

VILNIAUS UNIVERSITETAS

ROMUALDAS RUDYS

ENDOGENINIŲ PORFIRINŲ DETEKCIJA SPEKTROSKOPIJOS IR
MIKROSKOPIJOS METODAIS REUMATOIDINIO ARTRITO ATVEJU

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biofizika (02B)

Vilnius, 2014 metai

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universitete.

Eksperimentiniai darbai atlikti Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centre ir Vilniaus universiteto Onkologijos institute.

Mokslinis vadovas:

doc. dr. Saulius Bagdonas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02 B)

Konsultantas:

dr. Gailutė Kirdaitė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

ISBN 978-609-459-356-7

Sutartiniai žymėjimai

AIA – antigenų indukuotas artritas

AL – albuminas iš kiaušinio

ALA – 5-aminolevulininė rūgštis

ALA-Me – 5-aminolevulininės rūgšties metilo esteris

CFA – pilnasis Froindo adjuvantas

FD – fotodiagnostika

FDT – fotodinaminė terapija

FLIM – fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopija

HA – natrio hialuronatas

HE – hematoksilino ir eozino histocheminio dažymo metodas

i.a. – intrasąnarinė

i.v. – intraveninė

OA – osteoartritas

OA sinoviocitai – OA sergančių pacientų sinoviocitai

PpIX – protoporfirinas IX

TCSPC – laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimas

τ – fluorescencijos gyvavimo trukmė

RA – reumatoidinis artritas

RA sinoviocitai – RA sergančių pacientų sinoviocitai

RGB – 3 kanalų (raudonos, žalios, mėlynos spalvos) detektorius

ROI – tiriamoji bandinio sritis

TURINYS

Sutartiniai žymėjimai	3
1. ĮVADAS.....	7
1.1. Aktualumas.....	10
1.2. Naujumas	11
1.3. Darbo tikslas ir uždaviniai.....	12
1.4. Ginamieji teiginiai	13
1.5. Autoriaus indėlis.....	14
1.6. Publikacijų sąrašas.....	16
1.6. Padėka.....	20
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	21
2.1. Biologinių audinių optinės savybės.....	21
2.2. Fluorescencinė diagnostika	29
2.2.1. Savitoji audinių fluorescencinė diagnostika.....	30
2.2.2. Sensibilizuota audinių fluorescencinė diagnostika	35
2.3. ALA ir jos dariniai.....	42
2.4. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopijos (FLIM) principai ir taikymas.....	48
2.5. Reumatinės ligos	57
2.5.1. Reumatoidinis artritas.....	57
2.5.2. Osteoartritas.....	59
2.5.3. Sąvarinė kremzlė	60
2.5.4. Fotodinaminės terapijos taikymas reumatoidinio artrito gydymui.....	62
3. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	66
3.1. Medžiagos.....	66
3.1.1. Sensibilizacijai.....	66
3.1.2. Eksperimentinio reumatoidinio artrito modelio sukėlimui	66
3.1.3. Darbui su ląstelėmis, chondronais, kremzlės bandiniais.....	66
3.1.4. Audinių preparatų mikroskopjai paruošimui.....	67

3.2. Prietaisai	68
3.3. Pacientų tiriamoji medžiaga	69
3.3.1. Sinoviocitų paruošimas	69
3.3.2. Kremzlės bandiniai	70
3.3.3. Chondronų išskyrimas	71
3.4. Eksperimentiniai gyvūnai	72
3.4.1. Eksperimentinio antigenų indukuoto reumatoidinio artrito modelio sukėlimas.....	72
3.4.2. Tyrimų triušių eksperimentinio reumatoidinio artrito modelinėje sistemoje eiga.....	74
3.5. Fluorescencinė spektroskopija	76
3.5.1. In vitro	78
3.5.2. Ex vivo.....	79
3.5.3. In vivo.....	80
3.6. Biologinių audinių sensibilizuotų endogeniniai porfirinai paruošimas mikroskopijai	80
3.7. Biologinių audinių pjūvių mikroskopija ir spektroskopija.....	82
3.7.1. Pralaidumo mikroskopija	82
3.7.2. Fluorescencinė mikroskopija.....	82
3.7.3. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopija (FLIM).....	83
3.7.4. Fluorescencinė audinių pjūvių spektroskopija	84
3.8. Statistika	85
4. REZULTATAI.....	87
4.1. RA ir OA pacientų sinoviocitų bei OA pacientų chondronų ir kremzlės bandinių, sensibilizuotų endogeniniais porfiriniais, spektroskopiniai tyrimai ..	87
4.1.1. Sinoviocitų sensibilizacijos tyrimai.....	87
4.1.2. Kremzlės bandinių sensibilizacijos tyrimai.....	91
4.1.3. Tyrimų su pacientų pooperacine medžiaga rezultatų aptarimas ..	94
4.2. Spektroskopiniai EP tyrimai eksperimentiniame triušių AIA modelyje..	97
4.2.1. In vivo.....	97
4.2.2. Ex vivo.....	102

4.2.3. Tyrimų atliktų triušių eksperimentinio AIA modelyje, rezultatų aptarimas	105
4.3. EP lokalizacijos tyrimai triušių AIA modelio audiniuose.....	110
4.3.1. Vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdų analizė... ..	111
4.3.2. Apskaičiuotų FLIM vaizdų analizė	120
4.3.3. Vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdų analizės rezultatų aptarimas.	127
4.3.4. Apskaičiuotų FLIM vaizdų analizės rezultatų aptarimas	129
5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS.....	132
6. IŠVADOS	138
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS	139

1. ĮVADAS

Fluorescencijos matavimas yra vienas iš plačiausiai taikomų būdų optiniam įvairių molekulių kontrastui gauti naudojant skirtingas spektroskopines, mikroskopines ar endoskopines sistemas. Fluorescencija suteikia informacijos ne tik apie tam tikrą fluoroforą bandinyje, bet ir apie fluorescuojančios molekulės ar fluoroforo mikroaplinką. Skirtingi fluoroforai gali būti charakterizuojami remiantis jų žadinimo ir emisijos spektrais, jų kvantiniu našumu, poliarizacija bei fluorescencijos gyvavimo trukmėmis¹⁻⁴. Pagrindiniai endogeniniai fluoroforai sąlygojantys būdingą biologinių audinių savitąją fluorescenciją yra aromatinės aminorūgštys (tirozinas, triptofanas, fenilalaninas), struktūriniai baltymai (elastinas, kolagenas), fermentų metaboliniai kofaktoriai (NAD(P)H, flavinai (FAD)), riebalų komponentai ir porfirinai, kurių emisijos ir sugerties charakteristikos yra plačiai ištyrinėtos¹⁻⁶. Medicininuose taikymuose savitoji fluorescencija yra naudojama biologinių audinių ir ląstelių fluoroforų savybių tyrimams. Fluoroforų savybių pokyčiai suteikia informacijos apie biocheminius, funkcinis ar struktūrinius fluoroforų pokyčius audiniuose, kurie atsiranda dėl biocheminių, fiziologinių, metabolinių ar morfologinių audinių pokyčių¹⁻¹⁰. Savitosios fluorescencijos detekcija paremtos technologijos audinių charakterizavimui yra labai tinkamos klinikiniuose tyrimuose, nes papildomai nereikia jokių kontrastinių medžiagų, jos yra minimaliai invazinės, tačiau itin jautrios. Kiekybinė ir kokybinė informacija apie biologinių audinių sudėtį ir patofiziologiją gaunama naudojant nuostoviosios ar kinetinės spektroskopijos metodus¹¹. Nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos sistemos yra nesudėtingos ir pigios, lyginant su kitomis, todėl dažniausiai jos yra taikomos diagnostikai *in vivo*. Jau yra sukurtos kelios komercinės navikų diagnostikos sistemos pritaikančios audinių savitosios fluorescencijos detekciją, tačiau jų specifiškumas yra ribotas dėl veiksnių apsukinančių absoliutaus fluorescencijos intensyvumo registravimą *in vivo*¹¹. Fluorescencijos intensyvumas priklauso nuo žadinimo ir detekcijos sistemų geometrijos, audinių judėjimo, netolygaus audinių sužadavimo,

fotoblukimo ir fluorescenciją reabsorbuojančių endogeninių chromoforų koncentracijos bei jos pokyčių. Papildomos informacijos apie audinius gali suteikti gerai žinomų fluorescencijos parametrų egzogeniniai fluoroforai – fluoresceinas, indocianinas žaliasis ar porfirininiai sensibilizatoriai naudojami fotodiagnostikoje (FD) ir fotodinaminėje terapijoje (FDT)^{6-8,12,13}. Alternatyvus audinių fluorescencijos detekcijos metodas, kuris nėra jautrus nuostoviosios spektroskopijos signalus įtakojantiems veiksniams, yra laikinės skyros spektroskopija. Fluorescencijos gyvavimo trukmės gali padėti atskirti endogeninius biologinių audinių fluoroforus net jeigu jų fluorescencijos spektrai yra platūs ir persidengiantys. Taip pat biologinių audinių fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimų pranašumas yra tai, kad jos kinta keičiantis fizikocheminei fluoroforų aplinkai bei nepriklauso nuo fluorescencijos intensyvumo. Nepaisant šių pranašumų, visa potenciali fluorescencijos gyvavimo trukmių teikiama informacija kol kas nėra plačiai taikoma klinikinėje praktikoje. Sunkumų sukelia sudėtinga ir brangi laiko skyros detekcijos aparatūra bei ilga duomenų rinkimo ir analizės procedūra. Daug fluorescencijos gyvavimo trukmių tyrimų yra atlikta audiniuose *ex vivo*, tačiau dėl pakitusios audinių biocheminės sudėties (metabolizmo, hipoksijos) ir audinių morfologijos šių tyrimų rezultatai negali tiksliai prognozuoti *in vivo* matavimų rezultatų^{4,5,9,14,15}. Todėl yra kuriamos metodikos leidžiančios kuo artimesnėmis *in vivo* sąlygomis tirti biologinius audinius bei atlikti laiko skyros tyrimus *in vivo*^{4,5}. Kadangi fluorescencinės spektroskopijos matavimo rezultatų negalima susieti su biologinių audinių morfologine struktūra, tam naudojama mikroskopinė audinių analizė, kuri vis dar išlieka auksiniu standartu atpažįstant audinių tipus ar nustatant diagnozę. Biologinių audinių vaizdinimui gerinti, šalia įprastos fazinio kontrasto mikroskopijos, labai susidomėta fluorescencinės mikroskopijos taikymu, ypač po to, kai buvo sukurti konfokalinės ir dvifotonės lazerinės skenuojančios mikroskopijos principai^{16,17}. Fluorescencinės mikroskopijos metodu galima užregistruoti audinių savitąją fluorescenciją ar egzogeninių dažiklių fluorescenciją, tačiau atskirų endogeninių fluoroforų fluorescenciją yra sunku identifikuoti dėl persidengiančių emisijos spektrų. Šią

problema gali išspręsti fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopija (FLIM), kurios metu kiekviename vaizdo pikselyje atvaizduojamos būdingos endogeninių fluoroforų gyvavimo trukmės^{4,5,11,18,19}. Taip pat FLIM tyrinėjamos ir FDT naudojamų sensibilizatorių savybės ir jų pokyčiai^{9,20-23}. Šie tyrimai yra labai svarbūs norint tiksliai realiu laiku įvertinti FDT eigą ir prognozuoti gydymo rezultata. FDT buvo susidomėta ieškant naujų reumatoidinio artrito gydymo būdų²⁴⁻³⁰. Kadangi uždegiminei reumatoidinei membranai būdinga daug požymių, kuriais pasižymi neoplaziniai audiniai, t. y. hipermetabolinis aktyvumas, aktyvi vaskuliarizacija, tikėtina, kad fotodinaminę terapiją būtų galima taikyti ir reumatoidiniam artritui. Fotosensibilizuotos terapijos taikymo principas gydant artritą būtų selektyvi sinovijos destrukcija, kurią sukelia aktyvių deguonies radikalų, susidariusių po fotosensibilizatorių apšvitinimo tam tikro bangos ilgio šviesa, inicijuotos citotoksinės reakcijos uždegiminėse ląstelėse. Į organizmą galima įvesti egzogeninius fotosensibilizatorius arba jų pirmtakus. FDT toks pirmtakas gali būti 5-aminolevulininė rūgštis arba jos dariniai, kurie hemo biosintezės ciklo metu yra paverčiami į endogeninį fotosensibilizatorių protoporfiriną IX. Taip pat šio ciklo metu susidaro ir kiti porfirinai. Kadangi FDT metu fotopazaidos yra sukeltos artimoje fotosensibilizatorių aplinkoje, labai svarbu tiksliai nustatyti jų sudėtį ir pasiskirstymą audiniuose. Detektuoti endogeninius porfirinus galima spektroskopijos arba mikroskopijos metodais, tačiau norint gauti maksimalų skirtingų fluoroforų kontrastą diagnostikos ar kitais tikslais, neužtenka pasikliauti tik viena spektrine ar gyvavimo trukmių dimensija, kai galima atlikti detalesnę to paties bandinio analizę apjungus kelis spektroskopijos ir mikroskopijos metodus.

1.1. Aktualumas

Daugiau nei 100 mln. europiečių serga bent viena reumatine liga. Jos pagal sukeltą ilgalaikį neįgalumą užima 1-ą arba 2-ą vietą iš visų ligų, o išlaidos šioms ligoms gydyti sudaro 25 % visų išlaidų. Reumatoidiniu artritu (RA) pasaulyje serga 0,5-1 % suaugusių žmonių, tai viena iš dažniausių ir svarbiausių reumatinių ligų. Ligos paplitimo dažnumas išsivysčiusiose šalyse yra nuo 5 iki 50 atvejų 100000 žmonių³¹. Be to, šis skaičius kasmet didėja. Geografiškai RA labiausiai paplitęs Šiaurės Amerikoje ir šiaurinėje Europos dalyje, lyginant su kita besivystančio pasaulio dalimi³². Taigi, ši liga yra labai aktuali ir Lietuvoje. Visuomenės sveikatos stebėsenos fondo skelbiamo epidemiologinio tyrimo duomenimis Lietuvoje 2013 metais RA sirgo 12081 pacientų, iš kurių net 80 % yra moterys. Nors atrodytų, kad RA nesukelia tiesioginio pavojaus gyvybei, vis dėlto ligonių sergančių šia liga vidutinė gyvenimo trukmė yra 3–15 metų trumpesnė negu apskritai jų kartos populiacijos³³. Dėl sudėtingos RA diagnostikos ir gydymo, RA užima pirmą vietą tarp visų lėtinių ligų pagal tai, kokia dalis pacientų tampa neįgaliais; per 10 metų tai nutinka net apie 50 % pacientų. Kaip ir visų kitų ligų, ankstyva diagnostika yra vienas svarbiausių sėkmingo RA gydymo etapų, tačiau RA ankstyva diagnostika yra labai sudėtinga. Diagnostikai pasitelkiama keletas laboratorinių ir instrumentinių tyrimų metodų. Iš instrumentinių tyrimų RA diagnostikai svarbiausi yra rentgenologinis tyrimas, kompiuterinė tomografija, magnetinio rezonanso tyrimas, ultragarsinis tyrimas ir artroskopija. Diagnozavus ligą, RA gydymui gali būti skiriamas medikamentinis gydymas nesteroidiniais vaistais nuo uždegimo, steroidiniais hormonais, sintetiniais ir biologiniais ligos eigą modifikuojančiais vaistais³⁴. Nors yra daug pasiekta RA konservatyvaus gydymo srityje, ypač taikant biologinę terapiją, daugumai ligonių anksčiau ar vėliau prireikia ir chirurginės pagalbos. Taigi vis dar yra daug neišspręstų problemų RA diagnostikoje ir terapijoje, kurios skatina inovatyvių diagnostikos ir gydymo metodų paiešką. Taip pat norima pasiekti ilgalaikį, slopinantį uždegiminius procesus poveikį atliekant trumpus intensyvius terapinius kursus, kurie sukeltų ligos remisiją. Šiam tikslui pasiekti

reikia naujų vaistų, biologinių žymenų ir technologijų, leidžiančių tiksliai įvertinti ligos stadiją ir paciento būklę.

1.2. Naujumas

Šiuose tyrimuose pirmą kartą reumatoidinio artrito modelyje *in vivo* norint kuo selektyviau sukelti protoporfirino IX sintezės indukciją uždegiminėje sinovijoje buvo panaudotas 5-aminolevulininės rūgšties metilo esteris, kuris jau yra aprobuotas aktininei keratozei ir pamatinių ląstelių karcinomai gydyti.

Norint išsiaiškinti ar ligos pažeisti kremzlės audiniai geba indukuoti endogeninius porfirinus juos paveikus ALA ar jos dariniais, pirmą kartą pademonstruotos endogeninių porfirinų kaupimosi kinetikos osteoartritu sergančių pacientų kremzlės bandiniuose *ex vivo* ir chondronuose *in vitro* po inkubacijos su ALA ar ALA-Me. Taip pat pirmą kartą tirta hialurono rūgšties preparato įtaka endogeninių porfirinų indukcijai chondronuose, kurie buvo inkubuojami kartu su natrio hialuronatu ir ALA.

Remiantis fluorescencinės spektroskopijos duomenimis palygintos pirmtakų ALA ir ALA-Me savybės indukuoti endogeninius porfirinus po intraveninės ar intrasąnarinės injekcijos antigeno sukeltame triušio monoartrito modelyje *in vivo* ir audiniuose *ex vivo*. Iš fluorescencijos spektrų pokyčių nustatyta endogeninių porfirinų sudėtis ir jų kiekiai sinovijos ir kremzlės audiniuose.

Pirmą kartą atlikti endogeniniais porfiriniais sensibilizuotų audinių fluorescencinės gyvavimo trukmių mikroskopijos tyrimai. Taip pat atlikti triušio kelio sąnario kremzlės pjūviai jos nedekalcinavus. Pirmą kartą atlikti tos pačios bandinio vietos fluorescencinės spektroskopijos bei intensyvumo ir gyvavimo trukmių mikroskopijos tyrimai ir vėliau sulygtinti su histologiniu vaizdu. Ši metodika įgalina nustatyti endogeninių porfirinų sudėtį ir jų lokalizaciją biologinių audinių bandiniuose.

1.3. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Spektroskopiniais ir mikroskopiniais metodais ištirti endogeninių porfirinų susikaupimą ir pasiskirstymą eksperimentinio reumatoidinio artrito modelyje ir pacientų pooperacinėje medžiagoje po 5-aminolevulininės rūgšties ar jos metilo esterio panaudojimo.

