

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

FOTODINAMINĖS TERAPIJOS POVEIKIS UŽDEGIMINIAM PROCESUI
EKSPERIMENTINIO ANTIGENU SUKELTO ARTRITO METU

Magistrantė MONIKA PETKEVIČIŪTĖ

(parašas)

Darbo vadovė
dr. G. Kirdaitė

(parašas)

Darbo mokslinė konsultantė
Doc., dr. J. Dadonienė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

TURINYS

Tekste naudojamų trumpinių sąrašas	3
1. ĮVADAS	4
2. LITERATŪROS APŽVALGA	6
2.1. Reumatoidinis artritas	6
2.2. Eksperimentiniai artrito modeliai	10
2.2.1. Adjuvantu indukuotas artritas	11
2.2.2. Kolagenu indukuotas artritas	11
2.2.3. Proteoglikanu indukuotas artritas	12
2.2.4. Streptokoko ląstelės sienelės sukeltas artritas	12
2.2.5. Antigenu indukuotas artritas	13
2.3. Fotodinaminė terapija ir jos taikymas reumatoidinio artrito gydymui	14
3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS	17
3.1. Tyrimo medžiaga	17
3.2. Tyrimo metodai	17
3.2.1. Antigenu indukuoto artrito (AIA) sukėlimas	17
3.2.2. Fotodinaminės terapijos metodika	18
3.3. Statistinė analizė	20
4. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	21
4.1. Antigenu indukuoto artrito (AIA) sukėlimas, jo kaip monoartrito, tinkamumo vertinimas lokaliai artrito gydymui	21
4.2. Eksperimentinio AIA modelio gydymas fotodinamine terapija	24
4.3. Rezultatų aptarimas	34
5. IŠVADOS	36
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS	37
SUMMARY	41
Priedai	

Tekste naudojamų trumpinių sąrašas

AIA – antigenų indukuotas artritas
ALA – aminolevulino rūgštis
CRB – C reaktyvus baltymas
DKS – dešinieji kelio sąnariai
ENG – eritrocitų nusėdimo greitis
FA – Froido adjuvantas
FDT – fotodinaminė terapija
FS – fotosensibilizatorius
IL – interleukinai
KKS – kairieji kelio sąnariai
MMP – matrikso metaloproteinazė
OA – ovalbuminas
PpIX – protoporfirinas IX
RA – reumatoidinis artritas
TNF – navikų nekrozės faktorius
ŪFB – ūmios fazės baltymas

1. ĮVADAS

Reumatoidiniu artritu (RA) – lėtinė uždegimine sąnarių liga serga apie 1-3% pasaulio gyventojų [33]. Vilniaus mieste žmonių su negalia dalis dėl RA sukeltų pažaidų sudaro net 55%. Remiantis statistiniais tyrimais buvo parodyta, kad po dešimties metų nuo ligos pradžios 50% sergančių reumatoidiniu artritu neišvengiamai tampa neįgaliaisiais, ir daugiau nei 50% ligonių yra priklausomi nuo savo artimųjų [8].

Jau daugiau nei dešimtmetį pasaulinėje klinikinėje praktikoje, o taip pat ir Lietuvoje, kai kurių onkologinių susirgimų gydymui sėkmingai taikomi fotodinaminės terapijos (FDT) metodai [4]. Pastaraisiais metais susidomėta artrito gydymui taikyti FDT, nes uždegiminė reumatoidinė membrana pasižymi daugeliu požymių, būdingų neoplaziniams audiniams – padidėjusiu metaboliniu aktyvumu, aktyvia vaskuliarizacija, nekontroliuojama sinoviocitų proliferacija. Chirurginis uždegiminės kremzlės šalinimas yra skausmingas ir traumuoja sąnarį, o fotodinaminė terapija yra neinvazyvus, netraumuojantis sąnario gydymo metodas [14]. Australų mokslininkų tyrimai parodė, kad sensibilizatoriai kaupiasi uždegiminiuose sinovijos audiniuose, o pritaikyta FDT sukelia sinovektomiją gyvūnų reumatoidinio artrito modeliuose [3].

Mokslininkai savo tyrimams stengiasi parinkti labiausiai panašų eksperimentinį modelį, kuris pagal pakenktų sąnarių pobūdį atitiktų reumatoidinį artritą (RA), būtų pakankamai išreikštas pagal savo klinikinius ir laboratorinius rodiklius. Labiausiai panašus į žmogaus reumatoidinį artritą yra antigenų indukuoto artrito (AIA) modelis. Tyrimams buvo pasirinkti triušiai, nes jų kelio sąnario sandara yra artima žmogaus mažojo piršto sąnariui, be to sąnarys yra pakankamai didelis, palyginus su graužikais, todėl patogus tirti. Antigenų indukuotas artritas tai monoartritas, kuris suteikia galimybę palyginti to paties gyvūno kojų sąnarius [35].

Reumatoidinio artrito metu vyksta sinovijos uždegimas, kurio mastui įvertinti yra nustatomi uždegiminiai rodikliai geriausiai atspindintys uždegimo aktyvumą [38].

Šio darbo tikslas: Sprendžiant uždegiminio proceso sąnariuose lokalaus gydymo problemas, numatoma išanalizuoti fotodinaminės terapijos poveikį antigenų sukeltai artrito eigai.

Šiam tikslui įgyvendinti buvo išskelti uždaviniai:

1. *Įvertinti AIA modelio vystymąsi ir tinkamumą eksperimentui:*

1.1. Bendrųjų kraujo rodiklių dinamiką, kūno masės pokyčius.

1.2. Monoartrito klinikinius požymius.

2. *Išanalizuoti fotodinaminės terapijos poveikį uždegiminiam procesui:*

2.1. Bendriesiems kraujo rodikliams, kūno masės pokyčiams.

2.2. Klinikiniams AIA eigos parametrams.

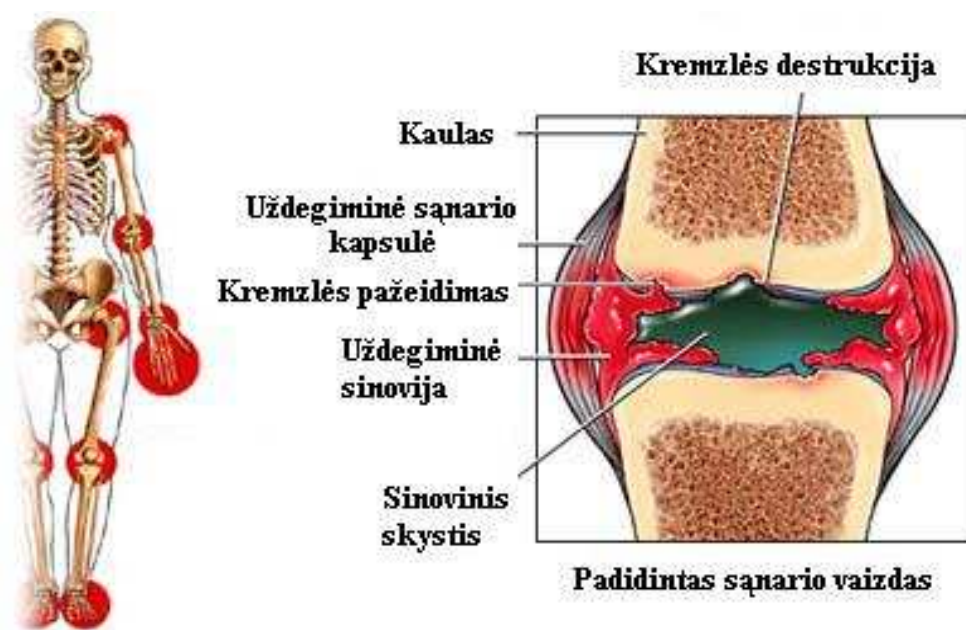
2.3. Galutiniams histologiniams kelio sąnarių audinių pokyčiams.

Darbas atliktas VU Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institute vadovaujant daktarei Gailutei Kirdaitei.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Reumatoidinis artritas

Reumatoidinis artritas yra lėtinė sisteminė autoimuninė liga, kuriai būdingas lėtinis daugelio sąnarių uždegimas. Pažeistiems sąnariams būdinga sinovijos hiperplazija ir hipertrofija su padidėjusiu sinovinio skysčio kiekiu, vėlesnėse stadijose – kremzlės ir kaulinių struktūrų pažeidimas [33] (2.1.1 pav.).



2.1.1 pav. Reumatoidinio artrito pažeisti sąnariai [41].

RA kilmė iki šiol nenustatyta, nors žinoma, kad tai yra autoimunine liga, pasireiškianti antigenui specifiniu imuniniu atsaku. Artritogeninis sukėlėjas taip pat tiksliai nežinomas, bet tai gali būti infekcinės kilmės agentas: bakterija, bakterijos komponentas ar virusas. Jis gali būti gydomas operacijos metu pašalinant sinoviją (sinovektomija) arba lokaliai suleidžiant radionuklidų ar kitų citotoksinių medžiagų (sinovioartezė), tačiau pastaruosius du gydymo metodus riboja sąnarių dydis ir jie ne visada veiksmingi [25, 24]

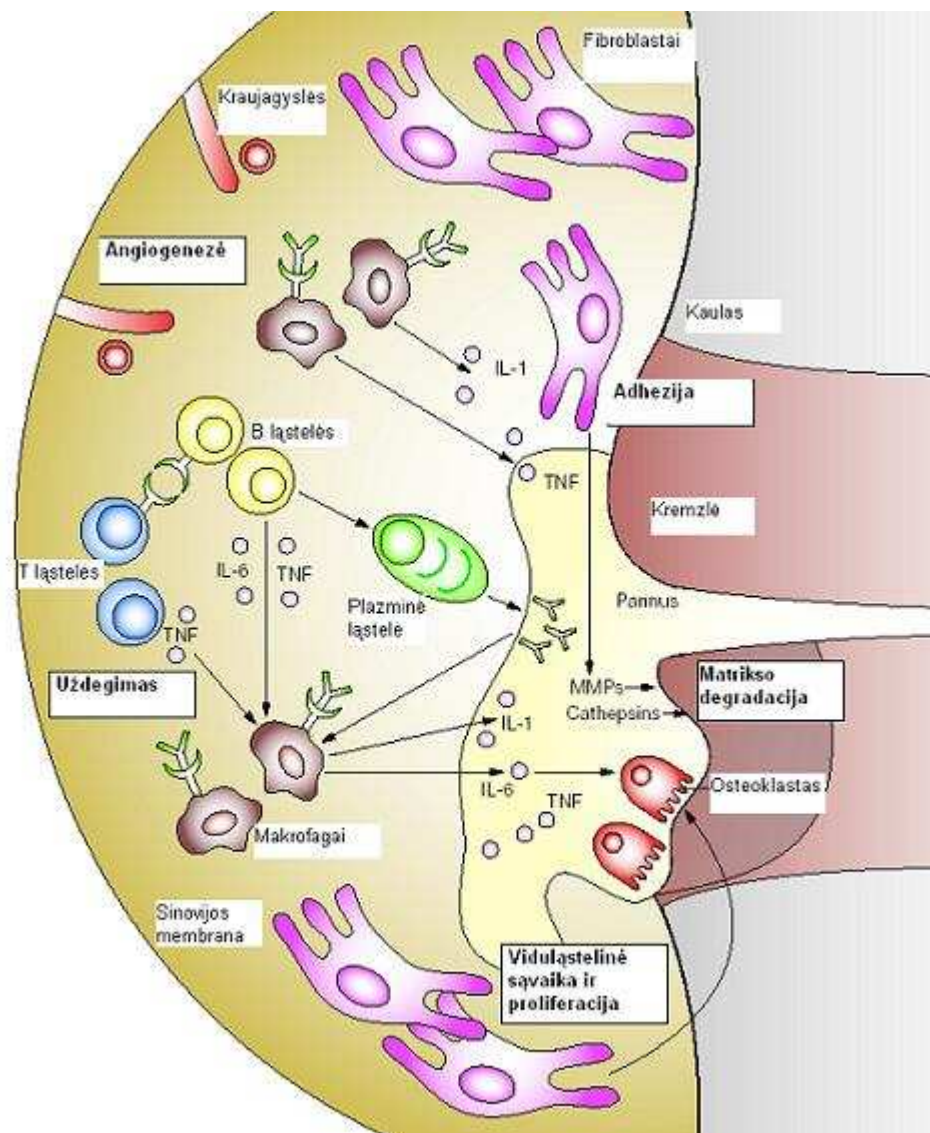
Reumatoidinio artrito sąnariui būdingos šios histopatologinės savybės: imuniniai kompleksai sąnario kremzlės sluoksniuose ir įvairus makrofagų bei T limfocitų kiekis sinovijoje, o taip pat fibrozė ir sinovijos hiperplazija [35].

Skirtingi signaliniai ir efektoriniai keliai reumatoidinėje sinovijoje, kurie prasideda ikiklinikinėje ligos stadijoje, vedą prie patofiziologinių įvykių kaskados, kuri pasibaigia progresyvia ir negrįžtama sąnario destrukcija. Reumatoidinio sinovito vystymuisi ir

persistavimui reikalingas įvairių ląstelių bendradarbiavimas, įskaitant sinovijos ląsteles (fibroblastus, endotelines ir perivaskuliarines ląsteles), makrofagus, dendritines ląsteles, ir kitas efektorines imuninės sistemos ląsteles. Reumatoidinio artrito sinovijos fibroblastai (RASf), kurie sveikame sąnaryje dalyvauja sinovijos homeostazėje, manoma yra pagrindiniai veikėjai, lemiantys sąnario destruktijos patogenezę kartu su kitomis mezenchiminėmis ir imunokompetentinėmis ląstelėmis [23]

Tyrimai rodo, kad makrofagai ir fibroblastai formuoja parakrininį ir autokrininį tinklą ir tokia ląstelių sąveika skatina lėtinio sinovito vystymąsi [10]. (2.1.2 pav.)

Penki pagrindiniai faktoriai: viduląsteliniai signalai ir proliferacija, adhezija, uždegimas, angiogenezė ir matrikso degradacija yra susieti įvairiais uždegiminių ląstelių mediatoriais (TNF, IL-1, IL-6, matrikso metaloproteinazės, kathepsinai) .



2.1.2 pav. Uždegimo ir pažeidimo mechanizmai reumatoidiniame sąnaryje [23]

Iš uždegiminių citokinių, kurie padidina destruktinį RASF potencialą, ypač domimasi IL-1 β ir TNF. Šie citokinai daugiausiai gaminami makrofaginėse ląstelėse, kurios iškloja sinoviją ir ekspresuoja daugybės kitų citokinių, chemokinių ir prostaglandinų. Be to, IL-1 β ir TNF tiesiogiai stimuliuoja matriksą degraduojančių fermentų, tokių kaip matrikso metaloproteinazės (MMP) produkciją [23]

Uždegiminei sinovijai, ypač sinovinei membranai, būdinga didelė T, B ląstelių, plazminių, NK, dendritinių ląstelių infiltracija. Sąveikaujant šioms ląstelėms ir makrofagams, atsipalaiduoja chemokinai bei padidėja chemokinių receptorių ekspresija. T ląstelių susikaupimą skatina sinovijos fibroblastai [29].

Reumatoidinio artrito metu patobiologiniai vyksmai gali būti suskirstyti tokia seka: 1) sinovinis uždegimas; 2) pakitęs humoralinis ir ląstelinis imuninis atsakas; 3) sinovijos hiperplazija bei panus formavimasis [30]. Nenormali ląstelė-ląstelė, ląstelė-matriksas ir viduląstelinė sąveika, kintanti dėl įvairių tirpių mediatorių, suformuoja šių procesų pagrindą ir skatina lėtinį sąnario uždegimą, sistemine manifestacija bei sukelia jungiamojo audinio ir sąnario struktūrų pažeidimą RA metu. Sinovijos uždegimas ir pakitęs imuninis atsakas sąlygoja sąnario skausmo vystymąsi ir tinimą. Daugelis mediatorių ir mechanizmų, dalyvaujančių RA, nėra specifiniai šiai ligai ar sąnario uždegimui, bet jų sąveika turi didžiulį poveikį uždegimui ir sąnario destruktijai RA metu [31].

