir nustatome dsDNR lygį mėginyje, kitaip sakant, pradžioje izoliuoto mRNR lygį mėginyje.

Kadangi į mėginius galėjo patekti mRNR iš nevienodo kiekio ląstelių, rezultatams vertinti taikytas lyginamasis fluorescencijos ribinių verčių (C_t) metodas, dar vadinamas $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu (2 pakeltas minus delta delta C_t laipsniu). PGR vyksta ciklais. Kiekvieno ciklo metu dsDNR kiekis padidėja dvigubai. Šiuo metodu, pirmiausia nustatoma dydis C_t . Jis parodo ties kuriuo ciklu dažo SYBR Green švytėjimo kreivė kirto ribinį slenkstį (13 pav.)



Pav.13 Polimerazės grandžių reakcijos ciklų ir švytėjimo grafikas. Kiekviena linija paveiksle reprezentuoja vieną mėginį. Kiekviena kreivė kerta slenkstį (horizontalus brūkšny) ties tam tikru ciklu. Ciklas kurio metu mėginio švytėjimo kreivė kiro slenkstį ir duoda C_t reikšmę. A pažymėti, su VEGF pradmenimis inkubuoti, mėginiai kerta slenkstį ties 20 ciklu. B pažymėti, non-RT PGR, neigiamos kontrolės mėginiai kerta slenkstį ties 30 ciklu.

Mėginių C_t reikšmės tiesiogiai lygintos nebuvo, nes mRNR izoliacijos metu mėginiuose galėjo būti nevienodas endotelocitų skaičius, tuo pačiu ir vėliau gautas cDNR kiekis, kaip minėta, per kiekvieną PGR ciklą dsDNR kiekis padvigubėja. Rezultatų lyginimui naudotas ΔC_t .

Šis dydis apskaičiuotas iš mėginio C_t atėmus konstitutyvinio(18s) geno C_t .

$$\Delta C_t = C_{t(\text{mėginio})} - C_{t(18s)}$$

Rezultatai tarp grupių lyginti naudojant formulę:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

čia $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{mėginio})} - \Delta C_{t(\text{kontrolės})}$. Naudojant šį būdą dydžiai išreiškiami santykiniais vienetais, o kontrolinė grupė prilyginama vienetai.

5.6. Angiogenezės etapų eksperimentai

5.6.1. Proliferacijos eksperimentas

Endotelio ląstelių proliferacija yra pirmasis angiogenezės žingsnis. Kadangi ląstelių gebėjimas dalytis yra ne tik angiogenezės etapas, bet ir bazinė ląstelių funkcija, todėl proliferacijos eksperimentas aptartas bazinių funkcijų skyrelyje – 5.2.1 Proliferacijos kreivių generavimas.

6.2. Migracijos eksperimentai

6.2.1. „Brėžio“ eksperimentas

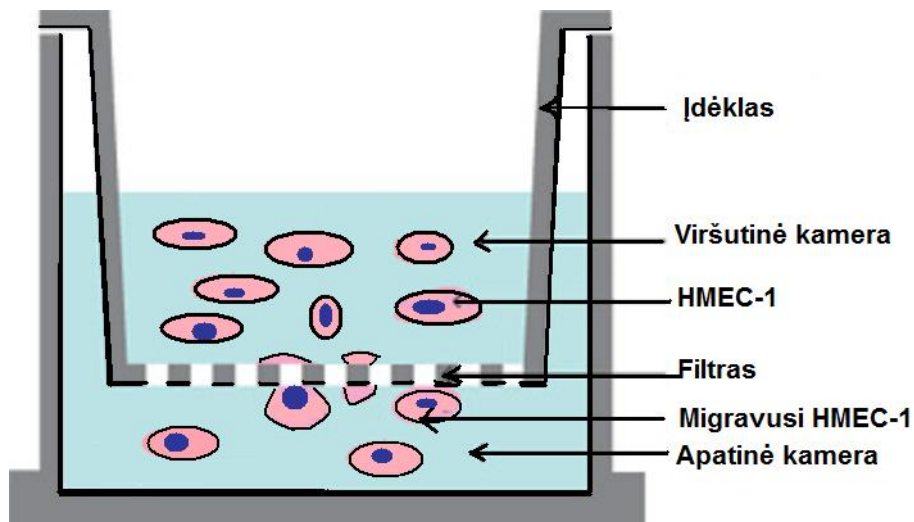
Šiame eksperimente ląstelės auginamos šešių šulinėlių lėkštelėse, kol lėkštelės dugnas visiškai pasidengs viengubu ląstelių sluoksniu. Tuomet ląstelių sluoksnyje, ant lėkštelės dugno, pipetės antgaliu padarytas brėžis. Taip suformuotas primityvus pjūvis (žaisda). Eksperimento esmė – skaičiuoti, ar su imatinibu kultivuotos ląstelės pjūvį padengs taip efektyviai, kaip ir ląstelės, kultivuotos tik terpėje. Atlikus brėžį, terpė pakeista, pridėta imatinibo mezilato.

Pradinis brėžis bei ląstelių judėjimas stebėti naudojant Spot Insight QE fotokamerą. Fotografuotapo 0, 24 ir 48 h trijuose, tuose pačiuose, kiekvieno mėginio taškuose. Atstumas tarp pjūvio kraštų buvo matuojamas nuotraukose

po 0 h, po 24 h paskaičiuota kiek ląstelės migravo pirmą eksperimento parą, po 48 h – antrą parą. Eksperimente naudotos HMEC-1 ląstelės inkubuotos su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0.1 iki 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Terpėje, be imatinibo, inkubuotos ląstelės naudotos kaip kontrolinė grupė.

6.2.2. Chemotaksio eksperimentas

Imatinibo mezilato poveikis chemotaksiui vertintas transšulinėlinio chemotaksio eksperimentuose. Eksperimente naudotos 24 šulinėlių lėkštelės, bei jų įdėklai su 8 μm porų polikarbonato filtrais. Įdėklai šulinėlį dalijo į dvi, viršutinę ir apatinę, kameras (14 pav.).



14 pav. Lėkštelės šulinėlis su įdėklu. Įdėklas šulinėlį dalija į dvi dalis. Į viršutinę dalį patalpintos HMEC-1 ląstelės dėl chemoatraktantų koncentracijų skirtumo viršutinėje ir apatinėje kameroje migruoja didesnės koncentracijos link.

24 h prieš eksperimentą endotelio ląstelės kultivuotos 0,1 % FCS turinčioje terpėje, siekiant sukelti „serumo alkį“. Atliekant eksperimentą apatinėje šulinėlio kameroje patalpinta terpė, turinti 30 % FCS, o viršutinėje – 0,1% FCS. Į viršutinę kamerą patalpintos $1,3 \times 10^4$ endotelio ląstelės. Šiuo atveju FCS koncentracijų skirtumas atliko chemoatraktanto vaidmenį ir vertė

ląsteles iš viršutinės kameros migruoti į apatinę. Eksperimente naudotos HMEC ląstelės inkubuotos su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0,1 iki 1,0 µg/ml). DMEM terpėje inkubuotos ląstelės naudotos kaip kontrolinė grupė. Ląstelėms leista migruoti 36 h. Apatinėse kamerose esantis (migravusių) ląstelių kiekis skaičiuotas naudojant FACSCalibur tėkmės citometrą.

6.3. *In vitro* kapiliarų morfogenezės eksperimentas

Siekiant įvertinti imatinibo mezilato efektą kapiliarų tubulių formavimui, buvo atlikti kapiliarų morfogenezės eksperimentai.

Eksperimentai atlikti ant medžiagos, labai primenančios kraujagyslės bazinę membraną – Matrigel'io (*BD Matrigel™*). BD Matrigel™ bazinės membranos matriksas yra tirpus bazinės membranos preparatas ekstraguotas iš *Engelbreth-Holm-Swarm*'o pelės sarkomos auglio, turtingo ekstraląstelinio matriksu baltymų: lamininas, kolagenas IV, heparanasulfato proteoglikanas. BD Matrigel™ savyje turi ir augimo faktorių: TGF-beta, epidermio augimo faktorių, į insuliną panašų (*insulin-like*) augimo faktorių, fibroblastų augimo faktorių ir kt.

Endotelio ląstelės, kultivuojamos ant BD Matrigel™ bazinės membranos matriksu, pradeda formuoti į kapiliarus panašias struktūras – tubules.

Eksperimente naudotos 24 šulinėlių lėkštelės. Lėkštelių dugnas buvo dengiamas Matrigel™. Į šulinėlį buvo patalpinta po 5×10^3 endotelio ląstelių. Eksperimente naudotos HMEC ląstelės inkubuotos su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0,1 iki 1,0 µg/ml). Terpėje, be imatinibo mezilato, inkubuotos ląstelės naudotos kaip kontrolinė grupė.

Tubulių formavimasis stebėtas naudojant Spot Insight QE fotokamerą. Fotografuota po 24 ir 48 h. Rezultatai vertinti skaičiuojant tubulių kiekį, šakotumą ir didžiausią ilgį fotografijose.

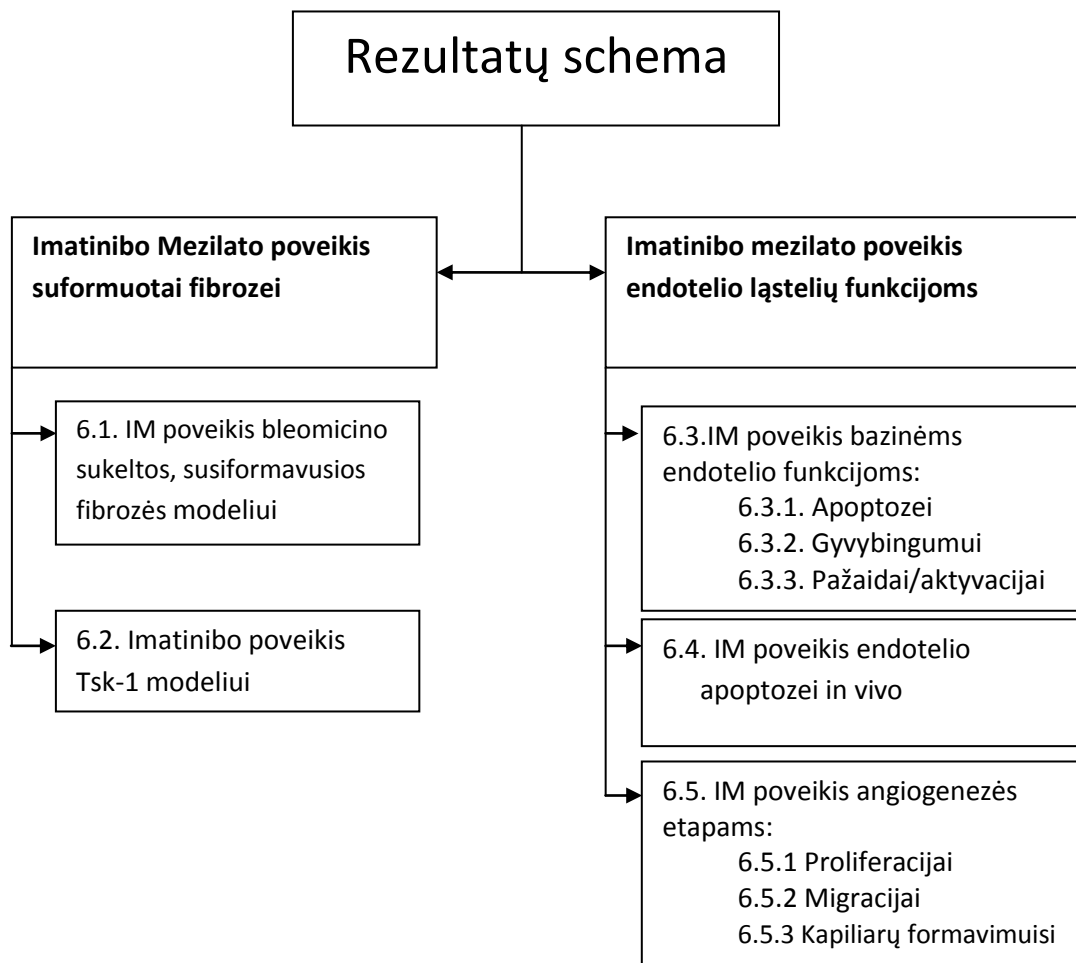
7. Statistika

Duomenys išreikšti, kaip vidurkis (\pm) standartinis nuokrypis(SD).

Patikimumo įvertis (P) laikomas statistiškai reikšmingu, kai $P \leq 0,05$. Statistinė analizė atlikta naudojant MedCalc 11.3.1.0 programinę įrangą.

Visus minėtus metodus įsisavinau ir eksperimentus atlikau asmeniškai.

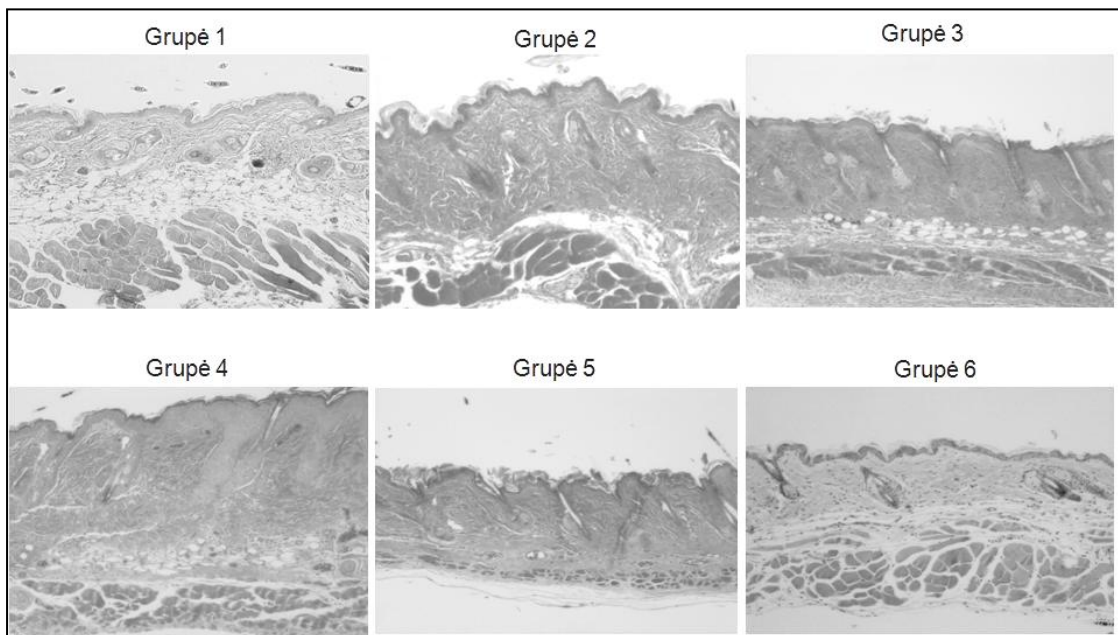
6. Rezultatai



6.1. Imatinibo mezilato poveikis bleomicino sukeltos suformuotos fibrozės modeliui

Nors fibrozės prevencija yra pagrindinis sisteminės sklerozės gydymo tikslas, tačiau klinikinėje praktikoje dažniausiai pasitaikantys atvejai jau turi daugiau ar mažiau išreikštą fibrozę. Todėl antifibroziniams preparatams keliami reikalavimai – sustabdyti fibrozės progresavimą ir paskatinti jau egzistuojančios regresavimą.

Imatinibo mezilato poveikis jau egzistuojančiai fibrozei vertintas modifikuotame bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje (9, 15 pav., 1 lentelė), naudojant histocheminius dažymo būdus.



Pav.15 Bleomicino sukeltos suformuotos odos fibrozės modelio kiekvieną grupę reprezentuojančios nuotraukos.

1 lentelė. Bleomicino sukeltos suformuotos odos fibrozės modelio įvairių grupių odos storis.

Pelės Nr.	NaCl 6 sav. (grupė 6)	Bleo 6sav. (grupė 4)	Bleo 6sav. +IM 3sav. (grupė 5)	NaCl 3sav. (grupė 1)	Bleo 3sav. (grupė 2)	Bleo 3sav. +NaCl 3sav. (grupė 3)
1	5,7	9,1	6,9	5,2	7,4	7,9
2	5,5	9,5	7,2	5,2	8,7	8
3	6,8	8	6	5,2	8,1	8,1
4	6,6	9,6	6	5,7	7,8	8
5	6,7	9	6,2	5	8,2	8
6	5,7	9,6	7,3	5,3	8,6	7,6
7	5,8	8,6	7,2	6,3	8,1	8,4
8	6,6	9,5	6,3	5,7	8,5	8
Vidurkis	6,18	9,11	6,64	5,45	8,18	8,00
SD	0,54	0,57	0,57	0,42	0,43	0,22

Lentelėje pateikti visų suformuotos fibrozės eksperimento grupių odos storiai. Mėginių odos storis vertintas mėginių fotografijose, pateiktas centimetrais. Pateikti mėginio odos storio vidurkiai. Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis.

SD – standartinis nuokrypis; Bleo – bleomicinas; NaCl – fiziologinis tirpalas; sav. – savaitė; IM – imatinibo mezilatas dozėmis 150 mg/kg/d

Suformuotos odos fibrozės modelyje stebėjome, kad po 3 savaičių bleomicino injekcijų, oda pastorėjo $50\% \pm 5,3\%$, palyginti su kontroline grupe, kuriai 3 savaites leista NaCl ($P < 0,0001$) (2 ir 1 lentelės, 15 pav.). Galima teigti, kad po 3 savaičių veikimo bleomicinu, odos fibrozė yra susiformavusi. Šis fibrozės lygis bus atskaitos taškas vertinant imatinibo mezilato poveikį suformuotai fibrozei – tokiai, kuri jau egzistavo prieš pradėdant gydyti imatinibu.

2 lentelė. Bleomicino per tris savaites sukeltas odos sustorėjimas.

Pelės Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	Procentai	SD%
NaCl 3sav. (grupė 1)	5,2	5,2	5,2	5,7	5	5,3	6,3	5,7	100%	7,78%
Bleo 3sav. (grupė 2)	7,4	8,7	8,1	7,8	8,2	8,6	8,1	8,5	150%	5,30%

Mėginių odos storis vertintas mėginio fotografijose, pateikta centimetrais.

Pateikti mėginio odos storio vidurkiai. Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis. 1 grupė – kontrolinė, jos odos storio vidurkis prilygintas 100%.