Darbo uždaviniai:

1. Palyginti endogeninių porfirinų kaupimąsi reumatoidiniu artritu ir osteoartritu sergančių pacientų sinoviocituose, chondronuose ir kremzlės bandiniuose inkubavus juos terpėse su ALA ar ALA-Me.
2. Ištirti hialurono rūgšties preparato įtaką endogeninių porfirinų indukcijai chondronuose.
3. Palyginti ALA ir ALA-Me indukuotų endogeninių porfirinų kaupimąsi triušių eksperimentinio AIA modelyje *in vivo* intraveninio ir intrasąnarinio preparatų suleidimo atvejais.
4. Įvertinti endogeninių porfirinų susikaupimą AIA triušių sinovijos ir kremzlės audiniuose *ex vivo* po ALA ar ALA-Me injekcijos.
5. Nustatyti endogeninių porfirinų lokalizaciją sensibilizuotuose sinovijos ir kremzlės bandiniuose.

1.4. Ginamieji teiginiai

1. RA ar OA sinoviocitai 24 valandų laikotarpiu sukaupia nuo 5 iki 10 kartų daugiau PpIX negu kremzlės bandiniai ir chondronai po inkubacijos su ALA ar ALA-Me. RA ir OA sinoviocitai sukaupia tokius pat PpIX kiekius po inkubacijos su šiais pirmtakais.
2. ALA ir ALA-Me vienodai veiksmingai skatina PpIX susikaupimą bandiniuose *in vitro* bei *ex vivo*.
3. Hialurono rūgšties preparatai skatina PpIX kaupimąsi chondronuose *in vitro*.
4. Triušių eksperimentiniame AIA modelyje *in vivo* PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminio kelio odos paviršiuje yra apie 8 kartus didesnis po intrasąnarinės 16 mM ALA injekcijos negu po ALA-Me. O didžiausias intensyvumas registruojamas praėjus 2 valandoms po šių pirmtakų injekcijos.
5. PpIX fluorescencijos intensyvumas po intraveninės 16 mM ALA injekcijos uždegiminio kelio odos paviršiuje sumažėja apie 5 kartus lyginant su intrasąnarine injekcija, o po intraveninės 16 mM ALA-Me injekcijos – praktiškai neregistruojamas.
6. Vertinant indukuoto PpIX fluorescencijos intensyvumą uždegiminėje sinovijoje intrasąnarinė ALA-Me injekcija yra apie 5 kartus veiksmingesnė negu ALA. Triušių, kuriems antigenu sukeltas monoartritas, uždegiminio ir kontrolinio kelio sąnario kremzlėse kaupiasi vandenyje tirpūs porfirinai.
7. Praėjus 3 valandoms po intrasąnarinės ALA-Me injekcijos *in vivo*, PpIX lokalizuojasi sinovijos ir kremzlės audinių ląstelėse.

1.5. Autoriaus indėlis

Šioje disertacijoje aprašyti eksperimentai atlikti Vilniaus universiteto Kvantinės elektronikos katedros biofotonikos laboratorijoje, Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centre ir Vilniaus universiteto Onkologijos instituto Biomedicininės fizikos laboratorijoje. Biofotonikos laboratorijoje buvo sukurta ir surinkta spektroskopinė sistema. Inovatyvios medicinos centre buvo atliekami pacientų pooperacinės medžiagos ir iš jų išskirtų ląstelių, eksperimentinių gyvūnų *in vivo* ir jų audinių *ex vivo* spektroskopiniai tyrimai bei ruošiami audinių bandiniai mikroskopijos tyrimams. Biomedicininės fizikos laboratorijoje patobulinta mikroskopijos sistema ir atlikti sensibilizuotų audinių pjūvių spektroskopijos ir mikroskopijos tyrimai.

Darbo vadovas doc. dr. Saulius Bagdonas suformulavo eksperimentinių tyrimų kryptis, konsultavo rezultatų interpretavimo klausimais, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas ir medžiagą pristatymui konferencijose.

Pagrindiniai mokslinių publikacijų bendra autoriai yra doc. dr. Saulius Bagdonas, dr. Gailutė Kirdaitė, prof. Ričardas Rotomskis.

Dr. Gailutė Kirdaitė konsultavo mediciniais klausimais, dalyvavo aptariant eksperimentų rezultatus, vykdė organizacinius tyrimų darbus.

Prof. Ričardas Rotomskis konsultavo interpretuojant rezultatus.

Jaroslav Denkonskij paruošė visus bandinius iš pooperacinės pacientų medžiagos. Dr. Laima Leonavičienė ir dr. Rūta Bradūnaitė vykdė visas procedūras su eksperimentiniais gyvūnais. Jurga Papečkienė konsultavo interpretuojant histologinių preparatų mikroskopijos vaizdus.

Autorius planavo tyrimus, sukūrė ir surinko spektroskopinę sistemą, atliko *in vitro*, *ex vivo* ir *in vivo* spektroskopinius tyrimus, parengė sensibilizuotų audinių paruošimo mikroskopijai metodiką, paruošė bandinius mikroskopijai,

atliko mikroskopijos tyrimus, atliko bandinių dažymą, analizavo ir interpretavo gautus rezultatus, juos pristatė mokslinėse konferencijose ir parengė publikacijas.

1.6. Publikacijų sąrašas

1. Publikacijos, įrašytos į *Thomson Reuters Web of Science* duomenų bazę:

1. R. Rudys, G. Kirdaitė, S. Bagdonas, L. Leonavičienė, R. Bradūnaitė, G. Streckytė, R. Rotomskis. Spectroscopic assessment of endogenous porphyrins in a rheumatoid arthritis rabbit model after the application of ALA and ALA-Me. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013, 119:15-21.
2. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Kirdaitė, J. Papečkienė, R. Rotomskis. Fluorescence morphology and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) of rabbit knee tissues in the experimental arthritis model. *Medical Physics in the Baltic States: proceedings of the 10th International Conference on Medical Physics*. Kaunas, Lietuva. Technologija, 2012, p. 56-61.
3. J. Lesins, A. Lihache, R. Rudys, S. Bagdonas, J. Spigulis. Skin autofluorescence photo-bleaching and photo-memory. *Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions: Proceedings of SPIE-OSA Biomedical Optics (Optical Society of America)*. 2011, 8092: 80920N.
4. J. Denkovskij, G. Kirdaitė, G. Streckytė, R. Rudys, S. Bagdonas. Surface markers of synovial mesenchymal stem cells: refinement of flow cytometric analysis. *Medical Physics in the Baltic States: proceedings of the 9th International Conference on Medical Physics*. Kaunas, Lietuva. Technologija, 2011, p. 23-26.

2. Straipsniai kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose:

1. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Kirdaitė. Application of aminolevulinic acid or its methyl ester in rabbit rhaumatoid arthritic model: spectroscopy study. Tarptautinės konferencijos „Biomedical Engineering 2010“ medžiaga. Kaunas, Lietuva. 2010, p. 170-174.

3. Pranešimai mokslinėse konferencijose

1. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Kirdaitė. Application of aminolevulinic acid or its methyl ester in rabbit rhaumatoid arthritic model: spectroscopy study. Tarptautinės konferencijos „Biomedical Engineering 2010“ medžiaga. Kaunas, Lietuva. 2010, p. 170-174.
2. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Streckytė, G. Kirdaitė. Spectroscopic study of ALA and its methyl ester induced endogenous porphyrins in human synoviocytes and cartilage tissue. Book of Abstracts of 14th Congress of the European Society for Photobiology. 2011 rugsėjo 1-6 d.; Ženeva, Šveicarija, p. 116-117.
3. S. Bagdonas, R. Rudys, G. Streckytė, G. Kirdaitė. A comparative spectroscopic study of endogenous porphyrins induced with aminolevulinic acid (ALA) and its methyl ester in rabbit rheumatoid arthritis model *in vivo*, and in human synoviocytes *ex vivo*. Book of Abstracts of 14th Congress of the European Society for Photobiology. 2011 rugsėjo 1-6 d.; Ženeva, Šveicarija, p. 94.
4. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Streckytė, G. Kirdaitė. Endogeninių porfirinų indukuotų ALA ir jos metilo esteriu spektroskopiniai tyrimai žmogaus sinoviocituose ir kremzlėje. 39-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija: programa ir pranešimų tezės. 2011 m. spalio 6-8 d.; Vilnius, Lietuva. Vilniaus universiteto leidykla, p. 298
5. J. Denkovskij, G. Kirdaitė, G. Streckytė, R. Rudys, S. Bagdonas. Surface markers of synovial mesenchymal stem cells: refinement of flow cytometric analysis. Medical Physics in the Baltic States: proceedings of the 9th International Conference on Medical Physics. Kaunas, Lietuva. Technologija, 2011, p. 23-26.
6. R. Rudys, S. Bagdonas. Diagnostic aspects of light-induced skin autofluorescence decay. International conference Biophotonics in Dermatology and Cardiology. 2012 m. kovo 30-31 d.; Ryga, Latvija, p. 21.

7. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Kirdaitė, J. Papečkienė, R. Rotomskis. Fluorescence morphology and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) of rabbit knee tissues in the experimental arthritis model. Medical Physics in the Baltic States: proceedings of the 10th International Conference on Medical Physics. Kaunas, Lietuva. Technologija, 2012, p. 56-61.
8. R. Rudys, J. Papečkienė, S. Bagdonas, G. Kirdaitė, R. Rotomskis. Biologinių audinių diagnostinis vaizdinimas fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopija (FLIM) modelinio reumatoidinio artrito atveju. 40-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija. 2013 birželio 10-12 d.; Vilnius, Lietuva. Vilniaus universiteto leidykla, p.129.
9. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Kirdaitė, R. Rotomskis. Application of FLIM for diagnostic imaging of sensitized tissues. Biophotonics-Riga. 2013 rugpjūčio 26-31 d.; Ryga, Latvija, p.50.
10. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Kirdaitė, R. Rotomskis. FLIM for the characterization of sensitized tissues in rheumatoid arthritis model. 15th European society for photobiology 2013 congress. 2013 rugsėjo 2-6 d.; Liege, Belgija, p.136-137.
11. S. Bagdonas, R. Rudys, R. Rotomskis. Time-resolved fluorescence spectroscopy of protoporphyrin IX and water soluble porphyrins in model biological systems and in sensitized tissues. 15th European society for photobiology 2013 congress. 2013 rugsėjo 2-6 d.; Liege, Belgija, p.137.
12. R. Rudys, J. Papečkienė, S. Bagdonas, G. Kirdaitė, R. Rotomskis. FLIM of synovium and cartilage tissues in rheumatoid arthritis model. International Multidisciplinary Microscopy Congress – INTERM 2013. 2013 spalio 10-13 d.; Antalija, Turkija, p. 72.
13. R. Rudys, S. Bagdonas, G. Kirdaitė, R. Rotomskis. Application of steady state and time-resolved fluorescence techniques for microscopic discrimination of sensitized tissues *ex vivo*. International Conference on

Laser Application in Life Sciences 2014. 2014 birželio 28 d. – liepos 3 d.; Ulmas, Vokietija, p. 165.

1.6. Padėka

Dėkoju mokslinio darbo vadovui doc. dr. Sauliui Bagdonui už vertingas, nuoširdžias ir atsakingas konsultacijas bei diskusijas, įgytas žinias, visapusišką palaikymą studijuojant, patarimus ir pagalbą rengiant šią disertaciją.

Dėkoju prof. habil. dr. Ričardui Rotomskiui už konstruktyvias diskusijas ir konsultacijas bei sudarytą galimybę atlikti eksperimentus su šiuolaikine įranga.

Dėkoju dr. Gailutei Kirdaitei už vertingas konsultacijas ir patarimus bei organizacinius darbus.

Dėkoju Jaroslav Denkonskij, Jurgai Papečkieni, dr. Laimai Leonavičienei ir dr. Rūtai Bradūnaitei už bendradarbiavimą ir pagalbą atliekant eksperimentus su ląstelėmis ir gyvūnais.

Dėkoju VUOI Biomedicininės fizikos laboratorijos ir VU Fizikos fakulteto Kvantinės elektronikos katedros kolektyvams už pagalbą, geranoriškumą, profesionalią ir nuotaikingą darbo aplinką.

Tariu nuoširdų ačiū savo Tėvams už paramą ir visapusišką palaikymą visais studijų metais, visiems artimiesiems ir draugams už jų supratingumą ir kantrybę.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Biologinių audinių optinės savybės

Optinių metodų plėtra šiuolaikinės modernios medicinos diagnostikos, terapijos ir chirurgijos srityse paskatino įvairių biologinių audinių optinių savybių tyrimus, kadangi šviesos parametrų matavimu paremtų metodikų diagnostinis veiksmingumas priklauso nuo šviesos sklidimo ir jos intensyvumo pasiskirstymo audinyje. Metodai grindžiami šviesos sąveika su biologiniu audiniu diagnostikoje naudojami stebėti kraujo įsotinimą deguonimi ir audinių metabolizmo aktyvumą^{35,36}, pulso oksimetrijai³⁷, fluorescencinėje navikų diagnostikoje^{38,39}, spektrofotometriuose matavimuose^{40,41} ir įvairiose naujai pasiūlytose optinio vaizdinimo technologijose⁴²⁻⁴⁴. Terapijoje šviesa naudojama lazerinėje chirurgijoje^{45,46}, lazerinei angioplastikai ir abliacijai^{47,48} bei fotodinaminei terapijai^{49,50}. Šiuose taikymuose žinios apie biologinių audinių optines savybes yra būtinos norint tiksliai interpretuoti ir kiekybiškai įvertinti diagnostinius duomenis bei prognozuoti šviesos pasiskirstymo ir sugertos dozės terapinį poveikį. Taip pat žinios apie audinių optines savybes yra būtinos siekiant išvystyti naujas optines technologijas, pritaikomas fotodinaminėje ir fototerminėje terapijoje, optinėje tomografijoje, optinėje biopsijose ir t.t.. Fluorimetriniais metodais gali būti labai tiksliai ištirti sugerties sąlygoti fotofizikiniai ir fotocheminiai procesai skaidriose sistemose, tačiau audiniuose vis dar yra sudėtinga tiksliai įvertinti spektrinį, laikinį ir erdvinį šviesos pasiskirstymą.

Audinių optines savybes lemia jų struktūra ir būklė: fiziologinė būseną, hidratacijos lygis, homogeniškumas, pokyčiai *in vivo* ir *in vitro*. Audinius galima aprašyti makroskopiškai ir mikroskopiškai. Mikroskopiniai parametrai gerai aprašo ląstelių monosluoksnius ir taikomi izoliuotiems biologiniams objektams, o makroskopinės audinių savybės nustatomos eksperimentiškai. Makroskopiniai parametrai dažnai yra vadinami optiniais koeficientais. Šviesos

sklidimas audiniuose charakterizuojamas optinės skvarbos gyliu δ . Šviesos sąveika su biologiniu audiniu, kaip ir kiekviena neskaidria aplinka, sukelia įvairius vyksmus: lūžį, atspindį, sklaidą ir sugertį.

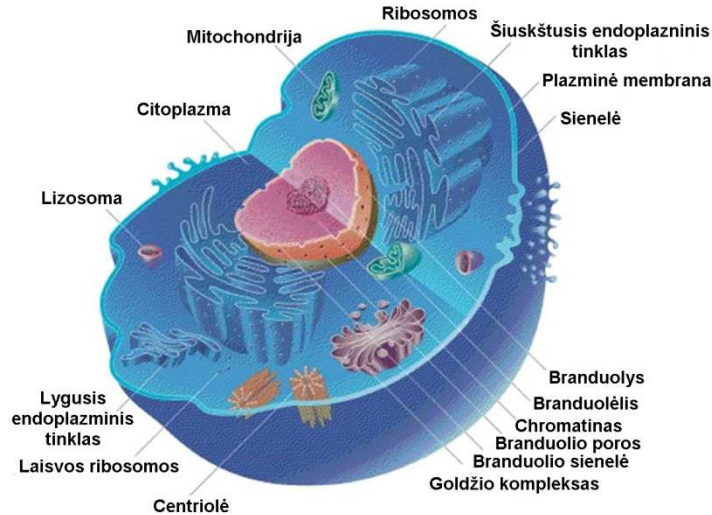
Šviesos lūžis ir atspindys yra glaudžiai susiję tarpusavyje ir aprašomi Frenelio dėsniais. Šviesos atspindys suprantamas kaip elektromagnetinės spinduliuotės atsispindėjimas nuo paviršiaus, į kurį krinta spinduliuotė. Paprastai atspindintis paviršius susidaro skirtingus lūžių rodiklius turinčių dviejų medžiagų riboje (pavyzdžiui, biologinio audinio ir oro). Kai paviršius, į kurį krinta šviesa, yra glotnus, o nelygumai maži, lyginant su krintančios šviesos bangų ilgiu, vyksta veidrodinis atspindys (statmentai krintančios šviesos veidrodinio atspindžio koeficientas audiniui ore yra $\approx 3\%$). Jei paviršiaus nelygumai yra palyginamo dydžio arba didesni nei krintančios šviesos bangos ilgis, vyksta difuzinis atspindys. Pagal paprastą atspindžio dėsnį, krintantis ir atspindėtas spinduliai ir atspindintis paviršius yra vienoje plokštumoje, o atspindžio kampas yra lygus kritimo kampui. Taigi atspindys priklauso nuo šviesos kritimo kampo: kuo jis didesnis, tuo didesnis atspindys nuo paviršiaus. Daugiausia šviesos prasiskverbs į audinį, jei ji kris 90° kampu, t.y. šviesos spindulys bus statmenas audinio paviršiui. Tačiau, kadangi visiems biologiniams audiniams yra būdingas difuzinis atspindys, aprašyti šviesos intensyvumo pasiskirstymą audinio paviršiuje nėra taip paprasta. Audinyje taip pat gali vykti ir vidinis atspindys, kai šviesa audinio viduje atspindima nuo paviršiaus atgal į audinį, ar atvirkščiai. Šviesą audinyje gali sugerti ar išsklaidyti įvairūs ląstelių ir tarpląstelinės terpės struktūrų elementai.

Spinduliuotės sklidimas į optiškai tankų audinį ir iš jo pirmiausia priklauso nuo santykinio sugerties ir sklaidos indėlio. Labiausiai pastebimas reiškinys biologiniuose audiniuose yra šviesos sklaida. Kai elektromagnetinė banga susiduria su kliūtimi (dalele), ji sklaidančioje terpėje indukuoja dipolį, kuris osciliuoja tokiu pat dažniu kaip ir banga. Tokio indukuoto dipolio virpesiai ir sukelia išsklaidytą bangą. Sklaidos vyksmai audiniuose yra sudėtingi ir įvairūs, todėl gali vykti elastingė ir neelastingė sklaida. Elastinės (Reilėjaus ir Mie)

sklaidos atveju krintančių ir išsklaidytų fotonų dažnis vienodas, neelastinės sklaidos atveju išsklaidytų ir krintančių fotonų dažniai skiriasi. Šviesos banga, susidūrusi su sklaidančia dalele, difraguoja ir keičia sklaidimo kryptį. Kai dalelės dydis apytikriai lygus $0,1-0,2 \lambda$, difragavusi šviesa maždaug tolygiai sklinda visomis kryptimis. Jeigu dalelės didesnės, šviesos difrakcija aprašoma sudėtingiau. Tada difragavusios šviesos sklaidimas įvairiomis kryptimis priklauso nuo dalelių dydžio, formos ir lūžio rodiklio. Kai sklaidančios dalelės yra mažesnės už krintančios bangos ilgį, vyksta Reilėjaus sklaida ir šviesa išsklaidoma į priekį ir atgal vienodai. Reilėjaus sklaidos priklauso nuo bangos ilgio proporcingai λ^{-4} , taigi trumpesnės bangos sklaidomos stipriau. Mie sklaida vyksta, kai sklaidančių dalelių dydis artimas šviesos bangos ilgiui. Ji pasižymi silpnesne nei Reilėjaus sklaidos priklausomybe nuo bangos ilgio λ^{-x} (biologiniams audiniams $x \sim 1$)^{51,52}, o spinduliuotė sklaidoma nedideliais kampais.