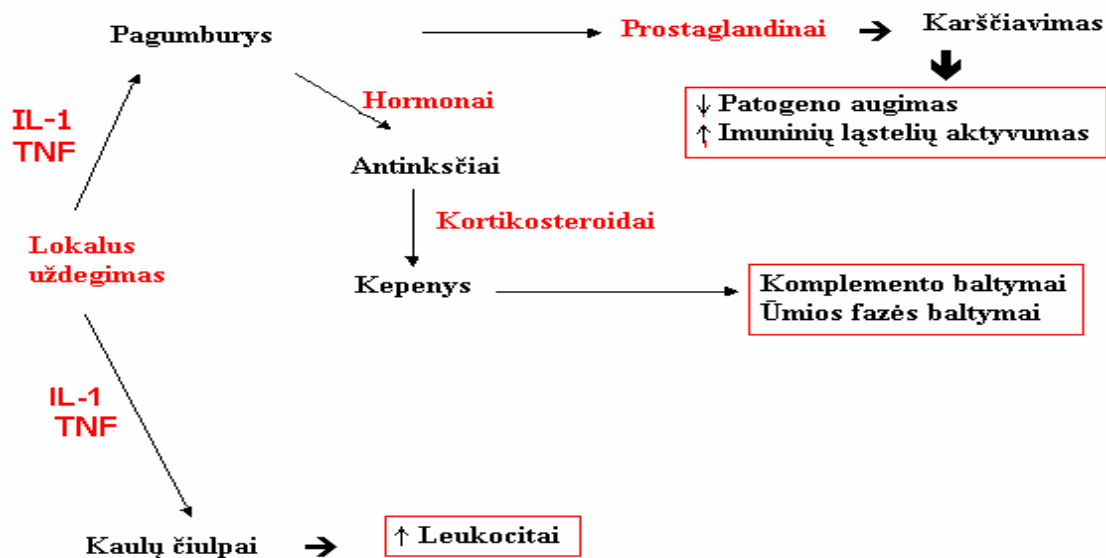
Uždegimo mediatorių prigimtis, jų stabilumas, aktyvumas, difuzijos bei išbuvimo audinyje ir skystoje fazėje pajėgumas, gali taip pat kritiškai įtakoti jų vaidmenį. Uždegiminio sąnario aplinka yra rūgštinė ir hipoksinė. Sinovinio skysčio klampumas sumažėja dėl hialurono rūgšties degradacijos, kremzlės maitinimas susilpnėja, be to yra randamos mikroskopinės ir makroskopinės audinių nuolaužos bei fibrino nuosėdos [31].

Sąnarys yra uždara sistema, kuri pati neišsivalo. Kad uždegimo nuolaužos būtų pašalintos, iš pradžių jos turi būti degraduotos, fagocituotos ar kitoku būdu eliminuotos. Taigi mikroaplinka pati gali nulemti ir skatinti daugelį biologinių efektų nuo genų indukcijos iki sąnario audinių formuojančių makromolekulių pokyčių [31].

Ūmios fazės atsakas, tai terminas dažniausiai naudojamas apibūdinti bendriems įvairiems sisteminiams ir lokaliems pokyčiams, kurie lydi uždegimo procesą atsirandusį dėl audinių pažeidimo. Nepaisant to, kad atsakas vadinamas ūmios fazės, pokyčiai pasireiškia tiek ūmaus, tiek lėtinio uždegimo metu [31].

Uždegimo sisteminių reakcijų spektre du fiziologiniai atsakai yra susiję su ūmiu uždegimu. Pirmasis susijęs su temperatūros pakitimais veikiant pagumburį, kurio poveikyje karščiuojama. Kitas apima metabolizmo ir genų reguliacijos pokyčius kepenyse [39] (2.1.3 pav.).

SISTEMINIS ŪMIOS FAZĖS UŽDEGIMO ATSAKAS



4 pav. Sisteminis ūmios fazės uždegimo atsakas [40].

Svarbu aptarti ūmios fazės atsaką kaip dinaminį homeostatinį procesą, kuris įtakoja visas didžiąsias organizmo sistemas: imuninę, kardiovaskulinę ir centrinę nervų sistemą. Normaliomis sąlygomis ūmios fazės atsakas trunka tik kelias dienas, tačiau esant lėtiniam ar pasikartojančiam uždegimui, netipiškas kai kurių ūmios fazės atsako užsitęsimas, gali prisidėti prie audinio pažeidimo. Tokiu būdu gali būti skatinamos tolesnės komplikacijos, pavyzdžiui baltymų nusėdimo ligos tokios kaip amiloidozė [31].

Kita svarbi ūmios fazės atsako išraiška yra radikaliai pakeistas kepenų biosintetinis vaidmuo. Normaliomis sąlygomis kepenys sintetina būdingas plazmos baltymų grupes palaikydamos pastovias jų koncentracijas. Daugelis šių baltymų pasižymi svarbiomis funkcijomis ir didesnis šių ūmios fazės baltymų (ŪFB) lygis plazmoje yra reikalingas vykstant ūmios fazės atsakui [31].

Pagrindiniai parametrai dažniausiai naudojami ūmios fazės atsakui įvertinti yra eritrocitų nusėdimo greitis (ENG), plazmos klampumas ir ūmios fazės baltymų koncentracijos plazmoje nustatymas [31].

Ūmios fazės baltymai uždegimo metu nespecifiškai jungiasi prie eritrocitų, tuo didindami jų nusėdimo greitį. Šis reiškinys yra susijęs su bet kokios kilmės uždegimu, piktybiniu procesu arba sisteminė reakcija. ENG tyrimas yra nespecifinis, tačiau jis visuomet padeda diferencijuoti uždegiminio proceso kilmę, be to jis yra gana patikimas rodiklis vertinant gydymo veiksmingumą [1].

ENG apibrėžiamas kaip kraujo forminių elementų nusėdimas per laiko tarpą autologinėje plazmoje tam tikromis tiksliai apibrėžtomis sąlygomis [21]. Eritrocitų nusėdimo

greitis yra paprastas ir nebrangus laboratorinis testas dažnai naudojamas ūmios fazės atsakui įvertinti. Eritrocitų agregacija vyksta dėl eritrocitų paviršiaus krūvių ir jėgų esančių aplink ląsteles. Eritrocitai yra įkrauti neigiamai, todėl stumia vienas kitą. Didelės molekulinės masės teigiamai įkrauti baltymai skatina agregatų formavimąsi, tokiu būdu padidindami ENG. Fibrinogenas turi didžiausią poveikį ENG padidėjimui, palyginus su kitais ūmios fazės baltymais. Dėl šios priežasties plazmos klampumo įvertinimas koreliuoja su ENG, bet nėra toks patikimas kaip ENG, nes jis yra nežymiai veikiamas trumpalaikių pokyčių ūmaus atsako metu [28].

Reumatoidinio artrito metu, ENG yra naudojamas kaip pagalbinis ligos stadijai įvertinti, jis atspindi klinikinį ligos intensyvumą [37] ENG trūkumas yra tas, kad sveikstant, šis rodiklis gali būti padidėjęs keletą savaičių po klinikinių, laboratorinių požymių normalizavimosi [38].

2.2. Eksperimentiniai artrito modeliai

Artrito eksperimentiniai modeliai naudojami tirti veiksnius išprovokuojančius lėtinį artritą, lėtinį procesą reguliuojančius mechanizmus ir audinių pažeidimus. Sukūrus modelį, svarbu įrodyti, kad tokios reakcijos vyksta ir žmogaus artrito atveju [35].

Reumatoidinio artrito tyrimuose plačiausiai naudojami eksperimentiniai modeliai yra šie: adjuvantu sukeltas artritas, kolagenu sukeltas artritas, antigenu indukuotas artritas ir streptokoko ląstelių sienelių pagalba sukurti artrito modeliai, taip pat proteoglikanu sukeltas artritas. T limfocitai visuose artrito modeliuose atlieka svarbiausia vaidmenį. Kitas svarbus veiksnys yra lėtinis stimulus, kuriuo gali būti pastovus antigenas arba autoantigenas prieš sąnario struktūras. Pastovūs antigenai yra nedegraduojamos bakterijų sienelės sinovijos audinyje ar antigenai esantys kolagenu turinguose audiniuose, tokiuose kaip raiščiai ir sąnario kremzlė. Fagocitozė šiuo atveju nevyksta. Kita nuolatinių veiksmų kategorija yra suformuojama autoantigenų prieš sąnario kremzlę. Šiuo atveju autoantigenas gali būti II tipo kolagenas ir proteoglikanai. Adjuvantu ir streptokokų sienelių indukuotuose artrito modeliuose kremzlė taip pat gali funkcionuoti kaip autoantigenas, tai susiję su struktūriniu supanašėjimu tarp bakterijų peptidoglikanų ir kremzlės proteoglikanų. Tačiau, turi būti galutinai įrodyta, kad šis kryžminio reaktyvumo atsakas tikrai prisideda prie artrito sukėlimo [35].

Eksperimentinių modelių mikrobiniai komponentai, būtent mikroorganizmų ląstelių sienelių fragmentai, be jų sugebėjimo sukelti artritą, dėl tiesioginės lokalizacijos sąnario audinyje, gali sukelti artritą dėl molekulinės mimikrijos su sąnario struktūromis. Yra gausu

įrodymų, besiremiančių klinikiniais stebėjimais, kad bakterinės infekcijos ir artrito vystymasis gali būti susiję [35].

2.2.1. Adjuvantu indukuotas artritas

Šiam artritui sukelti daroma pilno Froido adjuvanto su karščiu užmuštomis mikobakterijomis injekcija į dermą. Jautrioms žiurkių linijoms (Lewis linijos žiurkėms) artritas išsivysto per 2 savaites. Adjuvantu sukkelto artrito pasireiškimas ir imlumas priklauso nuo gyvūno linijos [35].

Histopatologinės adjuvanto artrito savybės atspindi periartritą su periostitu vietoj sinovito ir masyvų uždegimą kaulų čiulpuose. Imuninių kompleksų nusėdimas kremzlėje nėra būdingas, o kremzlės destrukcija ankstyvoje ligos eigoje yra ribota [34].

Adjuvanto artrito modeliai pasižymi spontanišomis remisijomis ir imlumo pakartotinei indukcijai stygiumi. Šis atsparumas yra specifinis antigeniui. Tai susiję su reguliaciniais T limfocitais, kurie atpažįsta antigeniui specifinius receptorių ant T limfocitų, kurie skatina artritą, ir gali užblokuoti šių ląstelių aktyvumą. Reguliacinės ląstelės pačios nėra artritoginės [35].

Nesteroidiniai prieš uždegiminius vaistai yra efektyvūs kremzlės ir kaulo destrukcijos inhibitoriai šiame modelyje, priešingai negu žmonių reumatoidinio artrito atveju. Todėl šis modelis kelia abejonių dėl jo tinkamumo [35].

2.2.2. Kolagenu indukuotas artritas

Artritas sukliamas natyviu sąnario kremzlės komponentu - II tipo kolagenu. Kiti sąnario kremzlę sudarantys kolagenai, taip pat gali funkcionuoti kaip artritoginiai, pavyzdžiui IX ir XI tipo kolagenai. Lemiamas elementas šio artrito patogenezėje yra imuniškumo indukcija svetimam II tipo kolagenui, vėliau kryžminis reagavimas su homologišku II tipo kolagenu. Taip pat gali būti naudojama paprasta imunizacija su homologiniu II tipo kolagenu [7].

Artritas žiurkėms pasireiškia per 14 dienų. Tačiau pelėms ligos ekspresija yra labiau laipsniška, prasideda po 3-4 savaičių [35].

Priešingai adjuvantu indukuotam artritui, kolagenu artritas yra lokalizuotas periferiniuose sąnariuose. Kolagenu artrito histopatologija rodo aiškų ūmų sinovitą su granulocitų gausa ir kaulo erozija bei panus formavimusi. Visiškas sąnario kremzlės

sunykimasis po 2 savaičių ir artritas baigiasi ankiloze su ribotu uždegimu. Pagrindinė artrito remisijos priežastis šiuo atveju yra trumpas antigeno išsilaikymas [35].

Kolagenu indukuoto artrito mechanizmas paremtas dviem principais: turi būti antikolageniniai antikūnai ir T limfocitų imuniškumas prieš II tipo kolageną. Nors antikūnai ir vieni gali sukelti artritą, tačiau reikalingos didelės jo koncentracijos, o sukeltas artritas būna trumpalaikis. Kolagenu sukulto artrito ekspresija gali būti sustiprinta papildomais antikūnais prieš II tipo kolageną, nespecifiniais uždegiminiais stimulais, tokiais kaip lipopolisacharidai ar pavienių uždegimo mediatorių IL-1, TNF- α ar transformuojančio augimo faktoriaus- β (TGF- β) papildymu [15].

2.2.3. Proteoglikanu indukuotas artritas

Proteoglikanu sukeltas artritas palyginti naujas modelis. Proteoglikanas yra vienas pagrindinių sąnario kremzlės sudedamųjų komponentų. Artritogeninis epitopas yra baltyminė šerdis [22].

Proteoglikano modelis atitinka poliartritą, su stipria kremzlės erozija ir žymia ankiloze. Taip pat buvo pastebėta, kad į procesą įtraukiami juosmeninė stuburo dalis ir disko regionai, todėl modelis gali būti taikomas ir spondilitui tirti [35].

Didžiausia ir stipriausia proteoglikanu indukuoto artrito išraiška yra antikūnai ir T limfocitų imuniškumas proteoglikanui. Antiproteoglikanų antikūnai patys sugeba sukelti žymų proteoglikanų kiekio sumažėjimą kremzlėje be aiškaus sinovito [35].

Deja, ieškant tokio antiproteoglikanų imuniškumo pacientams sergantiems reumatoidiniu artritu nepavyko gauti patikimų rezultatų, kurie paremtų jo vaidmenį žmogaus artrite [35].

2.2.4. Streptokoko sienelės sukeltas artritas

Šis modelis sukliamas atliekant sisteminę A grupės streptokokų sienelės fragmentų injekciją. Buvo naudojami ir kitų bakterijų, tokių kaip *Lactobacillus casei* ar *Eubacterium aerofaciens*, sienelių fragmentai artritui sukelti. Principas paremtas mažu fragmentų degradacijos laipsniu, todėl sukuriamas ilgalaikis stimulus. *Lactobacillus* ir eubakterijų modeliai sukurti norint nustatyti jų įmanomą poveikį žmogaus sveikatai, nes šios bakterijos yra dalis normalios gastrointestinalinės floros [35].

Per 24 h nuo sienelės fragmentų įvedimo, ūmus uždegimas išsivysto periferiniuose sąnariuose ir sutampa su bakterijų sienelės fragmentų pasklidimu sinovijos kraujagyslėse ir

subchondrinių kaulų čiulpuose. Šis ūmus nuo komplemento priklausomas uždegimas nuslūgsta per kitą savaitę, po to, per 2 savaites, atsiranda lėtinis erozinis poliartritas, kuris apima daugiausiai periferinius sąnarius. Lėtinėje fazėje šis artritas yra panašus į žmogaus RA, nes pasireiškia ligos paūmėjimais ir remisijomis. Yra tik kelios pelių linijos imlios šiai artrito formai [35].

Ankstyviems histopatologijos rezultatams būdingas stiprus mononuklearinis sinovitas, su negausia eksudacija sąnario ertmėje bei ribotu proteoglikanų netekimu iš sąnarinės kremzlės. Tik vėlesnėse lėtinio artrito stadijose buvo pastebimas žymus panus formavimasis ir ryškios kremzlės bei kaulo erozijos [34].