SD – standartinis nuokrypis; NaCl – fiziologinis tirpalas; Bleo – bleomicinas

Grupė pelių, gavusių imatinibo mezilatą, eksperimente dalyvavo iš viso 6 savaites. Norėdami įsitikinti, jog per 6 savaites nevyksta savaiminė fibrozės regresija, palyginome pelių, kurioms 3 savaites leistas bleomicinas ir pelių, kurioms 3 savaites leistas bleomicinu, bei kitas 3 savaites fiziologinis tirpalas, odų storius (3 lentelė). Skirtumo negavome ($P = 0,3595$). Iš to sprendėme, kad savaiminė odos fibrozės regresija, per 6 savaites nevyksta.

3 lentelė. Grupių pelių, gavusių 3 sav. bleomiciną ir 3sav. Bleomiciną + 3 sav. fiziologinį tirpalą, palyginimas.

Pelės Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	Procentai	SD%
Bleo 3sav.+NaCl 3sav. (grupė 3)	7,9	8	8,1	8	8	7,6	8,4	8	98%	2,75%
Bleo 3sav. (grupė 2)	7,4	8,7	8,1	7,8	8,2	8,6	8,1	8,5	100%	5,30%

Mėginių odos storis vertintas mėginio fotografijose, pateikta centimetrais.

Pateikti mėginio odos storio vidurkiai. Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis.

SD – standartinis nuokrypis; Bleo – bleomicinas;

NaCl – fiziologinis tirpalas; sav. – savaitė

Dėl tolimesnio bleomicino leidimo odos storis didėjo. Leidžiant bleomiciną dar 3 savaites (iš viso 6 savaitės) oda pastorėjo palyginti su kontroline, 6 savaites gavusia fiziologinio tirpalo, grupė (P < 0,0001) bei su 3 savaites bleomiciną gavusia grupe (P = 0,0025) (4 lentelė, 16 pav.). Tai rodo, jog ilgesnį laiką veikiant bleomicinu, odos storis didėja. Per 6 savaites susiformavęs odos storis bus atskaitos taškas vertinant imatinibo poveikį fibrozės progresijai.

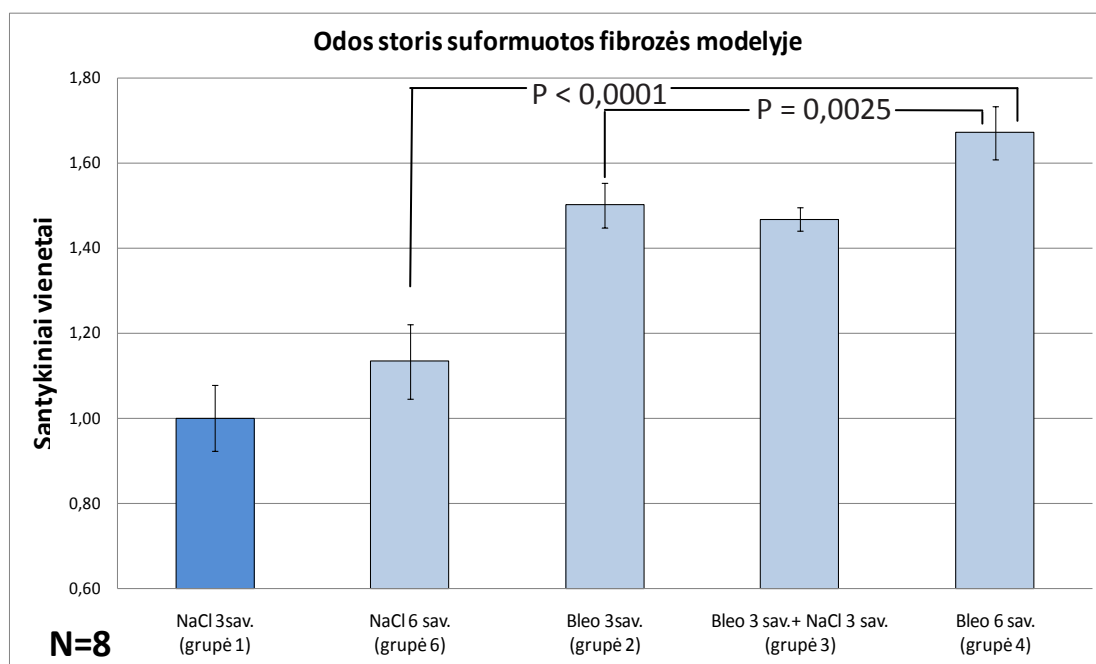
4lentelė. Grupių pelių, gavusių 6sav. bleomiciną ir 3 sav. bleomiciną + 3 sav. fiziologinį tirpalą ir kontrolinės grupės pelių, gavusių 6sav. fiziologinį tirpalą, palyginimas.

Pelės Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8		
Bleo 6sav. (grupė 4)	9,1	9,5	8	9,6	9	9,6	8,6	9,5	147,40%	111,40%
Bleo 3sav.+NaCl 3sav. (grupė 3)	7,9	8	8,1	8	8	7,6	8,4	8		100%
NaCl 6 sav. (grupė 6)	5,7	5,5	6,8	6,6	6,7	5,7	5,8	6,6	100%	

Mėginių odos storis, vertintas mėginio fotografijose, pateiktas centimetrais. Pateikti mėginio odos storio vidurkiai. Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis.

SD – standartinis nuokrypis; Bleo – bleomicinas;

NaCl – fiziologinis tirpalas; sav. - savaitė



16 pav. Odos storio didėjimas įvairiose suformuotos fibrozės eksperimento grupėse. Išreikšta santykiniais vienetais. Kontrolė – 3 savaites fiziologinį tirpalą gavusi grupė (prilyginta 1).

Pelių, paskutines 3 eksperimento savaites veiktų ir imatinibo mezilatu (5 grupė), oda buvo $27\% \pm 6\%$ plonesnė, nei pelių, 6 savaites veiktų tik bleomicinu (4 grupė) ($P < 0,0001$). Tai rodo, jog 3 savaitių gydymas imatinibu sustabdė tolesnę fibrozės progresiją.

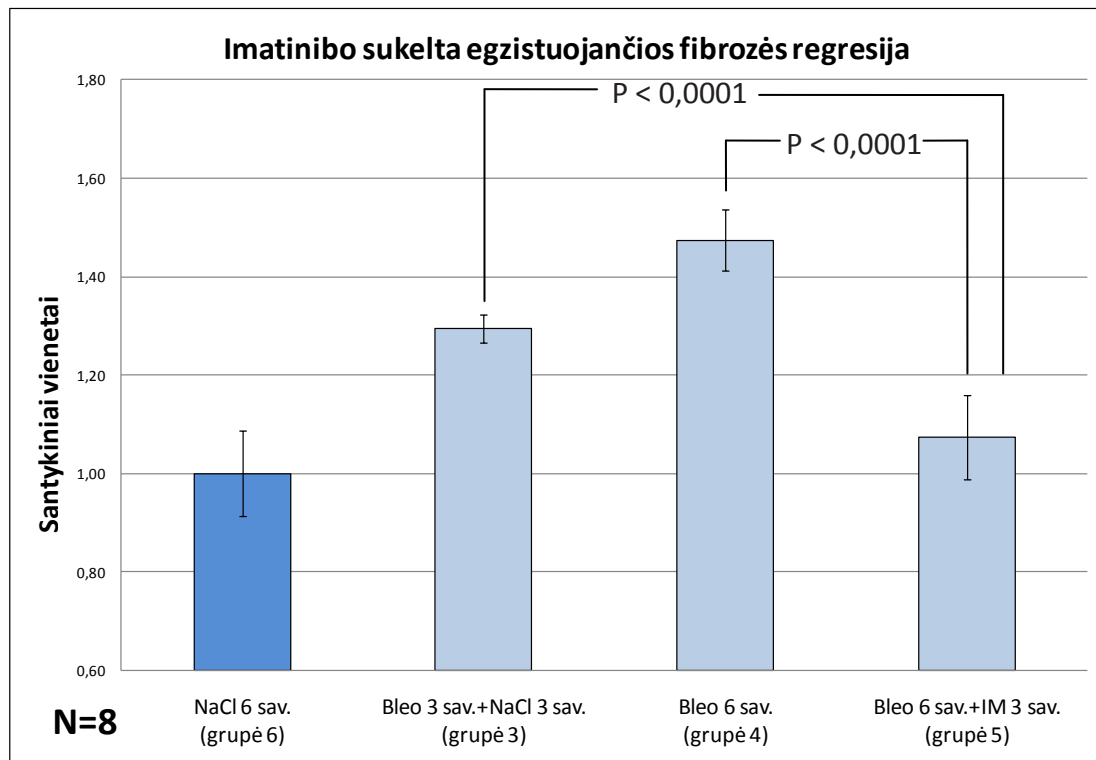
Pelių, 6 savaites veiktų bleomicinu ir 3 paskutines savaites imatinibo mezilatu (5 grupė), oda buvo taip pat plonesnė nei pelių, 3 savaites veiktų bleomicinu (3 grupė) ($P < 0,0001$) (5 lentelė ir 17 pav.). Tai rodo, kad 3 savaites gydant imatinibu odos storis regresavo žemiau pradinio (to momento, kai pradėtas leisti imatinibas) lygio.

5 lentelė. Odos storio regresija veikiant imatinibu.

Pelės Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	Vidurkis	SD
Bleo 3sav. (grupė 2)	7,4	8,7	8,1	7,8	8,2	8,6	8,1	8,5	8,18	0,43
Bleo 6sav. (grupė 4)	9,1	9,5	8	9,6	9	9,6	8,6	9,5	9,11	0,57
Bleo 6sav.+IM 3sav. (grupė 5)	6,9	7,2	6	6	6,2	7,3	7,2	6,3	6,64	0,57

Lentelėje pateiktas pelių, 3 ir 6 savaites veiktų tik bleomicinu, bei pelių, 6 savaites veiktų bleomicinu ir 3 paskutines savaites imatinibu, odos storiai. Mėginių odos storis, vertintas mėginio fotografijose, pateiktas centimetrais. Pateikti mėginio odos storio vidurkiai. Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis.

SD – standartinis nuokrypis; Bleo – bleomicinas; NaCl – fiziologinis tirpalas; sav. – savaitė; IM – imatinibo mezilatas (dozė 150 mg/kg/d).

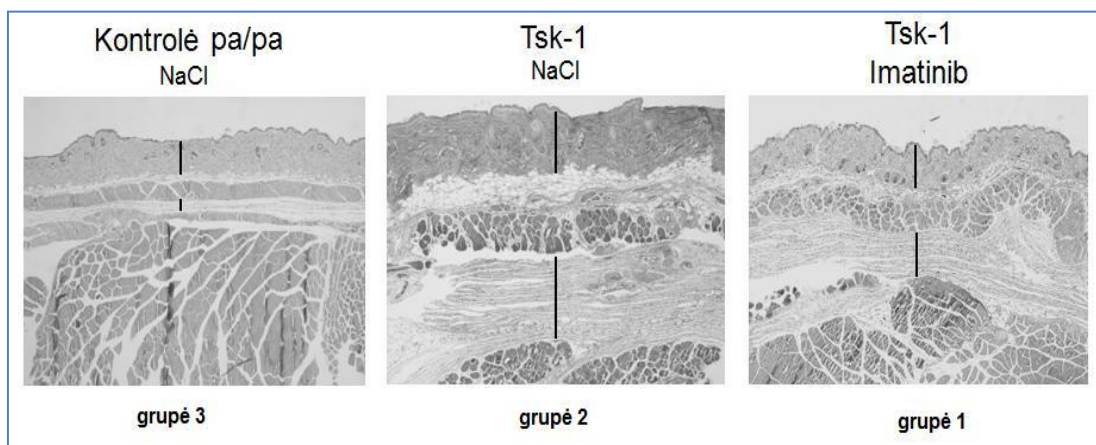


17 pav. Odos storio regresija žemiau pradinės-suformuotos fibrozės lygio. Išreikšta santykiniais vienetais. Kontrolinė – 3 sav. fiziologinį tirpalą gavusi grupė (prilyginta 1).

Iš odos tyrimų histocheminiu metodu matyti, kad Imatinibo mezilatas ne tik sustabdė fibrozės vystymąsi Bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje, bet ir paskatino jau egzistuojančios fibrozės regresiją.

6.2. Imatinibo mezilato poveikis Tsk-1 mutacijos odos fibrozės modeliui

Tyrime siekta įvertinti imatinibo mezilato efektyvumą ir nuo uždegimo nepriklausomame suformuotos odos fibrozės modelyje *in vivo*. Todėl buvo vertintas imatinibo poveikis fibrilino-1 heterozigotinę mutaciją turinčioms – Tsk-1 pelėms. (11, 18 pav. ir 6 lentelė).



18 pav. Eksperimentinio Tsk-1 mutacijos modelio, kiekvienos grupės reprezentatyvios nuotraukos, atspindinčios odos ir poodžio fibrozę. (odos ir poodžio storis pažymėtas vertikaliomis linijomis).

6 lentelė. Visų Tsk-1 mutacijos eksperimento grupių, pelių odos storis.

Pelės Nr.	pa/pa (grupė 3)	Tsk-1 (grupė 2)	Tsk-1 + IM (grupė 1)
1	8,1	12,1	7,9
2	6,8	10,4	6,5
3	8,1	10,6	6,9
4	7,3	10,1	6,7
5	7,5	10,2	7,8
6	8,2	10,7	6,6
7	8,7	10,6	7,3
8	6,8	10,8	8,3
Vidurkis	7,7	10,7	7,2
SD	0,69	0,63	0,69

Mėginių odos storis, vertintas mėginio fotografijose, pateiktas centimetrais. Pateikti mėginio odos storio vidurkiai. Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis.

SD – standartinis nuokrypis; IM – imatinibo mezilatas (dozė 150 mg/kg/d)

Tsk-1 mutaciją turinčių pelių odos storis yra 39 % didesnis nei šios mutacijos neturinčių pa/pa pelių ($P < 0,0001$) (Lentelė 6 ir 7).

Lentelė 7 Tsk-1 mutacijos sąlygotas odos sustorėjimas. Tsk-1 ir pa/pa pelių odos storio palyginimas (%). Kontrolinės grupės pelių odos storio vidurkis 100%. SD – standartinis nuokrypis.

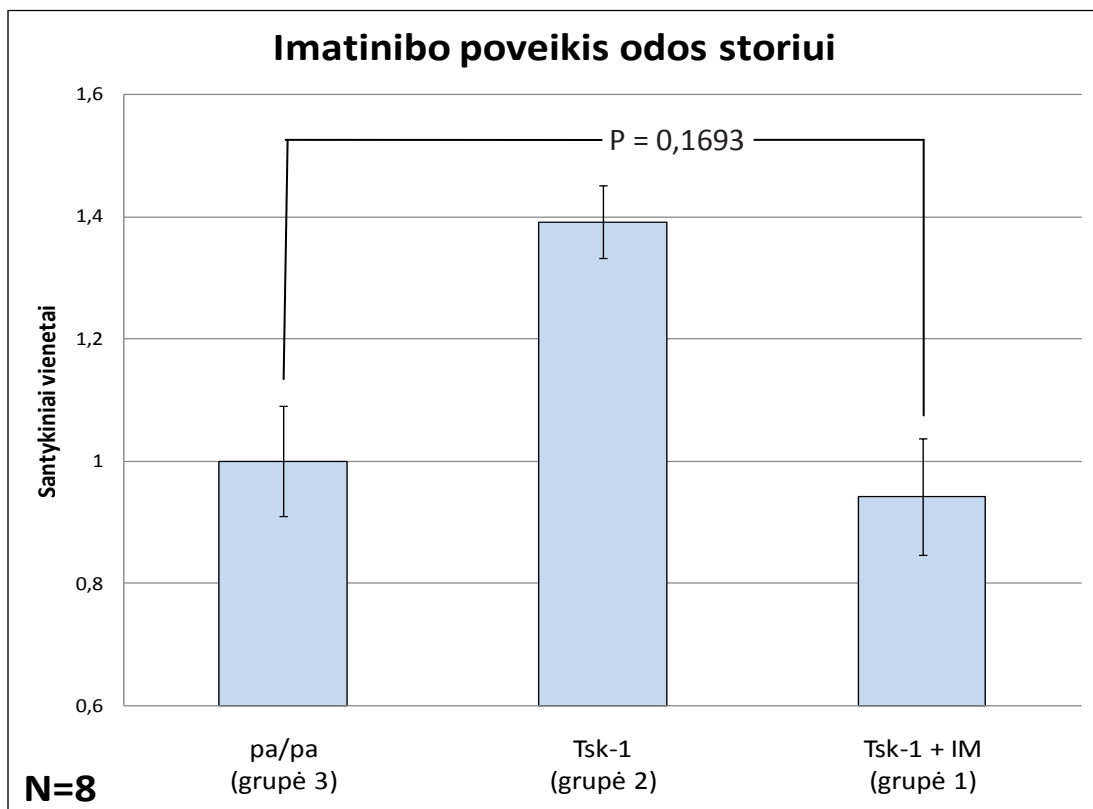
Mėginio Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	Odos storis	SD
pa/pa	1,05	0,88	1,06	0,95	0,97	1,06	1,13	0,89	100%	±9%
Tsk-1	1,58	1,36	1,38	1,31	1,33	1,39	1,38	1,41	139%	±8%

Dėl imatinibo mezilato poveikio Tsk-1 pelių odos storis sumažėjo iki normalaus lygio ir nesiskyrė nuo kontrolinės grupės pelių ($P = 0,1693$) (8,6, lentelė ir 19 pav.).

8 lentelė. Imatinibo poveikis Tsk-1 mutacijos sukeltam odos storiui. Tsk-1, veiktų imatinibo mezilatu ir pa/pa pelių odos storiai(%). Kontrolinės grupės pelių odos storio vidurkis – 100%.

Pelės Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	Odos storis	SD
pa/pa (grupė 3)	1,05	0,88	1,06	0,95	0,97	1,06	1,13	0,89	100%	±9%
Tsk-1+IM (grupė 1)	1,03	0,84	0,90	0,87	1,02	0,86	0,94	1,08	93%	±9%

IM – imatinibo mezilatas (dozė 150 mg/kg/d); Tsk-1 – fibrilino-1 mutaciją turinčios pelės.



19 Pav. Odos storio regresija iki normalaus lygio. Išreikšta santykiniais vienetais. Kontrolinė pa/pa grupė prilyginta 1.

Tsk-1 pelėms būdingas padidėjęs ne tik odos, bet ir poodžio storis. Poodis ryškiai išstorėjęs ir tvirtai suaugęs su poodiniu bei gilioju raumenų sluoksniais. Tai aiškiai matyti reprezentatyviose nuotraukose (poodžio storis pažymėtas vertikaliu brūkšniu) palyginus, Tsk-1 mutaciją turinčių (2 grupės) ir kontrolinės grupės pelių poodžio storį, bei atlikus poodžio storio matavimus (18 pav., 9 lentelė).

9 lentelė. Visų Tsk-1 mutacijos eksperimento grupių pelių poodžio storis.