Sklaidą audinyje apibūdinti yra gana sudėtinga, nes ji priklauso ir nuo audinio morfologijos, ir nuo ląstelių formos, ir nuo jose esančių organelių. Audinio drumstumą, jo nepralaidumą šviesai sąlygoja sudėtinė sklaida nuo heterogeninių audinio komponentų: makromolekulių, ląstelių organelių, citozolio ir ląstelės membranos, mikroskopinių vandens sancaupų (1 pav.), kurių dydis, forma ir šviesos lūžio rodikliai (n) yra skirtingi. Vanduo yra vienas iš svarbiausių audinių sandaros elementų, kurio lūžio rodiklis ($n = 1,33$) yra mažiausias tarp skysčių ir minkštųjų audinių junginių. Tuo tarpu melanino dalelių, randamų odos epidermyje, lūžio rodiklis yra pats didžiausias tarp aptinkamų minkštuosiuose audiniuose ($n = 1,6$). Citoplazmos ir tarpląsteliniai skysčiai $n = 1,35-1,38$. Taip pat yra išmatuoti vidutiniai visų audinių lūžio rodikliai, kurie pasiskirstę 1,36-1,46 intervale: riebalinių audinių $n = 1,455$, inkstų – 1,418, raumens – 1,41, kraujo ir blužnies – 1,40, plaučių – 1,38, kepenų – 1,368^{53,54}. Šie lūžio rodiklių skirtumai šiek tiek keičia šviesos sklaidimo audiniu kryptis, ir nors šie pokyčiai yra maži, jų visuma šviesai sklindant audiniu sukelia pastebimus vyksmus. Taip pat yra stebimas lūžio

rodiklio sumažėjimas mažesnės energijos bangos ilgių srityje, pavyzdžiui, galvijų raumenų lūžio rodiklis 390-700 nm bangų ilgio intervale kinta nuo 1,42 iki 1,39.



1 pav. Ląstelių struktūros sklaidančios šviesą audinyje. Pačioms organelėms būdinga Mie sklaida, o organoidams ir ląstelių membranai būdinga Reilėjaus sklaida [adaptuota iš www.sciencewriters.ca]

Pastebėta, kad daugelyje biologinių audinių šviesa sklaidoma nedideliais kampais, taigi atrodytų, kad audiniuose vyrauja Mie sklaida, tačiau nustatyta sklaidos kampo priklausomybė nuo bangos ilgio yra kur kas artimesnė Reilėjaus sklaidai. Audinyje Reilėjaus sklaida būdinga ląstelių membranoms ir ląstelių organelių struktūriniais elementais bei tarpląsteliniams komponentams, pvz., kaip kolageno fibrilėms. Mie sklaidą sukelia ląstelės mitochondrijos, branduoliai ir tarpląsteliniai dariniai, pvz., kolageno skaidulos, kurių dydis yra nuo 1 iki 12 μm . Mitochondrijos, kurių dydis 0,5-2 μm , yra pagrindinės šviesą sklaidančios organelės. Kraujyje šviesą labiausiai sklaido eritrocitai, kurie yra apie 2 μm storio ir 7-9 μm skersmens. Šie dydžiai yra palyginami su dažniausiai biomediciniuose taikomu 0,5-1 μm šviesos bangos ilgių diapazonu⁵⁵. Dažniausiai į audinį patekusi šviesa yra sklaidoma visų

minėtų biologinių elementų, kurių dydžiai labai įvairūs, todėl audiniuose vyksta tiek Reilėjaus, tiek Mie sklaida.

Sklaidančiai aplinkai apibūdinti yra naudojamas sklaidos koeficientas μ_s [cm^{-1}], kurio atvirkščias dydis nusako laisvą fotono kelią iki išsklaidymo. Sklaidos koeficientas ir sklaidos anizotropijos koeficientas g kinta keičiantis bangos ilgiui: regimosios šviesos srityje ir artimųjų infraraudonųjų bangų spektro srityje sklaidos koeficientas mažėja didėjant bangos ilgiui, tuo tarpu anizotropija lieka beveik pastovi. Kadangi fotonai išsklaidomi įvairiomis kryptimis (vyksta anizotropinė sklaida), dažniausiai naudojamas supaprastintas sklaidos koeficientas μ'_s :

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g),$$

čia $g = \langle \cos(\theta) \rangle$ – anizotropijos koeficientas, kuris apytiksliai lygus sklaidos kampo kosinusui. Kai $g = 1$, sklaida vyksta į priekį (spinduliuotės sklaidimo kryptimi), kai $g = 0$, sklaida gali vykti bet kokiais kampais (izotropinė sklaida). Audiniuose g kinta nuo 0,70 iki 0,99, ir tai reiškia, kad sklaida dažniausiai vyksta 8° – 45° kampais. Biologinių audinių sklaidos koeficientų μ_s vertės, išmatuotos daugeliui skirtingų bangos ilgių, paprastai siekia $10 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ ⁵⁶⁻⁵⁹.

Biologinio audinio suminis sugerties koeficientas yra spektriškai sudėtingas, daugybės atskirų chromoforų ekstinkcijos spektrai yra kompleksiniai, kurie kinta kartu su fiziologinėmis ar metabolinėmis audinio savybėmis. Biomediciniuose taikymuose šviesos sugertis yra svarbi diagnostiniais ir terapiniais tikslais. Sugerties atveju, kai elektromagnetinė banga susiduria su kliūtimi (dalele), ši įgauna perteklinės energijos, kurią gali atiduoti aplinkai šilumos pavidalu arba išspinduliuoti elektromagnetinę bangą. Fluorescencijos bangos ilgis bus didesnis nei sugertos bangos ir būdingas tam tikrai molekulei, todėl jų fluorescencijos spektrai yra kaip „piršto antspaudai“, kurie gali būti panaudoti diagnostikoje. Terapijoje šviesos sugertis yra pirminis veiksnys reikalingas sukelti fotofizikinius, fotocheminius ir fotobiologinius vyksmus. Šios perteklinės energijos migracijos ir relaksacijos kelių tyrimai optiniais ar

kitais metodais suteikia informacijos apie biomolekulių ir biosistemų struktūrą bei juose vykstančius procesus.

Vienalytėse sistemose šviesos sugertį aprašo Bugerio dėsnis:

$$I = I_0 e^{-\mu_{sg} l};$$

čia I_0 yra kritusios, o I – praėjusios šviesos intensyvumas, l – optinio kelio ilgis. Dydis μ_{sg} yra vadinamas sugerties koeficientu. Skaičiavimuose patogiau naudoti dešimtainius logaritmus, todėl dėsnį galima parašyti:

$$I = I_0 10^{-\epsilon c l}.$$

Šioje formulėje ϵ vadinamas moliniu ekstinkcijos koeficientu arba tiesiog ekstinkcija. Medžiagos tirpalo koncentracija c išreiškiama $[\text{mol/l}] = [\text{M}]$, optinio kelio ilgis l – $[\text{cm}]$, todėl ekstinkcijos koeficiento matavimo vienetas yra $[\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$. Dydis $T = I/I_0$ vadinamas bandinio pralaidumu, o $A = \epsilon c l$ – bandinio optiniu tankiu (Bero dėsnis):

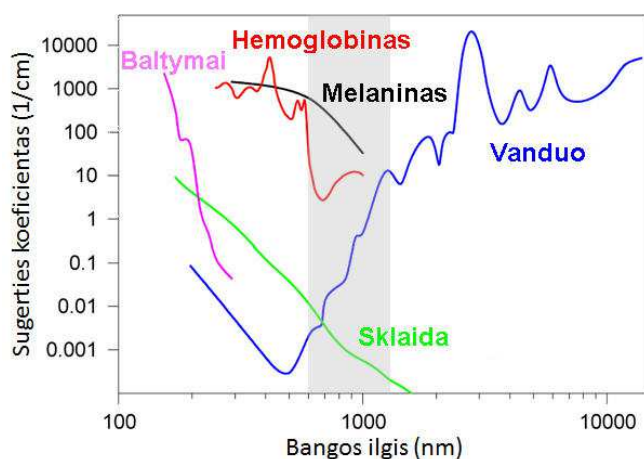
$$\lg(1/T) = \epsilon c l = A \text{ arba } T = 10^{-A}.$$

Biologinio audinio sugerties koeficientas yra visų audinių sudarančių šviesą sugeriančių chromoforų suma:

$$\mu_{sg} = \ln 10 \sum_i c_i \epsilon_i.$$

Yra daugybė endogeninių ir egzogeninių chromoforų, kurie gali paveikti biologinio audinio μ_{sg} . Visų jų vidinė molekulinė sandara yra skirtinga, todėl jų sugerties spektrai taip pat yra skirtingi. Kadangi įvairių chromoforų kiekis ir pasiskirstymas audinio tūryje yra labai netolygus, audinys sugeria įvairią spinduliuotę ir jo sugerties spektras yra platus, be aiškios struktūros. Pagrindiniai audinio sugertį nulemiantys chromoforai yra kraujas ir vanduo, be jų didelę įtaką daro melanino, baltymų, deoksiribonukleininės rūgšties (DNR), kolageno, elastino, redukuoto nikotinamid-adenin-dinukleotido (NADH) ir jo oksiduotos formos (NAD⁺), porfirinų, riebalų sugertis⁵⁸. Kiti chromoforai daro

mažą įtaką audinio sugerčiai, tačiau jie yra svarbūs atliekant spektroskopinius tyrimus.. Regimojoje spektro srityje (400 – 780 nm) audinio sugertį labiausiai nulemia hemoglobino ir melanino sugertis. Melanino sugerties spektro maksimumas yra ties 355 nm ir ji mažėja didėjant bangos ilgiui⁶⁰. Hemoglobino spektras yra skirtingas redukuotoje (Hb) ir prisotintoje deguonimi (HbO₂) būsenoje. Nors Hb ir HbO₂ sugeria ir UV srityje, regimojoje spektro srityje jų sugertis dominuoja lyginant su kitais audinyje esančiais chromoforais. Pagrindinės Hb sugerties spektro smailės yra atitinkamai ties 433 nm, 556 nm ir nežymi smailė ties 750 nm bangos ilgiu, o HbO₂ – ties 410 nm, 540 nm ir 575 nm^{58,61}. Įprastai oksiduoto ir redukuoto hemoglobino koncentracijų santykis yra pastovus, tačiau jis gali kisti keičiantis terpės pH, temperatūrai ir kitoms sąlygoms. Vandens sugertis regimojoje spektro srityje yra nežymi⁶², tačiau infraraudonosios (IR) spinduliuotės spektrinėje srityje vanduo yra pagrindinis sugertį audinyje sąlygojantis chromoforas. Vandens sugerties spektro smailės yra ties 970 nm, 1430 nm, 1925 nm⁶³. Minkštųjų audinių sugerties koeficiento vertės kinta nuo 0,1 iki 6000 cm⁻¹ mažėjant bangos ilgiui nuo IR iki UV, taigi optinis prasiskverbimo gylis (kuriame intensyvumas sumažėja e kartų) siekia nuo 10 cm iki 0,17 mm⁵⁵.



2 pav. Pagrindiniai endogeniniai chromoforai sugeriantys šviesą audinyje. Pilkai pažymėta sritis yra audinių „optinio skaidrumo langas“ (600-1300 nm)⁵⁵

Erdvinis šviesos sklaidimas apšviestame audinio tūryje priklauso ne tik nuo sklaidos ir sugerties koeficientų kiekviename audinio taške, bet taip pat ir nuo

šių savybių heterogeniškumo, paviršiaus būklės ir audinio formos bei tūrio. Kai sklaidos koeficientas mažas, krintančios spinduliuotės pluošto forma audinyje išlieka neišplitusi ir difuzinio atspindžio poveikis, t.y. audinyje išsklaidytas bei atgal iš audinio išspinduliuotas šviesos kiekis, yra mažas. Tokia situacija yra minkštuosiuose audiniuose ultravioletinių ir vidurinių bei tolimų infraraudonųjų spindulių spektro srityse. Tačiau, kai sklaida dominuoja sugerties atžvilgiu, spinduliuotės pluoštas stipriai plečiasi audinyje, o difuzinis atspindys yra didelis. Minkštuosiuose audiniuose ši situacija būdinga šviesai 600 nm iki 1300 nm bangų ilgių intervale, taip vadinamajame audinių „optinio skaidrumo lange“ (2 pav.), kur audinių pigmentų sugertis smarkiai susilpnėja palyginus su trumpesnių bangų sritimi, o vandens sugertis maža palyginus su ilgesnių bangų sritimi. Tokios sąlygos leidžia pasiekti didesnę spinduliuotės prasiskverbimo gylį, todėl ši sritis tinkamiausia giluminei audinių fluorescencinei diagnostikai ar fotodinaminei terapijai.

Kalbant apie audinių optines savybes reikia pabrėžti, kad ląstelių *in vitro* ir audinių *ex vivo* optinės savybės skiriasi nuo registruojamų *in vivo*^{64,65}. Biologinius audinius džiovinant, laikant fiziologiniame tirpale ar šaldant pakinta jų biocheminės, morfologinės ir metabolinės savybės, o tai daro įtaką spinduliuotės sugerčiai, sklaidai ir emisijai. Todėl tik *in vivo* atliktų tyrimų rezultatai atspindi tikrąsias audinio optines savybes.

2.2. Fluorescencinė diagnostika

Šviesos ir biologinio audinio sąveika sukelia visą seką fizikinių, cheminių, terminių ir mechaninių vyksmų, kurie gali būti pritaikomi diagnostikos ir gydymo tikslais. Šviesos sukelti vyksmai prasideda, kai biologinio objekto pigmentai arba specialiai į organizmą įterptos jautrumą šviesai padidinančios medžiagos (fotosensibilizatoriai) sugeria šviesos fotoną. Audinio endogeniniai fluoroforai intensyviausiai sugeria ultravioletinės ir mėlynos spektro srities šviesą, o fluorescuoja dažniausiai ultravioletinėje ir regimoje spektro srityje. Kadangi atskiri audinyje esantys endogeniniai ar įvesti egzogeniniai fluoroforai turi charakteringus žadinimo ir emisijos spektrus, skirtingi žadinančios spinduliuotės bangos ilgiai sužadins skirtingus fluoroforus. Todėl tinkamas žadinančios spinduliuotės bangos ilgio parinkimas yra ypatingai svarbus fluorescencinės diagnostikos rezultatų interpretacijai. Sugėrusi fotoną molekulė sužadinama į aukštesnį energijos lygmenį, iš kurio nespindulinės relaksacijos būdu grįžta į žemiausią sužadintąjį lygmenį. Iš žemiausio sužadinto energijos lygmens molekulėms grįžtant į pagrindinį lygmenį nespinduliniu būdu, vyksta šilumos išsiskyrimas, kuris panaudojamas terminėje lazerinėje terapijoje ir chirurgijoje. Kai molekulė į pagrindinį energinį lygmenį grįžta išspinduliuodama energijos perteklių į aplinką, vyksta fluorescencijos reiškinys, kuriuo pagrįstos įvairios medicininės diagnostikos metodikos.

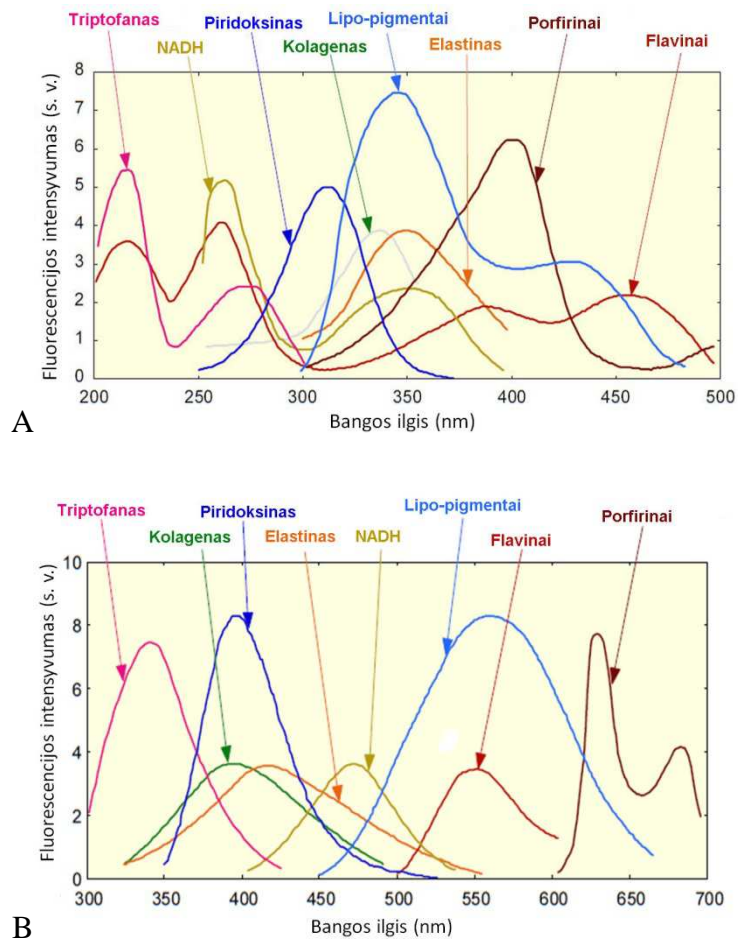
Dažniausiai taikomi nesensibilizuotos ir sensibilizuotos fluorescencinės diagnostikos metodai. Nesensibilizuotoji fluorescencinė diagnostika pagrįsta audinių endogeninių fluoroforų optiniu sužadinimu ir jų fluorescencijos stebėjimu. Endogeninių audinio fluoroforų, esančių ląstelėse ir tarpląstelinėje terpėje, skleidžiama fluorescencija vadinama savitąja fluorescencija. Sensibilizuotai fluorescencinei diagnostikai gali būti panaudoti iš išorės įterpti egzogeniniai arba organizme sintetinami endogeniniai fotosensibilizatoriai.