Pagrindinė priežastis, kodėl šis modelis ribotai naudojamas tyrimams, yra ta, kad yra sudėtinga paruošti artritogenines bakterinių ląstelių sieneses [35].

2.2.5. Antigenų indukuotas artritas (AIA)

Šis modelis gali būti sukeltas daugeliui gyvūnų rūšių (pelėms, žiurkėms ir jūros kiaulytėms, triušiams). Priešingai poliartritiniams modeliams, šis artrito tipas išlieka ribotas viename sąnaryje (monoartritas), tai leidžia lyginti su to paties gyvuliuko kitos kojos sąnariu [35].

Dažniausiai naudojami antigenai yra ovalbuminas, jaučio serumo albuminas ir fibrinas. Preimunizacija yra atliekama antigenų pilname Froido adjuvante, tokiu būdu sukeliamas stiprus humoralinis bei ląstelinis imuniškumas. Artritas dažniausiai indukuojamas po 3 savaitžių atlikus lokalią didelio kiekio antigeno injekciją į kelio sąnarį. Triušiams lėtinė ligos forma gali trukti ne vienerius metus [35].

Histopatologinis vaizdas – granulocitų turtingas eksudatas sąnario ertmėje, sinovinio sluoksnio išvešėjimas, vėlesnėse stadijose – daugiausiai infiltracija mononuklearais, kartu su gausiu T limfocitų skaičiumi ir plazminių ląstelių grupėmis. Intensyvus imuninių kompleksų formavimasis stebimas išoriniuose sąnario kremzlės paviršiuose, tai skatina kremzlės ardymo procesą. Būdingas ankstyvas proteoglikanų netekimas, po to panus formavimasis bei kremzlės ir kaulo erozijos. Šiais požymiais AIA modelis yra artimiausias žmogaus reumatoidiniam artritui [35].

Du svarbūs veiksniai paaiškėję tiriant antigenų sukeltus artritus yra: 1. Lėtinė forma randama tik tada, kai antigenas pakankamai išbūna sąnario audiniuose bei yra reikiamas T limfocitų hiperjautrumas; 2. Kremzlė, raiščiai ir sausgyslės yra nevaskuliarizuoti audiniai, todėl antigenas išsilaiko ilgiau, tokiu būdu palaikomas lėtinis artritas. Antigenas suleistas į

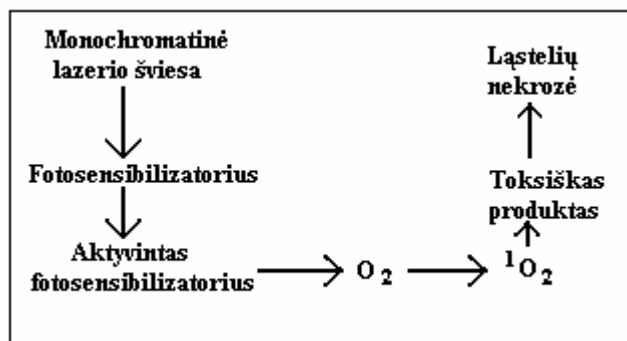
sąnarių sukelia lėtinį artritą. Lėtinė artrito eiga yra susijusi su lokaliomis lėtinėmis padidėjusio jautrumo reakcijomis. Nors sukelti artritui reikalingi palyginti dideli antigeno kiekiai, tačiau ligos palaikymui pakanka net mažų kiekių [35].

Antigenų indukuoto artrito modelis yra tinkamiausias tyrinėti kremzlės bei sinovijos pažeidimo mechanizmą, svarbu, kad yra žinomas tikslus artrito pradžios laikas, kelio sąnarys yra gerai prieinamas tyrimams ir jį galima lyginti su to paties gyvūno kitos kojos sąnariu [35].

2.3. Fotodinaminė terapija ir jos taikymas reumatoidinio artrito gydymui

Fotodinaminė terapija pagrįsta šviesai jautrių medžiagų selektyviu susikaupimu navikiniuose bei kituose greitai proliferuojančiuose audiniuose, po to šios struktūros apšvitinamos fotosensibilizatoriaus absorbcijos maksimumą atitinkančia šviesa. FDT principas gali būti suskirstytas į du etapus: I etapas fotosensibilizatoriaus (FS) suleidimas į organizmą, jo susikaupimas mitotiškai aktyviose ląstelėse ir audiniuose, II etapas – FS šiose struktūrose yra aktyvinamas tam tikro ilgio monochromatine lazerio banga [11].

Patekusios į organizmą fotosensibilizatoriaus molekulės yra neaktyvios ir negali inicijuoti fotocheminių vyksmų. Tokias molekules apšvitinus tinkamo bangos ilgio šviesa, įvyksta fotosužadınimas, t.y. molekulės peršoka į sužadintąją didesnės energijos būseną. Dėl sužadınimo energijos pernašos susidarę laisvieji radikalai yra labai aktyvūs ir inicijuoja biomolekulių oksidacijos reakcijas, sukeliančias ląstelių žūtį. Sužadinta deguonies molekulė taip pat yra chemiškai labai aktyvi, oksiduoja biomolekules ir, sutrikdydama ląstelių metabolizmą, sukelia ląstelių žūtį (2.3.1 pav.). Pažaidų vieta priklauso nuo to, kur susikaupęs sensibilizatorius, nes sužadintos molekulės gyvuoja labai trumpai ir negali toli nukeliauti. Daugelis fotosensibilizatorių gali generuoti tiek laisvuosius radikalus, tiek ir aktyvias deguonies formas [27].



2.3.1 pav. Fotodinaminės terapijos principas [18].

Viduląstelinės struktūros - taikiniai yra ląstelės membrana, mitochondrijos, lizosomos, ir branduolys. FDT poveikyje ląstelės membranos pažeidimas įvyksta po kelių minučių [13], aktyvintas deguonis reaguoja su ląstelės citoplazmoje bei organelių membranose esančiomis medžiagomis, prasideda fotocheminės reakcijos, lemiančios tų stuktūrų pažeidimus [11]

Biosubstrato oksidacija vyksta jam reaguojant su singuletinium deguonimi ($^1\text{O}_2$), sąveikaudamas su substratu singuletinis deguonis sudaro nestabilius ciklinius peroksidus, kurie vėliau terminių ir fermentinių reakcijų metu suyra. $^1\text{O}_2$ nuo oksiduojamų substratų gali atplėšti elektroną ir sudaryti superoksidinius radikalus O_2^- . Taip susidarantys laisvieji radikalai irgi dalyvauja fotocheminėse reakcijose [27].

FDT naudojami fotosensibilizatoriai tamsoje yra nekenksmingi, tačiau dėl jų nepakankamai selektyvios lokalizacijos navikiniuose audiniuose ir gana lėto pašalinimo iš organizmo neišvengiama pašalinio poveikio – padidėjusio žmogaus jautrumo šviesai. Todėl tobulindamai FDT metodą ir ieškodami veiksmingesnių ir mažesnius pašalinius reiškinius sukeliančių fotosensibilizatorių, mokslininkai susidomėjo vidiniais žmogaus organizmo ištekliais. Organizme yra endogeninių molekulių, galinčių atlikti fotosensibilizatoriaus vaidmenį [27]. Buvo pastebėta, kad navikiniai audiniai pasižymi didesne fluorescencija raudonojoje spektro srityje, o juos apšvitinus raudona šviesa, nors ir nesant egzogeninio sensibilizatoriaus, lėčiau auga navikinis darinys ir pailgėja eksperimentinių gyvūnų gyvenimo trukmė [12].

Žmogaus organizme iš hemo sintezės pirmtako – aminolevulino rūgšties (ALA) sintetamos porfirininės prigimties molekulės. Įsvirkštus į organizmą ALA ląstelėse ir audiniuose pradeda kauptis daugiau endogeninių porfirinų, kuriuos apšvitinus galima inicijuoti fotosensibilizacinį efektą, sukelti ląstelių žūtį. Paaiškėjo, kad, esant organizme ALA pertekliui, navikiniuose audiniuose susikaupia daugiau endogeninių porfirinų nei sveikuose [27].

Iš keturių 5-aminolevulino rūgšties molekulių ląstelių citoplazmoje sintetinamas protoporfirinas IX (PpIX). Kai kurios ląstelės, esant didelei egzogeninės ALA koncentracijai, pasižymi savybe sintetinti didelius kiekius PpIX. Kadangi hemo sintezė iš PpIX vyksta santykinai lėtai, tokios ląstelės savyje akumuliuoja didelius fotosensibilizatoriaus (PpIX) kiekius ir gali būti veikiamos FDT [16].

Histologiniai RA požymiai yra apibūdinami sinoviocitų proliferacija sinovinėje membranoje, padidėjusia vaskuliarizacija, uždegiminių ląstelių sankaupomis (limfocitai, plazminės ląstelės, makrofagai, neutrofilai), kurios susijusios su padidėjusia citokinų, imunoglobulinų ir uždegiminių mediatorių gamyba. Kadangi uždegiminei reumatoidinei membranai būdinga daug požymių, kuriais pasižymi neoplaziniai audiniai, tai yra

hipermetabolinis aktyvumas, aktyvi vaskuliarizacija, todėl fotodinaminė terapija galima gydyti ir reumatoidinį artritą [18]. FS susitelkia uždegiminėje sinovijoje, o paveikus tam tikro ilgio šviesa, FS aktyvinasi. Susidarę aktyvūs deguonies radikalai sukelia citotoksines reakcijas uždegiminėse ląstelėse. FDT ir FS poveikio tyrimams pasitelkiami eksperimentiniai gyvūnų artrito modeliai [26].

3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

3.1. Tyrimo medžiaga

Bandymams panaudota 17 4-5 mėn. šinšių veislės triušių (Imunologijos Instituto veislynas, Vilnius, Lietuva), kurių vidutinė kūno masė buvo apie 3 kg. Gyvuliukai buvo patalpinti VU Eksperimentinės ir klinikinės medicinos instituto vivariume ir naudojami laikantis Europos direktyvos 86/609/EEC. Jie buvo laikomi po vieną nerūdijančio plieno narvuose, gaudavo standartinį granuliuotą triušių maistą (UAB Kėdainių grūdai) ir vandentiekio vandenį. Eksperimentams atlikti gautas etikos komisijos leidimas Nr. 0105 (2004.01.05).

3.2. Tyrimo metodai

Eksperimentiniai reumatoidinio artrito fotodinaminės terapijos galimybių tyrimai buvo atliekami trimis etapais:

I. Antigenų indukuoto artrito (AIA) sukėlimas bei jo, kaip monoartrito, tinkamumo vertinimas lokaliai artritui gydyti.

II. Aminolevulino rūgšties injekcijos ir fotosensibilizatoriaus kaupimosi uždegiminiuose ir kontroliniuose sąnariuose vertinimas bei lokalus fotodinaminės terapijos (FDT) pritaikymas eksperimentiniame AIA modelyje.

III. Eksperimentinio monoartrito eigos, kraujo rodiklių ir kūno masės pokyčių stebėjimas dviejų savaičių laikotarpyje po FDT. Galutinė histologinė sąnario audinių analizė.

3.2.1. Antigenų indukuoto artrito (AIA) sukėlimas

Triušiai buvo 3 kartus (kas dvi savaites) imunizuoti ovalbumino (OA) pilname Froido adjuvante (FA) mišiniu. Kiekvienos imunizacijos metu nugaros srityje po oda buvo suleidžiamas 1 ml OA ir FA mišinio (į 4 vietas po 0,25 ml): pirmosioms dviem imunizacijoms po 10 mg OA/1 ml, o trečiai imunizacijai 5 mg OA/1 ml. Emulsija pirminei ir antrinei imunizacijai turėjo 0,5 ml FA ir 20 mg/ml OA (Sigma-Aldrich) tirpalą steriliame fiziologiniame tirpale. Injekcijos vietos buvo masažuojamos, kad emulsija gerai pasiskirstytų ir sumažėtų žaizdų ir poodinių granulomų susiformavimo rizika šiose vietose. Praėjus 5 dienoms po trečios imunizacijos, triušių kelio sąnariai buvo nudepiliuoti, oda sterilizuota spiritu ir į dešinės kojos sąnario ertmę suleistas 1 ml (5 mg/ml) OA tirpalo, o į kairės kojos sąnario ertmę – sterilus fiziologinis tirpalas. AIA sukėlimo schema pavaizduota 3.2.1.1 lentelėje [5].

3.2.1.1 lentelė. Antigenų indukuoto artrito sukėlimas

Dienos	Procedūra	Ovalbuminas	Adjuvantas	Suleidimo būdas (vieta)
0	Pirminė imunizacija	10 mg	FA	Po oda (nugara)
14	Antrinė imunizacija	10 mg	FA	Po oda (nugara)
28	Tretinė imunizacija	5 mg	FA	Po oda (nugara)
32	Intrasąnarinė injekcija	5 mg	Nėra	Į sąnario ertmę

Antigenų indukuoto artrito gyvūnuose vystymuisi įvertinti buvo stebima kelio sąnarių patinimo apimtis, matuojamas kūno svoris, iš ausies venos imamas kraujas ENG, leukocitų ir eritrocitų skaičiui nustatyti.

Eritrocitų nusėdimo greičiui įvertinti buvo taikomas Pančenkovo metodas, kad tyrimui reikėtų kuo mažiau kraujo. Kraujas prisiurbiamas į citruotą Pančenkovo pipetę, paskui specialiaje indelyje sumaišomas su natrio citratu santykiu 4:1 ir prisiurbiamas į graduotą Pančenkovo pipetę. Pipetė statoma vertikaliai į stovą, o rezultatas vertinamas po valandos (mm/h).

Leukocitų ($10^9/L$) ir eritrocitų skaičiaus ($10^{12}/L$) nustatymui buvo naudojamas hematologinis analizatorius PICOSCALE PS-4 (Vengrija).

3.2.2. Fotodinaminės terapijos metodika

Tirpalo paruošimas. Aminolevulino rūgštis (ALA) tirpalas (40 mMol) injekcijoms buvo paruoštas tirpinant 5-aminolevulino rūgštis hidrochloridą (Sigma-Aldrich) 0,9% NaCl tirpale.

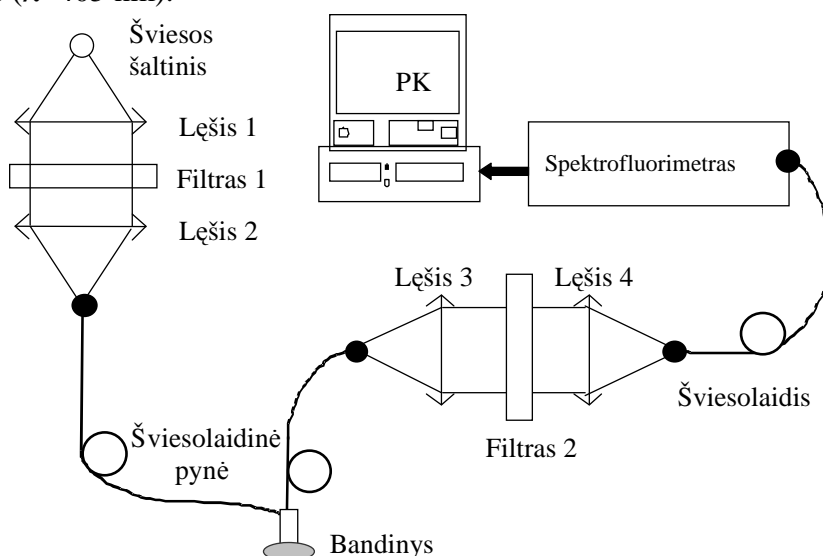
Gyvūnų fotosensibilizacija. Eksperimentiniai gyvūnai, praėjus 3 dienoms po artrito indukcijos (OA suleidimo į dešinį kelio sąnarį (DKS)), buvo sugrupuoti į 5 grupes (3.2.2.1 lentelė). Dviem grupėms buvo taikoma fotodinaminė terapija, o kitos trys buvo kontrolinės. Pirmai grupei AIA triušių $n=5$ buvo suleista 1ml 40 mMol ALA tirpalas į dešiniuosius uždegiminius kelių sąnarius (DKS), antrai grupei 1ml 40 mMol ALA injekcija į DKS ir intraveninė 1ml 40 mMol ALA injekcija į ausies veną ($n=4$). Kontroliniams gyvūnams atitinkamai buvo suleista: 1ml fiziologinio tirpalo, 1ml 40 mMol ALA ir 2ml 40 mMol ALA (po 1ml į DKS ir ausies veną).