Pelės Nr.	pa/pa (grupė 3)	Tsk-1 (grupė 2)	Tsk-1 + IM (grupė 1)
1	1,7	4,3	2,7
2	1,9	4,6	3,0
3	1,9	5,2	3,6
4	1,9	5,1	2,5
5	1,3	4,1	2,5
6	1,7	5,5	2,6
7	1,3	4,8	2,9
8	1,6	4,6	2,7
Vidurkis	1,65	4,77	2,81
SD	0,24	0,46	0,36

Mėginių odos storis, vertintas mėginio fotografijose, pateiktas centimetrais.

Pateikti mėginio odos storio vidurkiai. Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis.

SD – standartinis nuokrypis; Tsk-1 – fibrilino-1 mutaciją turinčios pelės

IM – imatinibo mezilatas (dozė 150 mg/kg/d).

Tsk-1 pelių poodis yra 190 % didesnis nei mutacijos neturinčių pa/pa pelių ($P < 0,0001$) (10 lentelė).

10 lentelė. Tsk-1 mutacijos sukeltas poodžio sustorėjimas Tsk-1 ir pa/pa pelių poodžio storis(%). Kontrolinės grupės (pa/pa) vidurkis prilygintas 100 %.

Pelės Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	Vidurkis	SD
pa/pa (grupė 3)	103	115	113	112	79	100	79	97	100%	±14%
Tsk-1 (grupė 2)	261	279	314	310	249	331	292	279	290%	±9,6%

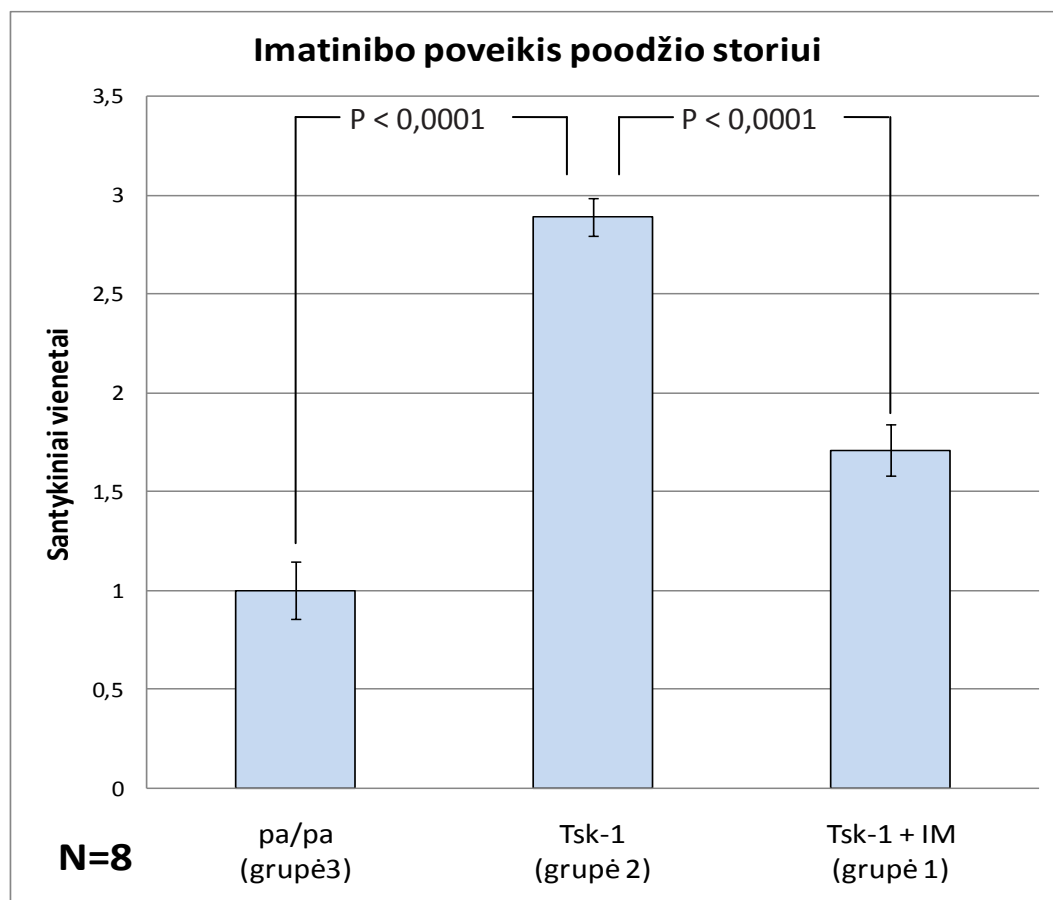
SD – standartinis nuokrypis; Tsk-1 – fibrilino-1 mutaciją turinčios pelės.

Tsk-1 pelių poodžio storis veikiant imatinibo mezilatui sumažėjo 41% (P<0,0001) (lentelė11, pav.20).

11 lentelė. Imatinibo mezilato poveikis Tsk-1 mutacijos sukeltam poodžio sustorėjimui. Tsk-1 pelių ir Tsk-1 pelių, veiktų imatinibo mezilatu, poodžio storis(%). Tsk-1 pelių poodžio storio vidurkis prilygintas 100 %.

Pelės Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	Vidurkis	SD
Tsk-1 (grupė 2)	90,23	96,52	108,59	107,02	86,03	114,36	100,72	96,52	100%	9,60%
Tsk-1 + IM (grupė 1)	56,66	62,60	76,07	52,81	52,98	54,30	59,80	57,18	59%	7,66%

Tsk-1 – fibrilino-1 mutaciją turinčios pelės; IM – imatinibo mezilatas (dozė 150mg/kg/d).



20 pav. Poodžio regresija imatinibo poveikyje. Išreikšta santykiniais vienetais. Kontrolinė pa/pa grupė prilyginta 1.

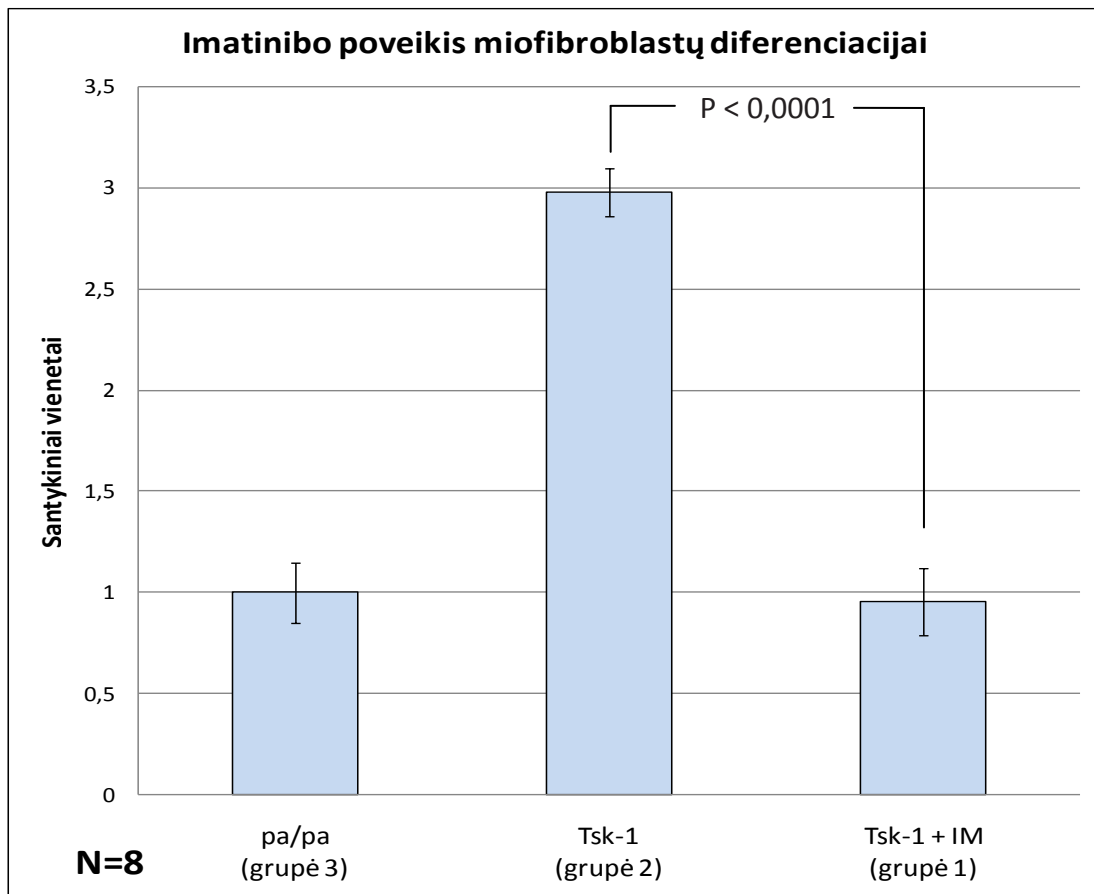
Miofibroblastai – pagrindinės efektorinės, fibrogenezės procese dalyvaujantios, ląstelės. Tai iš fibroblastų besidiferencijuojantios ląstelės, esančios fibrogenezės židiniuose. Imatinibo mezilatas ryškiai sumažino fibroblastų diferenciaciją į miofibroblastus Tsk-1 pelėse (P < 0,0001 2 grupė vs. 1 grupė) (12 lentelė, 21 pav.).

12 lentelė. Imatinibo mezilato poveikis miofibroblastų skaičiui.

Pelės Nr.	pa/pa (grupė 3)	Tsk-1 (grupė 2)	Tsk-1 + IM (grupė 1)
1	1,7	4,3	1,3
2	1,3	5,3	1,3
3	1,3	4,3	1,3
4	1,3	3,8	1,5
5	1,3	3,8	1,0
6	1,8	4,0	1,8
7	1,3	3,8	1,3
8	1,4	4,1	1,3
Vidurkis	1,4	4,1	1,3
SD	0,21	0,50	0,22

Pateiktas miofibroblastų skaičius Tsk-1, pa/pa ir imatinibu veiktų Tsk-1 pelių odos pjūviuose. Miofibroblastai skaičiuoti kiekvieno mėginio pjūvio trijose nuotraukose. Lentelėje pateikti mėginio odos pjūvio miofibroblastų skaičiaus vidurkiai.

Tsk-1 – fibrilino-1 mutaciją turinčios pelės; IM – imatinibo mezilatas (dozė 150 mg/kg/d).



Pav.21 Miofibroblastų skaičius Tsk-1, pa/pa ir imatinibu veiktų Tsk-1 pelių odos pjūviuose, santykiniais vienetais. Kontrolinės grupės (pa/pa) miofibroblastų skaičius prilygintas 1.

Fibrilino-1 mutaciją turinčių Tsk-1 pelių odos tyrimai histochemijos ir imunohistochemijos (dažant prieš alfa-SMA) metodais rodo, kad imatinibo mezilatas ryškiai sumažino poodžio storį, visiškai normalizavo Tsk-1 pelių odos storį, taip pat normalizavo fibroblastų diferenciaciją į miofibroblastus.

6.3. Imatinibo mezilato poveikis bazinėms endotelio funkcijoms

6.3.1. Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelių apoptozei *in vitro*

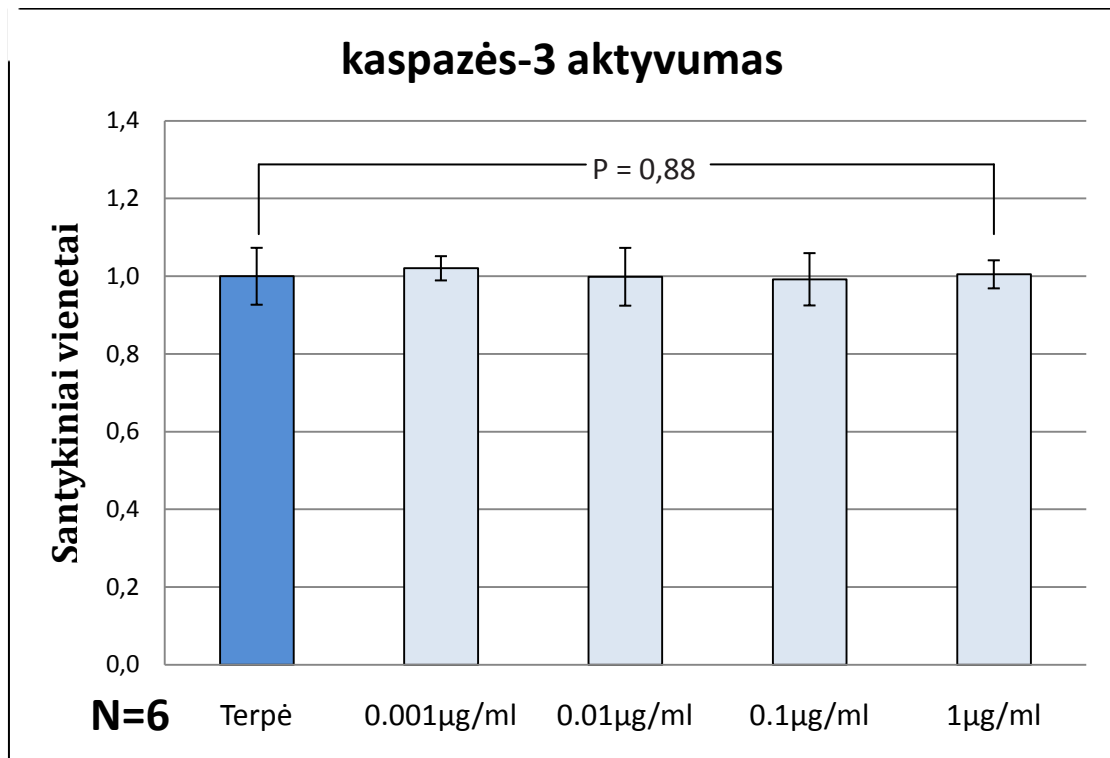
Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelių apoptozei buvo analizuotas kaspazės-3 aktyvumo kiekybinio vertinimo ir dažymo aneksinu-5 tyrimuose.

Po 24 h trukusios endotelio ląstelių inkubacijos su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0.001 iki 1.0µg/ml), kaspazės-3 aktyvumo pokyčiai, palyginti su kontroline grupe, fiksuoti nebuvo (P=0,88 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę), o DMSO paveiktų, jau žuvusių, ląstelių grupėje kaspazės-3 aktyvumas buvo kur kas mažesnis (13 lentelė ir 22 pav.).

13 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka kaspazės-3 aktyvumui endotelio ląstelėse optiniais vienetais.

Mėginio Nr.	Kontrolė		Imatinibo mezilato koncentracija			
	DMSO	Terpė	0.001µg/ml	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml
1	1857	41375	41043	42647	37441	38683
2	1997	39476	39824	36544	34858	37874
3	2172	34085	39991	35775	41128	40673
4	2215	41222	37684	36998	36555	40128
5	1986	39847	38687	41862	39754	36989
6	2125	36778	40335	38652	41235	39589
Vidurkis	2059	38797	39594	38746	38495	38989
SD	135	2841	1211	2887	2613	1402

SD – standartinis nuokrypis, DMSO – dimetilsulfoksidas .



22 pav. Įvairių koncentracijų imatinibo mezilato įtaka kaspazės-3 aktyvumui endotelio ląstelėse (santykiniais vienetais), palyginti su kontroline grupe.

Fermento kaspazės-3 aktyvumas rodo apoptozės iniciaciją, pačią pradžią.

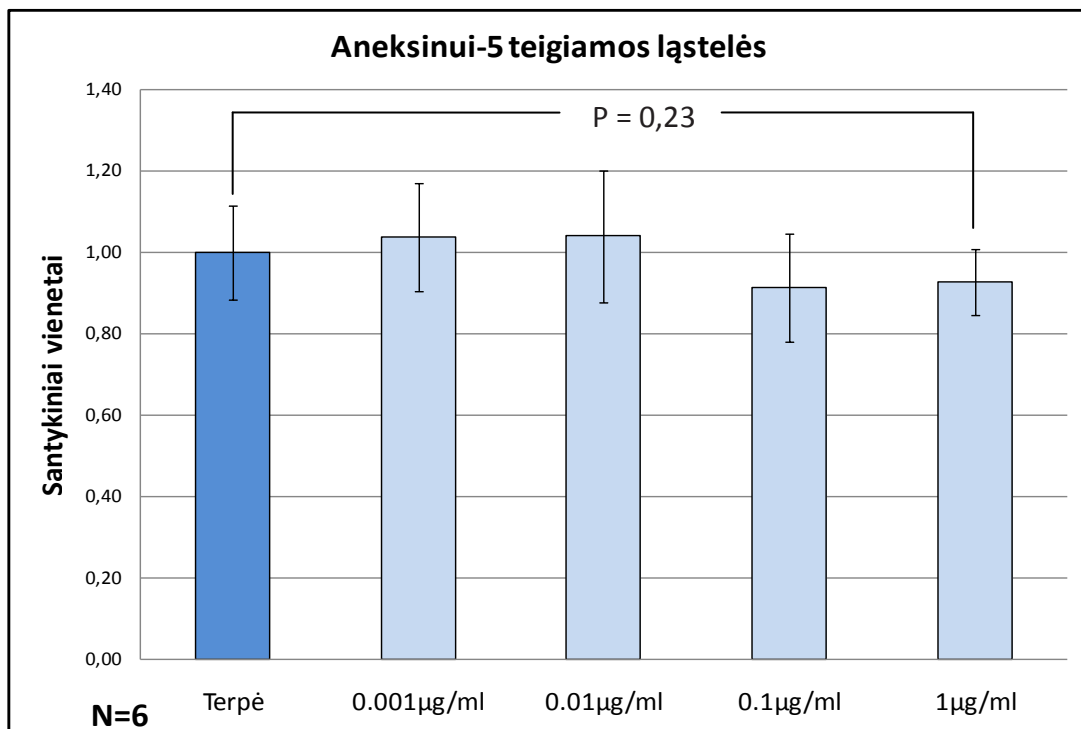
Imatinibas galėtų inicijuoti apoptozę gana staiga, tuomet per keliolika valandų turėtume visiškai apoptavusias ląsteles. Todėl atlikti ir aneksino-5 tyrimai, kurie atspindi jau pažengusią apoptozę.

HMEC-1 24 h inkubacija su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0.001 iki 1.0 μg/ml), nepadidino aneksinui V teigiamų ląstelių skaičiaus, palyginti su kontroline grupe – tik terpėje inkubuotomis ląstelėmis (P=0,23 kontrolinė vs. 1.0 μg/ml grupę) (14 lentelė, 23 pav.). Su DMSO inkubuotų ląstelių grupėje, aneksinui teigiamų ląstelių skaičius buvo gerokai didesnis.