2.2.1. Savitoji audinių fluorescencinė diagnostika

Biologiniai audiniai silpnai fluorescuoja, tačiau juos apšvietus reikiamo bangos ilgio šviesa ir matuojant spektrus jautriais spektriniais prietaisais, galima užregistuoti specifinį įvairių audinių švytėjimą. Nors audinių savitosios fluorescencijos spektrai nėra išraiškingi ir juos gana sunku interpretuoti, tačiau jais remiantis gana dažnai galima apibūdinti biologinės sistemos fiziologinę būseną, aptikti, ar ji atitinka normalią būseną, nustatyti mikroskopinius piktybinius audinių pakitimus nepakenkiant aplinkiniams audiniams. Optiniai diagnostiniai metodai pagrįsti tuo, kad ligos pažeistų audinių spektrai skiriasi nuo sveikų audinių spektrų^{3,8,66,67}. Norint tinkamiau panaudoti savitąją fluorescenciją grįstos diagnostikos galimybes ir geriau suprasti jos ribotumus, reikia žinoti patologijos sukeltų fluorescencijos pokyčių biochemines ir morfologines ištakas. Tam reikia nustatyti sveikų ir pažeistų audinių fluorescencijos signalų šaltinius. Navikų ar kitokių pažaidų audiniuose sukelti biocheminiai ir morfologiniai pokyčiai keičia ir spektrines audinių savybes, tačiau biologinių ir fizikinių pokyčių sąryšis nėra iki galo suprastas. Fluoroforų pasiskirstymas audinio paviršiuje yra netolygus ir skiriasi įvairiame gylyje, todėl fluorescencijos spektrai, išmatuoti nuo audinio paviršiaus, bus kitokie negu iš gilesnių sluoksnių. Be to, fluoroforų fluorescencijos šviesa yra sklaidoma kitų audinio komponentų, dalį jos gali sugerti kiti chromoforai. Todėl audinio paviršiuje matuojamos fluorescencijos signalas nebus gryna fluoroforo fluorescencija, o spektre atsispindės ir šviesą sugeriančių, ir sklaidančių dalelių indėlis.

Nors audinius sudaro sudėtingas įvairiausių molekulių mišinys, tačiau už audinių fluorescenciją atsakingi keli pagrindiniai fluoroforai, kurių fluorescencijos spektrų juostos yra plačios ir viena kitą dengiančios, todėl tiksliai identifikuoti šiuos fluoroforus yra sunku^{2,68-70}. Svarbiausi audiniuose

pasitaikantys fluoroforai yra triptofanas, kolagenas ir elastinas, redukuotas nikotinamid-adenin-dinukleotidas (NADH) ir jo fosfatas (NADPH), flavinai ir flavoproteinai, β karotenas ir porfirinai. Endogeninių fluoroforų sugerties ir emisijos spektrai pateikti 3 pav. Pagrindiniai biologinių audinių endogeniniai fluoroforai yra kolagenas ir elastinas, kurie aptinkami jungiamajame audinyje⁷¹. Jungiamajame audinyje kolagenas fluorescuoja 330 – 510 nm spektrinėje srityje (smailė ties 390 nm), o elastinas – 330 – 550 nm srityje (smailė ties 410 nm)⁷², tačiau skirtingo tipo audiniuose jų fluorescencijos smailės gali kisti⁷³. Šių dviejų fluoroforų fluorescencijos kvantinis našumas, palyginus su kitais endogeniniais fluoroforais, yra didžiausias, todėl didžiausias ir įnašas į bendrą audinio fluorescencijos spektrą⁷⁴. Skirtingų tipų audiniams būdingas savitas kolageno kiekis bei tipas, kuris organizmui senstant ar dėl kitų įvairių išorinių ir vidinių organizmo procesų mažėja⁷⁵. Identifikuotos kelios dešimtys skirtingų kolageno tipų, kurių dominavimas skirtingo tipo audiniuose yra skirtingas⁷⁶.



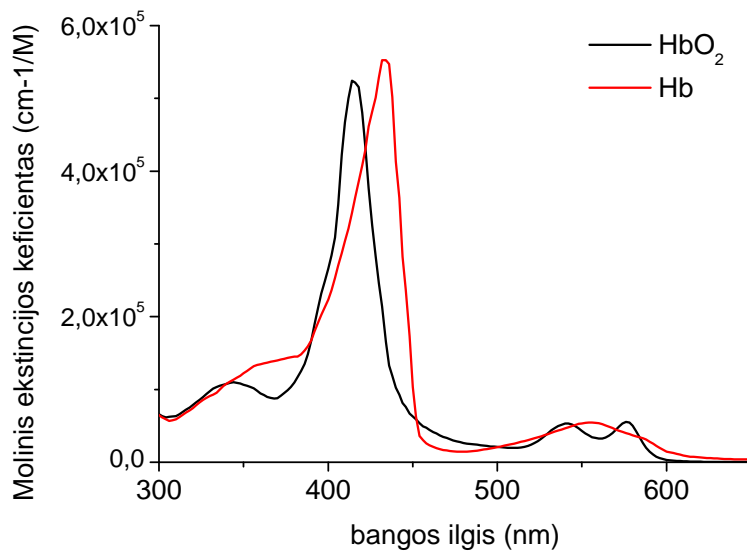
3 pav. Pagrindinių audinio fluoroforų fluorescencijos žadinimo (A) ir emisijos spektrai (B)³

Kiti fluorescencinei diagnostikai svarbūs endogeniniai fluoroforai yra su ląstelės medžiagų apykaita susiję junginiai – tai redukuotas nikotinamid-adenin-dinukleotidas (NADH) arba jo fosfatas (NADPH) ir flavinai, aptinkami mitochondriose ir citoplazmoje^{77,78}. NADH fluorescencijos smailė *in vivo* yra ties 500 nm, flavinų – ties 550 nm. Keičiantis ląstelių metaboliniam aktyvumui ar vykstant mitochondrijų pokyčiams, susijusiems su įvairiais audinių patologiniais pakitimais ir kitomis ligomis, šių fluoroforų fluorescencija kinta ir gali būti panaudota fluorescencinei diagnostikai. Sveikų ir navikinių audinių pH skirtingas, dėl to gali kisti redukuotos (NADH) ir oksiduotos (NAD⁺) formų santykis, todėl daugelio navikinių ir ikinavikinių darinių savoji fluorescencija mėlynoje spektro srityje yra silpnesnė nei sveiko audinio^{79,80}.

Trumpiausio bangos ilgio (180 – 400 nm) spinduliuotę biologiniame audinyje sugeria baltymai, DNR ir melaninas. Trumpiausių bangos ilgių srityje dominuoja peptidinės jungties sugertis, kurios sugerties spektro maksimumas yra ties 190 nm. Ilgesnių bangos ilgių srityje DNR, aromatinių aminorūgščių liekanos ir melaninas yra pagrindiniai spinduliuotę sugeriantys chromoforai. DNR sugeria trumpesnę nei 300 nm bangos ilgio spinduliuotę⁸¹. Aromatinės aminorūgštys, pvz., triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas, taip pat turi plačias sugerties juostas su smailėmis ties 250 – 280 nm⁸². Jei žadinimo bangos ilgis didesnis nei 295 nm, sužadinas tik triptofanas. Triptofanas turi didžiausią ekstinkcijos koeficientą ir plačią sugerties juostą, todėl audiniuose įprastai stebima tik triptofano fluorescencija, nes sužadintas tirozinas ir fenilalaninas energiją perduoda triptofanui. Baltymų fluorescencija įprastai yra sužadinama 280 nm ar ilgesnių bangos ilgių spinduliuote, o fluorescencija stebima 300 – 430 nm srityje¹.

Raudonojoje, 600-700 nm spektro srityje fluorescuoja įvairūs porfirinai. 1924 metais raudonoji navikinių audinių fluorescencija taip pat buvo priskirta porfirinams^{83,84}. Natūralūs porfirinai, pvz., protoporfirinas, hematoporfirinas, koproporfirinas ar uroporfirinas yra tarpiniai hemoglobino, mioglobino ar citochromo biosintezės ciklo produktai⁸⁵. Sutrikdžius hemo biosintezės ciklą, dėl tam tikrų fermentų, atsakingų už ciklo reguliavimą, veikos sutrikimų, gali ženkliai padidėti porfirinų kiekis audiniuose.

Dažnai audinių savosios fluorescencijos spektruose yra stebimi ryškūs pokyčiai 500-575 nm spektriniame ruože. Buvo nustatyta, kad šiuos spektrų pokyčius nulemia hemoglobino sugertis (fluorescencijos reabsorbicija) (4 pav.). Kadangi audinių vaskuliarizacija yra skirtinga skirtinguose audiniuose bei esant įvairioms patologijoms ar ligoms, kraujo sugertis apsunkina savosios fluorescencijos spektrų analizę.



4 pav. Oksiduoto (juoda kreivė) ir neoksiduoto (raudona kreivė) hemoglobino sugerties spektrai

Savosios audinių fluorescencijos metodai medicininėje praktikoje įprastai taikomi kaip papildoma priemonė ankstyvajai diagnostikai greta kitų diagnostikos būdų. Atlikti moksliniai tyrimai parodė, kad savosios fluorescencijos metodas yra perspektyvus, ir palyginti nesudėtingai atliekama diagnostinė procedūra. Tačiau jos taikymas yra komplikuoatas dėl daugybės veiksnių, kaip fluoroforų koncentracijos, jų pasiskirstymo audinyje, spektro, audinių morfologijos, biocheminės ir biofizikinės audinio aplinkos bei vaskuliarizacijos pokyčių, į kuriuos reikia atsižvelgti norint teisingai interpretuoti gautus duomenis. Nors šis metodas suteikia daug diagnostikai svarbios informacijos, tačiau dažnai neužtikrina pakankamo fluorescencijos kontrasto tarp pažeistų ir sveikų audinio savosios fluorescencijos. Todėl kontrasto padidinimui į organizmą gali būti įvedami egzogeniniai žymekliai ar susintetinti endogeniniai fluoroforai, kurie selektyviai kaupiasi tikslinėse vietose.

2.2.2. Sensibilizuota audinių fluorescencinė diagnostika

Norint pasiekti geresnį sveikų ir pažeistų audinių fluorescencijos kontrastą, į organizmą yra įterpiamos egzogeninės fluorescuojančios medžiagos, geriau besikaupiančios pažeistuose audiniuose. Taigi selektyvus fotosensibilizatorių kaupimasis navikiniuose audiniuose gali būti panaudotas ne tik terapijai, bet ir fluorescencinei diagnostikai (FD), kurios metu jautriais detekcijos prietaisais registruojama specifinė konkrečių sensibilizatorių fluorescencija³. Dažniausiai tai tie patys fotosensibilizatoriai, kurie naudojami fotodinaminėje terapijoje (FDT). Fotosensibilizatoriai – tai junginiai, padidinantys kitų medžiagų jautrumą šviesai. Biologiniuose objektuose fotosensibilizatoriai ląstelėms ar jų organelėms suteikia jautrumą šviesai. Sensibilizatoriais dažniausiai būna heterociklinės struktūros medžiagos, kurios sugertą šviesos fotonų energiją perduoda kitoms molekulėms. Idealus fotosensibilizatorius fluorescencinei diagnostikai turėtų turėti tokias savybes:

- chemiškai grynas;
- gerai tirpstantis fiziologiškai tinkamuose tirpaluose;
- turėti didelį ekstinkcijos koeficientą ties žadinimo bangos ilgiu;
- turėti didelį fluorescencijos kvantinį našumą;
- turėti mažą singuletinio deguonies generavimo našumą;
- turėti kuo didesnę skirtumą tarp žadinimo ir fluorescencijos bangų ilgių;
- turėti kuo mažesnę fluorescencijos spektro persidengimą su audinių savitosios fluorescencijos spektru;
- būti fotostabilus;
- selektyviai kauptis navikinėse ląstelėse;
- greitai pasišalinti iš serumo ir sveikų audinių;
- sukelti minimalų toksinį ir fototoksinį poveikį organizmui.
-

Fluorescencinės diagnostikos atveju sensibilizuotas poveikis, kaip kad aktyvių deguonies formų generavimas ir jų sukeltos citotoksinės pažeidimai, yra

nepageidaujamas. Tada naudojamos daug mažesnės sensibilizatorių ir šviesos dozės arba parenkami tokie sensibilizatoriai, kurių mažas tripletinės būsenos ir singletinio deguonies generacijos kvantinis našumas.

Porfirinai – vieni plačiausiai taikomų fotodinaminėje navikų terapijoje egzogeninių junginių. Porfirinai pasižymi tiek rūgštinėmis, tiek bazinėmis savybėmis ir, priklausomai nuo terpės pH, azoto atomai ir pakaitų funkcinės grupės gali protonuotis arba jonizuotis⁸⁶. Porfirinų energines būsenas bei struktūrą geriausiai atspindi jų sugerties ir fluorescencijos spektrai. FDT naudojamų porfirinų spektras yra *etio* tipo⁸⁷. Šiems spektrams būdingas sugerties juostų intensyvumo mažėjimas didėjant bangos ilgiui. Tokie yra visų gamtinių porfirinų (proto-, kopro-, uro-, deuterio-, hemato-, piroporfirinų) neutralių vandeninių tirpalų sugerties spektrai. Hematoporfirino (Hp), hematoporfirino darinio (HpD), hematoporfirino diacetato (Hp-Diac), hematoporfirino dimetilo eterio (DMHp), Fotosano (FS) ir Fotofrino (FF) sudėtyje esančių porfirinų spektrai yra *etio* tipo. Pirmieji tyrimai *in vivo* pademonstravę selektyvų Hp kaupimąsi buvo atlikti dar 1942 metais, paskatino ir tolimesnius selektyvaus porfirinų kaupimosi audinyje tyrimus^{88,89}. Po to, kai 1975 metais J. Kelly ir kt. pademonstravo selektyvų hematoporfirino darinio (HpD) kaupimąsi žmogaus šlapimo pūslės navike, FDT sukėlė didelį susidomėjimą medicinos bendruomenėje⁹⁰. Tačiau, nepaisant didelių mokslo ir medicinos bendruomenių pastangų, tik keletas fotosensibilizatorių ar jų pirmtakų yra patvirtinti gydyti onkologiniams ir kitokiems susirgimams (1 lentelė). Ribotas FDT taikymas medicinoje buvo siejamas su esminiais tradicinių fotosensibilizatorių trūkumais. Pirmosios kartos sensibilizatoriai, pvz., HpD pasižymėjo nehomogenine sudėtimi, mažu fluorescencijos kvantiniu našumu, nedideliu kaupimosi selektyvumu navikiniuose audiniuose, ilgai išliekančia odos sensibilizacija bei silpna sugertimi raudonojoje spektro srityje. Pirmos kartos fotosensibilizatorių trūkumai skatino antrosios kartos sensibilizatorių paieškas. Tad dauguma fluorescencinei diagnostikai naudojamų egzogeninių sensibilizatorių pirmiausia buvo kuriami

fotosensibilizuotai terapijai. Jiems būdinga intensyvi sugertis raudonojoje spektro srityje ir didelis tripletinės būsenos užpildos kvantinis našumas, tačiau jų selektyvumas navikiniam audiniams dažniausiai nėra didelis. Tokios savybės nėra optimalios, nes labai svarbu, kad fluoroforai būtų pakankamai selektyvūs, t.y. geriau kauptųsi navikiniuose dariniuose negu sveikuose audiniuose. Fluorescencijos signalas turėtų būti stiprus ir ženkliai viršyti savitosios fluorescencijos intensyvumą. Siekiant išvengti pirmos kartos sensibilizatoriams būdingų trūkumų, antrosios kartos sensibilizatoriai pirmiausia yra homogeninės, žinomos struktūros medžiagos. Ilgesnių bangų diapazone fluorescuojantys sensibilizatoriai, pavyzdžiui ftalocianinai, fluorescencinei diagnostikai tinkamesni, nes jų fluorescencijos spektrai mažiau persidengia su audinių savitosios fluorescencijos spektrais. Nemažai klinikinių tyrimų atliekamų su antros ir pirmos kartos sensibilizatoriais, pasižyminčiais gera sugertimi audinių optinio skaidrumo srityje, yra pateikiami 2 lentelėje.