3.2.2.1 lentelė. Triušių grupės

Triušių grupės	Triušių skaičius (n)	Suleistas tirpalas	Inkubacija ir fluorescentiniai matavimai	Šviesos dozė
Kontrolinė grupė	3	1ml fiziologinio į DKS	Po 3val.	–
	3	1ml 40 mMol ALA į DKS	Po 3val.	–
	2	1ml 40 mMol ALA į DKS +1ml 40 mMol ALA į ausies veną	Po 3val.	–
Gydomoji grupė	5	1ml 40 mMol ALA	Po 3val.	18 J/cm ²
	4	1ml 40 mMol ALA į DKS +1ml 40 mMol ALA į ausies veną	Po 3val.	18 J/cm ²

Fotodinaminė terapija (FDT). Sensibilizuotų gyvūnų uždegiminiai dešinės kojos sąnariai buvo švitinami diodiniais šviesos šaltiniais ($\lambda_{maks}= 635 \text{ nm}$) panaudojant nuskausminančias priemones 1% lidokaino tirpalą. Švitinimo trukmė 15 min. Švitinimo dozė 18 J/cm².

Fluorescenciniams tyrimams buvo surinktas specialus fluorescencinės diagnostikos stendas (3.2.2.1 pav.). Žadinančios šviesos šaltiniu buvo naudotas mėlynos šviesos diodinis šaltinis ($\lambda=405 \text{ nm}$).



3.2.2.1 pav. Fluorescencijos registravimo stendo schema.

Gludžiamaisiais lęšiais žadinimo šviesa buvo fokusuojama į šviesolaidinę pynę, kurią sudaro du tarpusavyje sujungti šviesolaidžiai. Eksperimente buvo naudotas “saulutės” tipo

šviesolaidis, kuriame viena šviesolaidžio gija sueina į centrą, o kitos – išsidėstę ratu. Žadinimui buvo pasirinkta centrinė šviesolaidžio gija, o surinkimui – aplink ją išsidėsčiusios gijos. Šviesolaidinės pynės antgalis matavimo metu buvo prigludžiamas prie uždegiminių dešinės kojos sąnarių.

Histologiniai tyrimai. Bandymų pabaigoje gyvūnai buvo užmigdomi suleidžiant jiems į ausies veną 50 mg/kg tiopentalio dozę. Sąnario sinovijos ir kremzlės audiniai buvo išpjunami ir fiksuojami spirito-formalino (9:1) fiksatoriuje, po to kremzlė 14 dienų dekalcinuojama 15% EDTA tirpale ir po dehidratacijos audiniai buvo apliejami parafinu. Sagitaliniai 5µm pjūviai buvo dažomi: kremzlė – hematoksilinu/eozinu, toluidino mėliu ir safraninu; sinovija – hematoksilinu/eozinu, toluidino mėliu ir safraninu, Van-Gieson ir metilenu žaliu-pironinu pagal Bracchet dažymo būdą. Histologiškai audiniai buvo analizuojami pagal literatūroje aprašytus sinovijos ir kremzlės vertinimo protokolus [19,20]. Preparatuose įvertinta sinovijos hiperplazija, sinoviocitų sluoksnių skaičius, fibroblastų aktyvacija bei uždegiminė infiltracija; pagal tuos duomenis apskaičiuotas sinovijos pakenkimas balais (0-1 – sinovito nėra; 2-3 – silpnas sinovitas; 4-6 – vidutinis sinovitas, 7-9 – stiprus sinovitas). Kremzlės pakenkimas taip pat buvo įvertinamas balais, atsižvelgiant į struktūrinius chondrocitų ir metabolinius (matrikso) pokyčius (GAG'ų ir Safranino O nusidažymą) ir Tidemark'o integralumą (0-1 – normali kremzlė; 2-5 – silpni pokyčiai, 6-9 – vidutiniai pokyčiai, 10-14 – ryškūs pokyčiai).

3.3. Statistinė rezultatų analizė

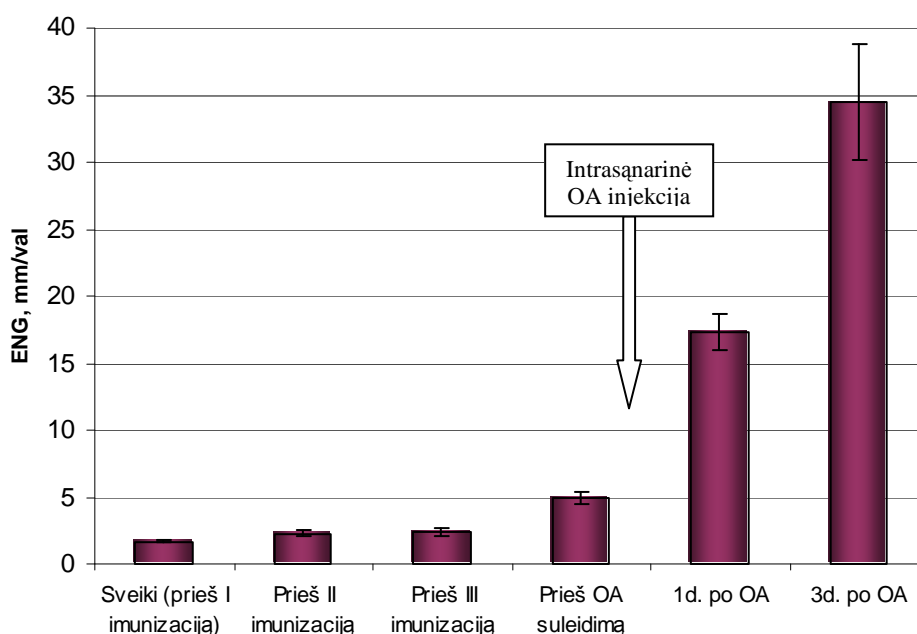
Statistinė duomenų analizė atlikta taikant kompiuterinės statistikos programą *SPSS for Windows* (versija 8.0). Apskaičiuoti įvairių parametrų reikšmių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais ir 95% pasikliautinaisiais intervalais, naudojamas Studento t kriterijus. Grafinis duomenų vaizdavimas atliktas Microsoft Excel 2002 programa.

4. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. Antigeno indukuoto artrito (AIA) sukėlimas, jo kaip monoartrito, tinkamumo vertinimas lokaliai artritui gydyti

Sukeliant antigeno indukuotą artritą, prieš kiekvieną procedūrą buvo matuojama triušių kūno masė, imamas kraujas ir nustatomi ENG, leukocitų ir eritrocitų skaičius. Po ovalbumino injekcijos kraujas tyrimams buvo imamas kas antrą dieną.

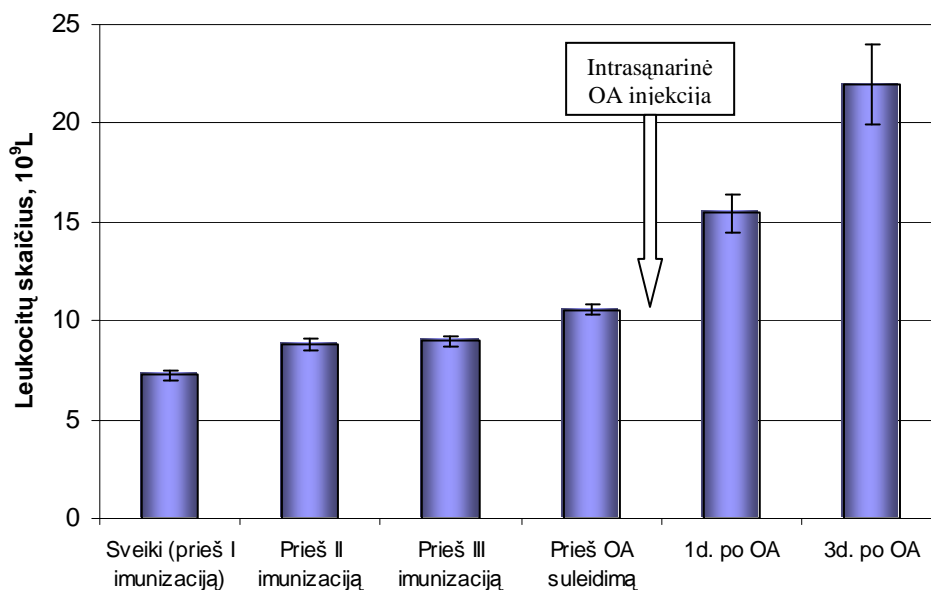
ENG pokyčiai AIA sukėlimo metu pavaizduoti 4.1.1 paveiksle. Sveikų triušių ENG vidurkis buvo $1,65 \pm 0,12$ mm/h. ENG turėjo tendenciją didėti kiekvienos imunizacijos FA+OA metu, statistiškai patikimai padidėjo prieš II imunizaciją ($p < 0,003$).



4.1.1 pav. Triušių ENG vidurkių pokyčiai AIA sukėlimo metu.

Prieš antigeno injekciją ENG siekė $4,88 \pm 2,26$ mm/h, o vieną dieną po ovalbumino (OA) injekcijos buvo nustatytas patikimas padidėjimas iki $16,76 \pm 5,47$ mm/h ($p < 0,001$). Trečiąją dieną po antigeno suleidimo ENG siekė $32,71 \pm 7,97$ mm/h ($p < 0,001$).

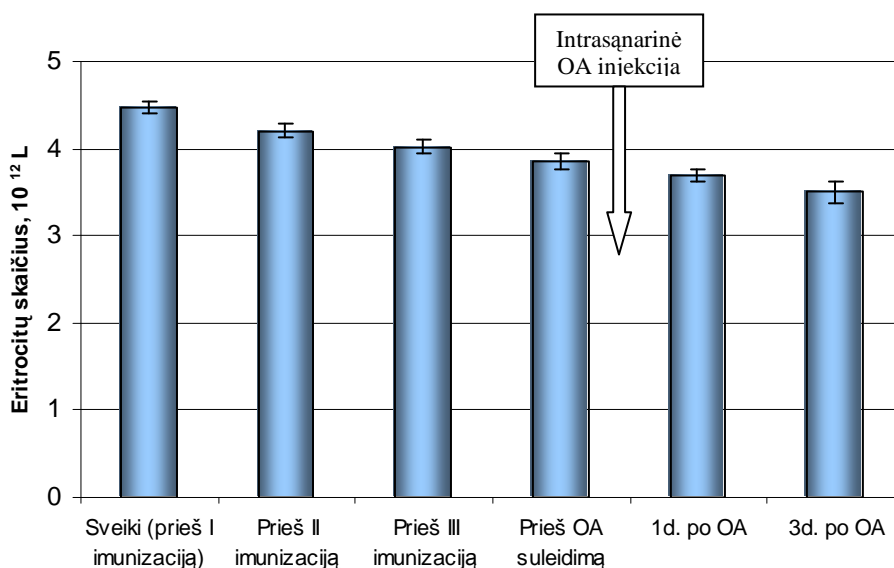
Leukocitų skaičiaus pokyčiai AIA metu pavaizduoti 4.1.2 paveiksle. Prieš I imunizaciją sveikų triušių leukocitų skaičius buvo lygus $7,27 \pm 1,28 \times 10^9/L$, prieš II imunizaciją leukocitų skaičius padidėjo iki $8,88 \pm 1,42 \times 10^9/L$ ir patikimai ($p < 0,001$) skyrėsi nuo sveikų triušių leukocitų skaičiaus.



4.1.2 pav. Triušių leukocitų skaičiaus vidurkių pokyčiai AIA sukėlimo metu.

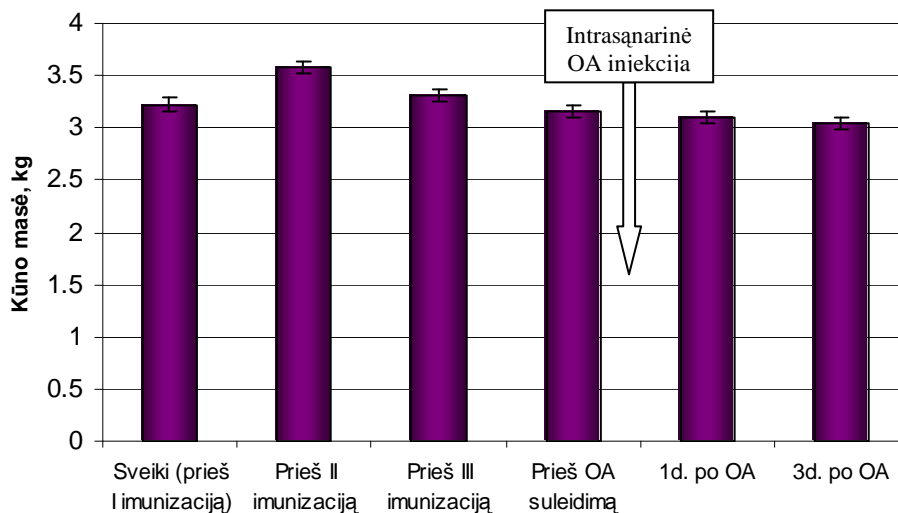
Prieš intrasąnarinę ovalbumino injekciją leukocitų skaičius siekė $10,41 \pm 1,28 \times 10^9/L$ ir statistiškai patikimai padidėjo po vienos dienos suleidus OA $15,01 \pm 3,84 \times 10^9/L$ ($p < 0,001$) ir dar padidėjo praėjus trimis dienoms po antigeno injekcijos $21,74 \pm 3,69 \times 10^9/L$ ($p < 0,001$).

Eritrocitų skaičius AIA modelio sukėlimo metu turėjo tendenciją mažėti (4.1.3 pav.). Sveikiems triušiams nustatytas $4,48 \pm 0,29 \times 10^{12}/L$ eritrocitų skaičius, imunizacijos eigoje jis statistiškai patikimai mažėjo: prieš II imunizaciją buvo $4,22 \pm 0,38 \times 10^{12}/L$ ($p < 0,01$), prieš III $3,96 \pm 0,35 \times 10^{12}/L$ ($p < 0,007$), prieš antigeno suleidimą $3,81 \pm 0,35 \times 10^{12}/L$ ($p < 0,026$), po dienos suleidus OA $3,68 \pm 0,31 \times 10^{12}/L$ ($p < 0,019$) ir trečią dieną po OA injekcijos eritrocitų skaičius buvo $3,49 \pm 0,27 \times 10^{12}/L$ ($p < 0,005$).



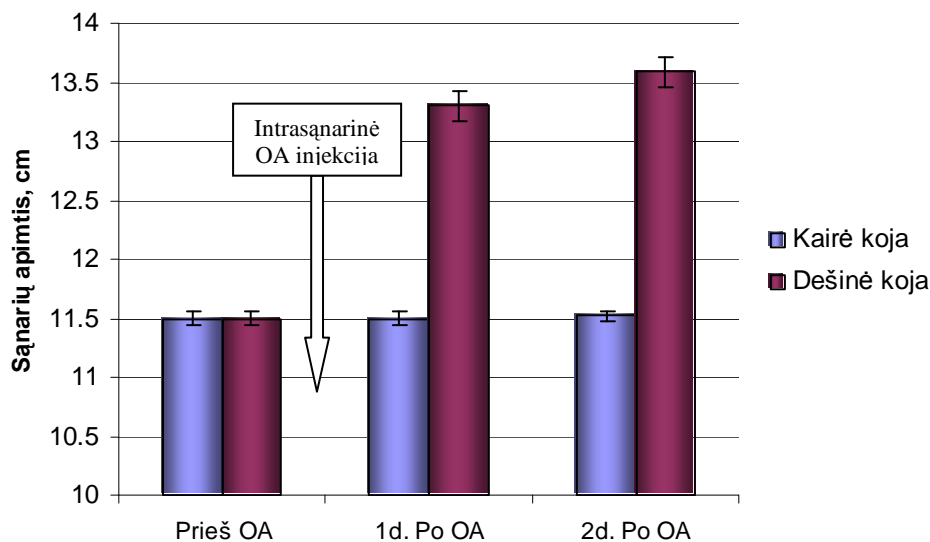
4.1.3 pav. Triušių eritrocitų skaičiaus vidurkių pokyčiai AIA sukėlimo metu.