14 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka aneksinui V teigiamų endotelio ląstelių skaičiui. Rezultatai išreikšti aneksinui V teigiamų ląstelių procentais nuo viso mėginio ląstelių skaičiaus

Mėginio Nr.	Kontrolinė grupė		Imatinibo mezilato koncentracija			
	DMSO	Terpė	0.001µg/ml	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml
1	31,39	3,24	4,49	5,14	4,15	4,02
2	35,71	3,69	4,54	4,31	4,21	3,82
3	34,12	4,60	3,32	3,63	3,05	3,58
4	42,97	3,99	4,07	3,70	3,04	3,86
5	37,47	3,93	3,60	4,36	3,39	3,50
6	32,07	4,18	4,49	3,43	3,74	3,14
Vidurkis	35,62	3,94	4,09	4,10	3,60	3,65
SD	4,25	0,46	0,52	0,64	0,52	0,32

SD – standartinis nukrypis, DMSO – dimetilsulfoksidas .



23 pav. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka aneksinui V teigiamų endotelio ląstelių skaičiui santykiniais vienetais, palyginti su kontroline grupe.

Iš tyrimų kaspazės-3 aktyvumo ir aneksino V metodu duomenų matyti, kad terapinės imatinibo mezilato koncentracijos neinicijavo apoptozės endotelio ląstelėse *in vitro*.

6.3.2. Imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių gyvybingumui

Potencialus imatinibo mezilato efektas endotelio ląstelių metaboliniam aktyvumui ir proliferacijai vertintas MTT eksperimentuose ir generuojant augimo kreives.

Tyrimas MTT metodu atspindi ląstelių mitochondrijų fermentinį aktyvumą. MTT eksperimente endotelio ląstelių, kultivuotų 24 ir 96h su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0.001 iki 1.0 µg/ml). metabolinis aktyvumas išliko kaip ir kontrolinės grupės (po 24h P=0,7 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę ir po 96h P=0,8 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę) (15 ir 16 lentelės).

15 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka MTT skaidymui endotelio ląstelėse, inkubuojant 24h, optiniais vienetais.

Mėginio Nr.	Kontrolinė grupė		24h inkubacija su imatinibu			
	DMSO	Terpė	0,001µg/ml	0,01µg/ml	0,1µg/ml	1µg/ml
1	0,042	0,101	0,116	0,132	0,110	0,115
2	0,042	0,112	0,108	0,102	0,107	0,122
3	0,042	0,115	0,094	0,095	0,096	0,107
4	0,041	0,124	0,105	0,093	0,092	0,090
5	0,047	0,096	0,094	0,090	0,093	0,097
6	0,046	0,067	0,098	0,098	0,094	0,091
7	0,048	0,076	0,071	0,090	0,080	0,094
8	0,042	0,095	0,088	0,108	0,086	0,102
9	0,043	0,086	0,071	0,094	0,074	0,088
10	0,045	0,093	0,093	0,066	0,096	0,083
11	0,046	0,079	0,070	0,083	0,094	0,088
12	0,045	0,091	0,072	0,070	0,086	0,087
13	0,045	0,076	0,095	0,095	0,091	0,072
14	0,042	0,120	0,106	0,093	0,097	0,095
15	0,042	0,102	0,100	0,093	0,100	0,088
16	0,041	0,108	0,103	0,090	0,102	0,087
Vidurkis	0,044	0,096	0,093	0,093	0,094	0,094
SD	0,002	0,017	0,015	0,015	0,009	0,012

SD – standartinis nuokrypis, DMSO – dimetilsulfoksidas ,

MTT – [3, (4,5-dimethyl thiazolyl -2) 2,5-diphenil-tetrazolio bromidas].

16 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka MTT skaidymui endotelio ląstelėse, inkubuojant 96 h, optiniais vienetais.

Mėginio Nr.	Kontrolinė grupė		96h inkubacija su imatinibu			
	DMSO	Terpė	0,001µg/ml	0,01µg/ml	0,1µg/ml	1µg/ml
1	0,031	0,102	0,106	0,104	0,096	0,102
2	0,031	0,123	0,110	0,097	0,091	0,089
3	0,036	0,106	0,104	0,099	0,100	0,094
4	0,044	0,090	0,089	0,086	0,077	0,099
5	0,034	0,088	0,070	0,083	0,092	0,085
6	0,043	0,082	0,086	0,086	0,080	0,091
7	0,037	0,094	0,111	0,101	0,097	0,102
8	0,039	0,125	0,119	0,100	0,106	0,107
9	0,037	0,098	0,104	0,088	0,091	0,097
10	0,036	0,096	0,087	0,081	0,077	0,087
11	0,034	0,093	0,089	0,094	0,104	0,113
12	0,043	0,093	0,071	0,080	0,084	0,073
13	0,034	0,087	0,071	0,084	0,084	0,080
14	0,032	0,100	0,111	0,099	0,094	0,112
15	0,033	0,090	0,117	0,096	0,102	0,101
16	0,032	0,105	0,101	0,090	0,099	0,116
Vidurkis	0,036	0,098	0,097	0,092	0,092	0,097
SD	0,004	0,012	0,016	0,008	0,009	0,012

SD – standartinis nuokrypis, DMSO – dimetilsulfoksidas ,

MTT – [3, (4,5-dimethyl thiazolyl -2) 2,5-diphenil-tetrazolio bromidas].

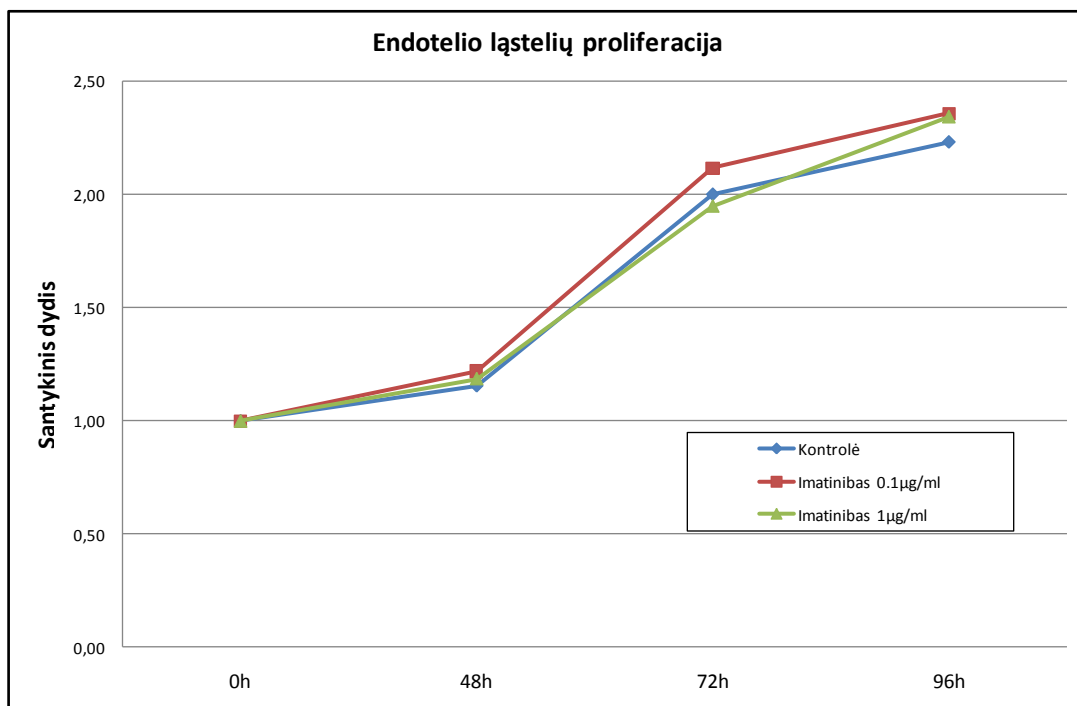
Tai, jog endotelio mitochondrijų aktyvumas išliko nepakitęs rodo, kad imatinibas nesukelė nei ūmaus (per 24 h), nei lėtinio (per 96 h) toksiškumo.

Inkubuojant endotelio ląsteles su imatinibo mezilatu (koncentracijos nuo 0,1 iki 1,0µg/ml) iki 96 h ląstelių proliferacijos inhibicijos nenustatyta (17 lentelė, 24 pav.).

17 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių proliferacijai inkubuojant iki 96 h, išreikšta absoliučiu ląstelių skaičiumi mėginyje.

Mėginio Nr.	48h inkubacija su IM			72h inkubacija su IM			96h inkubacija su IM		
	Terpė	0.1µg/ml	1µg/ml	Terpė	0.1µg/ml	1µg/ml	Terpė	0.1µg/ml	1µg/ml
1	13795	17343	16745	29683	29051	25566	27936	29047	39542
2	16204	16967	13496	27233	27638	27213	34200	38580	35574
3	14754	15425	17024	23346	23772	22872	25112	31418	29163
4	15245	13807	15399	23736	27038	20748	28750	31168	26723
5	14956	15569	14932	27053	27886	26747	28985	22017	24238
6	15156	16056	15009	24946	29733	28893	29014	31824	27535
Vidurkis	15018	15861	15434	26000	27520	25340	29000	30676	30463
SD	781	1261	1299	2428	2082	3011	2945	5333	5858

SD – standartinis nukrypis, IM – imatinibo mezilatas.



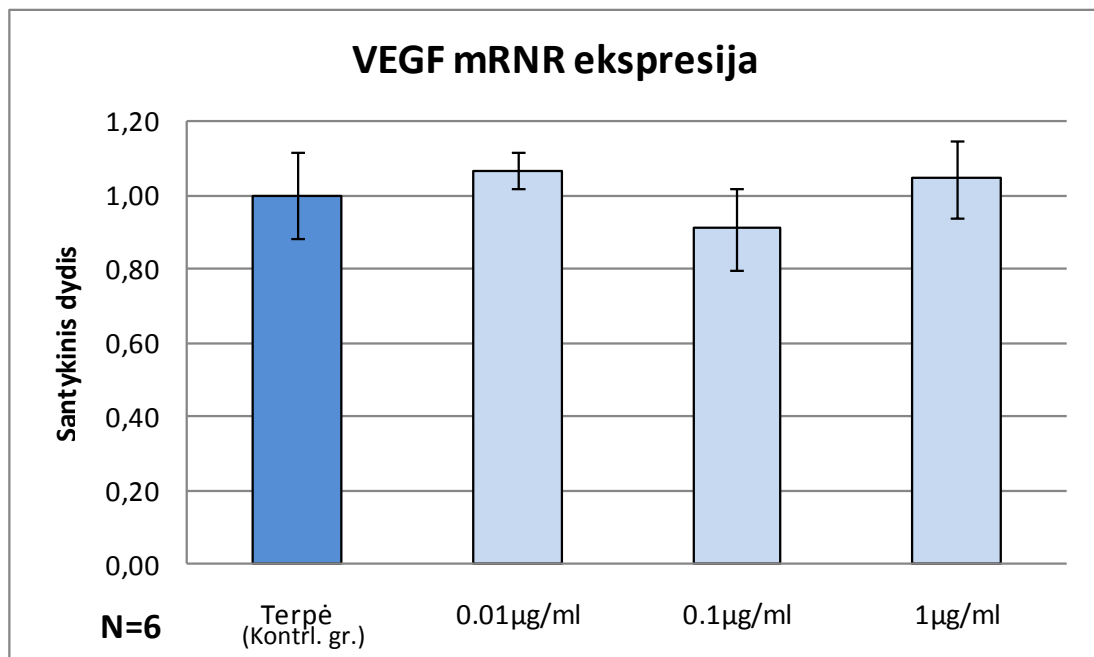
24 pav. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių proliferacijai santykiniais vienetais. Lyginta su pradiniu ląstelių skaičiumi.

Iš MTT eksperimentų ir augimo kreivių duomenų matyti, kad terapinės imatinibo mezilato koncentracijos nedarė neigiamo poveikio endotelio metabolizmo aktyvumui, bei proliferacijai *in vitro*.

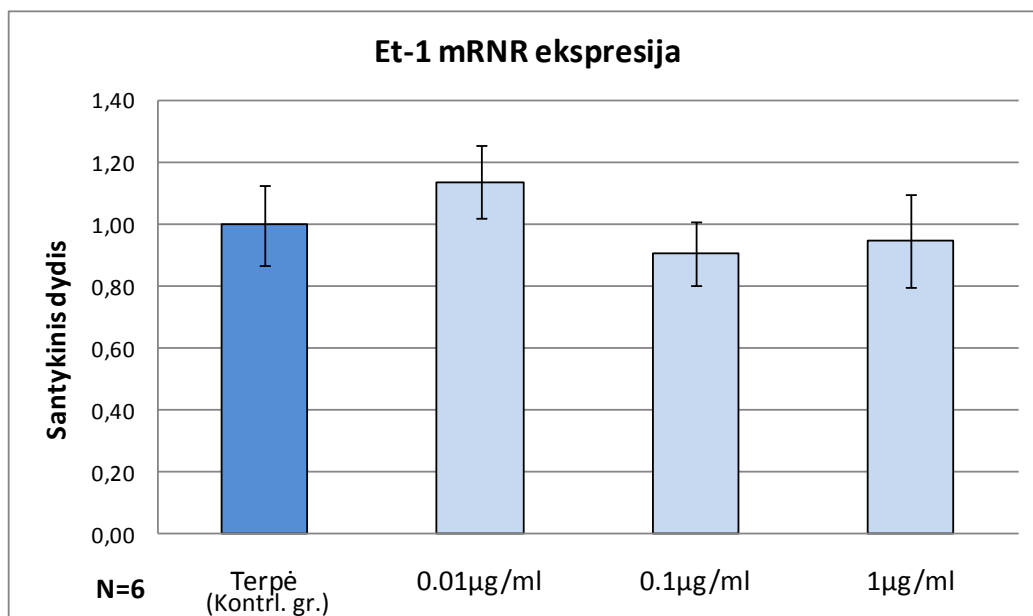
6.3.3 Imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių aktyvacijos bei pažeidimo žymenų sintezei

ICAM-1, VCAM-1, endotelinas-1 bei VEGF ekspresuojami endotelio ląstelėse sisteminės sklerozės metu ir yra klasikiniai endotelio aktyvacijos bei pažeidimo žymenys. HMEC inkubacija su imatinibo mezilatu nepaveikė ICAM-1, VCAM-1, endotelino-1 ir VEGF mRNR ekspresijos (25, 26, 27, 28 pav.).

Aktyvacijos bei pažeidimo žymenų ekspresija vertinta mRNR lygiu, polimerazės grandžių reakcijos metodu.

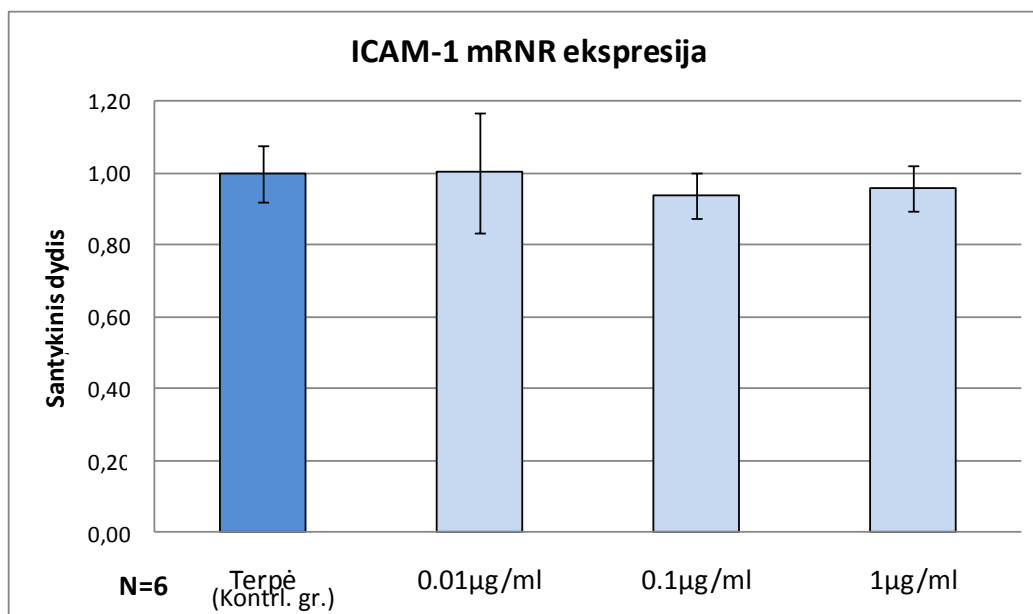


25 pav. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka VEGF mRNR ekspresijai endotelio ląstelėse, palyginti su kontroline grupe. (P=0,45 kontrolinė vs. 1,0 μg/ml grupę).

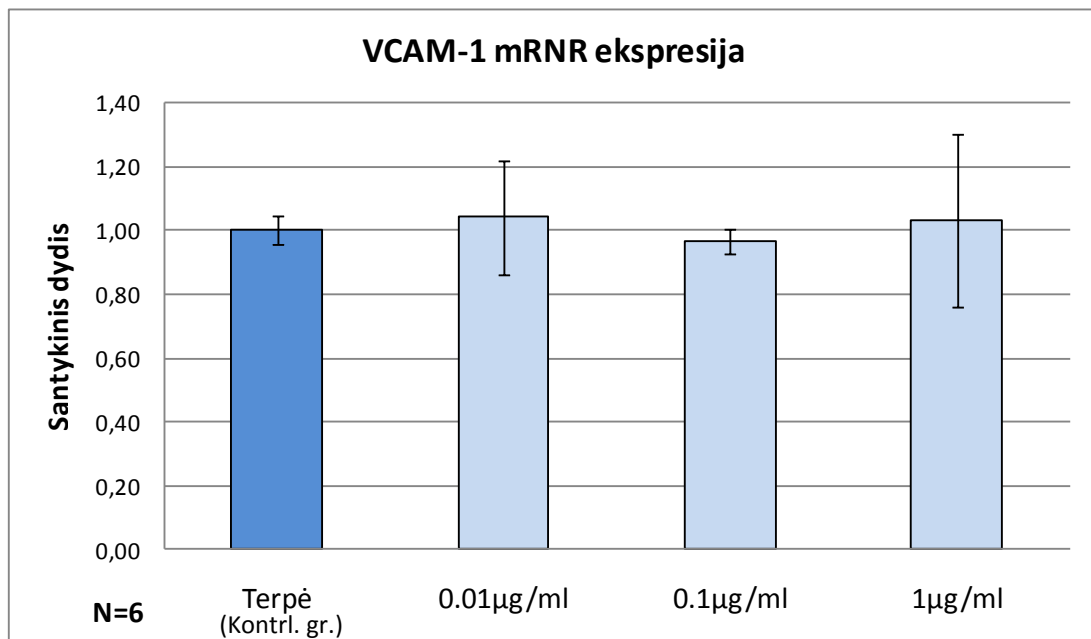


26 pav. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka Et-1 mRNR ekspresijai endotelio ląstelėse, palyginti su kontroline grupe. (P=0,35 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę).