1 lentelė. FDT ir FD patvirtinti fotosensibilizatoriai ir porfirinų pirmtakai ^{91,92}

	Prekinis pavadinimas	Gamintojas	λ (nm)	Taikymo sritis (šalis, metai)
Dihematoporfirino eteris	Photofrin	Axcan Pharma http://www.axcan.com http://www.photofrin.com	632	Paviršinių šlapimo pūslės, endobronchinių, stemplės, skrandžio, gimdos kaklelio navikams (>120 šalių, 1993)
Benzoporfirino darinio mono rūgšties žiedas A (BPD-MA)	Visudyne	QLT Inc. & Novartis Ophthalmics http://www.qltinc.com/Qtinc/main/mainhome.cfm http://www.visudyne.com	690	Gyslainės neovaskuliarizacijai dėl su amžiumi susijusios antrinės geltonosios dėmės drėgnosios degeneracijos, patologinei trumparegystei arba numatomi akių histoplazmozei (>70 šalių, 2001)
Tetra(meta-hidroksifenil)chlorinas (mTHPC)	Foscan	Biotech AG http://www.biotech.com	652	Galvos ir kaklo navikams (ES, Norvegija, Islandija, 2001)
5-aminolevulininė rūgštis (ALA)	Levulan	DUSA Pharmaceuticals, Inc. http://www.dusapharma.com http://www.levulanpdt.com	~400	Veido ir skalpo aktinei keratozei (JAV, 1999)
5-aminolevulininė rūgštis (ALA)	Giolan	Medac GmbH http://www.medac.de	375 – 400	Intraoperacinėje PD ir likutinei piktybinei gliomai (ES, 2007)
Metilo aminolevulinatas	Metvix	PhotoCure ASA http://www.photocure.com	632	Aktinei keratozei, pamatinių ląstelių karcinomai (ES, Australija, Naujoji Zelandija, 2001)
Heksilo aminolevulinatas	Hexvix	PhotoCure ASA http://www.photocure.com	370 - 400	Šlapimo pūslės nevikų fluorescencinei diagnostikai (Švedija, 2004; ES 2005)

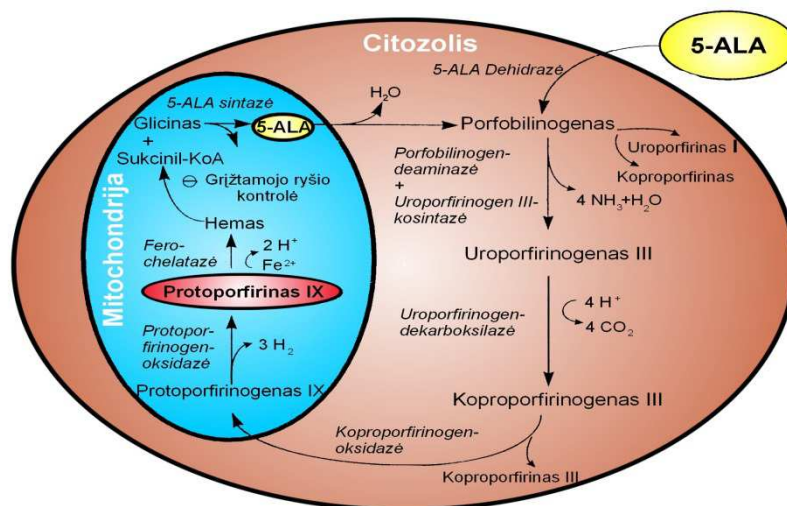
2 lentelė. Fotosensibilizatoriai ir porfirinų prekursoriai naudojami FDT ir FD esantys klinikinių tyrimų stadijoje

	Prekinis pavadinimas	Gamintojas	λ (nm)	Taikymo sritis
5-aminolevulininė rūgštis (ALA)		Shanghai Fudan-Zhangjiang Bio-Pharmaceutical Co., Ltd	630	Šlaplės smailiagalėms kondilomoms
5-aminolevulininė rūgštis (ALA)		Cosmo Oil Co., Ltd	630	Aknei
Paladžio bakteriofeoforbidas	Tookad	Negma-Lerads Laboratories, Toussus Le Nobel	762	Prostatos vėžiui
Alavo etil-etiopurpurinas	Purlytin	Miravant Medical Technologies	660	Gyslainės neovaskuliarizacijai dėl su amžiumi susijusios antrinės geltonosios dėmės drėgnosios degeneracijos, AIDS, Prostatos vėžiui
Liutecio teksafirinas (Lutetex)	LUTRIN ANTRIN	Pharmacyclics Inc.	732	Vietiška pasikartojantiems krūties navikams, periferinių arterijų angioplastikai
2-(1-heksiloksietil)-2-divinil pirofeoforbidas-a	Photochlor	Roswell Park Cancer Institute	660	Bareto stemplei, stemplės ir plaučių navikams, odos pamatinių ląstelių karcinomai
Boronuotas porfirinas	BOPP	Pacific Pharmaceuticals Inc.	628	Smegenų navikams
Mono-N-asparilchlorinas e6 (Npe6)	Talaporfin	Light Sciences Corporation, Inc.	664	Galvos, kaklo, plaučių, prostatos, tiesiosios žarnos navikams
Chlorinas e6 konjuguotas su polivinilpirolidinu	Fotolon	Apocare Pharma GmbH	665	Bovenų ligai
Hipericinas	VIMRxyn	VIMRX Pharmaceuticals Inc.	600-1000	Glioblastomai, odos T ląstelių limfomai, Kaposi sarkomai, karpoms ir psoriazei
Hematoporfirino darinys	Hiporfin	Chongqing Huading Modern Biopharmaceutics Co., Ltd (China)	630	Odos, plaučių, šlapimo pūslės, kepenų, virškinimo trakto ir kitiems navikams
Aluminio ftalocianino tetrasulfonatas (AIPcS)	Photosense	State Research Center (Russia)	675	Odos, krūtinės, plaučių, virškinimo trakto ir kitiems navikams

Kadangi nei vienas fotosensibilizatorius nepasižymi idealiomis savybėmis, buvo pasiūlyta į organizmą įvesti ne patį fotosensibilizatorių, o jo sintezę

indukuojantį pirmtaką . Pats pirmtakas nėra aktyvus junginys, tačiau po įvedimo į organizmą jis metaboliškai paverčiamas farmakologiškai aktyviu junginiu⁹³. 1990 metais buvo pademonstruota, kad tokiu pirmtaku FDT galėtų būti 5-aminolevulininė rūgštis (ALA)⁹⁴. Nuo tada navikinių ir kitų ligų FDT ir FD atliekamos egzogeniškai skatinant PpIX sintezę ląstelėse tapo vienomis sparčiausiai besivystančių šios krypties tyrimų sričių⁹⁵⁻⁹⁷. Daugelyje klinikinių ir ikiklinikinių tyrimų sisteminis ar vietinis ALA panaudojimas laikinai padidina PpIX koncentraciją tiriamuose audiniuose. Kadangi ALA indukuojamas PpIX yra natūrali organizmo hemo biosintezės ciklo medžiaga, jo, kaip sensibilizatoriaus, panaudojimas klinikinėje praktikoje patrauklesnis nei dirbtiniu būdu sintetinamų sensibilizatorių.

Pradiniu hemo biosintezės ciklo etapu iš glicino ir sukcinil-kofermento-A katalizuojant ALA-sintazei (ALAS) sintetinama aminolevulino rūgštis. Vėliau iš dviejų ALA molekulių susidaro porfobilinogenas (PBG) ir išsiskiria dvi vandens molekulės. Veikiant porfobilinogeno deaminazei (PBGD) ir uroporforinogeno sintazei keturios PBG molekulės kondensuojamos į uroporfirinogeną III. Toliau vyksta dekarboksilinimo ir oksidavimo reakcijų seka, kol geležies atomas įterpiamas į tetrapirolo žiedą. Hemo biosintezė vyksta mitochondrijose ir citozolyje. Mitochondrijoje susintetinta ALA pernešama į citozolį, ten susidaro PBG, uroporfirinogenas III, koproporfirinogenas III. Vėliau mitochondrijoje pastarojo junginio šoninės propioninės rūgšties liekanos, veikiamos koproporfirinogeno oksidazės, yra dekarboksilinamos ir oksiduojamos į vinilo grupes. Katalizuojant protoporfirinogeno oksidazei tetrapirolo žiedo metileno grupės oksiduojamos į metino grupes – susidaro protoporfirinas IX (5 pav.). Vienai PpIX molekulei pasigaminti reikia aštuonių ALA molekulių. Katalizuojant ferochelatazei į tetrapirilo struktūros centrą įterpiamas Fe(II) katijonas – susidaro hemo molekulė, kuri nefluorescuoja^{98,99}.



5 pav. Hemo biosintezės ciklas ir ALA metabolinė seka¹⁰⁰

Hemo sintezės ciklo greitis sureguliuotas taip, kad atitinka hemo pasiūalinimo iš sistemos greitį. Todėl normaliomis sąlygomis hemo poreikis kontroliuoja hemo, o kartu ir PpIX sintezės greitį. Diagnostikos, terapijos ar mokslinių tyrimų tikslais hemo biosintezės ciklas gali būti sutrikdytas organizmą paveikus egzogenine ALA. Paveikus pertekliniu ALA kiekiu, ne visas pasigaminęs PpIX paverčiamas hemu ir ląstelėse ima kauptis papildomas PpIX kiekis. Nors PpIX sintezė vykdoma beveik visose branduolį turinčiose ląstelėse, greitesnis ir didesnis PpIX kaupimasis buvo pademonstruotas ląstelėse pasižyminčiose didesniu aktyvumu. Pagrindinė tokio selektyvaus kaupimosi priežastis iki šiol nėra visiškai suprasta. Eksperimentiškai buvo įrodyta, kad kai kuriuose navikuose ferochelatazės aktyvumas yra sumažėjęs, o porfobilinogeno deaminazės – padidėjęs^{101,102}. Nepaisant to, aiškaus ryšio tarp aukšto PBGD ir / ar mažo ferochelatazės aktyvumo bei PpIX kaupimosi nepavyko rasti^{103,104}. – ALA pertekliui sutrikdžius hemo biosintezės ciklą iš uroporfirinogeno ir koproporfirinogeno gali susidaryti ir vandenyje tirpūs porfirinai – uroporfirinas ir koproporfirinas¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Nors ALA yra natūralus organizmo hemo biosintezės tarpinis produktas, jos perteklius gali sukelti įvairių šalutinių poveikių. Dėl savo fizikocheminių savybių egzogeninis ALA nėra idealus pirmtakas PpIX indukcijai. Nepaisant įvairiausių trūkumų, ALA

naudojimu grindžiama fluorescencinė diagnostika ir fotodinaminė terapija greitai paplito įvairiose medicinos srityse: urologijoje^{108,109}, pulmonologijoje¹¹⁰, smegenų chirurgijoje^{111,112}, dermatologijoje¹¹³⁻¹¹⁵, ginekologijoje^{116,117}.

2.3. ALA ir jos dariniai

Nepaisant gerų ir daug žadančių rezultatų, ALA taikymu paremtos FDT ir FD metodikos vis dar reikalauja reikšmingų patobulinimų. Kadangi fiziologinėmis sąlygomis 90 % ALA molekulių yra cviterjono būsenos (turi teigiamą amino ir neigiamą karboksilo grupes), jos prasiskverbimas per ląstelių membranas ir patekimas į gilesnes audinių sritis yra ribotas. Taigi, taikant ALA vietiškai, ji indukuoja PpIX tik paviršiniuose audinių sluoksniuose, ir porfirinų pasiskirstymas yra labai nehomogeniškas⁹⁶. Norint ALA-FDT taikyti gilesniuose sluoksniuose esančių ligos židinių gydymui, reikia ilgą laiką naudoti dideles ALA dozes, tuo didinant komplikacijų riziką^{118,119}. Naudojant ALA preparatą intraveniškai ar geriant, jis greitai pasišalina iš žmogaus organizmo. ALA kiekis plazmoje perpus sumažėja per 50 min. naudojant intraveniškai ir per 45 min. – geriant¹²⁰. Tyrimuose *in vivo* taikant ALA sistemiškai, ji pasižymėjo prastu selektyvumu ir sukėlė visų audinių, išskyrus raumeninio ir riebalinio audinio, odos ir smegenų, sensibilizaciją¹²¹. Be riboto biologinio prieinamumo, parenterinis ALA naudojimas žmonėms sukėlė didelių šalutinių poveikių, tokių kaip pykinimas, vėmimas, kepenų funkcijų sutrikimas, reikšmingas sistolinio ir diastolinio kraujo spaudimo sumažėjimas^{122,123}. Dėl šių ALA trūkumų norint ją taikyti terapijoje buvo atlikta daugybė tyrimų siekiant pagerinti jos selektyvumą ir sustiprinti PpIX sintezę¹²⁴⁻¹³⁷. Yra sukurta įvairių medžiagų ir metodikų, pagerinančių ALA farmakologines savybes, tačiau jos veiksmingos pasirodė tik eksperimentiniuose tyrimuose ir nepasiteisino kasdieninėje klinikinėje praktikoje.

Daugiausiai žadantys ir geriausi endogeninių porfirinų sintezės ir kaupimosi rezultatai buvo pasiekti pradėjus naudoti lipofiliškesnius ALA darinius. Yra parodyta, kad naudojant tokius ALA darinius vietoje ALA, galima pasiekti dvejomis eilėmis didesnę PpIX koncentraciją¹³⁸⁻¹⁴². Iš esmės ALA darinių pranašumas lyginant juos su ALA yra geresnė PpIX indukcija, geresnis prasiskverbimas į gilesnius audinių sluoksnius, homogeniškesnis indukuotų sensibilizatorių pasiskirstymas, trumpesnis inkubacijos laikas, taip pat reikalingos mažesnės dozės, mažesnis šalutinis poveikis ir geresnis stabilumas. Tačiau ne visais atvejais jie yra pranašesni už ALA ar kitus sensibilizatorius. Kol kas FDT ir FD taikymams yra patvirtinti du ALA dariniai (1 lentelė): 5-aminolevulininės rūgšties metilo esteris Metvix[®] ir heksilo esteris Hexvix[®]. Kad ALA ar jos dariniai sukeltų terapinį poveikį, pirmiausia šie pirmtakai turi su dideliu selektyvumu pasiekti taikinį, turi būti sukaupta pakankama jų koncentracija, ir hemo biosintezės ciklo metu jie būtų paversti fotoaktyviais sensibilizatoriais. Taigi pirmtakas pirmiausia turi palikti terpės (kremo ar kt.), kurioje yra, aplinką, vėliau būti sugertas, perneštas į gilesnius audinių sluoksnius, per ląstelės membraną patekti į ląstelės vidų, būti paverstas į PpIX, o jo perteklius greitai pasišalinti iš organizmo.

3 lentelė. ALA hidroklorido ir jos esterių fizikocheminės savybės ($\text{HCl} \cdot \text{R}^2_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}-\text{OR}^1$ =bendra struktūra). $P_{o/v}$ yra pasiskirstymo koeficientas tarp oktanolio/vandens (pH 7,4, 21°C)¹⁴³. $K_{rs/v}$ – pasiskirstymo koeficientas tarp raginio odos sluoksnio/ vandens¹⁴⁴.

Junginys	R ¹	R ²	Mol. masė	žymėjimas	log $P_{o/v}$	log $K_{rs/v}$
			[g/mol]			
ALA	H	H	167.6	ALA	-1.51692	-1,37
ALA-metilo esteris	nd ₃	H	181.6	ALA-Me	-0.94233	0,21
ALA-etilo esteris	CH ₂ CH ₃	H	195.6	e-ALA	0.84113	
ALA-butilo esteris	(CH ₂) ₃ CH ₃	H	223.8	b-ALA	1.42315	0,30
ALA-heksilo esteris	(CH ₂) ₅ CH ₃	H	251.8	h-ALA	1.83883	0,91
ALA-oktilo esteris	(CH ₂) ₇ CH ₃	H	279.6	o-ALA	2.6199	1,02
ALA-cikloheksil esteris	C ₆ H ₁₁	H	249.8	ch-ALA	1.49392	

Pasyvus transportas per biologines membranas yra svarbiausias daugumos junginių patekimo į ląsteles mechanizmas. Jis yra nulemtas pačių junginių ir biologinių barjerų fizikocheminių savybių. Šiandien jau yra žinoma, kad ALA į ląsteles patenka aktyvaus transporto keliu, kuris priklauso nuo Na^+ ir Cl^- koncentracijų¹⁴⁵. Tuo tarpu ALA-Me patekimas į ląsteles nepriklauso nuo Cl^- koncentracijos. Manoma, kad pasyvi difuzija ar endocitozė yra pagrindiniai lipofilinių ALA darinių patekimo į ląsteles mechanizmai. Viena iš svarbiausių ALA darinių savybių, jų lipofiliškumas, palengvina jų prasiskverbimą per ląstelių membranas. Tačiau jeigu junginys yra per daug lipofilinis jis gali įstrigti membranoje ir nepasiekti citozolio, kur toliau dalyvautų endogeninių porfirinų sintezės procese. Nustatyta, kad aliejaus / vandens pasiskirstymo koeficientas P nulemia junginių gebėjimą prasiskverbti per biologines membranas. ALA darinių lipofiliškumą galima pakeisti trimis eilėmis naudojant skirtingus ALA esterius. ALA ir ALA-Me $\text{Log}P_{o/v}$ vertės yra neigiamos ir parodo, kad šios medžiagos pasižymi hidrofilišėmis savybėmis (3 lentelė). Visi kiti ALA esteriai, turintys ilgesnes sočiųjų angliavandenilių grandines, yra lipofiliškesni, ir jų $\text{log}P_{o/v}$ vertės yra teigiamos. Naudojant lipofilinius ALA darinius dermatologijoje, svarbus yra ne tik jų geresnis tirpumas kremuose ir tepaluose, bet ir geresnis jų prasiskverbimas pro raginį odos sluoksnį. Yra paskaičiuota, kad b-ALA prasiskverbtų į odą 50 kartų efektyviau negu ALA, tuo tarpu ALA-Me – tik dvigubai geriau. Dydis $K_{rs/v}$ yra svarbus kalbant apie vaistų biologinį aktyvumą, nes medžiagos, kurios yra per daug lipofilinės, gali įstrigti raginiame odos sluoksnyje, kuriame vyrauja laisvosios riebalų rūgštys, cholesterolis ir ceramidai. Buvo nustatyta, kad h-ALA ir o-ALA epidermyje ir dermoje užsilaiko 2,5-3 kartus daugiau negu ALA¹⁴⁴. Hidrofiliška ALA lengviau prasiskverbia į kraujotakos tinklą, ir jos indukuotas PpIX bei pati ALA visiškai pasišalina iš organizmo per 24 val.¹⁴⁶. ALA esteriai sunkiau patenka į kraujotaką, o jų indukuotas PpIX greičiau negu ALA indukuotas PpIX¹⁴⁷ pasišalina iš pelių odos po suleidimo į pilvaplėvės ertmę, vietinio panaudojimo ar suvartojimo. Taigi, siekiant norimo audinių fotosensibilizacijos rezultato, reikia subalansuoti pirmtako pasiskirstymo

koeficientą, užtikrinant gerą tirpumą vandenyje ir riebaluose. Manoma, kad lipofiliniams pirmtakams, tokiems kaip h-ALA, vandeniniai tirpalai būtų optimalūs klinikiniam taikymams¹⁴⁸. Praktiškai šlapimo pūslės FD naudojami vandeniniai tirpalai nesukelia jokių problemų, tačiau lipofiliniai junginiai vandeninėje terpėje gali iškristi į nuosėdas. Kita vertus, dermatologijoje vietiškai naudojami vandeniniai ALA darinių tirpalai neužtikrintų selektyvaus pirmtako susikaupimo audinyje.

PpIX indukcija taip pat priklauso nuo pirmtako koncentracijos. Nustatyta, kad susidarančio PpIX kiekis tiesiogiai auga didinant pirmtako koncentraciją iki optimalios (c_{opt}), o ją pasiekus ima staigiai mažėti. Optimali koncentracija kinta ne tik nuo pirmtako pasirinkimo, bet ir nuo skirtingų ląstelių tipų. Visais atvejais ALA-Me ir e-ALA c_{opt} vertės yra didesnės negu ALA, o esterių, turinčių alkilo grupes iš keturių ar daugiau anglies atomų, atveju optimali PpIX indukcija pasiekia esant mažesnėms koncentracijoms. Šiais ALA dariniais indukuojamo PpIX kiekio priklausomybė yra labiau priklausoma nuo jų koncentracijos, t.y., reikia tiksliau parinkti pirmtakų koncentracijas, norint užtikrinti optimalų PpIX susikaupimą audiniuose. Kadangi ilgesnes grandines turintys ALA esteriai pasižymi mažesne c_{opt} , atrodytų, kad jie yra efektyvesni, negu ALA-Me ar e-ALA, nors pastarieji taip pat yra lipofiliškesni, negu ALA. Efektyvumą nulemia keli procesai; nors visi esteriai yra lipofiliškesni už ALA ir lengviau patenka į ląsteles, prieš patekdami į hemo biosintezės ciklą jie turi būti suskaldomi nespecifinių esterazių, kurios taip pat gali turėti didesnę ar mažesnę poveikį esterių funkcijoms¹⁴⁰. Taigi, lengvesnis ALA darinių patekimas į ląsteles nebūtinai reikš, kad bus susintetintas didesnis PpIX kiekis. Nustatyta, kad ląstelių lizate ilgesnes grandines turinčių ALA esterių fermentinė hidrolizė yra greitesnė negu turinčių trumpesnes grandines⁹⁵. *in vivo* eksperimentais buvo parodyta, kad naudojant ALA esterius intraveniškai ar vietiškai, daugiau endogeninių porfirinų susikaupė pelės odoje negu navike, nes sveikame audinyje esterazių aktyvumas buvo didesnis negu navikiniame audinyje¹⁴⁹.