Sukeliant antigenu indukuotą artritą, visos imunizacijos metu buvo įvertinamas triušių kūno masės kitimas (4.1.4 pav.). Esminių skirtumų tiriant kūno masę nerasta, ji tik nežymiai mažėjo. Sveikų triušių kūno masės vidurkis buvo $3,2 \pm 0,28$ kg, o trečią dieną po ovalbumino injekcijos triušių svorio vidurkis buvo $3,03 \pm 0,27$ kg.



4.1.4 pav. Triušių kūno masės vidurkių pokyčiai AIA sukėlimo metu.

Triušių dešinės ir kairės kojų kelio sąnarių apimtys buvo matuojamos prieš suleidžiant OA ir kiekvieną dieną po antigeno suleidimo (4.1.5 pav.). Sveikų triušių abiejų kojų sąnarių apimtis buvo lygi $11,5 \pm 0,25$ cm.



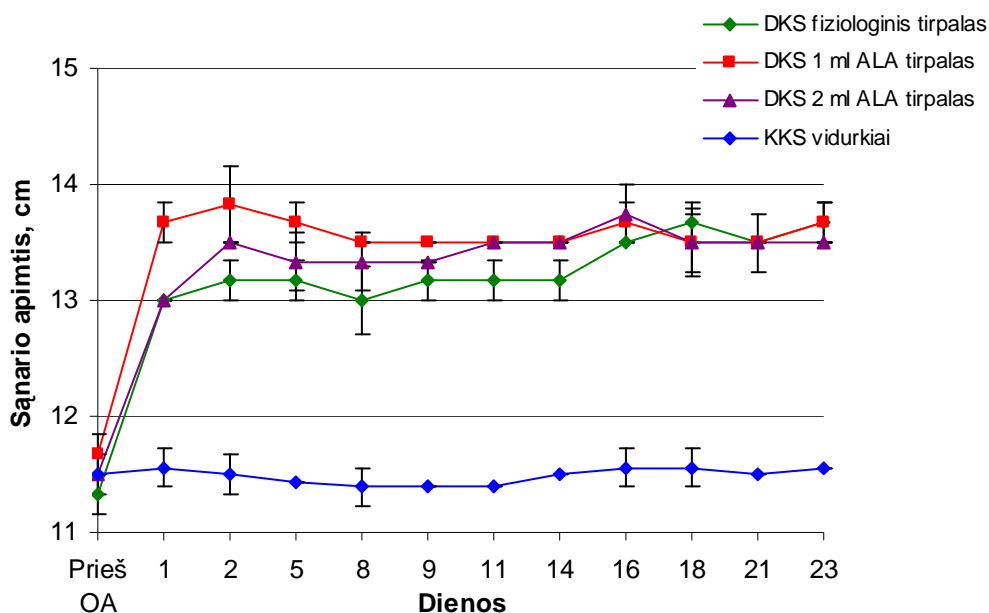
4.1.5 pav. Triušių dešiniųjų ir kairiųjų kojų kelio sąnarių patinimo dinamika atlikus OA injekciją į dešiniųjų kojų sąnarių ertmę.

Po intrasąnarinės OA injekcijos į dešinės kojos sąnarį buvo stebimas šių sąnarių patinimas. 1 dieną po OA injekcijos dešiniųjų sąnarių apimčių vidurkis siekė $13,3 \pm 0,36$ cm ($p < 0,001$), o antrąją dieną – $13,59 \pm 0,36$ cm ($p < 0,001$). Kairiųjų sąnarių apimtys nekito, skirtumas tarp kairiųjų ir dešiniųjų kojų sąnarių buvo akivaizdus, vidutiniškai apie 2 cm. Skirtumai tarp dešinės kojos sąnario ir kairės kojos sąnario po OA injekcijos yra statistiškai patikimi tiek pirmą, tiek antrą dieną ($p < 0,001$).

Taigi, turėdami šiuos laboratorinius ir klinikinius duomenis, darėme išvadą, kad eksperimentinis vieno sąnario artrito (monoartrito) modelis yra tinkamas tolesniems eksperimentiniams tyrimams.

4.2. Eksperimentinio AIA modelio gydymas fotodinamine terapija

Fotodinaminės terapijos taikymui, triušiai buvo suskirstyti į kontrolinę ($n=8$) ir gydomąją ($n=9$) grupes. Prieš švitinimą triušiams su AIA į sąnarį ir ausies veną buvo leistos skirtingos ALA tirpalo dozės. Kontrolinės grupės 3 triušiams buvo atlikta fiziologinio tirpalo injekcija. Stebėta sąnarių patinimo dinamika (4.2.1. pav.). Nuo 1 dienos iki eksperimento pabaigos (23 dienos) skirtumai tarp dešinės ir kairės kojos sąnarių išliko statistiškai patikimi ($p < 0,001$).



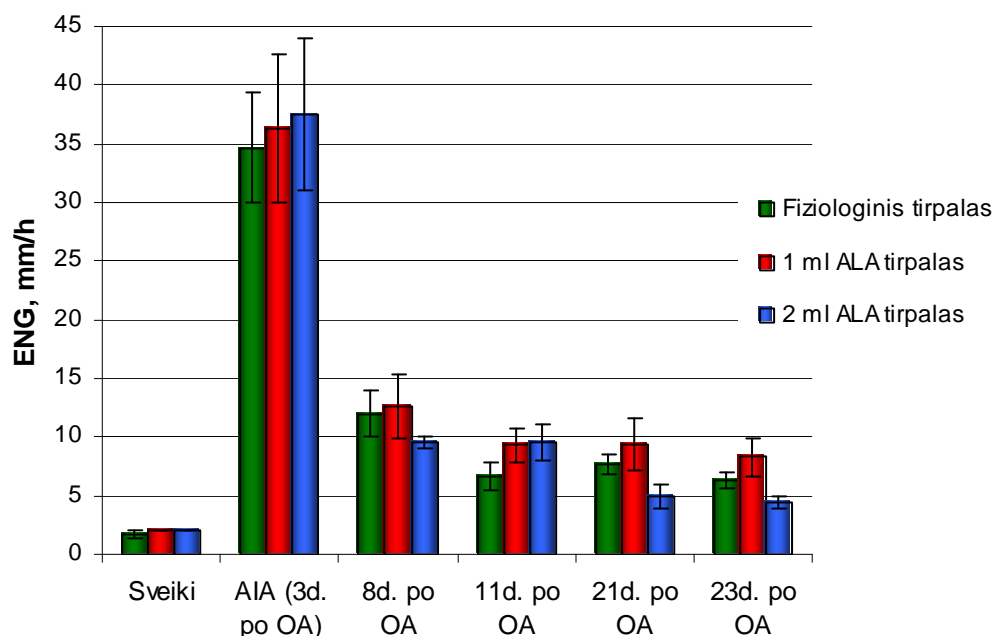
4.2.1. pav. Kairiųjų ir dešiniųjų kojų kelio sąnarių apimtys kitimo dinamika

Praėjus parai po OA injekcijos, tarp triušių dešiniųjų sąnarių, kuriems buvo leistas 1 ml 40 mMol ALA tirpalas ir 1ml fiziologinis tirpalas nustatytas statistiškai patikimas

skirtumas ($p < 0,016$), bet dinamikoje artrito eiga buvo panaši visuose pogrupiuose ir statistiškai patikimų skirtumų iki eksperimento pabaigos tarp pogrupių nekonstatuota.

Siekiant įvertinti fotosensibilizatorių kaupimosi intensyvumą ir selektyvumą uždegiminiuose audiniuose priklausomai nuo ALA įvedimo būdai bei dozės buvo registruojama fotosensibilizatoriaus fluorescencija. Aminolevulino rūgšties injekcijos ir fotosensibilizatoriaus kaupimosi uždegiminiuose ir kontroliniuose sąnariuose fluorescencijos spektrai pateikti 1 priede. Fluorescencija buvo registruojama po ALA suleidimo į sąnarius ir ausies veną. Sensibilizatoriaus kaupimosi santykiniai skirtumai uždegiminiuose DKS, lyginant su kontroliniais KKS, pasireiškė tiek suleidus ALA į sąnarį, tiek ir intraveniškai. Taigi, nepriklausomai nuo ALA įvedimo būdo fotosensibilizatorius uždegiminio kelio sąnario audiniuose kaupiasi selektyviau nei kontroliniuose audiniuose.

ENG pokyčiai kontrolinės grupės triušiuose nepriklausomai nuo suleisto tirpalo ir jo kiekio statistiškai patikimai skyrėsi lyginant sveikus triušius ir baigus jų imunizaciją ($p < 0,001$). ENG pokyčiai pavaizduoti 4.2.2 paveiksle. Sukėlus monoartritą ir stebint jo eigą, pogrupyje su fiziologiniu tirpalu 3d. po OA injekcijos (artrito indukcijos) ENG buvo lygus $34,7 \pm 8$ mm/h, o 8d. statistiškai patikimai ($p < 0,044$) sumažėjo iki $12 \pm 3,46$ mm/h. Nuo 8d. iki paskutinės eksperimento dienos ENG šioje triušių grupėje turėjo tendenciją mažėti ir 23d. buvo lygus $6,3 \pm 1,2$ mm/h, tačiau statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta.



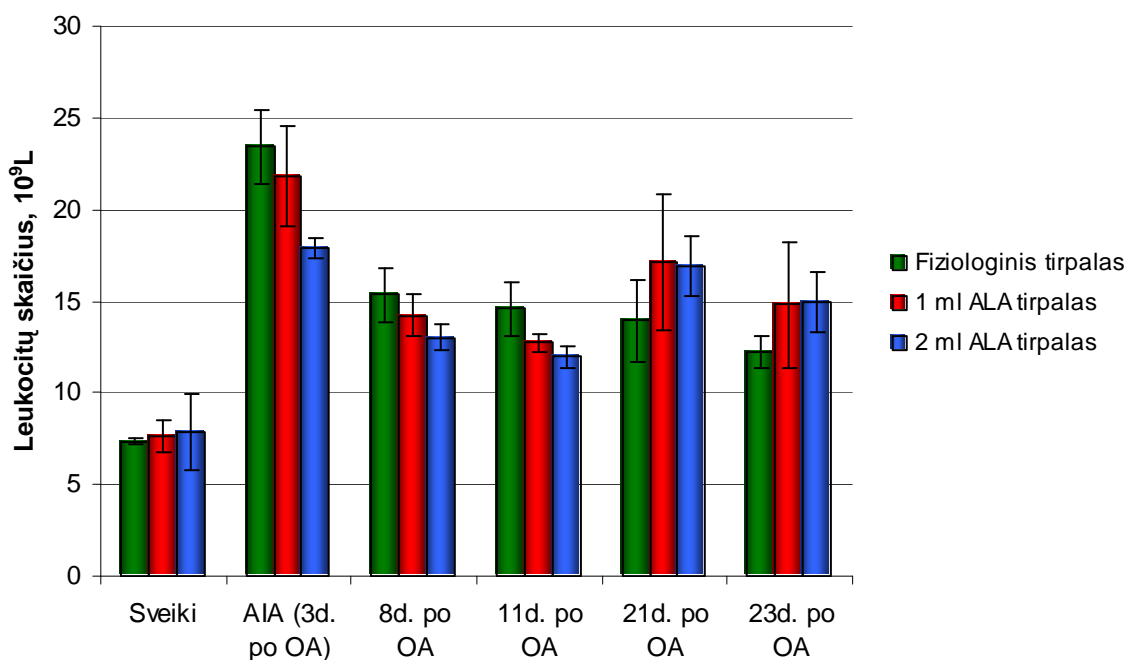
4.2.2. pav. ENG pokyčiai kontrolinės grupės triušiams su AIA

Triušiams su 1 ml ALA tirpalu 3d. po antigeno injekcijos ENG buvo lygus $36,3 \pm 10,9$ mm/h, o 8d. sumažėjo iki $12,67 \pm 4,7$ mm/h ($p < 0,048$). Stebint kraujo rodiklių dinamiką po

artrito sukėlimo nuo 8 iki paskutinės eksperimento dienos, matomas ENG mažėjimas, tačiau reikšmės statistiškai patikimai nesiskyrė. 23 eksperimento dieną eritrocitų nusėdimo greitis buvo lygus $8,33 \pm 2,8$ mm/h ir statistiškai patikimai sumažėjęs lyginant su ENG 3d. po antigeno injekcijos ($p < 0,027$).

Triušių, kuriems buvo suleistas 2 ml ALA tirpalas, ENG 3d. po OA buvo lygus $37,5 \pm 9,2$ mm/h, buvo stebimas statistiškai patikimas ENG sumažėjimas 8d. ($9,5 \pm 0,7$ mm/h) ($p < 0,032$). Laikotarpyje nuo 8d. iki 23d. ENG turėjo tendenciją mažėti, tačiau statistiškai patikimo skirtumo nenustatėme. Paskutiniąją eksperimento dieną ENG buvo lygus $4,5 \pm 0,7$ mm/h ir statistiškai patikimai skyrėsi lyginant su 3d. ($p < 0,01$). Statistiškai patikimų ENG skirtumų tarp 3 triušių grupių nerasta.

Leukocitų skaičiaus pokyčiai kontrolinės grupės triušiams su AIA pavaizduoti 4.2.3 paveiksle. Pogrupyje su fiziologiniu tirpalu patikimi duomenys gauti palyginus 3d. ($23,4 \pm 3,5 \times 10^9/L$) ir 8d. ($15,3 \pm 2,5 \times 10^9/L$) po OA injekcijos ($p < 0,009$).



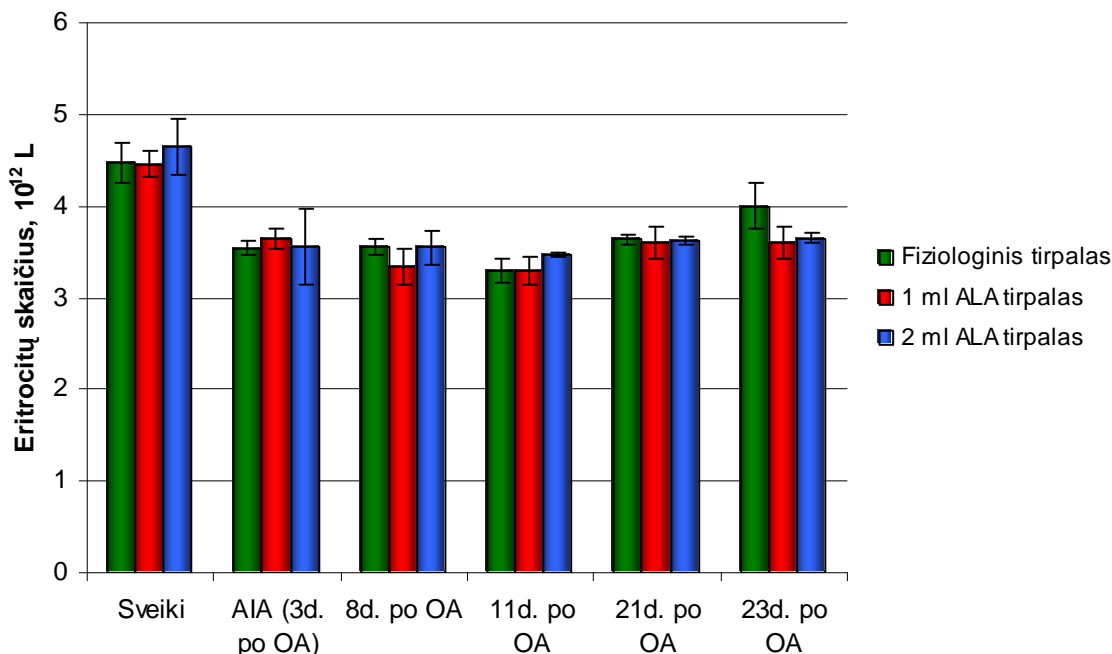
4.2.3. pav. Leukocitų skaičiaus pokyčiai kontrolinės grupės triušiams su AIA.