Tai, jog imatinibo mezilatas neinicijavo suintensyvėjusios VEGF ir endotelino-1 mRNR sintezės, rodo, kad imatinibas nedaro poveikio vaskulinėms endotelio funkcijoms, tokioms kaip vazokonstrikcija, angiogenezės iniciacija, apoptozė.



27 pav. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka ICAM-1 mRNR ekspresijai endotelio ląstelėse, palyginti su kontroline grupe. (P=0,55 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę).



28 pav. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka VCAM-1 mRNR ekspresijai endotelio ląstelėse, palyginti su kontroline grupe. (P=0,79 kontrolinė vs. 1.0µg/ml grupę).

Imatinibo mezilatas neinicijavo adhezijos molekulių ICAM-1 ir VCAM-1 mRNR sintezės. Tai rodo, jog imatinibas nedaro poveikio prouždegiminėms endotelio funkcijoms.

Polimerazės grandžių reakcijos eksperimentų duomenys rodo, kad imatinibo mezilatas nesukelia endotelio aktyvacijos ar pažeidimo.

6.4. Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelių apoptozei

eksperimentinės odos fibrozės modelyje *in vivo*

Imatinibo mezilato poveikį endotelio ląstelių apoptozei *in vivo*, fibrozės sąlygomis vertinome bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje.

Eksperimente naudoti bleomicino sukeltos odos fibrozės modelio pelių odos mėginiai (bet ne bleomicino sukeltos *suformuotos* fibrozės). Apoptozinių ląstelių kiekis vertintas TUNEL metodu (29 pav.). Pelių, neveiktų bleomicinu (sveikų), odoje apoptozinių ląstelių buvo mažiau nei bleomicino sukeltos odos fibrozės modelio pelėse, todėl tarpusavyje lygintos tik bleomicinu veiktų pelių grupės. Pelių, veiktų bleomicinu ir imatinibo mezilatu (dozės 50 mg/kg/d ir 150 mg/kg/d), bei kontrolinės (Bleo) grupės pelių odoje buvo vienodas kiekis apoptozinių endotelio ląstelių (P=1 1 grupė vs. 1,0µg/ml 3 grupė) (18 lentelė).

18 lentelė. Įvairių imatinibo mezilato dozių įtaka apoptozinių endotelio ląstelių skaičiui, eksperimentinės bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje *in vivo*. Pateikiami vienos pelės (trijų pjūvių) apoptotinių endotelio ląstelių skaičiaus, matomo nuotraukose, vidurkiai.

Pelytės Nr	Sveikos	Bleo (1grupė)	Bleo +IM 50mg/kg/d (2 grupė)	Bleo +IM 150mg/kg/d (3 grupė)
1	0,67	1,33	2,00	1,33
2	1,00	2,00	1,33	1,67
3	0,33	2,00	1,33	2,00
4	1,00	1,67	2,00	2,00
5	0,33	1,33	1,33	1,33
6	0,67	1,67	1,67	1,67
Vidurkis	0,67	1,67	1,61	1,67
SD	0,30	0,30	0,33	0,30

Bleo – bleomicinas, SD – standartinis nuokrypis, IM – imatinibo mezilatas

Svarbu atkreipti dėmesį į tai, jog šitame tyrime kontrolinė grupė yra bleomicinu veiktos pelės, kitaip sakant, lyginame imatinibo poveikį endotelio ląstelių apoptozei pataloginėmis sąlygomis.



29 pav. Apoptozinės endotelio ląstelės (rodyklės) eksperimentinės bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje. Dažyta TUNEL metodu.

Iš TUNEL tyrimo duomenų matyti, jog imatinibo mezilatas nesukelia endotelio ląstelių apoptozės eksperimentinės bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje *in vivo*.

6.5. Imatinibo mezilato įtaka angiogenezės etapams

6.5.1. Imatinibo mezilato įtaka endotelio proliferacijai

Endotelio ląstelių proliferacija yra pirmasis angiogenezės etapas. Kadangi ląstelių gebėjimas dalytis nėra tik angiogenezės etapas, bet ir bazinė ląstelių funkcija, todėl proliferacijos eksperimento rezultatai aptarti bazinių funkcijų rezultatų skyrelyje – 3.2 Imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių gyvybingumui

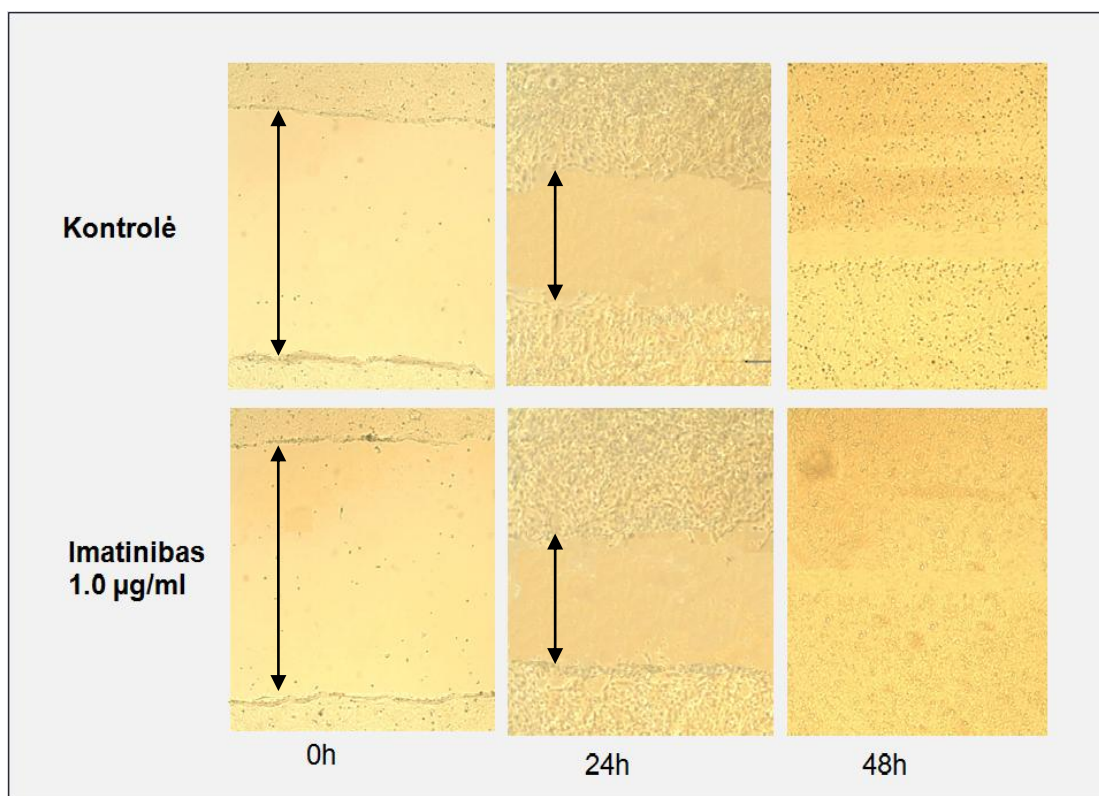
6.5.2. Imatinibo mezilato įtaka endotelio migracijai

Siekiant įvertinti, ar imatinibas slopina endotelio migraciją, buvo atliktas brėžio eksperimentas. Skirtumo endoteliocitų migracijoje per 24 ir 48 h tarp pjūvio kraštų kontrolinėje (tik terpėje kultivuotų EL) ir su imatinibu inkubuotų ląstelių grupėse, nenustatyta (po 24 h ir 48 h, atitinkamai $P=0,46$ ir $P=0,17$ kontrolinė vs. $1,0\mu\text{g/ml}$ grupę) (19 lentelė, 30 pav.).

19 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių migracijai tarp brėžio kraštų.

Mėginio Nr.	24h inkubacija			48h inkubacija		
	Terpė	0,1µg/ml	1µg/ml	Terpė	0,1µg/ml	1µg/ml
1	55	53	75	60	65	60
	59	52	73	58	61	63
	51	51	74	59	59	65
2	55	50	60	60	60	65
	58	49	59	63	57	61
	52	49	58	57	61	67
3	64	60	60	75	50	70
	64	59	59	71	51	69
	63	61	57	77	49	68
4	65	60	70	60	65	63
	65	55	69	63	63	66
	65	57	65	59	66	67
5	45	50	45	55	75	63
	49	53	49	52	75	63
	45	55	49	57	71	65
6	60	52	60	60	73	70
	55	49	59	60	69	69
	65	47	56	59	62	69
Vidurkis	57,50	53,44	60,94	61,39	62,89	65,72
SD	6,96	4,38	8,67	6,56	7,98	3,10

Pateikiamas judėjimo per parą nuotolis trijuose mėginio taškuose, matuota nuotraukose, išreikšta milimetrais. Kontrolinė grupė – tik terpėje kultivuotos ląstelės. SD – standartinis nuokrypis.



30 pav. Endotelio ląstelių, inkubuotų su imatinibo mezilatu (1,0µg/ml), bei kontrolinės grupės migracija, uždengiant pjūvį per 48 h. Atstumas tarp pjūvio kraštų pažymėtas rodykle.

„Brėžio“ eksperimentu bandome pakartoti žaizdą ar pjūvį primenančią situaciją, kuomet endotelio ląstelės netenka sąlyčio su šalia buvusią ląstele. Tuomet endotelio ląstelės turėtų migruoti į endotelium nepadengtą zoną, taip užpildydamos plyšį. „Brėžio“ eksperimentas parodė, kad imatinibo mezilatas nedarė poveikio endotelio ląstelių migracijai.

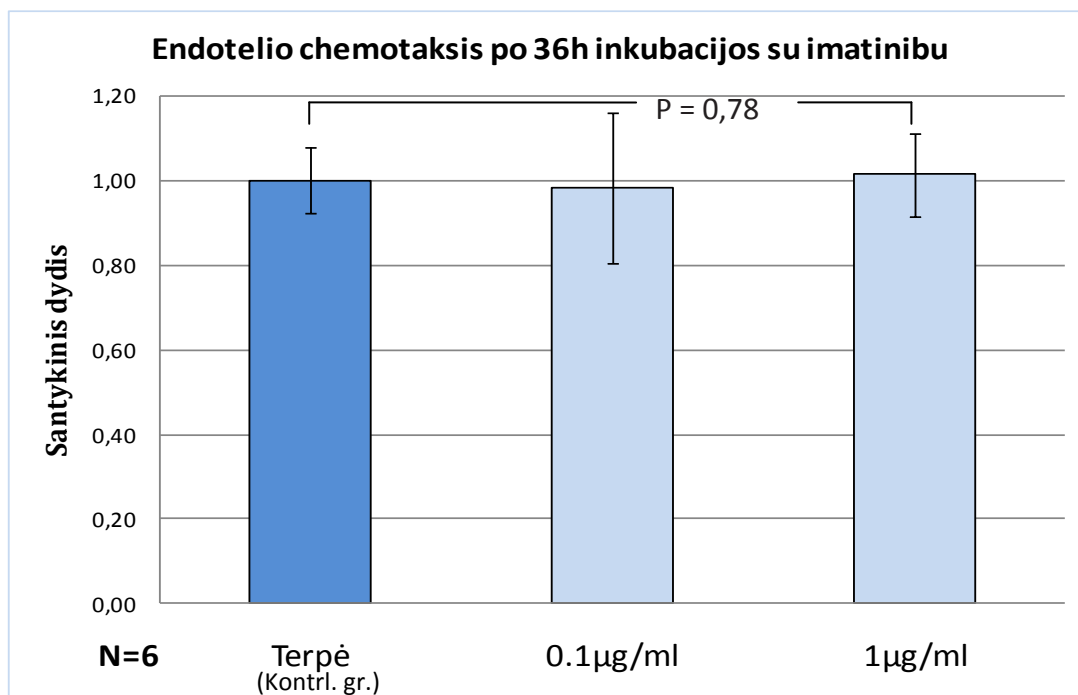
Imatinibo mezilato efektui endotelio ląstelių migracijai vertinti atliktas transšulinėlinis chemotaksio eksperimentas. Viršutinėje šulinėlio dalyje patalpinta $1,3 \times 10^4$ endotelio ląstelių. Endotelio ląstelės migravo 36 h per įdėklus su 8 μm porų polikarbonato filtrais. Įdėklai šulinėlyje dalijo į dvi kameras. Imatinibas nemažino migravusių HMEC-1 skaičiaus (20 lentelė, 31 pav.).

20 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių migracijai per polikarbonato filtrus chemotaksio eksperimentuose.

Mėginio Nr.	Terpė	Imatinibo mezilato koncentracija	
		0.1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
1	809	674	1013
2	941	1019	854
3	876	798	869
4	798	983	763
5	969	1002	965
6	887	720	896
Vidurkis	880	866	893
SD	69	154	88

Išreikšta absoliučiais migravusių ląstelių skaičiais. Kontrolinė grupė – tik terpėje kultivuotos ląstelės. SD – standartinis nuokrypis.

Šis eksperimentas labiau atspindi ne nuo tarpląstelinių kontaktų, o nuo chemoatraktantų (mūsų ekperimento atveju – FCS) priklausomą migraciją. Per polikarbonato filtrus migravusių ląstelių kiekis buvo vienodas imatinibo mezilatu veiktų ir neveiktų ląstelių grupėse.



31 pav. Įvairių koncentracijų imatinibo mezilato įtaka endotelio ląstelių migracijai per polikarbonato filtrus chemotaksio eksperimentuose, palyginti su kontroline grupe (P=0,78 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę).

Iš transšulinėlinio ir brėžio eksperimentų *in vitro* matyti, jog imatinibo mezilatas neslopina endotelio ląstelių migracijos ar chemotaksio.

6.5.3. Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelėms *in vitro* kapiliarų morfogenezės eksperimente

Imatinibo mezilato poveikis endotelio ląstelių gebėjimui formuoti į mikropilarių pirmtakus – tubules vertintas kapiliarų morfogenezės eksperimente. Su imatinibo mezilatu kultivuotos ląstelės formavo tubules taip pat efektyviai, kaip ir kontrolinė grupė (21,22,23 lentelės, 25 pav.).

21 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka tubulių skaičiui kapiliarų morfogenezės tyrime. Pateikiamas absoliutus tubulių skaičius matyti mėginio nuotraukose (P=0,93 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupė).

Mėginio Nr	IM koncentracija		
	kontrolė	0.1µg/ml	1µg/ml
1	17	18	20
2	19	14	16
3	18	21	19
4	18	22	18
5	15	18	14
6	17	14	18
7	15	21	14
8	19	18	18
9	16	15	17
10	18	14	19
11	17	13	15
12	16	17	14
13	19	19	14
14	15	18	19
15	18	14	21
Vidurkis	17,13	17,07	17,07
SD	1,46	2,94	2,40

IM – imatinibo mezilatas, SD – standartinis nuokrypis.

Standartizuota metodika, kaip vertinti kapiliarų morfogenezės eksperimentus, neegzistuoja. Dažnai naujai suformuoti kapiliarai vertinami *ad oculum*.

Kadangi aiškaus skirtumo tarp įvairiose grupėse suformuotų kapiliarų *ad oculum* mes nematėme, pasirinkome objektyvesnį metodą tyrimo rezultatams

vertinti. Buvo skaičiuota tubulių, bei jų atsišakojimų kiekis ir mėginyje didžiausio kapiliaro ilgis.

22 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka tubulių atsišakojimų skaičiui kapiliarų morfogenezės tyrime. Pateikiamas absoliutus tubulių skaičius matyti mėginio nuotraukose. (P=0,71 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę)

Mėginio Nr	IM koncentracija		
	kontrolė	0.1µg/ml	1µg/ml
1	23	24	28
2	27	23	24
3	21	27	21
4	26	25	23
5	21	22	22
6	24	24	24
7	24	28	21
8	22	26	24
9	25	26	21
10	26	22	26
11	24	24	23
12	22	25	21
13	24	21	22
14	25	24	24
15	21	18	25
Vidurkis	23,67	23,93	23,27
SD	1,95	2,52	2,05

IM – imatinibo mezilatas, SD – standartinis nuokrypis.

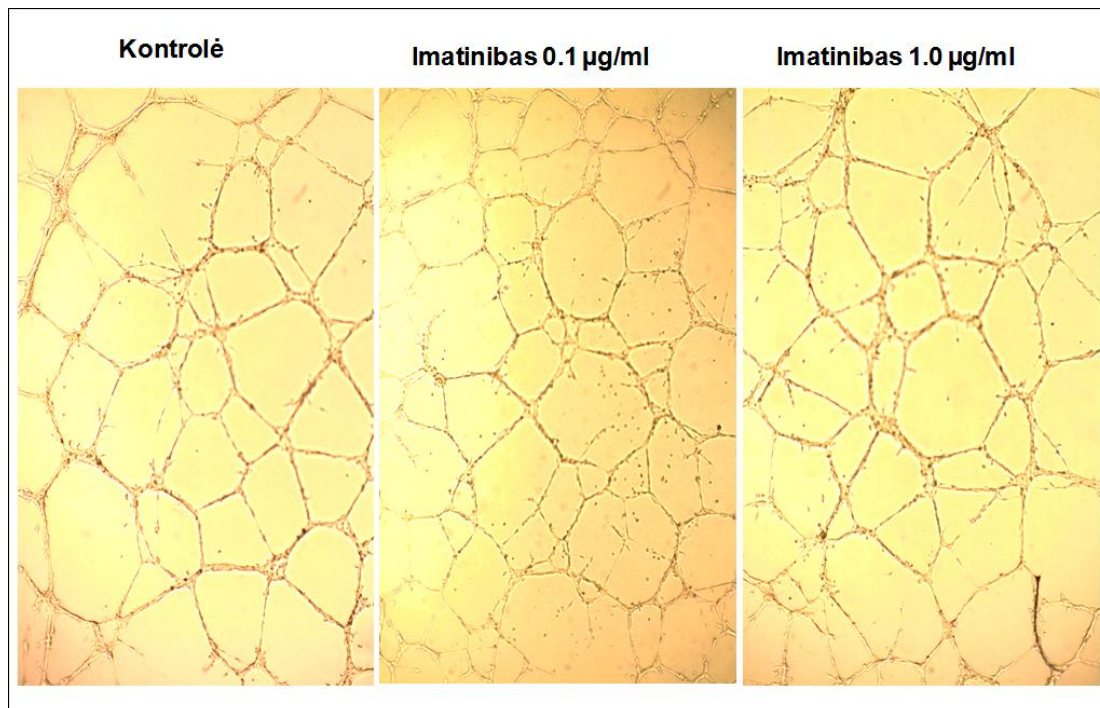
Iš skaičiavimų matyti, jog imatinibo mezilatas neturėjo įtakos nei pačių tubulių ar jų atsišakojimų kiekiui, nei didžiausio kapiliaro ilgiui. Net ir vertinant *ad oculos* (32 pav.) matyti, kad imatinibas neveikia tubulių formavimosi.