Yra žinoma, kad ALA perteklius gali sukelti citotoksinį poveikį ląstelėms¹⁵⁰⁻¹⁵². Inkubavus ląsteles didesnėmis nei c_{opt} pirmtakų dozėmis, PpIX indukcijos mažėjimas ląstelių kultūroje sutampa su mažesniu ląstelių išgyvenamumu. Tokia priklausomybė buvo stebėta visoms ląstelių linijoms ir visiems pirmtakams¹⁴³. Inkubacija mažesnėmis ALA ar jos darinių dozėmis įtakos ląstelių gyvybingumui nedaro. Todėl tik tiksliai parinkus ALA darinių dozes, galima pagerinti PpIX indukcijos sąlygas *in vivo*.

Fiziologinė pH vertė taip pat yra labai svarbi PpIX sintezei. Kai ląstelių kultūros terpės pH yra $7,5 \pm 0,5$, stebėtas maksimalus susintetinto PpIX kiekis, o pH vertei sumažėjus nuo 7,4 iki 5,5, bendras PpIX kiekis sumažėja trigubai¹⁴³. Naudojant ALA, PpIX sintezės mažėjimas rūgštinėje terpėje yra stipresnis negu šarminėje¹⁵³⁻¹⁵⁵. Kita vertus, jonų kanalas reguliuojantis ALA patekimą į ląsteles taip pat yra priklausomas nuo pH ir yra aktyvesnis esant pH 5,0 vertei¹⁴³.

Naudojant ALA ar jos darinius efektyviai PpIX indukcijai taip pat labai svarbus pačių pirmtakų stabilumas, kuris priklauso nuo pH, koncentracijos, temperatūros ir deguonies kiekio terpėje¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. ALA ilgalaikiu stabilumu pasižymi tik rūgštinėje terpėje (pH 2), todėl daugelis tyrėjų ruošia ALA tirpalus rūgštinėje terpėje, ir tik prieš pat naudojimą paruošiamas fiziologinio pH (5,5-7,4) tirpalas. Didinant ALA koncentraciją tirpale jos degradacijai yra būdinga antrojo laipsnio kinetika¹⁵⁸. Taigi, tokiomis pat sąlygomis ALA koncentraciją padidinus du kartus, degradacija padidės keturiais. Temperatūrų intervale nuo 37 °C iki 85 °C, temperatūrą didinant po 10 °C, ALA degradacija kiekvienąsyk padidėja pusantrą karto¹⁶⁰. Iki šiol labai mažai tyrimų atlikta tyrinėjant ALA darinių stabilumą. Visi ALA esteriai *in vivo* gali būti hidrolizuoti nespecifinių esterazių esančių odoje ar kraujyje. Prieš hidrolizę ar po jos esteriai *in vitro* ar *in vivo* taip pat gali suformuoti pirazino tipo degradacijos produktų, tačiau ilginant esterių grandines, šių degradacijos produktų susidarymo tikimybė mažėja¹⁶¹.

Sunkumų aiškinantis skirtumas tarp ALA ir jos darinių endogeninių porfirinų indukcijos sukelia ir tai, kad, pavyzdžiui, kai kurių porfirinų sugerties ir emisijos spektruose nėra jokių skirtumų (pvz., PpIX ir PpIX dimetilo esterio, potencialaus sensibilizatoriaus), tad po inkubacijos su ALA-Me ląstelėse šių porfirinų nebūtų galima spektroskopiškai atskirti. Taip pat nėra stebima jokių porfirinų fluorescencijos lokalizacijos skirtumų ląstelėse po inkubacijos ALA ar jos esteriais^{141,162}.

Nepaisant to, kad ALA metilo esteris (Metvix[®]) yra patvirtintas odos navikų FDT, o ALA heksilo esteris (Hexvix[®]) FD urologijoje, ALA darinių gebėjimas indukuoti didesnius PpIX kiekius *in vivo* vis dar išlieka kontraversiškas. Yra parodyta, kad ALA dariniai ląstelių linijose indukuoja didesnius endogeninių sensibilizatorių kiekius už ALA net naudojant mažesnes koncentracijas^{139,143,163}. Taip pat ALA esteriai indukuoja didesnius endogeninių sensibilizatorių kiekius ir kiaulių šlapimo pūslės modelyje¹³⁸. Tai patvirtina ir klinikiniai tyrimai, įrodantys, kad ALA heksilo esteris pasižymi geresne pernaša į audinius ir sensibilizatorių indukcija negu ALA^{142,148}. Tačiau literatūroje pateikiami ir priešingi rezultatai, kad vietiškai panaudotas ALA-Me plikų pelių odoje indukavo mažiau PpIX negu ALA¹⁶⁴. Remiantis fluorescencijos intensyvumo matavimais po ALA ir ALA-Me vietinio taikymo žmonių aktinės keratozės atveju, padaryta išvada, kad ALA indukavo didesnius kiekius endogeninių sensibilizatorių, o ALA-Me buvo selektyvesnis¹⁶⁵. Šie rezultatų nesutapimai daugiausia gali priklausyti nuo pirmtakų gebėjimo įveikti biologinius barjerus (pvz., raginį odos sluoksnį) ir transporto į tikslinę sritį mechanizmų, užtikrinančių didžiausią susikaupimo selektyvumą. ALA ir jos esterių savybes būtų galima apibendrinti remiantis tyrimais, atliktais pašalinus raginį odos sluoksnį, kurie įrodė, kad ALA esteriai yra tokie pat efektyvūs kaip ir ALA, nors ilgesnes grandines turinčių esterių indukuoto PpIX fluorescencijos signalo maksimumas registruojamas praėjus ilgesniam laiko tarpui po preparatų panaudojimo^{144,166-168}. Be to, kadangi ALA

esteriai selektyviau indukuoja porfirinus, jie nesukelia tokio sisteminio efekto, koku pasižymi ALA.

Šiame darbe endogeninių porfirinų sintezei indukuoti buvo pasirinkti ALA ir ALA-Me pirmtakai. ALA pasirinkta todėl, kad ji yra hidrofilinė molekulė, tad tam tikromis sąlygomis ji gali būti tinkamesnė FDT ir FD. Taip pat kiti tyrėjai ALA jau taikė reumatoidinio artrito atveju. ALA-Me pasirinktas todėl, kad jis jau yra patvirtintas aktininei keratozei ir pamatinių ląstelių karcinomai gydyti. Be to, ALA-Me yra lipofiliškesnis už ALA. Nors jo pasiskirstymo koeficientas $P_{o/v}$ yra neigiamas, o tai būdinga hidrofilinėmis savybėmis pasižymintiems junginiams, pasiskirstymo koeficientas tarp raginio odos sluoksnio ir vandens $K_{rs/v}$ yra teigiamas ir artimesnis ilgesnes grandines turinčių esterių $K_{rs/v}$ koeficientams.

2.4. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopijos (FLIM) principai ir taikymas

Skirtingi fluoroforai gali būti charakterizuoti pagal jų fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrus, kvantinį našumą, poliarizacinį atsaką ir fluorescencijos gyvavimo trukmes. Pavyzdžiui, norint geriau atskirti pažeistus audinius nuo sveikų, dažniausiai nepakanka kontrasto, gaunamo taikant vieną optinį metodą, todėl, kai įmanoma, reikia remtis keliais metodais. Greta nuostoviosios spektroskopijos ar mikroskopijos metodų daug svarbios papildomos informacijos gali suteikti laikinės skyros metodai. Fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimai gali būti atlikti laikiniais arba dažniniais registravimo metodais. Norint išmatuoti fluorescencijos gyvavimo trukmes laikiniais metodais, bandinys yra apšviečiamas žadinančios spinduliuotės impulsu, kurio trukmė yra daug trumpesnė už tiriamų molekulių fluorescencijos trukmę. Įprastai biologinių objektų fluorescencijos trukmė yra nanosekundžių eilės. Šiame darbe naudotas 50 ps impulso trukmės lazeris,

skleidžiantis 405 nm bangos ilgio spinduliuotę. Fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimuose yra registruojamas fluorescencijos fotonų skaičiaus skirstinys laike. Laiko momentas, kuriame yra surinkta daugiausia fotonų, yra laikomas fluorescencijos pradžia. Tada registruojamas švytėjimo intensyvumo mažėjimas laikui bėgant ir iš gautų duomenų apskaičiuojama fluorescencijos gyvavimo trukmė τ . Gyvavimo trukmė – tai laikas, per kurį fluorescencijos intensyvumas nuo maksimalios vertės sumažėja dydžiu e (6 pav.). Kai kur gyvavimo trukmė apibrėžiama kaip vidutinis laikas, kurį fluoroforas po sužadavimo išbūna sužadintos būsenos:

$$\tau = 1/(k_r+k_{nr}),$$

čia k_r – spindulinės relaksacijos spartos konstanta, k_{nr} – nespindulinės relaksacijos spartos konstanta.

Fluorescencijos gyvavimo trukmė priklauso ne tik nuo spindulinės relaksacijos spartos konstantos, bet ir nuo nespindulinės relaksacijos spartos konstantos. Šios konstantos kinta pakitus fluoroforo aplinkai. Tad fluorescencijos gyvavimo trukmė yra tiesioginis fluoroforo aplinkos indikatorius.

Tuo tarpu dažniniuose ar fazės moduliavimo metoduose bandinys yra apšviečiamas modulioto intensyvumo žadinančiąja spinduliuote, ir registruojama iš bandinio atėjusio signalo fazės ir amplitudės priklausomybė nuo žadinančio, periodiškai kintančio signalo dažnio. Laiko skirtumas tarp maksimalių intensyvumų yra užregistruojamas kaip fazių poslinkis, kuriuo remiantis apskaičiuojama fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmė. Šie du registravimo būdai yra susieti Furjė transformacijos ir bendru atveju suteikia tą pačią informaciją apie tiriamo objekto fluorescencijos gyvavimo trukmę¹⁶⁹. Nors rezultatas gaunamas praktiškai tas pats, technologiniai sprendimai ir matavimo metodikos kiekvienu atveju yra skirtingos.

Fluorescencijos gyvavimo trukmė, skirtingai negu intensyvumas, tiesiogiai nepriklauso nuo fluoroforo koncentracijos. Šis faktas ir tai, kad fluorescencijos gyvavimo trukmė priklauso nuo fluoroforo aplinkos, fluorescencijos gyvavimo

trukmių vaizdinimui suteikia unikalų pranašumą. Taigi, net ir nežinant fluoroforų koncentracijos, kuri gali kisti skirtingose audinio vietose, ir nepaisant kitų chromoforų sąlygotos reabsorbcijos, – veiksmų, keičiančių fluorescencijos spektrą, galima tirti fluoroforų lokalizaciją konkrečioje heterogeninėje aplinkoje. Fluorescencijos gyvavimo trukmė taip pat nepriklauso nuo žadinimo intensyvumo, spinduliuotės sklidimo kelio, sklaidos ar fluoroforo fotovirsmų audinyje. Tačiau yra keletas veiksmų, į kurių įtaką fluorescencijos gyvavimo trukmėms reikia atsižvelgti, ir kuriuos galima tirti laikinės skyros spektroskopijos ar mikroskopijos metodais.

Fluoroforų fluorescencija yra gesinama įvairių jonų¹. Gesiklių koncentracija gali būti tiesiogiai apskaičiuota įvertinus bandinio fluorescencijos gyvavimo trukmės sumažėjimą, nes gesinimo spartos konstanta tiesiškai priklauso nuo gesiklio koncentracijos. Tokia informacija svarbi, pavyzdžiui, ląstelių biologijoje, kur Ca^{2+} ir Cl^- jonų svyravimai ypač veikia neuronų ir kitų sistemų funkcijas^{170,171}.

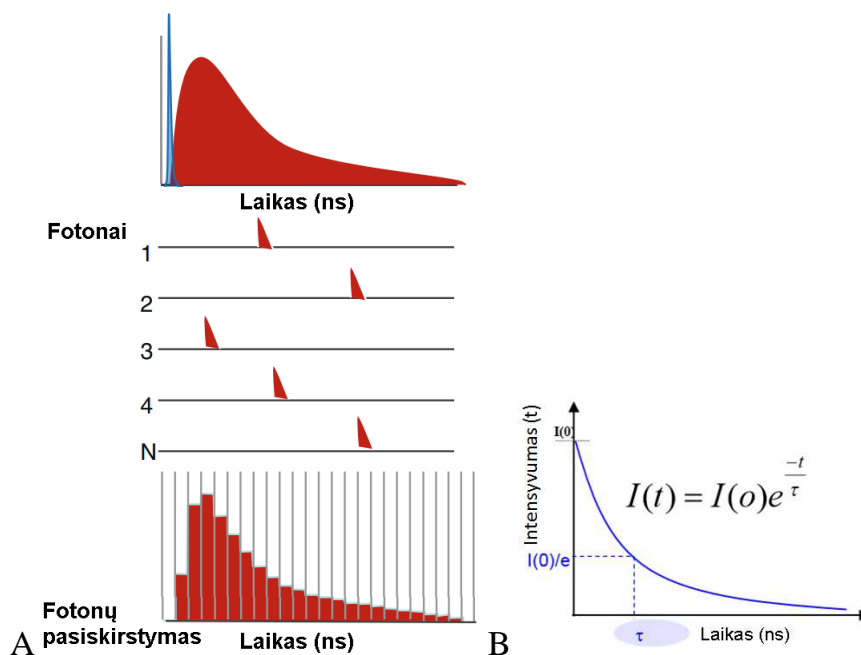
Degūnis taip pat yra efektyvus fluorescencijos gesiklis, ypač fluoroforų pasižymintį ilgomis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis. Didžiausią poveikį degūnis daro endogeniniams fluoroforams NADH ir FAD¹⁷².

Daugelis fluorescuojančių molekulių biologinėse terpėse sudaro kompleksus su kitomis molekulėmis, ypač baltymais. Skirtingų kompleksų fluorescencijos spektrai gali būti labai panašūs, tačiau fluorescencijos gyvavimo trukmės paprastai skiriasi. Fluoroforui sąveikaujant su baltymu, pakinta jo konformacija, todėl pakinta ir nespindulinio fluorescencijos gesimo spartos konstanta. Yra žinoma, kad NADH ir FAD sąveikaujant su baltymu, kinta jų fluorescencijos gyvavimo trukmės¹⁷³. Fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės ir santykinės amplitudės taip pat priklauso nuo metabolinės ląstelių ir audinių būklės^{5,174,175}.

Daugelis fluorescuojančių molekulių būna protonuotos ir deprotonuotos formos, kurių pusiausvyra priklauso nuo pH. Jeigu skirtingos formos turi

skirtingas fluorescencijos gyvavimo trukmes, tai išmatuota trukmė atliks pH indikatoriaus vaidmenį¹⁷⁶. Fluorescencijos gyvavimo trukmėms įtakos taip pat turi ir Försterio rezonansinė energijos pernaša (FRET), aplinkos lūžio rodiklis, klampa, temperatūra.

Šiuo metu fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimams dažniausiai naudojami laikiniai metodai, o plačiausiai naudojamas laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo (angl. „Time-correlated single photon counting” – TCSPC) metodas. Fluorescencijos žaditimui paprastai naudojami didelio impulsų pasikartojimo dažnio lazeriai. Molekulę sužadinus lazerio impulsu, po tam tikro laiko intervalo Δt ji išspinduliuos fotoną, kuris užregistruojamas detektoriuje. Išmatavus Δt daugelį kartų, gautos vertės pasiskirsto proporcingai išspinduliavimo tikimybei, t.y., pagal tai, kada sužadinta molekulė išspinduliuoja fotoną. Fluorescencijos fotonai, įvairiais laiko momentais registruojami skirtinguose detektoriaus kanaluose ir suformuoja fluorescencijos gesimo histogramą: kanalai, kurie atitinka dažniausias fluorescencijos gyvavimo trukmes, sukaupia didžiausias fotonų skaičiaus vertes, o rečiausias vertes atitinkantys kanalai užregistruoja vos keletą fotonų (6 pav., A). Paprastai matavimai vyksta tol, kol kuriame nors detektoriaus kanale sukaupiami 10000 fotonų, tačiau, pavyzdžiui, biologinių audinių savitosios fluorescencijos kvantinis našumas yra labai nedidelis, todėl tokį kiekį fotonų sukaupti yra labai sudėtinga.



6 pav. A – TCSPC metodikos principas; mėlyna kreivė – žadinantis impulsas, užpildyta raudona kreivė – fluorescencijos intensyvumas, histograma apačioje vaizduoja fotonų, užregistruotų detektoriaus kanaluose tam tikru laiko momentu po sužadavimo, skirstinį. B – eksponentinis fluorescencijos gesimas

Kad TCSPC metodika veiktų, būtina išpildyti vieną sąlygą: per matavimo trukmę detektorius turi pasiekti ne daugiau nei vienas fotonas. Tai pasiekama, naudojant mažo intensyvumo ir didelio pasikartojimo dažnio impulsus. Taigi šiai metodikai nereikia didelių lazerio intensyvumų ir iš esmės nesvarbus lazerio spinduliuotės stabilumas. Kadangi metodas yra kaupiamasis, galima skaičiuoti fotonus tol, kol signalo-triukšmo santykis pasieks norimą ribą ir iš gautų duomenų bus galima gana tiksliai apskaičiuoti fluorescencijos gyvavimo trukmes. Taip pat šis metodas yra pigus palyginus su kitais laiko skyros fluorescencijos metodais. TCSPC metodas yra elektroninis metodas, todėl pagrindinis jo trūkumas – ribota laikinė skyra. Laikinę skyrą apsprendžia aparatinė funkcija (angl. IRF – „instrument response function“), kurią sudaro žadinančio impulso laikinė forma, optinės sistemos dispersija, detektoriaus lėkio trukmės sąlygotas išplitimas ir neapibrėžtumas elektroninėje registravimo

sistemoje. Nors aparatinė funkcija užgožia dalį informacijos apie laikinę signalo formą, yra matematinis būdas šiai informacijai išgauti. Tai vadinama dekonvoliucijos procedūra, kurios dėka galime rasti τ vertes mažesnes už žadinančio impulso pusplotį. Praktikoje TCSPC metodas leidžia pasiekti apie <30 ps laikinę skyrą. TCSPC pastaruoju metu plačiai naudojamas fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopijoje, kur konfokaliniu mikroskopu registruojamas ne tik fluorescencijos intensyvumas bet ir jos gesimo trukmė.