Nuo 8 iki 23 eksperimento dienos leukocitų skaičius, triušiams su fiziologiniu tirpalu turėjo polinkį mažėti, tačiau statistiškai patikimų skirtumų, šiomis eksperimento dienomis, nenustatyta. Paskutiniąją eksperimento dieną leukocitų skaičius buvo lygus $12,2 \pm 1,5 \times 10^9/L$ ir patikimai skyrėsi nuo duomenų gautų 3 dieną.

Triušių, kuriems buvo suleistas 1 ml ALA tirpalo, leukocitų skaičius eksperimento eigoje keitėsi, tačiau statistiškai patikimų skirtumų nerasta, o triušiams su 2ml ALA tirpalo injekcija leukocitų skaičius 3d. buvo lygus $17,9 \pm 0,7 \times 10^9/L$ ir statistiškai patikimai ($p < 0,026$)

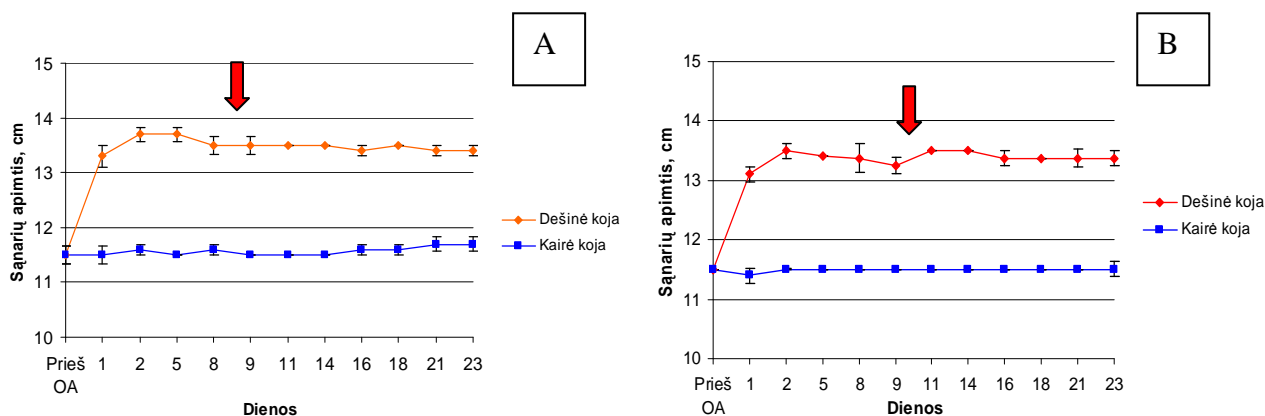
sumažėjo 8d. ($13 \pm 0,9 \times 10^9/L$). Kitomis eksperimento dienomis leukocitų skaičius kito, tačiau statistiškai patikimo skirtumo nebuvo.

Eritrocitų skaičiaus pokyčiai kontrolinės grupės triušiams pavaizduoti 4.2.4. paveiksle. Eritrocitų skaičius eksperimento eigoje nuo 11d. po OA injekcijos turėjo tendenciją didėti, tačiau statistiškai patikimų skirtumų nei pogrupiuose, nei tarp grupių nersta.



4.2.4. pav. Eritrocitų skaičiaus pokyčiai kontrolinės grupės triušiams su AIA

Gydomoji triušių grupė buvo suskirstyta į du pogrupius pagal tai, kokia ALA tirpalo dozė (1ml ir 2ml) buvo suleista prieš švitinimą. Sąnarių patinimo dinamika lyginant dešiniųjų ir kairiųjų kelio sąnarių vidurkius pavaizduota 4.2.5 paveiksle.

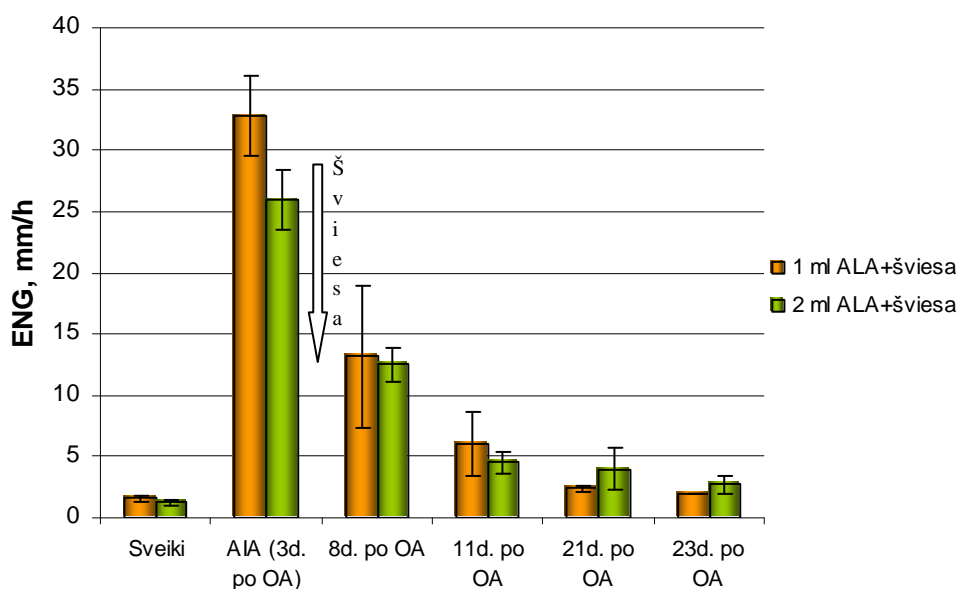


4.2.5 pav. Sąnarių patinimo dinamika triušiams su 1 ml ALA (A) ir 2 ml (B)

Skirtumai tiek triušiams su 1ml ALA tirpalu, tiek su 2ml ALA, tarp dešiniųjų ir kairiųjų kojų kelio sąnarių išlieka patikimi iki eksperimento pabaigos ($p < 0,001$). Lyginant dešiniųjų kojų sąnarių patinimo dinamiką 1ml ALA ir 2ml ALA tirpalo pogrupiuose,

statistiškai patikimų skirtumų nerasta. Triušių grupės su 1ml ALA tirpalo injekcija dešiniųjų kelio sąnarių apimčių vidurkis 2d. po antigeno injekcijos (prieš FDT) buvo lygus $13,7\pm 0,1$ cm, o FDT eksperimento pabaigoje tik nežymiai pakito ($13,4\pm 0,2$ cm). Grupėje su 2ml ALA tirpalo injekcija dešiniųjų kelio sąnarių vidurkis prieš FDT (2d. po OA injekcijos) buvo lygus $13,6\pm 0,1$ cm, o eksperimento pabaigoje buvo lygus $13,4\pm 0,1$ cm.

ENG pokyčiai gydomosios grupės AIA triušiams pavaizduoti 4.2.6 paveiksle. Triušių, kuriems buvo suleista 1ml ALA tirpalo, 3d. po OA injekcijos ENG buvo lygus $32,8\pm 7,2$ mm/h ir statistiškai patikimai ($p<0,001$) sumažėjo 8d. po antigeno injekcijos ($13,2\pm 8,9$ mm/h). Iki eksperimento pabaigos buvo stebimas ENG mažėjimas, tačiau patikimo skirtumo nebuvo. 23d. po OA injekcijos ENG reikšmė beveik susilygino su sveikų triušių ENG reikšme ir buvo lygi 2 ± 0 mm/h.



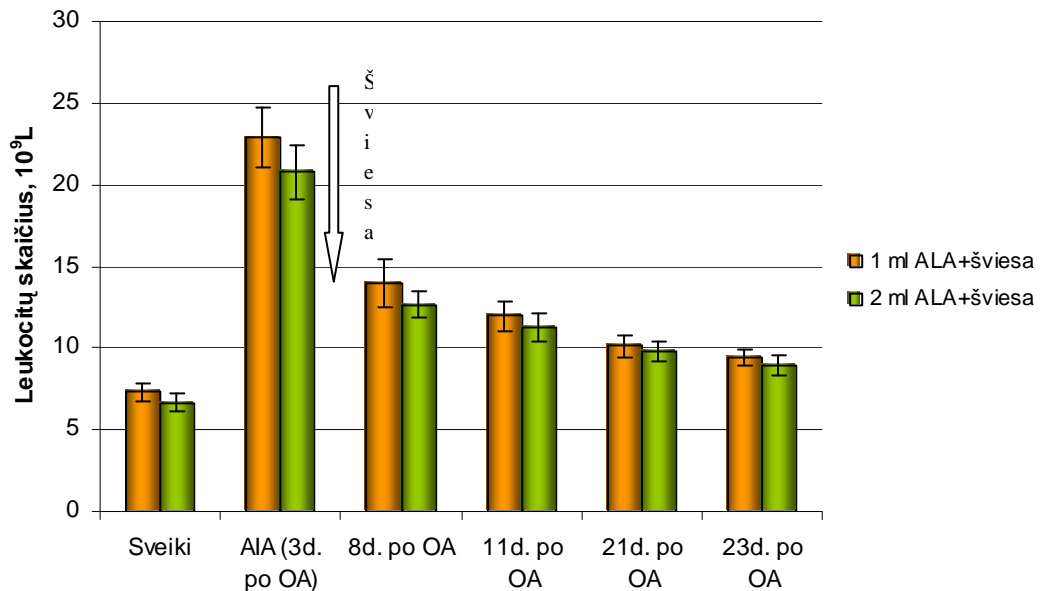
4.2.6. pav. ENG pokyčiai gydomosios grupės triušiams su AIA

Triušių grupei su 2ml ALA tirpalo injekcija ENG reikšmė prieš FDT (3d. po OA) buvo lygi $26\pm 4,9$ mm/h, 8d. po antigeno injekcijos ENG reikšmė statistiškai patikimai ($p<0,012$) sumažėjo iki $12,5 \pm 2,8$ mm/h, o 11d. dar kartą patikimai ($p<0,01$) sumažėjo iki $4,5\pm 1,9$ mm/h. Vėliau ENG mažėjo, tačiau patikimo skirtumo nebuvo. 23 eksperimento dieną ENG buvo lygus $2,75\pm 1,5$ mm/h ir lyginant su 3d. rezultatais statistiškai patikimai skyrėsi ($p<0,005$). Lyginant abu gydomosios grupės pogrupius tarpusavyje, patikimų skirtumų negauta.

Gydomosios grupės triušių leukocitų skaičiaus pokyčiai pateikti 4.2.7 paveiksle.

Triušių, kuriems buvo suleista 1 ml ALA tirpalo, leukocitų skaičius 3d. po antigeno injekcijos buvo lygus $22,9\pm 4,1\times 10^9/L$, 8d. leukocitų skaičius statistiškai patikimai ($p<0,046$)

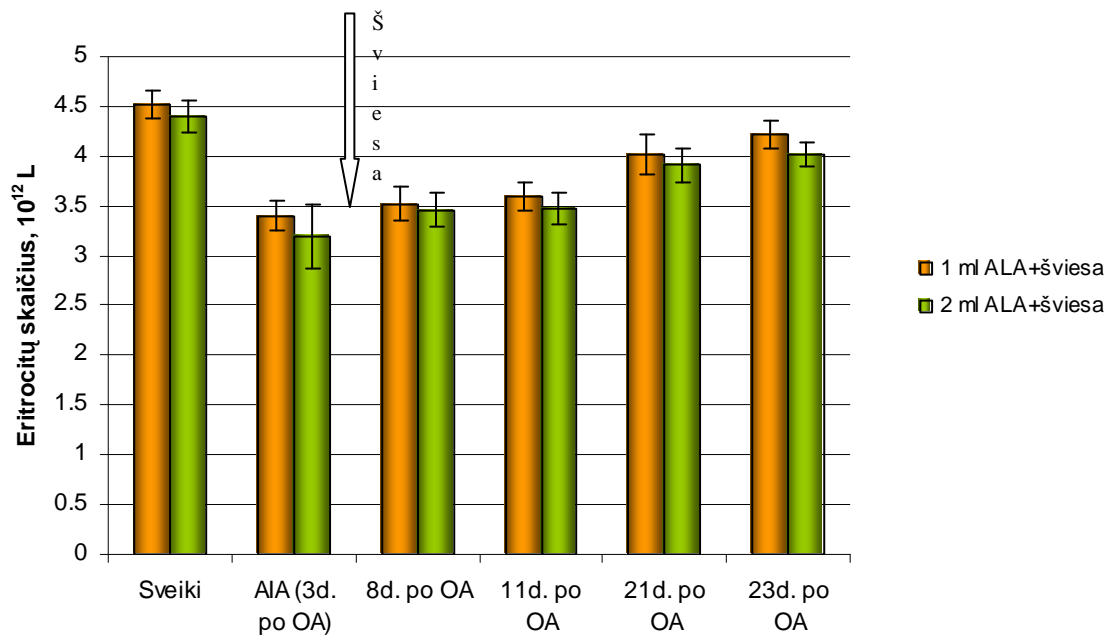
sumažėjo iki $13,9 \pm 3,1 \times 10^9/L$. Nuo 8d. po OA injekcijos iki eksperimento pabaigos leukocitų skaičius mažėjo, tačiau statistiškai patikimo skirtumo nebuvo. 23-ią eksperimento dieną leukocitų skaičius lyginant su 3d. po OA, patikimai sumažėjo iki $9,44 \pm 1 \times 10^9/L$ ($p < 0,003$).



4.2.7. pav. Leukocitų skaičiaus pokyčiai gydamosios grupės triušiams su AIA

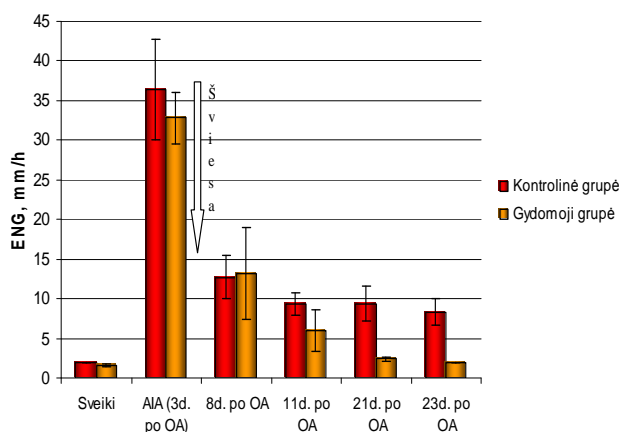
Tiriant triušių su 2ml ALA tirpalo injekcija leukocitų skaičių, nustatyti statistiškai patikimi skirtumai tarp 3 ($20,8 \pm 3,3 \times 10^9/L$) ir 8 ($2,6 \pm 1,5 \times 10^9/L$) dienos po OA injekcijos ($p < 0,01$), tarp 8 ir 11 ($11,3 \pm 1,8 \times 10^9/L$) dienos ($p < 0,014$). Eksperimento pabaigoje (23d.) leukocitų skaičius buvo lygus $9 \pm 1,1 \times 10^9/L$ ir patikimai ($p < 0,006$) sumažėjęs lyginant su 3d po OA injekcijos (prieš FDT). Lyginant abu pogrupius tarpusavyje, statistiškai patikimų skirtumų nerasta.