23 lentelė. Įvairios koncentracijos imatinibo mezilato įtaka didžiausios tubulės ilgiui kapiliarų morfogenezės tyrime.

Mėginio Nr	IM koncentracija		
	kontrolė	0.1µg/ml	1µg/ml
1	73	61	80
2	75	75	60
3	78	74	70
4	85	77	80
5	68	70	75
6	88	61	68
7	59	72	75
8	77	54	72
9	60	52	67
10	69	79	73
11	74	67	95
12	73	70	83
13	59	72	73
14	79	64	77
15	76	90	66
Vidurkis	72,87	69,20	74,27
SD	8,71	9,84	8,33

Pateikiamas didžiausios tubulės ilgis matyti mėginio nuotraukose, išreikšta milimetrais. (P=0,65 kontrolinė vs. 1,0µg/ml grupę).

IM – imatinibo mezilatas, SD – standartinis nuokrypis.



32 pav. Endotelio lāstelēs kultivtuotas ant Matrigel™ su imatinibo mezilatu (koncentracijas 0,1-1µg/ml) formuoja tubules taip gerai, kaip ir tik DMEM terpėje kultivtuotas lāstelēs.

Iš kapiliary morfogenezes eksperimento matyti, jog imatinibo mezilatas neturējo neigiamos įtakos endotelio tubuliy formavimuisi.

7. REZULTATŲ APITARIMAS

Yra žinoma, jog imatinibo mezilatas slopina pagrindinių ELM baltymų kolageno1 a1(COL1A1), kolageno1 a2(COL1A2), fibroenektino1 sintezę odos fibroblastuose tiek mRNR, tiek baltymų lygyje. Įrodyta, jog imatinibas ryškiai sumažino ELM akumuliaciją bei sintezę *de novo* bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje. Šiam odos fibrozės modeliui būdinga gausi uždegiminė infiltracija pažeistoje odoje. Dėl profibrozinių citokinų sintezės uždegiminės ląstelės ir yra atsakingos už pradinę fibroblastų aktyvaciją. Todėl bleomicino sukeltos pelių odos fibrozės modelis primena ankstyvą SSc, bet nėra reprezentatyvus vėlesnei SSc stadijai, kai uždegiminė infiltracija nebėra tokia gausi⁶⁷.

Imatinibo mezilato efektyvumui vėlesnėse sklerodermijos stadijose vertinti mes panaudojome Tsk-1 pelių modelį, kuriam būdinga nuolat padidėjusi ELM sintezė neuždegiminėje aplinkoje. Pademonstravome antifibrotinį imatinibo efektyvumą histologiniuose odos pokyčiuose bei slopinant fibroblastų diferenciaciją.

Kaip minėta, imatinibo poveikis ankstyvai SSc stadijai buvo įrodytas. Mums pirmą kartą pavyko įrodyti, jog imatinibas yra efektyvus ne tik fibrozės prevencijai ankstyvoje, uždegiminėje SSc fazėje, bet ir vėlesnėse SSc stadijose, kuomet uždegiminis komponentas nebėra taip ryškiai išreikštas. Tsk-1 modelio duomenys bei ankstesnė bleomicino sukeltos odos fibrozės studija rodo, kad imatinibas yra efektyvus fibrozės prevencijai įvairiuose preklinikiniuose SSc modeliuose.

Fibrozės prevencija aktuali tik ankstyvoje SSc stadijoje tiems pacientams, kurių ligos eiga agresyvi, vyksta aktyvi ELM akumuliacija audiniuose ir vystosi įvairių organų fibrozė. Tačiau klinikinėje praktikoje į reumatologą kreipiasi pacientai ne pradinėms ligos stadijoms, bet jau daugiau ar mažiau pasireiškus fibrozei. Todėl egzistuojančios fibrozės gydymas šiems pacientams ir yra pirmos svarbos reikalas. Gydymas turėtų panaikinti egzistuojančią fibrozę, bei kuo labiau sumažinti pažeistų organų disfunkciją. Todėl mums buvo svarbu išsiaiškinti, ar imatinibas gali turėti įtakos jau susiformavusiai fibrozei. Pasinaudojus bleomicino sukeltos fibrozės modeliu, kai veikimas bleomicinu buvo pailgintas, o gydyti pradėta vėlai, mums pavyko parodyti, kad imatinibo mezilatas ne tik sustabdo odos fibrozės progresą, bet ir sumažina jau egzistuojančią odos fibrozę, odos storį sugrąžindamas žemiau pradinio taško, nepaisant toliau skiriamo profibrotinio stimulo – bleomicino. Iš šių duomenų matyti, kad imatinibas ne tik sustabdo odos fibrozės progresavimą, bet ir gali sukelti jau egzistuojančios fibrozės regresavimą. Taigi imatinibas gali praversti klinikiniam tyrimams su pacientais, turinčiais ilgą SSc stažą ir egzistuojantį organų pakenkimą.

Tiek mūsų darbe, tiek kitų autorių darbuose buvo parodytas imatinibo poveikis fibroblastams ir fibrozės procesui. Turint omenyje, jog imatinibas yra tirozinkinazių inhibitorius, galima daryti išvadą, jog antifibrozinis efektas pasiekiamas blokuojant intraląstelinį signalą. Tačiau kiti autoriai yra įrodę, jog fibrozę galima slopinti ir sukelti fibroblastų apoptozę. Sukelus fibroblastų apoptozę pavyko išvengti inkstų fibrozės⁶⁸ bei plaučių fibrozės eksperimentiniuose modeliuose.⁶⁹ Siekdami įsitikinti, jog Imatinibo mezilato antifibrozinis poveikis yra tik dėl intraląstelinio kinazių slopinimo, Distler *et al.* ankstesniuose tyrimuose vertino imatinibo poveikį fibroblastams. Buvo įrodyta, jog imatinibas nedaro poveikio fibroblastų medžiagų apykaitai MMT bandymuose, nesukelia apoptozės *in vitro* aneksino V bei *in vivo* kaspazės-3 aktyvumo eksperimentuose.

Tuomet, atsižvelgiant į itin ilgą odos kolageno skilimo pusperiodį, kyla klausimas, koku mechanizmu imatinibo mezilatas lemia egzistuojančios fibrozės regresiją.

ELM depoziciją odos ir kitų organų jungiamajame audinyje lemia balansas tarp kolageno neosintezės ir degradavimo. Už pastarąjį procesą atsakingos audinių matrikso metalo proteinazės (MMPs). Sisteminės sklerozės metu gaminama daug ELM baltymų. Distler *et al.* yra pademonstravę, jog dviguba c-Abl ir PDGFR inhibicija slopina ELM baltymų sintezę 80 %, o imatinibo mezilatas efekto MMPs bei šių proteinazių inhibitoriams (TIMPs) neturi.^{70,71}

Imatinibo poveikis MMPs ir TIMPs vertintas mRNR lygiu ir buvo parodyta, jog dėl imatinibo poveikio MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 mRNR kiekiai sveikuose ir SSc fibroblastuose nekinta.

Egzistuojančios fibrozės regresiją lemia ne tiesioginis imatinibo poveikis ELM degradacijai, o balanso tarp sintezės ir degradacijos poslinkiui degradacijos link. Taigi galima teigti, kad imatinibo mezilatas tiesioginio poveikio ELM degradacijai nedaro, bet sukelia didesnę reliatyvią ELM degradaciją.

Mūsų darbe vertinome imatinibo mezilato poveikį odos fibrozei. Sklerodermija – sisteminė liga, pažeidžianti daugelį organų. Taip pat žinoma, kad fibroblastai, išskirti iš skirtingų organų, pasižymi sintetiamo ekstraląstelinio matrikso specifiškumu, t. y. sintetina tam tikram organui būdingo jungiamojo audinio komponentus tam audiniui būdingu santykiu. Šitame darbe imatinibo mezilato poveikio kitoms organų sistemoms nevertinome, nes imatinibo poveikis kitų organų fibrozei jau žinomas.

Imatinibas slopino ELM kaupimąsi plaučių fibrozės modelyje, ELM kaupimąsi inkstų obstrukcinės nefropatijos modelyje^{72,73,74}.

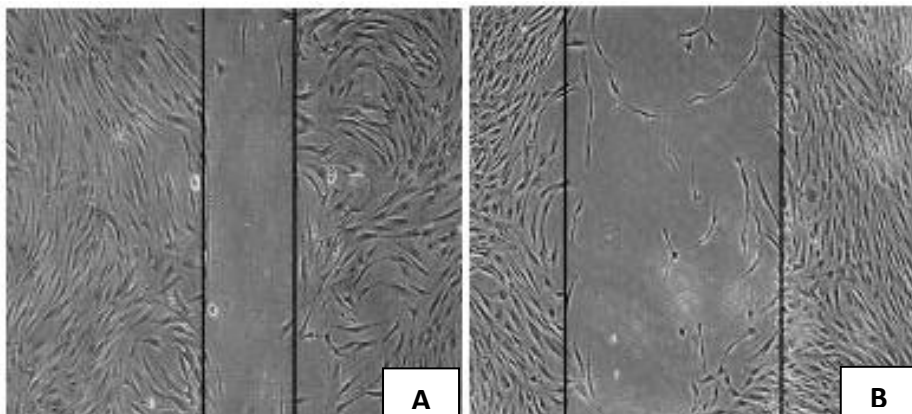
Imatinibo mezilato poveikis egzistuojančiai fibrozei eksperimentiniuose modeliuose iki šiol neanalizuotas. Nedidelėse klinikinėse studijose yra

parodyta, jog lėtine mielogenine leukemija sergančiųjų gydymas nulėmė ligą lydinčios kaulų čiulpų fibrozės regresiją.^{75,76} Paeiliui atliktos kaulų čiulpų biopsijos atskleidė pataloginių retikulino skaidulų kiekio mažėjimą. Pažymėtina, kad šis antifibrozinis efektas yra nepriklausomas nuo Filadelfijos chromosomos teigiamų vėžinių ląstelių supresijos.

Nors Imatinibas yra daug žadantis preparatas SSc gydyme, sklerodermija nėra vienintelė potenciali jo taikymo sritis. Savo darbe fibrogenezę vertiname kaip nepageidaujamą pataloginį procesą, tačiau kai kuriais atvejais jis pageidautinas ir itin svarbus. Padidėjusi fibrogenezė yra esminis procesas gyjant žaizdoms. Kiti autoriai yra parodę, jog imatinibo mezilatas slopina pelių žaizdų gijimą. Po 7 dienų gijimo pelių, veiktų imatinibo mezilatu, žaizdos kraštai buvo mažiau suartėję, o odoje miofibroblastų kiekis buvo sumažėjęs.

Ląstelių kultūrose imatinibas slopino svarbius žaizdų gijime procesus – miofibroblastų diferenciaciją, migraciją (33 pav.)

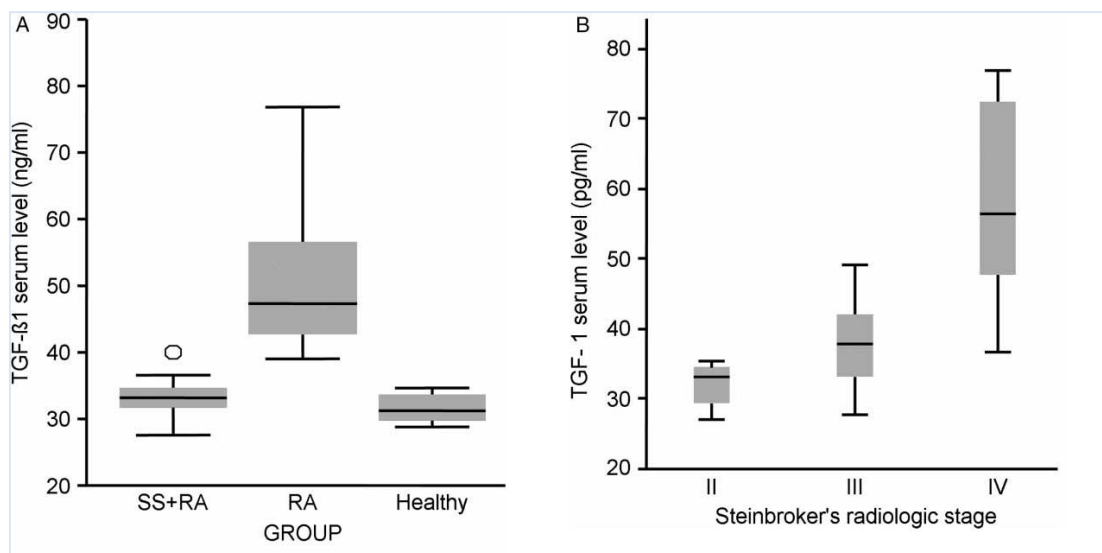
Sistemine skleroze sergančiųjų ELM baltymų sintezė yra padidėjusi, todėl galima spėti, kad nors imatinibas ir slopina žaizdų gijimą, tai neturėtų būti vaisto vartojimą ribojantis veiksnys sklerodermos pacientams.



33 pav. Imatinibo poveikis fibroblastų kultūrai “brėžio” eksperimente
A. Fibroblastai veikiant 10% FCS „brėžį“ visiškai uždengia per 72h.
B. Imatinibas slopina fibroblastų, kultivuotų su 10% FCS, migraciją.

Suintensyvėjęs žaizdų gijimas veda prie pataloginės būklės – rando. Tai, be abejonės, nepageidaujamas efektas, todėl vertinant imatinibo poveikį žaizdų gijimui ir mūsų įrodytą poveikį jau egzistuojančiai fibrozei, galima nuspėti, kad imatinibo mezilatas bus tiriamas ir kaip potencialus medikamentas randams gydyti.

Kita imatinibo taikymo sritis, reikalaujanti papildomų tyrimų, galėtų būti reumatoidinis artritas(RA). TGF- β , kaip minėta, yra multipotentinis citokinas, dalyvaujantis daugybėje procesų, įvairių susirgimų patogenezėje. Esame pademonstravę TGF- β serumo koncentracijos bei klinikinių parametru ryšį reumatoidiniu artritu, bei antriniu Sjogreno sindromu sergantiems pacientams.^{77,78} Tyrėme TGF- β koncentracijas reumatoidiniu artritu, antriniu Sjogreno sindromu RA (sSS+RA) sergančių ir sveikų žmonių serumuose. TGF- β serumo koncentracija RA grupėje buvo žymiai didesnė nei sSS+RA ar sveikų žmonių. RA ir sSS+RA grupėse TGF- β koncentracija koreliavo su radiologiškai nustatytu sąnario destruktijos lygiu (34 pav.).



34 pav. A. TGF- β serumo koncentracijos RA, sSS+RA ir sveikų žmonių grupėse. **B.** TGF- β serumo lygio ir sąnarių pažeidimo koreliacija bendroje RA ir sSS+RA grupėje.

Mūsų duomenis papildoma kita studija, kuria buvo įrodyta, jog imatinibo mezilatas daro slopinamąjį poveikį osteoklastų formavimuisi bei sąnario destrukcijai kolageno sukeltame žiurkių artrito modelyje.⁷⁹ Imatinibas, priklausomai nuo dozės, slopina osteoklastų prekursorių bei pačių osteoklastų proliferaciją. Be to 150 mg/kg per dieną imatinibo slopina radiologiškai nustatomą žiurkių sąnarių destrukciją, nors poveikio uždegimo procesui ir nedarė (sumažinti sąnarių tinimo nepavyko).

Šie tyrimai rodo platų TGF- β funkcijų spektrą bei terapines imatinibo galimybes, be to leidžia įtarti, jog intraląstelinės kinazės, kurias slopina imatinibas, yra specifinės ne tik fibroblastams ar sklerodermai.

Patologinio citokino ekspresijos bei aktyvumo blokavimas, naudojant tirpius receptorių ar antikūnus, jau taikomas klinikinėje praktikoje. TNF α blokavimas gydant reumatoidinį artritą, buvo itin sėkmingas. Būta bandymų šią praktiką taikyti ir gydant sisteminę sklerozę, nusitaikius į TGF- β ligandą. Laboratoriniai bandymai su antikūnais prieš TGF- β ar tirpiaisiais jo receptoriais buvo gana sėkmingi keliuose preklininiuose SSc modeliuose. Peles gydant monokloniniais antikūnais prieš TGF- β buvo išvengta inkstų fibrozės išsivystymo, gydymas buvo gana gerai toleruojamas ir efektyvus.⁸⁰ Pelių Morfano sindromo modelyje, naudojant anti TGF- β antikūnus, pavyko išvengti plaučių, bei širdies pažeidimų.⁸¹

Pirmame klinikiniam tyrime su anti TGF- β antikūnais buvo naudoti žmogaus rekombinantiniai IgG antikūnai (metelimumab) specifiniai šio citokino TGF- β 1 izoformai. SSc pacientai buvo randomizuoti intraveniniais antikūnų ar placebo injekcijai 18 savaitių periodui. Deja, klinikinio efekto nenustatyta. Šio tyrimo trūkumas buvo izotipinis antikūnų specifiskumas (tik prieš TGF- β 1, o ne TGF- β 2 ar TGF- β 3).

Žinomas TGF- β daugiafunkciškumas ir itin svarbus vaidmuo įvairiuose fiziologiniuose procesuose leidžia įtarti, jog visiškas TGF- β blokavimas turėtų ir

neigiamų padarinių. TGF- β yra imunomodulatorius, visiškas TGF- β blokavimas galėtų išprovokuoti spontanię T ar B ląstelių aktyvaciją, reguliacinių T ląstelių slopinimą, uždegimą ir autoimuniškumą. Dėl TGF- β ligando blokavimo gali atsirasti tam tikro toksiškumo, todėl būtinas ilgalaikis bei atidus klinikinių tyrimų stebėjimas yra.

Imatinibo mezilato koncentracijos naudotos mūsų atliktuose studijose, nesunkiai pasiekiamos ir žmogaus organizme, peroraliai skiriant standartinę vaisto dozę. Vidutinė plazmos piko koncentracija buvo matuojama pacientams, sergantiems Bcr-Abl teigiama lėtine mieloidine leukemija. Šiems pacientams skirta 400 mg imatinibo mezilato per parą. Jų vidutinė plazmos piko koncentracija buvo 2,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Mažiausia imatinibo plazmos koncentracija – 0.72 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nustatyta praėjus 24h po vaisto suvartojimo (standartinė dozė 400mg per parą). Disertacijoje aprašytuose *in vitro* eksperimentuose didžiausios naudotos koncentracijos – 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tos vaisto koncentracijos yra pakankamos, kad užslopintų *in vitro* kolageno sintezę fibroblastuose 92 %.