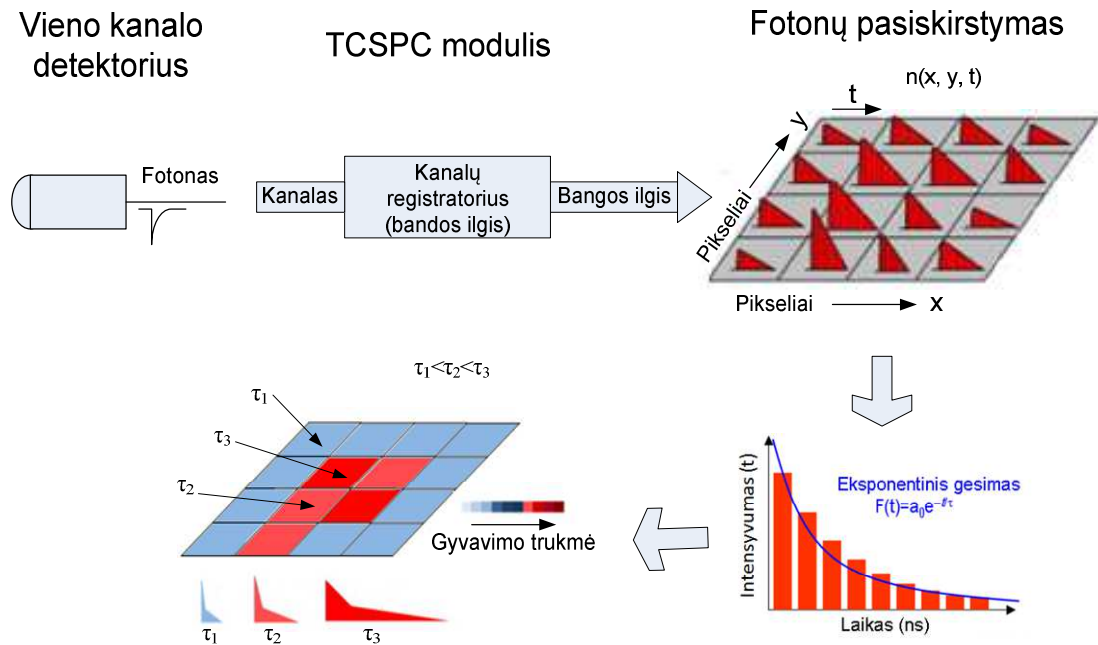
Vienalytėje aplinkoje panašių fluorescuojančių molekulių fluorescencijos gesimo funkcija yra eksponentinė (6 pav. B). Tačiau kelių fluorescuojančių medžiagų, kurios gali būti skirtingos molekulės, tokios pačios tik skirtingų konformacijų molekulės ar skirtingoje mikroaplinkoje esančios molekulės, fluorescencijos gesimas yra keleto eksponenčių suma. Užregistravus fluorescencijos gesimo charakteristikas atliekamas matematinis modeliavimas, kurio tikslas yra nustatyti, kiek mažiausiai kintamųjų reikia, norint tiksliai aprašyti eksperimentiškai gautus rezultatus. Taigi, jeigu gesimo kreivė aprašoma vienu kintamuoju, vadinasi fluorescuoja vieno tipo molekulės, jei dviem – fluorescuoja dviejų tipų, ir t.t. Fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės yra apskaičiuojamos modeliavimo proceso metu.

Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopija gyvybės moksluose buvo pradėta taikyti daugiau nei prieš 20 metų¹⁷⁷. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopijos (FLIM) metodas gali būti realizuojamas dviem technologijomis: I – skenuojanti konfokalinė mikroskopija, kuria vaizdas gaunamas pikselis po pikselio, registruojant trukmes ne vaizdo atkūrimo detektoriumi, o, pavyzdžiui, fotodaugintuvu, ir II – plataus lauko FLIM, kuria vaizdas registruojamas kamera su laikine skyra¹⁷⁸. Šiame darbe naudota skenuojančio konfokalinio mikroskopo su TCSPC metodika. Šios metodikos privalumai yra neribojamas dinaminis diapazonas susijęs su fotonų registravimo technologija, vieno fotono registravimo jautris, tiesinė signalo registravimo charakteristika, nepriklausanti nuo žadinančios spinduliuotės

intensyvumo, fliktuacijų bei fotoblyškimo ir paprastas fluorescencijos gyvavimo trukmių atvaizdavimas. Tačiau tai yra lėta metodika, nes kiekvienas fotonas kiekviename pikselyje registruojamas atskirai, tad norint surinkti statistiškai patikimus duomenis, matavimas gali labai ilgai užtrukti¹⁷⁹. Taip pat reikalingas tam tikro eksperimentui tinkamo bangos ilgio impulsinis lazeris.

Skenuojančio konfokalinio mikroskopo su TCSPC metodika FLIM vaizdai gaunami skenuojant bandinį pikselis po pikselio. Kiekviename pikselyje impulsinio lazerio spinduliuotė sužadina fluoroforų fluorescenciją. Tada tame pikselyje TCSPC modulių valdomu detektoriumi užregistruojama fluorescencijos gesimo charakteristika. Jeigu naudojamas vienas detektorius, fluorescencijos registravimo spektrinis diapazonas parenkamas filtru, o viename pikselyje gaunama tik viena ši diapazoną atitinkanti gesimo charakteristika. Gali būti naudojamos ir keturių kanalų registravimo sistemos¹⁷⁹ ar, multi-anodinio fotodaugintuvo atveju, net 16 kanalų sistemos^{180,181}. Tada iš užregistruotų fluorescencijos gesimo charakteristikų apskaičiuojama fluorescencijos gyvavimo trukmė ir atvaizduojama paveiksle tam tikra spalva. Išmatuotame FLIM vaizde atvaizduojama τ vertė yra trukmė, per kurią fluorescencijos intensyvumas nuo maksimalios vertės sumažėja e karto. Taigi, tai yra vidutinė fluorescencijos gyvavimo vertė, kuri apibendrina visų tame taške esančių sužadintų fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės. FLIM vaizdo registravimo metodika pavaizduota 7 pav. Vėliau detalesnė vaizdų analizė atliekama apskaičiuojant tikrąsias bandinyje esančių fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmes ir jų amplitudes. Atliekant detalesnę trukmių analizę būtina atsižvelgti ir į IRF atsaką. Atsižvelgiant į tikrąsias vertes perskaičiuojamas ir FLIM vaizdas, kuris leidžia įvertinti tam tikrų fluoroforų pasiskirstymą ir kiekį tiriamajame bandinyje. Biologiniuose audiniuose dažniausiai fluorescuoja keletas fluoroforų, turinčių skirtingas fluorescencijos gyvavimo trukmes, todėl fluorescencijos gesimo charakteristikos aprašomos keliomis eksponentėmis. Kiekybinė FLIM vaizdų analizė, ypač biologinių audinių, yra sudėtinga procedūra, nes reikia turėti

tikslų modelį bandinio sąlygoms aprašyti, įvertinti tikėtiną komponentių skaičių ir parametrus darančius įtaką jų fluorescencijos gyvavimo trukmėms. Todėl FLIM vaizdų analizę galėtų supaprastinti papildomi duomenys gauti kitais tyrimo metodais.



7 pav. FLIM vaizdų registravimo principas skenuojančio konfokaliniu mikroskopu su TCSPC metodika. Naudojamas vieno kanalo fotodetektorius ir TCSPC modulis. Kiekviename pikselyje užregistruojama fluorescencijos gesimo charakteristika, iš kurios apskaičiuojama fluorescencijos gyvavimo trukmė tame pikselyje. Vėliau skirtingos apskaičiuotos vertės atvaizduojamos skirtingomis spalvomis.

Vis didėja susidomėjimas audinių savitosios fluorescencijos tyrimais pagrįstų, neinvazinių diagnostikos metodų paieška medicininiam taikymams. Spektrinis savitosios fluorescencijos vaizdinimas yra gana detalai ištyrinėtas². Atlikti FLIM tyrimai siekiant gauti geresnį biologinių audinių savitosios fluorescencijos gyvavimo trukmių kontrastą atrodo daug žadantys¹⁸²⁻¹⁸⁵, tačiau dėl sudėtingų technologijų ir sudėtingos duomenų analizės tik nedaugelis

laboratorijų atlieka FLIM tyrimus su biologiniais objektais. Todėl, kol kas audinių savitosios fluorescencijos gyvavimo trukmių tyrimai daugiausia buvo atliekami matuojant viename taške. Audinyje randamų fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės pasiskirsčiusios nuo 100 ps iki 10 ns¹⁸⁶. FLIM tyrimų rezultatai ieškant fluoroforų gyvavimo trukmių biologiniuose audiniuose yra labai svarbūs tikintis laikinės skyros spektroskopijos ar FLIM metodus pritaikyti diagnostikai *in vivo*. Šaldytų ar fiksuotų audinių pjūviai yra vieni tinkamiausių bandinių FLIM tyrimams. Tačiau, kadangi fluorescencijos gyvavimo trukmės priklauso nuo aplinkos, *ex vivo* bandinių fluorescencijos gyvavimo trukmės ne visada atitiks *in vivo* audinių fluorescencijos gyvavimo trukmes. Skirtingi FLIM vaizdai bus gauti ir fiksuojant audinius metanoliu, formalinu ir glutraldehidu, nes nors ir išlieka gesimo trukmių kontrastas, naudojant skirtingą tirpiklį gaunamos skirtingos fluorescencijos gyvavimo trukmės⁴. Jau yra atlikta nemažai aterosklerotinių plokštelių^{18,187-189}, navikinių audinių^{183,190-193}, odos būklės^{194,195}, akių ligų¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ FLIM tyrimų. Yra atliktas ir sąnario kremzlės savitosios fluorescencijos FLIM tyrimas, kuriuo gauti rezultatai leidžia atskirti sveiką ir pažeistą kremzlę pagal fluoroforų gyvavimo trukmes¹⁹⁹. FLIM metodu taip pat buvo tirta FDT naudojamų sensibilizatorių agregacija^{22,200,201}. Iki šiol vis dar nėra surinkta daug biologinių audinių FLIM tyrimų duomenų, o jų rezultatų interpretacija yra sudėtinga, be to, duomenys gauti *in vitro* ar *ex vivo* tyrimuose ne visada sutampa su *in vivo* duomenimis. Kadangi įprasta FLIM aparatūra yra sudėtinga, kuriamos įvairios endoskopinės FLIM sistemos, kurios įgalina atlikti fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimus *in vivo*, o kai kuriais atvejais – realaus laiko režimu^{19,193,202-206}. Naudojant tokias vaizdinimo sistemas ir endogeninius fluoroforus, pvz. PpIX, indukuotus ALA ar jos dariniais, būtų galima labai tiksliai aptikti navikinius darinius ar uždegimines sritis. Kadangi FDT terapijos metu per didelės sensibilizatorių dozės gali pažeisti aplinkinius audinius, o per mažos dozės gali palikti gyvybingus audinių displazijos ar vėžinių ląstelių židinius, sensibilizatorių fluorescencijos gyvavimo trukmių registravimas ląstelėse ir audiniuose taikant laiko skyros spektroskopijos ar vaizdinimo metodus leistų

toliau tobulinti FDT dozių *in vivo* vertinimą. Išmatuotos PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmės įvairiose terpėse yra 10-16,8 ns intervale, ilgiausia gyvavimo trukmė yra terpėje su DMSO^{207,208}. Tačiau *in vitro* atliktų FLIM tyrimų rezultatai yra labai skirtingi, juose skelbiamos PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmės yra nuo 6,3 ns iki 14 ns^{20,23,208}. Audinių sensibilizuotų PpIX *in vivo* FLIM tyrimų yra labai mažai, ir juose nustatytos PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmės yra 18-20 ns^{9,21}. Taip pat reikėtų paminėti, kad dažniausiai FLIM tyrimų rezultatuose yra pateikiamos vidutinės fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės arba duomenys, aproksimuoti viena ar dviem eksponentėmis, jokių kitu metodu neįvertinant galimo tikro fluoroforų skaičiaus. Taigi, norint FLIM metodiką taikyti sensibilizuotų audinių diagnostikai ar FDT procesų eigai vertinti, reikia atlikti daugiau biologinių audinių gyvavimo trukmių tyrimų kuo artimesnėmis *in vivo* sąlygomis.

2.5. Reumatinės ligos

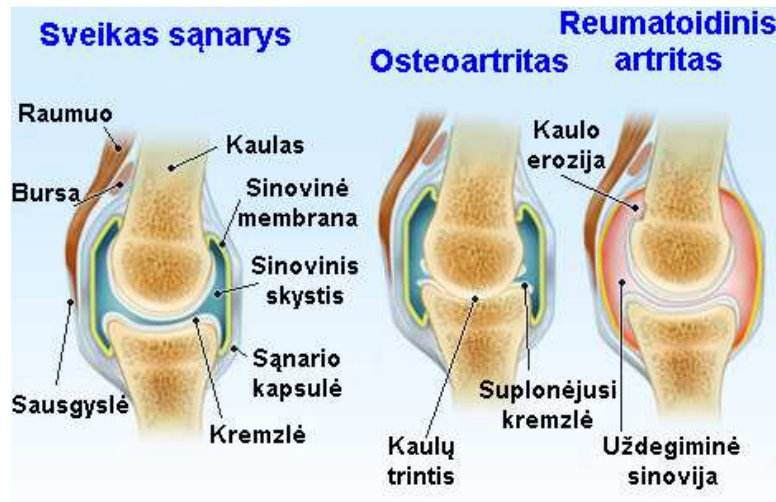
2.5.1. Reumatoidinis artritas

Reumatoidinis artritas (RA) yra autoimuninė liga²⁰⁹. Remiantis literatūroje pateikiamais statistiniais duomenimis, RA serga maždaug 0,5–1 proc. suaugusių žmonių³¹. Lietuvoje pastaraisiais metais buvo atliktas RA epidemiologinis tyrimas ir nustatytas RA paplitimas – 0,55 proc. suaugusiųjų. Taigi Lietuvoje RA serga apie 12 000–13 000 žmonių. Moterys RA serga 2–3 kartus dažniau negu vyrai. RA gali susirgti bet kokio amžiaus žmonės, tačiau dažniausiai susergama 5-ame–6-ame gyvenimo dešimtmetyje. Nors RA nesukelia tiesioginio pavojaus gyvybei, ligonių, susirgusių šia liga, vidutinė gyvenimo trukmė yra 3–15 metų trumpesnė negu vidutinė jų kartos populiacijos³³. Prie ankstyvos mirties prisideda kai kurios RA komplikacijos (amiloidozė, visceritai ir jų padariniai), žymiai spartesnė aterosklerozės raida ir

su tuo susijusios ūmios kraujagyslių sistemos pažeidos, vaistų pašaliniai poveikiai ir sukeltos komplikacijos, dėl ligos atsirandantys gyvenimo būdo ir gyvenimo kokybės pokyčiai. RA yra ir polietiologinė liga, nes jos atsiradimui reikšmės gali turėti genetinis polinkis, persirgta infekcija, endokrininiai sutrikimai, psichikos veiksniai ir patirtos traumos²¹⁰⁻²¹².

Iki šiol nėra tiksliai žinoma, koks antigenas sukelia autoimuninį procesą. Tai galėtų būti tokie auto-antigenai, kaip pakitusios struktūros IgG, II tipo kolagenas, proteoglikanai, chondrocitų antigenai arba tokie hetero-antigenai kaip bakterijos ir virusai. Svarbiausi procesai, sukeliantys sąnario uždegimą ir jo audinių (kaulų epifizų, kremzlės) ardymą, vyksta sinoviniame audinyje. Pastarąjį iš sąnario ertmės pusės sudaro dviejų tipų sinoviocitai: A-tipo (panašūs į makrofagus) ir B-tipo (panašūs į fibroblastus)²¹³. Tiek sinovijos vidinio dangalo makrofagai, tiek ir fibroblastai atlieka svarbiausią vaidmenį RA patogenezėje. Sinovinio dangalo gilesniuose sluoksniuose RA atveju randama įvairiausių imunokompetentinių ląstelių: T-limfocitų, dendritinių ir putliųjų ląstelių, makrofagų. Sinovinis audinys yra panašus į limfinį audinį. Dideli T-limfocitų kiekiai yra aptinkami sergančiųjų RA sinovijos dangale ir sinoviniame skystyje²¹⁴. Laisvieji deguonies radikalai padidina kraujagyslių laidumą, veikia citotoksiškai, depolimerizuoja hialurono rūgštį, proteoglikanus ir kolageną – labai svarbius sąnario hialininės kremzlės komponentus. Sinovijos dangalo ląstelių gaminami tromboksanai ir prostaglandinai skatina vietinę audinių edemą ir daugybę kitų uždegimo mechanizmų. Visi šie procesai sukelia sąnario uždegimą. Vėliau prasideda sąnario audinių destruktija dėl agresyvios sinovinio dangalo invazijos į kitus sąnario audinius. RA atveju sinovija labai suveša, iš dalies, dėl spartaus sinoviocitų dauginimosi. Tokios hiperplazijos mechanizmas nėra aiškus. Greičiausiai tai apoptozės sutrikimo rezultatas²¹⁵. Sinovinis dangalas pradeda hipertrofuotis ir invazyviai skverbti į kitus audinius – kremzlę, kaulą (8 pav.). Tokia suvešėjusi, besiskverbianti į kitus audinius sinovijos dalis vadinama panusu²¹⁶. Išvešėjusiame sinoviniame audinyje prasideda angiogenezė, kurią stimuliuoja sinovijos ląstelių gaminami

faktoriai: fibroblastų augimo faktorius, kraujagyslių endotelio augimo faktorius, kai kurios adhezijos molekulės²¹⁷.



8 pav. Sveikas, osteoartrito ir reumatoidinio artrito pažeistas sąnarys [adaptuota iš www.medicinenet.com]

RA gydymui yra taikomi medikamentiniai gydymo būdai nesteroidiniais vaistais nuo uždegimo, steroidiniais hormonais, klasikiais patogeninės terapijos vaistais ar biologinės terapijos preparatais. Tačiau nežiūrint vis tobulėjančio RA gydymo, išlieka pacientų, kuriems įprastinis gydymas nepadeda, ir dėl ligos jie greitai tampa neįgaliais²¹⁸. Dėl šios priežasties kartais siūlomi tokie terapijos būdai kaip plazmaferezė, imunosorbicija, kamieninių kraujodaros ląstelių transplantacija²¹⁹. Nepaisant to, kad yra daugybė mažiau ar daugiau veiksmingų gydymo būdų, anksčiau ar vėliau daugeliui ligonių prireikia gydomosios, koreguojančios, artrodezės ar sąnarių endoprotezavimo (pakeitimo) chirurginės operacijos.