Gydamosios grupės triušių eritrocitų skaičiaus pokyčiai parodyti 4.2.8. paveiksle. Eksperimento eigoje nuo 3d. po OA injekcijos stebimas gydamosios grupės triušių eritrocitų skaičiaus didėjimas, tačiau statistiškai patikimų duomenų nerasta nei triušių pogrupio viduje, nei tarp pogrupių

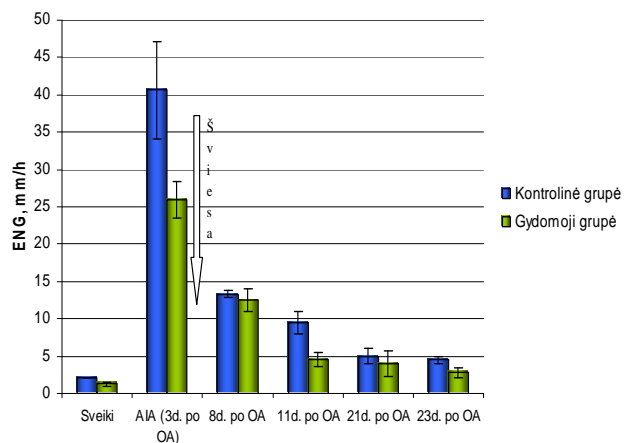


4.2.8. pav. Eritrocitų skaičiaus pokyčiai gydamosios grupės triušiams su AIA

Toliau pateiktas AIA triušių kontrolinės ir gydamosios grupių palyginimas. Paveikslas 4.2.9 vaizduoja ENG pokyčių palyginimą kontrolinės ir gydamosios grupės triušiams su AIA, kuriems buvo suleista 1ml ALA tirpalas. Statistiškai patikimi skirtumai tarp kontrolinės ir gydamosios triušių grupės nustatyti 21d. po OA injekcijos ($p < 0,005$) ir 23d. po antigeno injekcijos ($p < 0,002$). 4.2.10 paveiksle pateikti kontrolinių ir gydomųjų triušių, kuriems buvo leista 2ml ALA tirpalo, ENG pokyčiai. Lyginant šias grupes statistiškai patikimi skirtumai nustatyti 3d. po OA injekcijos ($p < 0,001$) ir 11d. po OA injekcijos ($p < 0,04$).



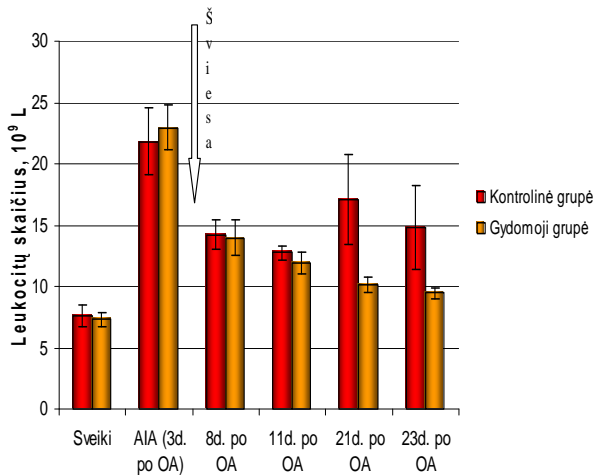
4.2.9. pav. Triušių su 1 ml ALA ENG



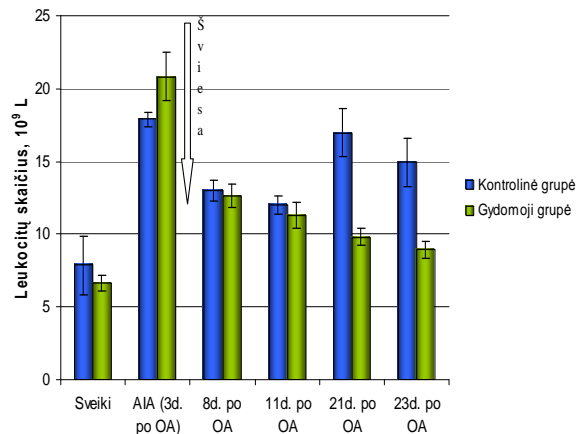
4.2.10. pav. Triušių su 2 ml ALA ENG

Leukocitų skaičiaus pokyčių kontrolinės ir gydamosios grupės AIA triušiams, kuriems buvo suleista 1 ml ALA tirpala, palyginimas pateiktas 4.2.11 paveiksle. Statistiškai patikimas skirtumas nustatytas 21 eksperimento dieną po OA suleidimo(artrito sukėlimo) $p < 0,048$.

Kitomis dienomis tarp grupių statistiškai patikimo skirtumo nerasta. Lyginant leukocitų skaičiaus pokyčius kontrolinės ir gydomosios grupės triušiams, kuriems buvo suleista 2ml ALA tirpalo, patikimai statistiškai skirtumai rasti 21 ir 23 eksperimento dienomis po OA suleidimo (artrito sukėlimo) atitinkamai $p < 0,006$ ir $p < 0,011$ (4.2.12 pav), šiomis dienomis kontrolinių gyvūnų leukocitų skaičius padidėjo, o gydomosios grupės - sumažėjo.

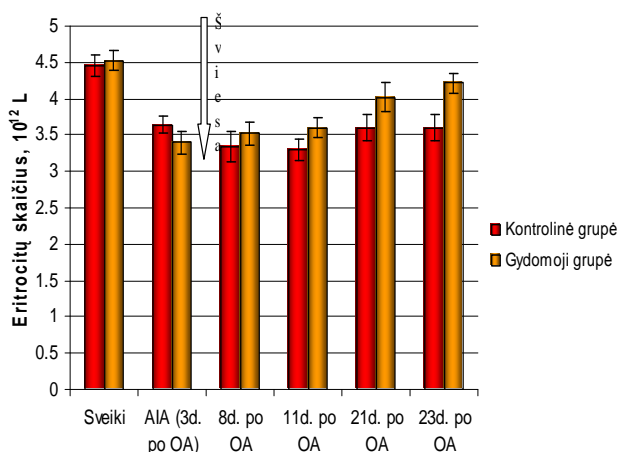


4.2.11. pav. Triušių su 1 ml ALA leukocitų skaičiaus pokyčiai.

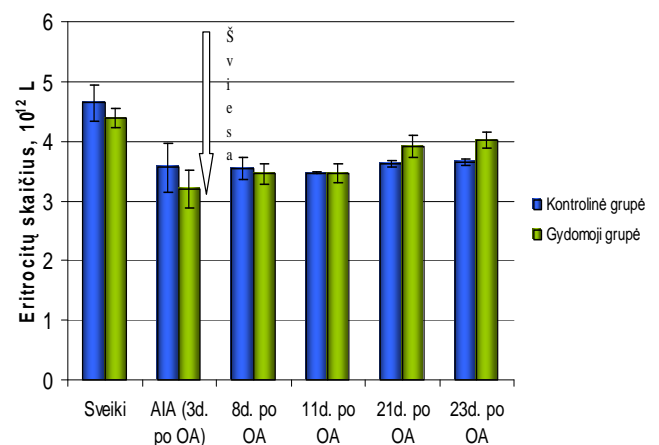


4.2.12. pav. Triušių su 2 ml ALA leukocitų skaičiaus pokyčiai.

Statistiškai patikimai eritrocitų skaičius lyginant kontrolinę ir gydomąją grupes, kurioms buvo suleista 1 ml ALA tirpalo, skyrėsi 23 eksperimento dieną $p < 0,032$ (4.2.13 pav.). Lyginant eritrocitų skaičiaus pokyčius kontrolinėje ir gydomojoje grupėse, kurioms suleista 2ml ALA tirpalo, patikimai tarp grupių besiskiriančių duomenų nerasta (4.2.14. pav).

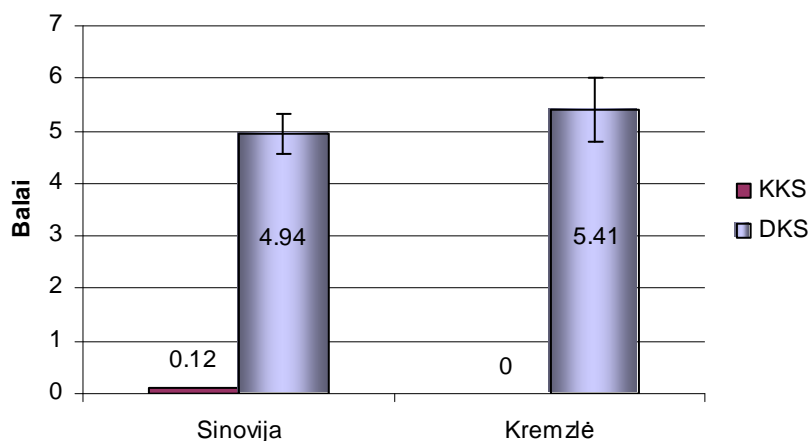


4.2.13. pav. Triušių su 1 ml ALA eritrocitų skaičiaus pokyčiai.



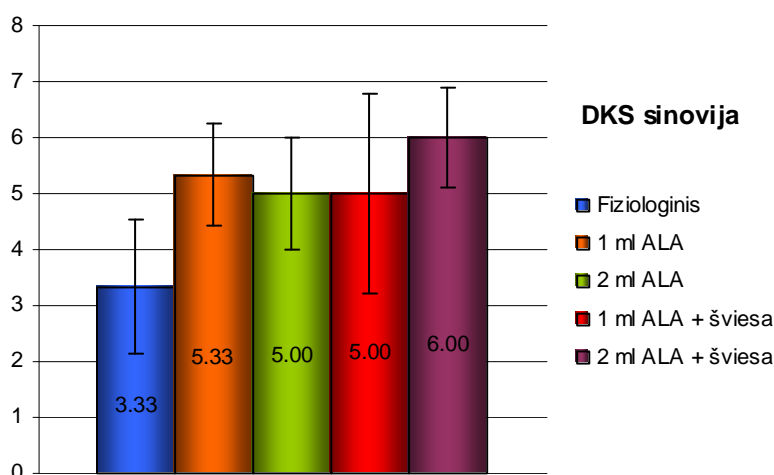
4.2.14. pav. Triušių su 2 ml ALA eritrocitų skaičiaus pokyčiai.

Histologiniai sinovijos ir kremzlės pokyčiai. Kairiuosiuose kelio sąnariuose (KKS) sinovijos uždegimiškumo arba visai nerasta, arba jis buvo silpnas (<0,12 balo), o tai patvirtino, kad eksperimentinis modelis turi visus reikalingus monoartrito (vieno kelio sąnario uždegimo) požymius. Skirtumai tarp kairiųjų ir dešiniųjų kelių sąnarių sinovijos uždegimiškumo statistiškai patikimi ($p < 0,001$). Kremzlės pažeidimų KKS nerasta, skirtumai tarp KKS ir DKS kremzlės pažeidimo taip pat statistiškai patikimi ($p < 0,001$) (4.2.15 pav.)



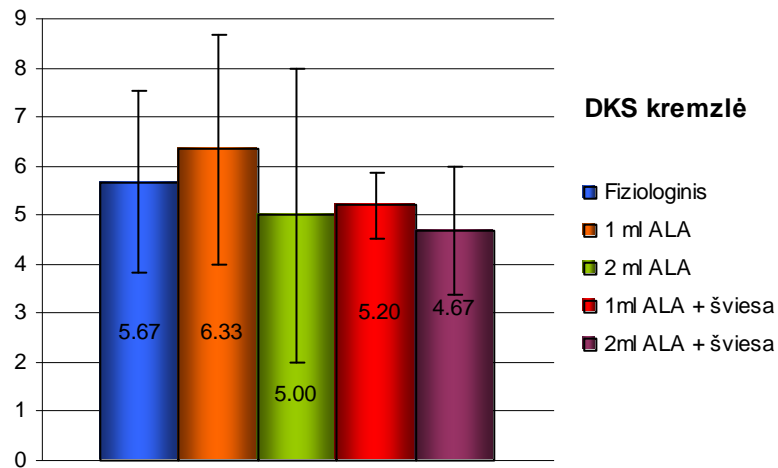
4.2.15 pav. Sinovijos ir kremzlės pažeidimų išreiktumas (balais) tarp kairiųjų ir dešiniųjų kelio sąnarių.

Apibūdinant sinovijos būklę eksperimentinio artrito atveju dešiniojo kelio sąnario sinovito išreikštumas visose tiriamose grupėse, buvo tarp 3,3 ir 6 balų (4.2.16 pav), o tai yra būdinga vidutiniškai išreikštam sinovitui. Patikimo skirtumo tarp kontrolinių ir gydomųjų grupių dešiniųjų uždegiminių sąnarių nerasta.



4.2.16 pav. Dešiniųjų kelio sąnarių sinovijos pažeidimų išraiška balais

Ištirus po sinovija esančią kremzlę taip pat stebėti pokyčiai dešinės kojos sąnariuose, pažaidos rodiklis svyravo nuo 4,67 iki 6,33 balų, tai atitinka vidutiniškus arba ryškius pokyčius kremzlinėse struktūrose, atsiradusius uždegimo pasėkoje. Tuo tarpu kairės kojos kremzlinėse struktūrose pokyčių nebuvo (4.2.17 pav.).



4.2.17 pav. Dešiniųjų kelio sąnarių sinovijos pažaidimų išraiška balais.

4.3. Rezultatų aptarimas

Dažniausiai artrito modeliai yra naudojami tirti vaistus ar kitus stimulus, kurie gali turėti poveikį artrito eigai, lėtinį uždegiminį procesą reguliuojantiems mechanizms ir audinių pažeidimui. Kiekvieno tyrimo atveju mokslininkai stengiasi parinkti labiausiai panašų eksperimentinį modelį, kuris pagal pakenktų sąnarių pobūdį atitiktų reumatoidinį artritą (RA), būtų pakankamai išreikštas pagal savo klinikinius ir laboratorinius rodiklius. Pastaruoju metu dažnai naudojami eksperimentiniai modeliai yra adjuvantu ir kolagenu indukuoti artritai [32, 36], jie pažeidžia daugelį sąnarių, tuo pačiu primena reumatoidinį poliartritą.