Yra žinoma, kad klinikinėje onkologijos praktikoje naudojant imatinibo mezilatą pastebėtas tik mažo laipsnio šalutinis poveikis bei gera vaisto tolerancija. Tai, ko gero, susiję su gana selektyvia c-Abl kinazės ir PDGF receptoriaus inhibicija.

Dauguma klasikinėje chemoterapijoje naudojamų preparatų veikia ląstelės replikacijos mechanizmus.^{82, 83} Kai kurie šių preparatų, prisijungdami kovalentine jungtimi ar slopindami topoizomerazių aktyvumą, žeidžia DNR. Kiti slopina nukleotidų sintezę. Didelė dalis chemoterapijos preparatų veikia kaip antimetabolitai ir slopina ribonukleorūgščių *neosintezę*.

Sisteminei sklerozei gydyti kartais vartojamas cikliofosfamidai. Tai yra neabejotinai stipriausias ir efektyviausias imunosupresantas, naudojamas reumatologijoje, bet tai pakankamai toksiškas, daugeliu aspektų pavojingas vaistas, todėl gali būti skiriamas tik gydant sunkios eigos sklerodermiją. Gydant ciklofosfamidais yra dažnos, net iki 50 %, komplikacijos. Tai

mielosupresija, amenorėja arba azoospermija, teratotoksiškumas, onkologiniai (ypač šlapimo pūslės) susirgimai, hemoraginis cistitas, imunosupresija, infekcijos, alopecija, pykinimas bei vėmimas.

Kitaips nei klasikiniai chemoterapiniai preparatai, imatinibo mezilatas neslopina pagrindinių ląstelių funkcijų, tokių kaip proliferacija ar DNR sintezė. Be to, imatinibu paveiktoms ląstelėms, ne fiksuota ir mutageninio poveikio. Imatinibo efektyvumas gydant Bcr-Abl teigiamą lėtinę mieloidinę leukemiją grįstas selektyviu patogeninės kinazės slopinimu, nuo kurios ir priklauso leukemijos ląstelių piktybiškumas.^{84, 85}

Gastrointestinalinių stromos auglių terapijoje imatinibo poveikis paremtas selektyviu patologiškai aktyvios c-Kit transmembraninio receptoriaus kinazės slopinimu. Imatinibas selektyviai slopina pataloginį signalą neveikdamas kitų intraląstelinio signalo perdavimo kelių.^{86, 87} Imatinibo selektyvus poveikis kinazėms ir lemia žemą toksiškumo lygį. Mūsų ir ankstesnėse studijose imatinibo mezilatas, naudojant koncentracijas, kurios labai sumažino ELM sintezę, nedidino apoptozinių ar nekrozinių ląstelių skaičiaus, neslopino proliferacijos, nesukėlė ląstelių toksiškumo. Klinikinės studijos parodė, kad imatinibas yra iš principo saugus ir gerai toleruojamas preparatas. Dažniausiai pasireiškę šalutiniai poveikiai buvo pykinimas, mialgijos, periferinės edemos. Klinikinė patirtis ir negausūs šalutiniai efektai daro šį preparatą pranašesniu už kai kuriuos klasikinius, reumatologijoje naudojamus vaistus, pvz., ciklofosamidą.

Tačiau, neseniai pasirodęs pranešimas apie 10 pacientų, kuriems išsivystė kardialinis nepakankamumas gydant imatinibu, rodo, jog būtinas akylas retų šalutinių efektų monitoravimas.⁸⁸

Kaip žinia, kraujagyslinės SSc komplikacijos sudaro svarbią sklerodermijos klinikos dalį ir yra atsakingos už komplikuoatą bei letalią šios ligos baigtį. Naujų vaskulinių komplikacijų sukėlimas ar esamų pablogėjimas būtų vienas svarbiausių imatinibo šalutinių efektų. Todėl gydant SSc imatinibo

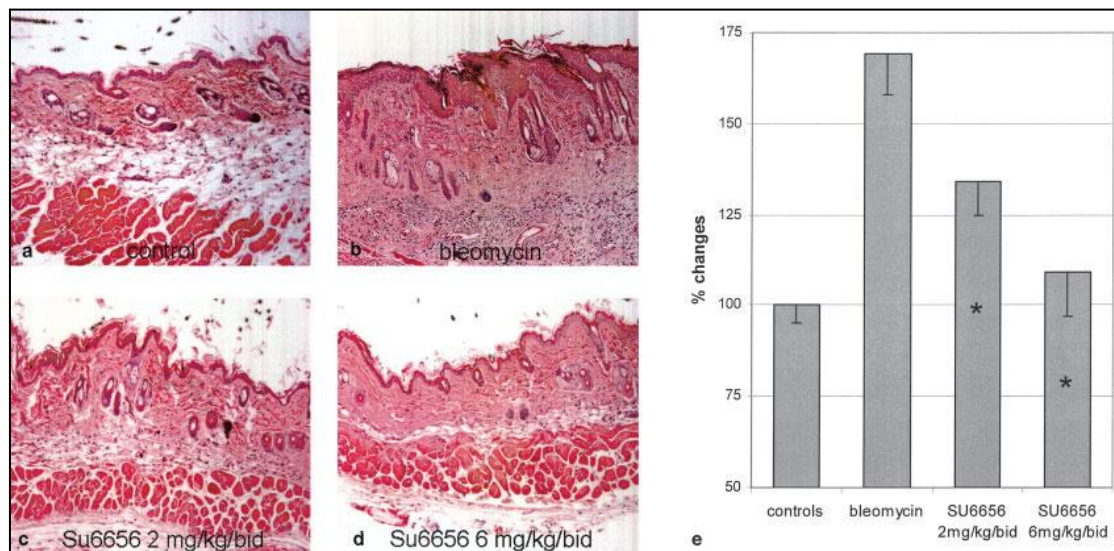
mezilatas turėtų ne tik pasižymėti antifibrozinėmis savybėmis, bet ir nedaryti neigiamo poveikio kraujagyslėms.

Kadangi imatinibo slopinami profibrotiniai citokinai TGF- β ir PDGF yra multipotentiniai, galima įtarti, kad slopindamas juos imatinibas slopins ir proangiogenezines jų funkcijas, bei turės neigiamos įtakos endoteliui. Tas būtų ypač nepageidautina, nes neigiamas poveikis endoteliui, galėtų riboti imatinibo taikymą gydant SSc.

Imatinibo mezilato poveikio endotelio ląstelėms projekte, parodjme, kad imatinibo mezilatas nesukelia apoptozės bei neslopina endotelio ląstelių proliferacijos *in vitro* ir *in vivo*. Imatinibas taip pat neveikė endotelio aktyvacijos, neslopino migracijos bei chemotaksio, nemažino kapiliarų formavimosi *in vitro*. Iš to matyti, kad imatinibas neveikia pagrindinių endotelio ląstelių funkcijų, taigi gydymas imatinibu neturėtų apsunkinti jau egzistuojančių ar sukelti naujų SSc vaskulinių komplikacijų (pvz. pirštų galų opos).

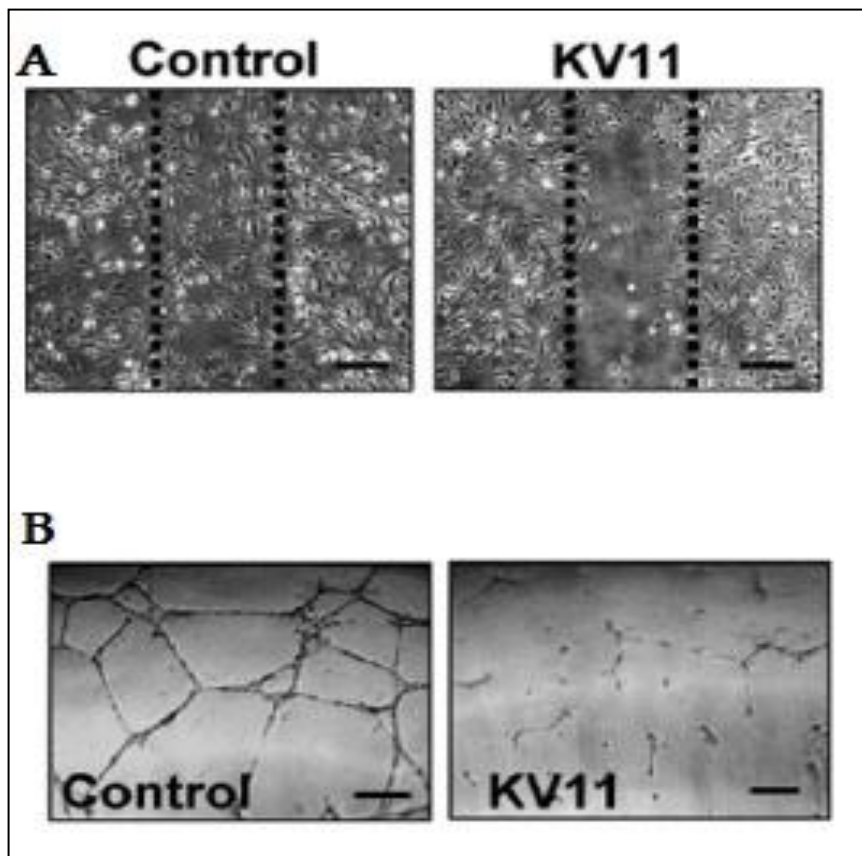
Paskutiniu metu aiškinant sisteminės sklerozės patogenezę matyti ryški pažanga. Eksperimentiniame lygyje atrandami vis nauji fibrogenezės inhibitoriai. Mes nagrinėjome ir Src kinazių vaidmenį SSc patogenezėje.

Src kinazės yra tirozinkinazių šeima, sudaryta iš 9 atstovų.⁸⁹ Šias kinazes aktyvuoja įvairūs citokinai, tarpe jų ir PDGF⁹⁰ bei TGF- β .^{91,92,93} Src kinazės siejamos su fibrozės procesu per centrinę adhezijos kinazę (FAK). FAK skatina fibroblastų diferenciaciją į miofibroblastus⁹⁴, o jos slopinimas stabdo eksperimentinę plaučių fibrozę.⁹⁵ Mums pavyko įrodyti, jog Src kinazių inhibicija (naudojant inhibitorių SU6656) sumažino ECM sudedamųjų dalių sintezę mRNA bei baltymų lygiu *in vitro*, taip pat odos storį eksperimentiniame SSc modelyje(35 pav.) *in vivo*.⁹⁶



35 pav. Bleomicino sukeltos odos fibrozės prevencija Src kinazių inhibitoriumi SU6656. SU6656 slopino ELM akumuliacija nuo dozės priklausomai. **a–d**, reprezentatyvios odos nuotraukos **a**, kontrolės, **b**, pelių veiktų tik bleomicinu, **c**, pelių veiktų bleomicinu ir 2 mg/kg SU6656 **d**, pelių veiktų bleomicinu ir 6 mg/kg SU6656. **e**, Odos storis kontrolinėse, tik bleomicinu veiktose, veiktose bleomicinu ir 2 arba 6 mg/kg SU6656 pelėse. SU6656 slopino ELM akumuliacija nuo dozės priklausomai. Duomenys išreikšti % nuo kontrolės.

Tačiau *Weis et al.* įrodė, jog per Src savo signalą perduoda ir VEGF, o Src inhibitoriai blokuoja nuo VEGF priklausomą kraujagyslių laidumą bei angiogenezę.⁹⁷ Onkologijoje Src inhibicija tiriama kaip galima antiangiogenezinė terapija.⁹⁸ *Yl et al.* įrodė neigiamą Src kinazių inhibitorių poveikį kai kuriems angiogenezės (36 pav.) etapams.⁹⁹



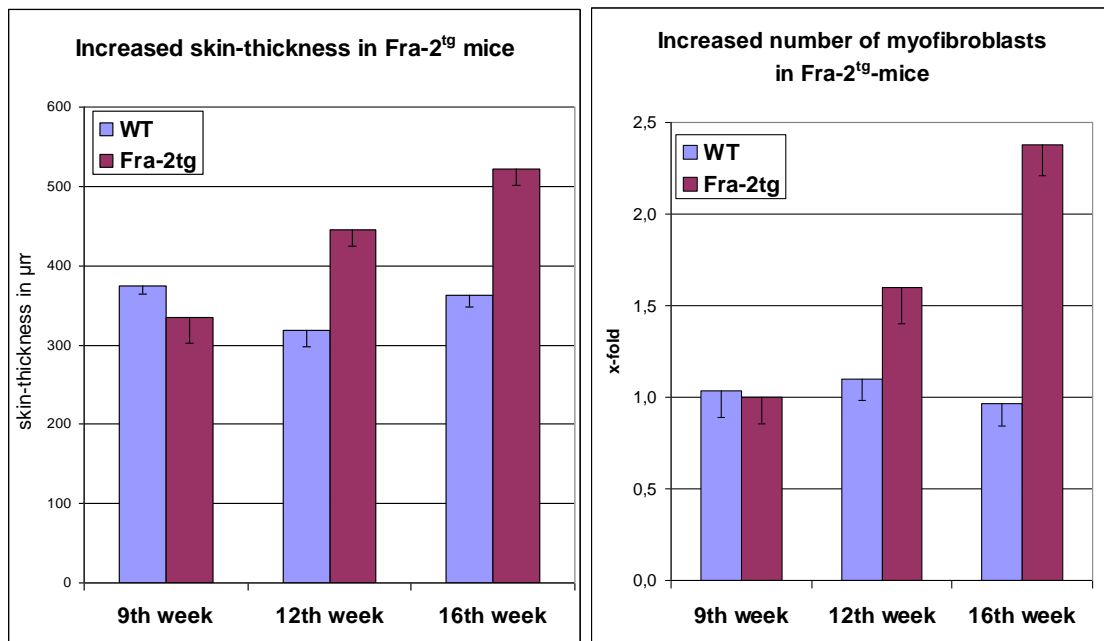
36 pav. Src kinazės inhibitoriaus kv11 poveikis endotelio funkcijoms. **A:** inhibitorius kv11 slopina endotelio migraciją brėžio eksperimente. **B:** inhibitorius kv11 slopina endotelio tubulių formavimąsi kapiliarų morfogenezės eksperimente.

Jei imatinibo mezilatas pasižymėtų panašiu poveikiu angiogenezei, kaip ir mūsų naudotas SU6656, tai, ko gero, klinikiniai IM efektyvumo gydant SSC, tyrimai nebūtų atliekami.

Mūsų išvadas, jog imatinibas neturi neigiamo efekto endotelio ląstelėms, patvirtina ir klinikiniai duomenys. Iš 100000 imatinibu gydytų, lėtine mielogenine leukemija ar gastrointestaliniais tumorais sergančiųjų, vaskulinės kilmės šalutinių poveikių nenustatyta.¹⁰⁰ Sklerodermos metu endotelio ląstelių pažeidimą paaiškina keletas mechanizmų. Tai ir virusinės infekcijos, ir prieš endotelį nukreipti autoantikūnai, ir mikrodalelės.¹⁰¹ Nors ir nekonstatuojame neigiamo imatinibo poveikio endoteliui, bet neneigiame, kad imatinibas galėtų slopinti jau pažeistų endoteliocitų funkcijas. Tačiau

džiugina tai, kad aprašyti pirmieji sisteminės sklerozės gydymo imatinibu atvejai vaskulinės patologijos atsiradimo ar jau egzistuojančios pablogėjimo neužfiksavo.¹⁰²

Disertacijoje aprašomuose eksperimentuose naudojome bleomicino sukeltos odos fibrozės ir Tsk-1 mutacijos sklerodermos modelius. Išreikšta odos fibroze šie modeliai ganėtinai artimai primena sisteminę sklerozę, todėl yra labai tinkami antifibrozinių priemonių paieškai. Tačiau jie neatspindi visų sklerodermos aspektų. Šiems modeliams nebūdinga vaskulopatija bei endotelio pažeidimas. Viename iš projektų („The Transcription Factor Fra-2 Regulates the Production of Extracellular Matrix in Systemic Sclerosis“), nagrinėjome transkripcijos faktoriaus Fra-2 vaidmenį SSc patogenezėje. Mums pavyko įrodyti transkripcijos faktoriaus Fra-2 aktyvumo ir audinių fibrozės tiek transgeninių pelių modelyje, tiek žmonių odos mėginiuose ryšį¹⁰³. Fra-2 transkripcijos faktoriui transgeninėms pelėms būdinga ir odos fibrozė, ir padidėjęs miofibroblastų skaičius (37 pav.). Šie odos pokyčiai atsiranda 12 savaičių pelėms.



37 pav. Odos storio ir miofibroblastų skaičiaus didėjimas transkripcijos faktoriui Fra-2 transgeninėse pelėse. WT – kontrolinės pelės, Fra-2tg – pelės transgeninės transkripcijos faktoriui Fra2.

Odos fibrozės aspektu ir Fra2 modelis, ir mūsų naudoti modeliai yra panašūs. Tačiau Fra2 modeliui, be fibrozės būdinga ir vaskulopatija. Mūsų kolegos nagrinėjo vaskulopatiją Fra2 transgeninėse pelėse.¹⁰⁴ Dabar žinoma, kad Fra2 transgeninėms pelėms vystosi ryškus odos smulkiųjų kraujagyslių netekimas, paraleliai besivystančiai 12 savaičių pelių odos fibrozei. Kaip ir sisteminės sklerozės atveju, Fra2 pelėms vystėsi endotelio ląstelių apoptozė dar prieš pasireiškiant vaskulopatijai ir fibrozei, maždaug 9 gyvenimo savaitę.

Aktyvuotas Fra2 transkripcijos faktorius taip pat mažino endotelio ląstelių migraciją, chemotaksį bei tubulių formavimąsi.

Odos fibrozė bei vaskulopatija daro šį modelį itin tinkamu bandant preparatus, veikiančius tiek fibrozę, tiek vaskulopatiją, bei ieškant galimo šalutinio preparatų poveikio endoteliui. Disertacijoje, vertindami imatinibo poveikį endoteliui, nenaudojome pelių transgeninių transkripcijos faktoriui Fra2, nes disertacijoje aprašyti projektai atlikti anksčiau, nei Fra2 projektas. Ateityje, tiriant preparatų poveikį endoteliui, derėtų naudoti šį SSc modelį, nes, kaip ir pacientams, sergantiems skleroderma, šiame modelyje endotelis yra pažeistas dar prieš paskiriant preparatą.