Fotodinaminės terapijos pritaikymui ir tolesnei rezultatų analizei mes pasirinkome vieno uždegiminio sąnario-monoartrito modelį, t.y. antigenu indukuotą artritą. Pasirinkimą lėmė tai, kad FDT norėtume lokaliai gydyti vieną labiausiai uždegimo pakenktą sąnarį, nes kaip nurodo literatūra apie 30% pacientų susirgusių RA mažai pasiduota įprastiniam gydymui priešuždegiminiais ir ligą modifikuojančiais vaistais [9], nes išlieka nuolat persistuojantys artritai. Gyvūno pasirinkimą apsprendė tai, kad triušio kelio sąnarys yra didesnis negu pelės ar žiurkės, primenantis žmogaus rankos sąnarį, taip pat radome keletą publikacijų, kuriose FDT tyrimams ir gi buvo naudojami triušiai [6, 33]. AIA sukėlimo metodika buvo atliekama pagal A.Ceponio su kt. tyrėjais aprašytą schemą, šiuo atveju buvo tirtas lokalus vaisto injekuoto į uždegiminį kelio sąnarį poveikis [5]. Pirmą ir antrą dieną po antigeno (OA) suleidimo į DKS išryškėjo pastarųjų sąnarių audinių patinimas, tuo tarpu kairiųjų kelio sąnarių apimtis nekito, skirtumas tarp DKS ir KKS buvo akivaizdus – apie 2cm, taigi įvertinome tą faktą, kad sukėlėme monoartritą, kuris išliko iki tyrimo pabaigos (23dienos). Tuo tarpu kraujo rodiklių dinamika eksperimentinio AIA modelio organizme buvo kiek kitokia: ryškiausias uždegiminio proceso sustiprėjimas stebėtas 1 ir 3 parą po OA injekcijos, ENG atitinkamai pakito apie 10 ir 20 kartų daugiau, negu triušiams esant sveikiems. Tačiau atlikus fotosensibilizatoriaus ALA injekciją, apšvitinus DKS, ENG turėjo tendenciją mažėti. Taigi, uždegimo paūmėjimo kraujyje nestebėjome, o pačio artrito eiga DKS nekito. Leukocitų skaičiaus ryškesnis padidėjimas, stebėtas praėjus 3 dienoms po OA injekcijos, kas byloja apie uždegiminio proceso sustiprėjimą organizme, tolesnėje eksperimento eigoje nei ALA bei fiziologinio tirpalo suleidimas kontrolinėje grupėje, nei gydymo metu patirtas šviesos poveikis neturėjo esminės įtakos ENG, leukocitų ir eritrocitų bei kūno masės pokyčiams, t.y. galime daryti prielaidą, kad kraujo rodikliai be pakartotinės antigeninės stimuliacijos palaipsniškai pradėjo normalizuotis (ENG sveikiams triušiams buvo – 1,7, tuo tarpu 3 dieną po artrito sukėlimo buvo vidutiniškai 33,5, o 23-ią eksperimento dieną sumažėjo beveik iki normos- 4,7). Analizuojant artrito eigą eksperimento metu, galime taip pat daryti prielaidą,

kad šviesa nepadarė jokio poveikio uždegiminiams DKS, nes iki 23 eksperimento dienos DKS patinimas išliko toks pat, kaip ir eksperimento dieną (apie 13,5cm), tuo tarpu teoriškai FDT dėl atsipalaidavusių aktyvių deguonies radikalų sukelia ląstelių-taikinių nekrozę, atsipalaiduoja uždegiminiai faktoriai ir laikinai paūmėja uždegiminis procesas bei sunaikinami uždegiminiai sinovijos audiniai, gydymo metu vystosi fibroziniai pokyčiai [17].

Kad FDT nedavė laukiamo efekto byloja ir galutinė histologinė audinių analizė, statistiškai patikimo skirtumo tarp kontrolinių ir gydomųjų grupių DKS nebuvo. Manome, kad taip atsitiko todėl, kad artrito modelis buvo su išreikštais uždegiminiais pokyčiais DKS, fotosensibilizatoriaus susikaupimas juose taip pat buvo pakankamas, nes po 3val. užregistruoti fotoaktyvios medžiagos protoporfirino IX (PpIX) kiekiai buvo pakankami FDT atlikti. Panašūs rezultatai po 2-3val. gauti, tiriant uždegiminius sąnario audinius S.Bagdono su bendraautorais publikuotame darbe [2].

Taigi, apibendrinant tyrimo rezultatus, galime daryti prielaidą, kad greičiausiai šviesos dozė buvo nepakankama, o kolegų sukonstruota švitinimo sistema nepilnai apgaubė sąnarį, dalis šviesos išsisklaidė, todėl laukto efekto galutiniame etape - artrito susilpnėjimo nestebėjome, ką patvirtino ir histologinių rezultatų duomenys.

Manome, kad tęsiant FDT taikymą uždegiminių sąnarių lokaliajam gydymui, reikia ypač kruopščiai pritaikyti švitinimo sistemą, parinkti apšvitinimo dozę.

5. IŠVADOS

1. Kraujo rodikliai FDT eksperimento dieną atitiko stiprų uždegiminį procesą, nes ENG buvo iki 20 kartų didesnis, negu sveikų triušių ($p < 0,017$). Leukocitų skaičius padidėjo nuo $7,27 \pm 1,28 \times 10^9/L$ sveikiems iki $21,74 \pm 3,69 \times 10^9/L$ ($p < 0,001$). Stipraus uždegimo pasekoje mažėjo eritrocitų skaičius nuo $4,48 \pm 0,29 \times 10^{12}/L$ sveikiems iki $3,49 \pm 0,27 \times 10^{12}/L$ ($p < 0,005$). Esminių kūno masės pokyčių nekonstatuota.
2. AIA modelis atitiko vieno kelio artritu keliamus reikalavimus: po artrito indukcijos dešiniųjų kelio sąnarių patinimas buvo apie 2cm didesnis, nei kontrolinių kairiųjų kelio sąnarių (1d po OA $p < 0,001$, 2d po OA $p < 0,001$).
3. Gydomosios grupės gyvūnų ENG turėjo tendenciją po FDT mažėti laipsniškai (8d $p < 0,012$, 11d. $p < 0,01$). Lyginant kontrolinių ir gydomųjų grupių ENG dinamiką, skirtumų tarp grupių nekonstatuota, todėl darome prielaidą, kad be pastovios antigeninės stimuliacijos modelis silpsta, FDT metu generuojami aktyvūs deguonies radikalai nesukėlė uždegiminio proceso paūmėjimo.
4. FDT poveikis uždegiminiam procesui buvo nepakankamas, kadangi dešiniųjų ir kairiųjų kelio sąnarių patinimų skirtumas FDT eksperimento dieną ir stebint dviejų savaitių laikotarpyje išliko nepakitęs (apie 2 cm), nekonstatuotas nei artrito eigos pablogėjimas, nei pagerėjimas.
5. Histologinė sąnarių audinių analizė parodė, kad ir sinovijos, ir kremzlės pažeidimai dešiniuosiuose kelio sąnariuose statistiškai patikimai skyrėsi nuo kairiųjų ($p < 0,001$). Patikimo skirtumo tarp kontrolinių ir gydomųjų grupių dešiniųjų kelio sąnarių nebuvo.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Bagdonaitė L., Kirdaitė G. Sisteminių reumatinių ligų laboratorinė diagnostika. *Laboratorinė medicina*. 2003, 3, 32-33 p.
2. Bagdonas S., Kirdaitė G., Streckytė G., Gražienė V., Leonavičienė L., Bradūnaitė R., Venalis A., Rotomskis R Spectroscopic study of ALA-induced endogenous porphyrins in arthritic knee tissues: targeting rheumatoid arthritis PDT. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005, 4, 497-502p.
3. Beischer A.D., Bhathal P., de Steiger R, Penn D, Stylli S. Synovial ablation in a rabbit rheumatoid arthritis model using photodynamic therapy *ANZ J Surg.* 2002, 72, 517-522p.
4. Bloznelytė L. Klinikinė fotodinaminė terapija Lietuvoje. *Medicina*. 1997, 33, 10, 121-133p.
5. Ceponis A, Waris E, Mönkkönen J, Laasonen L, Hyttinen M, Solovieva SA, Hanemaajier R, Bitsch A, Konttinen YT: Low-dose, non-cytotoxic intra-articular liposomal clodronate delays development of erosions and prevents loss of cartilage proteoglycan in established antigen-induced arthritis (AIA) in rabbits. *Arth. Rheum.* 2001, 44, 1908-1916p.
6. Chowdhary R.K., Ratkay L.G., Canaan A.J., Waterfield J.D., Richter A.M., Levy J.G. Uptake of verteporfin by articular tissues following systemic and intra-articular administration. *Biopharm Drug Dispos.* 1998, 19, 395-400p.
7. Cremer M.A., Ye X.J., Terato K., Owens S.W., Seyer J.M., Kang A.H. Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat. Characterization of cellular and humoral immune response to native types XI, V, and II collagen and constituent a-chains. *J. Immunol.* 1994, 153, 824-832p.
8. Dadonienė J., Lukšienė A. Reumatoidinis artritas – našta ligoniui ir visuomenei. *Sveikata*, 2002, 9-10p.
9. Dietze A., Engesaeter B., Berg K. Transgene delivery and gelonin cytotoxicity enhanced by photochemical internalization in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from rheumatoid arthritis patients. *Photochem. Photobiol Sci.* 2005, 4, 341-347p.
10. Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003, 423, 356–361p
11. Fisher A.M.R., Murphree A.L., Gomer C.J. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Laser Surg. Med.* 1995, 17, 2-31p.

12. Giniūnas L., Rotomskis R., Smilgevičius V., Piskarskas A., Didžiapetrienė J., Bloznelytė L., Gričiūtė L. Activity of hematoporphyrin derivate photoproduct in photodynamic therapy in vivo. *Lasers Med. Sci.* 1991, 6, 425-428p.
13. Henderson B.W., Dougherty T.J. How does photodynamic therapy work? *J. Photochem. Photobiol.* 1992, 55, 145-157p.
14. Hendrich C., Siebert W.E. Photodynamic therapy for rheumatoid arthritis? *Lasers Surg Med.* 1997, 21, 4, 359-364p.
15. Joosten L.A.B., Helsen M.M.A., van den Berg W.B. Accelerated onset of collagen-induced arthritis by remote inflammation. *Clinical and Experimental Immunology.* 1994, 97, 204-211p.
16. Kennedy J.C., Pottier R.H., Pross D.C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol.* 1990, 6, 143-148
17. Kirdaitė G., Lange N., Busso N., Van Den Bergh H., Kucera P., So A. Protoporphyrin IX photodynamic therapy for synovitis. *Arthritis Rheum.* 2002,46(5),1371-1378p.
18. Kirdaitė G. Aminolevulino rūgštis skatina protoporfirino IX gamybą: fotodinaminės terapijos perspektyvos vietišškai gydant artritą. *Laboratorinė medicina.* 2001, 1, 38-43p.
19. Krenn V, Morawietz L. Grading of chronic synovitis proposal for histological grading system. *Pathol Res Pract* 2002;198 (5), 317-25
20. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A, Biochemical and metabolic abnormalities in intraarticular cartilage from osteo-arthritic humans hips.II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Surg Am* 1971; 53: 523-37.
21. Matuzevičienė R. Eritrocitų nusėdimo greitis: mokomoji knygelė. V. 2003, 6-7p.
22. Mikecz K., Glant T.T., Buzas E., Poole A.R. Proteoglycan induced polyarthritis and spondylitis adoptively transferred to naive BALB/C mice. *Arthritis Rheum.* 1990, 33, 26-30p.
23. Müller-Ladner U., Pap T., Gay R.E., Neidhart M., Gay S. Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature clinical practice rheumatology*, 2005, 1, 102-110p.
24. O'Duffy E.K., Clunie G.P., Edwards D.L., J.C., Ell P.J. Double blind glucocorticoid controlled trial of samarium-153 particulate hydroxyapatite radiation synovectomy for knee synovitis. *Ann. Reum. Dis.*, 1999, 58, 554-558p.

25. Patzakis M.J., Mills D.M., Bartholomew B.A., Clayton M.L., Smyth C.J. A visual, histological, and enzymatic study of regenerating rheumatoid synovium in the synovectomized knee. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 1973, 55, 287-300p.
26. Ratkay L.G., Chowadhary R.K., Iamaroon A. Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbit by induction of apoptosis of inflammatory cells with local application of transdermal photodynamic therapy. *Arthritis Rheum.* 1999, 41, 525-534p.
27. Rotomskis R., Streckytė G., Gričiūtė L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai. Vilnius 2002.
28. Saadeh C. The erythrocyte sedimentation rate: old and new clinical applications. *South Med J* 1998, 3, 220-225p.
29. Schmutz C., Hulme A., Burman A., Salmon M., Ashton B., Buckley C., Middleton J. Chemokine receptors in the rheumatoid synovium: upregulation of CXCR5. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(2),217–229p.
30. Tak P.P., Bresnihan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis. Advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum.* 2000, 43, 1735-1743p.
31. Thompson D., Bird H.A. Acute phase response in *Oxford Text Book of Rheumatology*. Oxford University Press. London, 1998, 473 – 476p.
32. Tigka E., Daskala I., Rallis G., Anagnostopoulou S., Tesseromatis C. Adjuvant arthritis-induced changes on ampicillin binding in serum and tissues under the influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2005, 30(4), 235-241p.
33. Trauner K.B., Hasan T. Photodynamic treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis. *Photochem.Photobiol.*, 1996, 64, 740-750p.
34. Van de Langerijt A.G.M., Kingston A.E., van Lent P.L.E.M., Billingham M.E.J., van den Berg W.B. Cross-reactivity to proteoglycans in bacterial arthritis: lack of evidence for in vivo role in induction of disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1994, 71, 273-280p.
35. Van den Berg W.M. Animal models of arthritis in *Oxford Text Book of Rheumatology*. Oxford University Press. London. 1998, 433-440.
36. Williams R.O., Inglis J.J., Simelyte E., Criado G., Sumariwalla P.F. Analysing the effect of novel therapies on cytokine expression in experimental arthritis. *Int J Exp Pathol.* 2005;86(5), 267-278p.

37. Wolfe F, Michaud K. The clinical and research significance of the erythrocyte sedimentation rate. J Rheumatol. 1994, 21, 1227-1237p.
38. Zaleskis G. Pagrindinių laboratorinių tyrimų žinynas. Vaistų žinios I-kla, V. 2002, 68-218 p.
39. <http://nic.sav.sk/logos/books/scientific/node35.html>
40. <http://www.iuk.edu/faculty/cchauret/L321/L321se6.gif>
41. <http://www.nucleusinc.com>

Effect of photodynamic therapy on inflammation process in experimental antigen induced arthritis

SUMMARY

The aim of this study was to analyze the effect of photodynamic therapy (PDT) for the local treatment of inflamed knees in case of antigen induced arthritis.

For our tests we have chosen the model of antigen induced arthritis (AIA), characterized by the features of monoarthritis. AIA was provoked in rabbits (n=17) by injecting an ovalbumin (OA) solution in the right knee of previously immunized animals using OA and Freund's adjuvant solution. Different concentrations of 5-aminolevulinic acid, a precursor of PpIX, were injected intraarticular or intravenously. The measurements of the knee have been performed, the body weight was measured, blood test results (i.e. ESR., the number of erythrocytes and leukocytes) were evaluated. The accumulation of PpIX was determined by measuring fluorescence spectra.

In the first stage of the experiment the development and suitability of AIA model (n=17) was evaluated. The process of inflammation was characterized by statistically significantly increased ESR following the immunization, furthermore, after intraarticular injection with OA, ESR at day 3 was 20 times increased as compared with the healthy animals. The number of erythrocytes had the tendency to decrease due to the inflammation (control group -4.48×10^{12} L, at day three after the injection -3.8×10^{12} L). On the contrary, the number of leukocytes was increasing (control group -7.27×10^9 L, after the injection with OA -21.74×10^9 L). A significant feature of AIA model is the difference in the size between the inflamed right knees and the control left ones, that makes about 2 cm, as measured on the first and the second days following the antigen injection. During the second stage of this study in order to induce the process of photosensibilization in the inflamed synovia the different concentrations of 5-aminolevulinic acid, were injected. The animals for the treatment were injected with 1 ml ALA solution into the right knees (n=5) and the second group (n=4) was injected with 1 ml of ALA into the right knees and 1 ml of ALA into the ear vein. The control group of animals were treated with analogical ALA doses (n=3 and n=2) and physiological solution injections into the right knees (n=3). The comparison of inflamed and healthy knees showed the highest aggregation of PpIX in the right knees after 3 hours of immunization. Photosensitized therapy (irradiation dose of 18 J/cm^2) has been applied for the treatment of ill animals. The third step of our work was analyzing of PDT effect in the period of 20 days. ESR in the group receiving the PDT therapy was found to be statistically significantly decreased. The comparison of ESR dynamics did not reveal any differences between the groups investigated. PT effect for the process of inflammation was not significant as revealed by measuring the size of right and left knees at the day of PDT application and after the next 20 days. The difference of 2 cm remained unchanged. Histological analysis of right knee tissue did not reveal any statistically significant changes too.

To summarize, we can state, that the dose of irradiation might have not been sufficient enough therefore we did not receive the expected effect of impaired monoarthritis at the final stage of our experiment. It is confirmed by the histological tests as well.