Kapiliarai susideda iš dviejų tipų ląstelių, endotelio ir pericitų. Pericitai irgi svarbūs kai kuriuose angiogenezės etapuose, kapilarams brestant. Disertacijoje nenagrinėjome imatinibo poveikio pericitų funkcijoms. Kitaip nei endotelis, pericitai SSc metu suaktyvėja bei jų padaugėja.^{105,106} Manoma, kad aktyvūs pericitai gali prisidėti prie audinių fibrozės SSc metu. Pericitai geba transdiferencijuotis į miofibroblastus, jie turi neigiamą įtaką endoteliui (sukelia apoptozę) ir prisideda prie progresuojančios vaskulopatijos.¹⁰⁷ Sklerodermos terapijos objektu turėtų būti ir pernelyg aktyvuotų pericitų slopinimas. Pericitų aktyvacija ir proliferacija yra nuo PDGF priklausomi procesai. Kadangi imatinibas blokuoja PDGF receptoriaus

tirozinkinazės aktyvumą, imatinibas galėtų normalizuoti pericitų funkcijas ir taip didinti endotelio ląstelių išgyvenamumą sisteminės sklerozės metu.¹⁰⁸

8. IŠVADOS

1. Imatinibo mezilatas ne tik sustabdė fibrozės vystymąsi uždegiminiame, bleomicino sukeltos *suformuotos* odos fibrozės modelyje, bet ir paskatino jau egzistuojančios fibrozės regresiją.
2. Gydymas imatinibo mezilatu visiškai normalizavo odos ir poodžio storį, bei miofibroblastų skaičių neuždegiminiame fibrilino-1 mutaciją turinčių pelių sisteminės sklerozės modelyje.
3. Terapinės imatinibo mezilato koncentracijos neturėjo poveikio endotelio ląstelių gyvybingumui, aktyvacijos markerių ekspresijai ir neinicijavo apoptozės *in vitro*.
4. Imatinibo mezilatas neinicijavo endotelio ląstelių apoptozės bleomicino sukeltos odos fibrozės modelyje *in vivo*.
5. Endotelio ląstelių inkubacija su terapinėmis imatinibo koncentracijomis nedarė neigiamo poveikio pagrindiniams angiogenezės etapams: proliferacijai, migracijai, kapiliarų formacijai.

9. PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SARAŠAS

1. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis.

Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, Palumbo K, Zwerina J, Nevskaya T, Gay S, Distler O, Schett G, Distler JH.
Arthritis Rheum. 2010 Jan; 62(1):280-90.

2. Relationship between serum levels of TGF-beta1 and clinical parameters in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis.

Mieliauskaite D, Venalis P, Dumalakiene I, Venalis A, Distler J.
Autoimmunity. 2009 May; 42(4): 356-8.

3. Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis.

Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G, Distler O, Distler JH.
Arthritis Rheum. 2009 Jan; 60(1):219-24.

4. Lack of inhibitory effects of the anti-fibrotic drug imatinib on endothelial cell functions in vitro and in vivo.

Venalis P, Maurer B, Akhmetshina A, Busch N, Dees C, Stürzl M, Zwerina J, Jüngel A, Gay S, Schett G, Distler O, Distler JH.
J. Cell. Mol. Med. 2009; 13(10): 4185-4191.

5. Src kinases in systemic sclerosis: central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis.

Skhirtladze C, Distler O, Dees C, Akhmetshina A, Busch N, Venalis P, Zwerina J, Spriewald B, Pileckyte M, Schett G, Distler JH.
Arthritis Rheum. 2008 May; 58(5): 1475-84.

6. Serum levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome.

Mieliauskaitė D, Venalis P, Dumalakiene I, Gražienė V, Kirdaitė G, Venalis A
Acta Medica Lituanica. 2008; 15(4): 211-215

Žodiniai pranešimai konferencijose

1. “Effect of Imatinib mesylate on Endothelial cells functions” – 4th MYRACE, Austrija 2008.

2. “Effect of Imatinib mesylate on Endothelial cells functions”– ARTICULUM, Vokietija 2008.

3. „Imatinib mesylate prevents fibrosis and induces regression of established fibrosis in scleroderma models“ – TRiPR IV - Biological Agents and Emerging Treatments in the Management of Rheumatic Diseases, Italija 2010.

Stendiniai pranešimai

1. “Correlation of TGF-beta1 with some clinical parameters in patients with rheumatoid arthritis and secondary Sjogrens’s syndrome associated with rheumatoid arthritis” – EULAR 2007.

2. “Effect of Imatinib mesylate on Endothelial cells functions”– EULAR 2008.

10. LITERATŪROS SARAŠAS

- ¹ Chiffrot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 Feb;37(4):223-35.
- ² Mayes MD. Scleroderma epidemiology *Rheum Dis Clin North Am.* 2003 May;29(2):239-54
- ³ Kahaleh, M.B., Sherer, G.K., and LeRoy, E.C. 1979. Endothelial injury in scleroderma. *J. Exp. Med.* 149:1326–1335.
- ⁴ Kahaleh, M.B. 2004. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16:718–722.
- ⁵ Cerinic, M.M., et al. 2003. Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum.* 32:285–295
- ⁶ McHugh NJ, Distler O, Giacomelli R, Riemekasten G. Non organ based laboratory markers in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(3 Suppl 29):S32–8.
- ⁷ Vancheeswaran, R., Azam, A., Black, C., and Dashwood, M.R. 1994. Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin. *J. Rheumatol.* 21:1268–1276.
- ⁸ Cambrey, A.D., et al.. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994; 11:439–445.
- ⁹ 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: 785–92.
- ¹⁰ Flavahan, N.A., Flavahan, S., Mitra, S., and Chotani, M.A. 2003. The vasculopathy of Raynaud’s phenomenon and scleroderma. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 29:275–291.
- ¹¹ Distler, O., et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ. Res.* 2004. 95:109–116.
- ¹² Davies, C.A., Jeziorska, M., Freemont, A.J., and Herrick, A.L. The differential expression of VEGF, VEGFR-2, and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis. *Hum. Pathol.* 2006. 37:190–197.
- ¹³ Kuwana, M., Okazaki, Y., Yasuoka, H., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet.* 2004. 364:603–610.

-
- ¹⁴ Del Papa, N.D., et al. Bone marrow endothelial progenitors are defective in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:2605–2615.
- ¹⁵ Peter Carmeliet. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6, 389 - 395 (2000) doi:10.1038/74651
- ¹⁶ Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995 May;146(5):1029-39.
- ¹⁷ Muramatsu M, Katada J, Hayashi I, Majima M. Chymase as a proangiogenic factor. A possible involvement of chymase-angiotensin-dependent pathway in the hamster sponge angiogenesis model. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5545-52.
- ¹⁸ Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells.* 1997;15(3):180-9.
- ¹⁹ Kurz H. Physiology of angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000 Oct-Nov;50(1-2):17-35.
- ²⁰ Artlett, C.M. Immunology of systemic sclerosis. *Front. Biosci.* 2005; 10:1707–1719.
- ²¹ Sakkas, L.I., et al.. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J. Immunol.* 2002; 168:3649–3659.
- ²² Tan, F.K., et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford).* 2006; 45:694–702.
- ²³ Mavalia, C., et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am. J. Pathol.* 1997; 151:1751–1758.
- ²⁴ Hu, P.Q., Fertig, N., Medsger, T.A., Jr., and Wright T.M. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:1363–1373.
- ²⁵ Harris, M.L., and Rosen, A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr. Opin.Rheumatol.* 2003; 15:778–784.
- ²⁶ Carvalho, D., Savage, C.O., Black, C.M., and Pearson, J.D. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 1996. 97:111–119.

-
- ²⁷ Henault, J., Robitaille, G., Senecal, J.L., and Raymond, Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:963–973.
- ²⁸ Baroni, S.S., et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354:2667–2676
- ²⁹ Denton, C.P., Black, C.M., and Abraham, D.J. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2006; 2:134–144.
- ³⁰ Varga, J., and Bashey, R.I. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* 1995; 12:187–199.
- ³¹ Abraham, D.J., Exckes, B., Rajkumar, V., and Krieg, T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr. Rheumatol. Rep.* In press. 2007
- ³² Abraham, D.J., and Varga, J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to diseasemodels. *Trends Immunol.* 2005; 26:587–595.
- ³³ Rajkumar, V.S., et al. 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; 7:1113–1123.
- ³⁴ Ramirez, F., Tanaka, S., and Bou-Gharios, G. Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene (COL1A2), an informativemodel system to study fibrotic diseases. *Matrix Biol.* 2006; 25:365–372.
- ³⁵ Blobel, G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 2000. 342:1350–1358.
- ³⁶ Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* 2003. 116:217–224.
- ³⁷ Massague, J., and Gomis, R.R. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 2006. 580:2811–2820.
- ³⁸ Pannu, J., and Trojanowska, M. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004. 16:739–745.
- ³⁹ Moustakas, A., and Heldin, C.H. Non-SmadTGF-beta signals. *J. Cell Sci.* 2005. 118:3573–3584.

-
- ⁴⁰ Daniels, C.E., et al. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2004. 114:1308–1316.
- ⁴¹ Gay, S., Jones, R.E., Jr., Huang, G.Q., and Gay, R.E. Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expression in scleroderma. *J. Invest. Dermatol.* 1989. 92:301–303.
- ⁴² Ludwicka, A., et al. Elevated levels of platelet derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with scleroderma. *J. Rheumatol.* 1995. 22:1876–1883.
- ⁴³ Claman HN, Jaffee BD, Huff JC, Clark RA. Chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma. II. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol.* 1985 Aug;94(1):73-84. PMID: 4016962
- ⁴⁴ Holda JH, Maier T, Claman HN. Graft-vs-host reactions (GVHR) across minor murine histocompatibility barriers. I. Impairment of mitogen responses and suppressor phenomena. *J Immunol.* 1985 Mar;134(3):1397-402.
- ⁴⁵ Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al.: Transforming growth factor type [beta]: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:4167–4171.
- ⁴⁶ Shinozaki M, Kawara S, Hayashi N, et al.: Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor-[beta]: simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 240:292–297
- ⁴⁷ Adamson IYR, Bowden DH: The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 1974, 77:185–197
- ⁴⁸ Ichihashi H, Shinkai H, Takei M, et al.: Analysis of the mechanism of bleomycin-induced cutaneous fibrosis in mice. *J Antibiot* 1973, 26:238–242
- ⁴⁹ Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al.: Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. *Am Rev of Respir Dis* 1979, 120:893–899.
- ⁵⁰ Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al.: Animal model of sclerotic skin I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999, 112:456–462.
- ⁵¹ Zhu J, Cohen DA, Goud SN, et al.: Contribution of T lymphocytes to the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Ann NY Acad Sci* 1996, 796:194–202

-
- ⁵² Yamamoto T, Nishioka K: Animal model of sclerotic skin IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell dependent. *J Invest Dermatol* 2001, 117:999–1001.
- ⁵³ Schrieer DJ, Kunkel RG, Phan SH: The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1983, 127:63–66.
- ⁵⁴ Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K: Animal model of sclerotic skin III: histopathologic comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000, 292:535–541
- ⁵⁵ Haston CK, Amos CI, King TM, et al.: Inheritance of susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the mouse. *Cancer Res* 1996, 56:2596–2601
- ⁵⁶ Haston CK, Travis EL: Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 1997, 57:5286–5291.
- ⁵⁷ Yamamoto T, Nishioka K: Animal model of sclerotic skin V: increased expression of [alpha]-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 2002, 102:77–83
- ⁵⁸ Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K: Fibroblast proliferation by bleomycin stimulated peripheral blood mononuclear cell factors. *J Rheumatol* 1999,26:609–615
- ⁵⁹ Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al.: Effect of superoxide dismutase on bleomycin-induced dermal sclerosis: implications for the treatment of systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1999, 113:843–847
- ⁶⁰ Distler JH, Jünger A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2007 Jan;56(1):311-22.
- ⁶¹ Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 1976;82:493–512.
- ⁶² Kasturi KN, Shibata S, Muryoi T, Bona CA. Tight-skin mouse: an experimental model for scleroderma [review]. *Int Rev Immunol* 1994;11:253–71
- ⁶³ Green MC, Sweet HO, Bunker LE: Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 1976
- ⁶⁴ Saito S, Nishimura H, Brumeanu TD, Casares S, Stan AC, Honjo T, Bona CA. Characterization of mutated protein encoded by partially duplicated fibrillin-1 gene in tight skin (TSK) mice. *Mol Immunol.* 1999 Feb;36(3):169-76.

-
- ⁶⁵ Gardi C, Martorana PA, Calzoni P, et al.: Lung collagen synthesis and deposition in tight-skin mice with genetic emphysema. *Exp Mol Pathol* 1992, 56:163–172.
- ⁶⁶ Osborn TG, Bauer NE: Physical and biochemical manifestations of cardiomyopathy in the tight-skin mouse. *Arthritis Rheum* 1984, 27:S75.
- ⁶⁷ Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557–67.
- ⁶⁸ Pang M, Kothapally J, Mao H, Tolbert E, Ponnusamy M, Chin YE, Zhuang S. Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Oct;297(4):F996-F1005. Epub 2009 Jul 29.
- ⁶⁹ Chuang CY, Liu HC, Wu LC, Chen CY, Chang JT, Hsu SL. J Agric Food Chem. Gallic acid induces apoptosis of lung fibroblasts via a reactive oxygen species-dependent ataxia telangiectasia mutated-p53 activation pathway. 2010 Mar 10;58(5):2943-51.
- ⁷⁰ Distler JH, Jungel 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;56:311–22.
- ⁷¹ Akhmetshina A, Dees C, Pilecky M, Maurer B, Axmann R, Jungel 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;22:2214–22.
- ⁷² Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, et al. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest* 2004;114:1308–16.
- ⁷³ Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2005;201:925–35.
- ⁷⁴ Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J* 2005;19:1–11.
- ⁷⁵ Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, Tsybrovsky O, Hofler G, Haas OA, et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood* 2002;99:381–3.
- ⁷⁶ Bueso-Ramos CE, Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Rios MB, et al. Imatinib mesylate therapy reduces bone marrow fibrosis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2004;101: 332–6.

⁷⁷ Mieliauskaitė D, Venalis P, Dumalakienė I, Gražienė V, Kirdaitė G, Venalis A. Serum levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Acta Medica Lituanica*. 2008. Vol. 15. No. 4.

⁷⁸ Mieliauskaite D, Venalis P, Dumalakiene I, Venalis A, Distler J. Relationship between serum levels of TGF-beta1 and clinical parameters in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2009 May;42(4):356-8.

⁷⁹ Ando W, Hashimoto J, Nampei A, Tsuboi H, Tateishi K, Ono T, et al. Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). *J Bone Miner Metab* 2006;24:274–82.

⁸⁰ Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, et al. Treatment with anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGFbeta signaling. *Kidney Int* 2004; 65:63–74.

⁸¹ Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2003; 33:407–411.

⁸² Beijnen JH, Schellens JH. Drug interactions in oncology. *Lancet Oncol* 2004;5:489–96.

⁸³ Nygren P, Larsson R. Overview of the clinical efficacy of investigational anticancer drugs. *J Intern Med* 2003;253:46–75.

⁸⁴ Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561–6.

⁸⁵ Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 1997;90:3691–8.

⁸⁶ Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577–80.

⁸⁷ Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342–9.

⁸⁸ Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* 2006;12:908–16

-
- ⁸⁹ Lowell CA. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* 2004;41:631–43.
- ⁹⁰ Catarzi S, Biagioni C, Giannoni E, Favilli F, Marcucci T, Iantomasi T, et al. Redox regulation of platelet-derived-growth-factorreceptor: role of NADPH-oxidase and c-Src tyrosine kinase. *Biochim Biophys Acta* 2005;1745:166–75.
- ⁹¹ Kim HP, Kim TY, Lee MS, Jong HS, Kim TY, Lee JW, et al. TGF- β -1-mediated activations of c-Src and Rac1 modulate levels of cyclins and p27(Kip1) CDK inhibitor in hepatoma cells replated on fibronectin. *Biochim Biophys Acta* 2005;1743:151–61.
- ⁹² Mishra R, Zhu L, Eckert RL, Simonson MS. TGF- β -regulated collagen type I accumulation: role of Src-based signals. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1361–9.
- ⁹³ Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Transforming growth factor- β -1-dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPKdependent signaling in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:8567–76.
- ⁹⁴ Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2003;278:12384–9.
- ⁹⁵ Vittal R, Horowitz JC, Moore BB, Zhang H, Martinez FJ, Toew GB, et al. Modulation of prosurvival signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury. *Am J Pathol* 2005;166:367–75.
- ⁹⁶ Skhirtladze C, Distler O, Dees C, Akhmetshina A, Busch N, Venalis P, Zwerina J, Spriewald B, Pileckyte M, Schett G, Distler JH. Src kinases in systemic sclerosis: central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2008 May;58(5):1475-84.
- ⁹⁷ Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, et al. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* 2004;113:885–94.
- ⁹⁸ Nautiyal J, Majumder P, Patel BB, Lee FY, Majumdar AP. Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by modulating EGFR signaling. *Cancer Lett.* 2009 Oct 8;283(2):143-51. Epub 2009 Apr 26.
- ⁹⁹ Yi ZF, Cho SG, Zhao H, Wu YY, Luo J, Li D, Yi T, Xu X, Wu Z, Liu M. A novel peptide from human apolipoprotein(a) inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting c-Src phosphorylation in VEGF-induced human umbilical endothelial cells. *Int J Cancer.* 2009 Feb 15;124(4):843-52.

¹⁰⁰ Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate– a new oral targeted therapy. *N Engl J Med.* 2002; 346: 683–93.

¹⁰¹ Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007; 117: 557–67.

¹⁰² Sfikakis PP, Gorgoulis VG, Katsiari CG, et al. Imatinib for the treatment of refractory, diffuse systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2008; Oxford University

¹⁰³ The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, Palumbo K, Zwerina J, Nevskaya T, Gay S, Distler O, Schett G, Distler JH. *Arthritis Rheum.* 2010 Jan;62(1):280-90.

¹⁰⁴ Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. Maurer B, Busch N, Jüngel A, Pileckyte M, Gay RE, Michel BA, Schett G, Gay S, Distler J, Distler O. *Circulation.* 2009 Dec 8;120(23):2367-76. Epub 2009 Nov 23.

¹⁰⁵ Helmbold P, Fiedler E, Fischer M, Marsch W. Hyperplasia of dermal microvascular pericytes in scleroderma. *J Cutan Pathol* 2004;31(6):431-40.

¹⁰⁶ Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ, Rubin K, Black CM. Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42(5):930-41.

¹⁰⁷ Orledge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1987;105(3):1455-62.

¹⁰⁸ Chen Y, Leask A, Abraham DJ, Pala D, Shiwen X, Khan K, et al. Heparan sulfate-dependent ERK activation contributes to the overexpression of fibrotic proteins and enhanced contraction by scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2008;58(2):577-85