2.5.2. Osteoartritas

Osteoartritas (osteoartrozė) – tai lėtinė degeneracinė sąnarių liga, pasireišianti židinine kremzlės destrukcija, lydima pokyčių pokremzliniame kaule ir naujų darinių – osteofitų formavimosi²²⁰. Tai dažniausia artrito forma. Dažniausiai

osteoartritas pažeidžia plaštakų, klubų, kelių, pečių ir stuburo sąnarius. Žmogui senstant jo sąnarių kremzlės plonėja, susiaurėja sąnariniai tarpai, sąnario judesiai tampa skausmingi, judėti tampa sunkiau, sąnarys gali patinti (8 pav.). Osteoartritas taip pat stebimas kaip pacientų, sergančių uždegiminėmis sąnarių ligomis, pvz. reumatoidinis artritas, antrinė artrito forma. Osteoartritas paprastai nelaikomas pirminiu uždegiminiu sindromu, kadangi dažniausiai nėra pagrindinių uždegimo simptomų – paraudimo, karščio, patinimo, tačiau skausmas ir funkcijos sutrikimas pasireiškia beveik visais simptominiiais ligos atvejais. Nors osteoartritas yra degeneracinė sąnarių liga, osteoartritu sergančių pacientų sąnario dangalo biopsija dažnai rodo uždegiminius pokyčius²²¹. Kartais pakitimai yra tokie ryškūs, kad juos sunku atskirti nuo būdingųjų reumatoidiniam artritui.

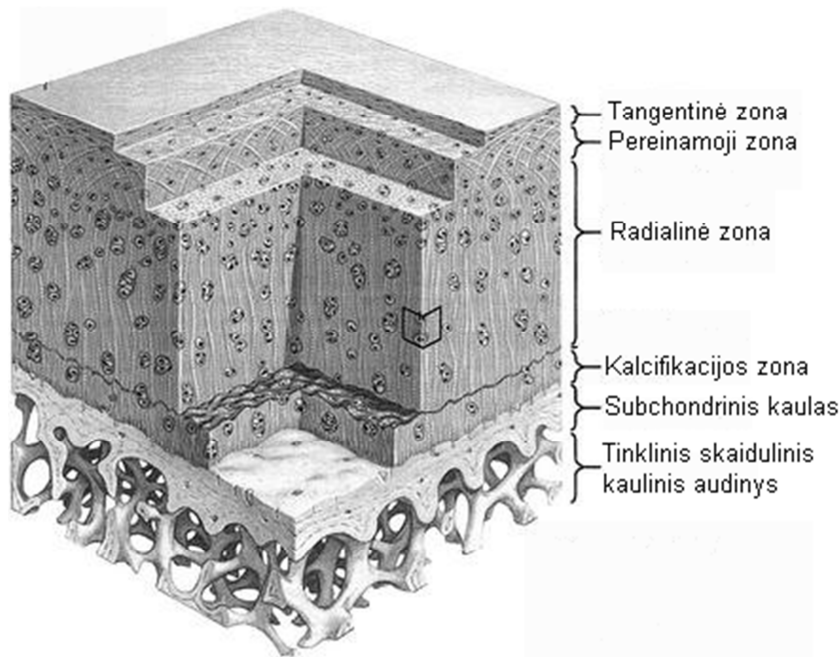
2.5.3. Sąnarinė kremzlė

Kremzlinis audinys yra specializuotas jungiamojo audinio tipas. Kremzlė sudaryta iš retai išsidėsčiusių kremzlinių ląstelių chondrocitų ir daug tarpląstelinės medžiagos. Kol pilnai panyra tarpląstelinėje medžiagoje, chondroblastai gali dalintis ir sekretuoti tarpląstelinę medžiagą. Vėliau šios jų savybės silpsta, jie tampa chondrocitais. Maisto medžiagos į kremzlę patenka difuzijos būdu, per tarpląstelinę medžiagą iš antkremzlio. Suaugusiame organizme kremzlė dengia sąnarius kaulų paviršius, jos yra šonkaulių galuose, tarpslankstelinuose diskuose, išorinėje ausyje, nosyje, kvėpavimo takuose, ji susiformuoja ir kaulo lūžio vietoje. Kremzlė yra tvirta, atspari tempimui ir spaudimui, svarbi judėjimui ir kaulų augimui. Kadangi kremzlėje nėra kraujagyslių ir nervų, jos regeneracinės galimybės yra menkos.

Atsižvelgiant į ląstelių išsidėstymą, kolageno ir elastino skaidulų kiekį tarpląstelinėje medžiagoje bei bendrą kremzlės struktūrą, yra skiriamos trys kremzlių grupės: hialininė, elastinė ir skaidulinė. Hialininė kremzlė organizme yra paplitusi labiausiai, ji yra skaidri, auga intersticiniu būdu. Šioje kremzlėje yra dviejų tipų ląstelių: chondroblastocitų ir chondrocitų. Apie penktą

embriogenezės mėnesį, būsimos kremzlės vietoje mezenchimos ląstelės kondensuojasi ir formuoja chondrogeninius centrus. Tuo pat metu kinta jų forma ir palaipsniui jos virsta chondroblastocitais, jaunomis, ovalios formos, sferišku branduoliu ląstelėmis, kurios geba sekretuoti tarpląstelinės medžiagos komponentus. Kai susintetintos tarpląstelinės medžiagos padaugėja, jie palaipsniui vienas nuo kito atsiskiria ir pasilieka mažose ertmelėse – lakunose. Ten jie diferencijuojasi į chondrocitus – subrendusias kremzlės ląsteles, kurios formuoja izogenines grupes, chondronus. Chondrone būna 1-4 chondrocitai. Chondrocitų forma priklauso nuo jų diferenciacijos ir buvimo vietos; kremzlės gilumoje jie yra sferiški, o išorėje – plokščios formos²²².

Sąnarinė kremzlė, tai speciali hialininės kremzlės forma, neturinti antkremzlio. Ji kaulų sąnarius paviršius daro paslankiais, neleidžia deformotis. Maisto medžiagos į ją patenka iš sinovinio skysčio, kuris užpildo sąnario ertmę. Priklausomai nuo chondrocitų ir kolageno skaidulų išsidėstymo, sąnarinėse kremzlėse išskiriamos ląstelių išsidėstymo zonos: tangentinė (paviršinė), pereinamoji (tarpinė), radialinė (gilioji) ir kalcifikacijos (9 pav.). Tangentinės zonos chondrocitai maži, suplokštėję. Pačiame jos paviršiuje ląstelių nėra, kolageninės skaidulos plonos ir išsidėsčiusios lygiagrečiai kremzlės paviršiui. Pereinamosios zonos chondrocitai didesni, apvalūs ir chondronuose jie būna dažniausiai po vieną. Šios zonos tarpląstelinės medžiagos kolageninės skaidulos išsidėsto įstrižai. Radialinėje zonoje chondrocitai yra dideli ir išsidėstę statmenais kremzlės paviršiui stulpeliais suformuoja kolonas, o kolageno skaidulos orientuotos į chondrocitų stulpelius. Kalcifikacijos zona yra virš kaulinio audinio, ir jos tarpląstelinė medžiaga hematoksilino ir eozino dažais nusidažo tamsiau negu kitose zonose²²².



9 pav. Sąvarinė kremzlė²²³

Esant nepakankamam aprūpinimui maisto medžiagomis, sąvarinės kremzlės gilumoje chondrocitai gali atrofuoti. Sumažėjus vandens, tarpląstelinėje medžiagoje atsiranda smulkių plyšelių. Tuomet maisto medžiagų patekimas į ją sutrinka, chondrocitai žūsta ir kremzlės kalcifikuojasi. Nors chondrocitai gamina tarpląstelinės medžiagos komponentus iki pat žūties, tačiau, po kremzlės pažeidimo jos greitai atstatyti negali, ir defektas užpildomas jungiamuoju audiniu arba skaiduline kremzle. Šie audiniai tikrosios kremzlės funkcijos neatlieka²²².

2.5.4. Fotodinaminės terapijos taikymas reumatoidinio artrito gydymui

Ieškant naujų reumatoidinio artrito gydymo būdų buvo susidomėta fotodinamine terapija. Kadangi uždegiminei reumatoidinei membranai būdinga daug požymių, kuriais pasižymi neoplaziniai audiniai, t. y. hipermetabolinis aktyvumas, aktyvi vaskuliarizacija, fotodinaminę terapiją būtų galima taikyti ir

reumatoidiniam artritui. Fotosensibilizuotos terapijos principas gydant artritą primena vėžio terapiją: fotosensibilizatorius susitelkia uždegiminėje sinovijoje, paveikus tam tikro bangos ilgio šviesa, jis sužadinamas, po to susidarę aktyvūs deguonies radikalai sukelia citotoksines reakcijas uždegiminėse ląstelėse. Atlikta nemažai tyrimų su triušių ir pelių eksperimentinio reumatoidinio artrito modeliais naudojant įvairius pirmos ir antros kartos sensibilizatorius. Vieni pirmųjų tyrimų pritaikant fotodinaminę terapiją RA gydymui buvo pradėti V. Tauraičio 1988 metais Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institute (dabar Valstybinis tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras). Buvo tyrinėjamas sensibilizatoriaus chlorino e6 ir helio-neono lazerio spinduliuotės poveikis eksperimentinio artrito gydymui²²⁴. Vėliau pasirodė ir kitų autorių publikacijos taikant įvairius fotosensibilizatorius ir įvairius artrito modelius. Chowdhary ir kt. pademonstravo uždegimo simptomų sumažėjimą ir pagerėjimą pelių adjuvantu indukuoto artrito modelyje, panaudojus benzoporfirino darinio (BPD-MA) sensibilizatorių^{225,226}. Buvo gautas galinių pelių galūnių patinimo sumažėjimas nuo 70 % iki 19 % bei histologiškai nustatytas mažesnis panuso susidarymas bei mažesni kaulų ir kremzlės pažeidimai. Triušių antigenų indukuotame artrito (AIA) modelyje naudojant BPD-MA buvo gautas panuso sumažėjimas 75-85 procentais^{227,228}. Tokiame pat triušių modelyje spektroskopiniai ir mikroskopiniai tyrimai parodė, kad BPD-MA didžiausias kiekis po intraveninio suleidimo susikaupia sinovijoje ir audiniuose su didesne vaskuliarizacija, tuo tarpu kremzlėje, meniske, raiščiuose ir kauliniame audinyje nebuvo aptiktas. Po intraveninės sensibilizatoriaus injekcijos jis labai sparčiai pasišalina iš sinovijos. Geresnis BPD-MA susikaupimo sinovijoje rezultatas buvo gautas sensibilizatorių suleidžiant tiesiai į sąnarį, tada jo koncentracija sinovijoje išlieka pastovi keletą valandų²²⁹. Atlikus intrasąnarinį švitinimą, po dviejų savaičių 50 % gydytų sąnarių buvo stebima sinovijos nekrozė, o po 4-ių savaičių – 43 %, be to, jokių kremzlės pažeidimų nebuvo matyti³⁰. Panaudojus BPD-MA Ig-G indukuotame triušių artrito modelyje taip pat buvo gauta sinovijos nekrozė²³⁰. Tyrimai naudojant Fotofriną triušių AIA modelyje pademonstravo, kad Fotofrino didžiausias kiekis sinovijoje susikaupė

praėjus 48-ioms valandoms po sisteminio poveikio, be to, nei spektroskopiniais nei mikroskopiniais matavimais nebuvo aptiktas sensibilizatoriaus susikaupimas meniske, raiščiuose, kauluose, raumenyse ir kremzlėje²²⁸. Tačiau praėjus 2-iems savaitėms po atliktos fotodinaminės terapijos, tik 43 % triušių buvo stebėta sinovijos nekrozė, o po 4-ių savaičių – tik 29 %²³¹. Naudojant Fotosaną-3 taip pat buvo gauta sinovijos hemoraginė nekrozė^{232,233}. Pradėti daug žadantys tyrimai ir su antros kartos sensibilizatoriais. Naudojant tetrahidroporfirino tetraetoksilatą, turintį sugerties spektro maksimumą infraraudonojoje srityje, tyrimuose *in vitro* pademonstruotas įvairiapusiškas FDT poveikis, o tyrimuose *in vivo* atlikta audinių fotodinaminė abliacija nepažeidžiant odos²³⁴. Taip pat pademonstruotas statistiškai patikimas artrito uždegiminių rodiklių sumažėjimas AIA pelių modelyje naudojant liposominį tetra(meta-hidroksifenil)-chloriną (mTHPC)²³⁵. Fotosensibilizatorius talaporfinas yra veiksmingas žiurkių kolagenu indukuotame artrito modelyje²⁹.

Prasidėjus ALA naudojimui pargrįstiems FDT taikymams onkologijoje, šią terapiją buvo bandoma pritaikyti ir reumatoidinio artrito atveju. Pirmieji tyrimai taikant ALA RA atveju buvo atlikti Huttman ir kt.²³². Triušių artrito modelyje praėjus 2 ir 4 valandoms po intrasąnarinio ar intraveninio ALA suleidimo buvo užregistruotas ryškus PpIX fluorescencijos signalas sinovijoje, kuris buvo stebimas iki 24 valandų. PpIX fluorescencija užregistruota odoje, raumenyse, raiščiuose taip pat išliko iki 24 val. Tačiau didžiausią susirūpinimą sukėlė tai, kad praėjus net 24 valandoms po ALA panaudojimo PpIX fluorescencija buvo stebima chondrocituose. Buvo nuspręsta, kad FDT gali pažeisti sveikus chondrocitus ir kremzlės paviršių, todėl tyrimai buvo sustabdyti. Vėliau, prasidėjus tyrimams su lipofiliniais ALA dariniais, vėl pasirodė publikacijos apie ALA ar jos darinių naudojimą RA atveju. Pelių AIA modelyje buvo nustatyta, kad uždegiminėje sinovijoje susikaupė apie 4 kartus daugiau PpIX negu sveikuose audiniuose po intrasąnarinio ALA heksilo esterio (h-ALA) suleidimo praėjus 3 valandoms²⁴. Histologiniais tyrimais buvo nustatyta, kad ląstelės sukaupusios didžiausius kiekius PpIX buvo makrofagai,

endotelio ir sinovijos ląstelės. Taip pat pademonstruota, kad parinkus tinkamas FDT sąlygas, pirmtako ir švitinimo dozes, galima išvengti kremzlės pažeidimų ir sumažinti sinovijos uždegimą. RA ir OA sergančių pacientų sinovijos biopsijos bandinius inkubavus su h-ALA 6 valandas buvo nustatyta, kad didesnius PpIX kiekius sukaupia RA o ne OA sinovijos bandiniai²⁴. ALA indukuotas PpIX kaupimasis buvo tiriamas triušių AIA artrito modelyje²⁶. Po intrasąnarinio ir intraveninio ALA suleidimo didžiausia endogeninių fluoroforų fluorescencija buvo užregistruota uždegiminiuose audiniuose, tačiau taip pat pasireiškė ir sisteminė sensibilizacija. Didžiausias PpIX fluorescencijos intensyvumas audiniuose *ex vivo* buvo sinovijoje. Kremzlėje taip pat buvo užregistruota porfirinų fluorescencija, tačiau remiantis fluorescencijos spektrais buvo padaryta išvada, kad jų sudėtis kitokia negu sinovijoje. ALA, ALA-Me ir h-ALA sąlygoti PpIX sintezės skirtumai buvo tiriami *in vitro* pacientų sergančių RA ir OA sinoviocituose²⁵. Inkubavus ląsteles 100 kartų mažesne h-ALA koncentracija negu ALA ir ALA-Me, jis indukavo dvigubai daugiau PpIX. Nepaisant to, koks pirmtakas ar koncentracija buvo naudoti, RA sinoviocitai sukaupė apie du kartus daugiau PpIX negu OA sinoviocitai. Priešingi rezultatai naudojant ALA (10 mg) ir h-ALA (0,1 mg) buvo gauti žiurkių kolagenu indukuotame artrito modelyje. *In vivo* ALA indukavo apie 4 kartus daugiau PpIX negu h-ALA praėjus 4 valandoms po intrasąnarinio preparatų suleidimo²⁵. Pastaraisiais metais atlikti tyrimai parodė chondrocitų rezistentiškumą FDT naudojant ALA^{236,237}. Tai mus paskatino tęsti anksčiau pradėtus tyrimus, ieškant optimalių ALA ar jos darinių panaudojimo parametru, tinkančių FDT ar FD, siekiant padidinti endogeninių porfirinų kaupimosi sinovijoje selektyvumą ir kartu apsaugoti kremzlines struktūras nuo fotosensibilizatorių sukeltų pažeidimų, bei sumažinti sisteminę endogeninių porfirinų poveikį organizmui.

3. MEDŽIAGOS IR METODAI

3.1. Medžiagos

3.1.1. Sensibilizacijai

5-aminolevulininės rūgšties hidrochloridas (angl. 5-Aminolevulinic acid hydrochloride) – ALA, (Sigma Aldrich Chemie, Miunchenas, Vokietija). Formulė – $C_5H_9NO_3 \cdot HCl$;

5-Amino-4-oksipentanoinės rūgšties metilo esteris, 98% (angl. Methyl δ -aminolevulinate hydrochloride) – ALA-Me, (Fluka Chemie GmbH, Miunchenas, Vokietija). Formulė – $C_6H_{11}NO_3 \cdot HCl$.

3.1.2. Eksperimentinio reumatoidinio artrito modelio sukėlimui

Šinšilų veislės triušių patelės (kūno svoris apie 3,5 kg);

Albuminas iš vištos kiaušinio (angl. Albumin from chicken egg) – AL, (Sigma-Aldrich, Miunchenas, Vokietija);

Pilnasis Froindo adjuvantas (angl. Freund's Adjuvant Complete) – CFA, (Sigma-Aldrich, Miunchenas, Vokietija);

Kremas depiliacijai „Veet“ (Reckitt Benckiser, Dansom Lane Hull, Didžioji Britanija).

3.1.3. Darbui su ląstelėmis, chondronais, kremzlės bandiniais

Dulbecco modifikuota Eagle terpė – DMEM (su 1g/1 dm³ D-gliukozės, natrio piruvato, L-Glutamino, fenolio raudonojo), (Invitrogen: 21885025);

10% galvijų vaisiaus serumas (angl. Foetal bovine serum) – FBS, (Biochrom: S0615);

0,1 % kolagenazė (angl. Collagenase), (Tipas I, Biochrom, Cat. #C 1-22);

Penicilino (10 000 units/ml), streptomicino (10 mg/ml) ir amfotericino B (0.025 mg/ml) tirpalas, (Biological Industries: 03-033-1B);

0.25 % tripsino/ 0.2 % etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA) tirpalas, (Biological Industries: 03-050-1);

Tyroido terpė (angl. Thyroid's medium) – sudėtis: 1-ame dm³ dejonizuoto vandens ištirpinta 8g NaCl, 0,2g KCl, 0,2g CaCl₂, 0,21g MgCl₂·6H₂O, 0,05g NaH₂PO₄, 1g NaHCO₃ ir 1 g gliukozės;

Fosfato buferinis fiziologinis tirpalas (angl. Phosphate-buffered saline) – PBS, (Biochrome AG: L182-01);

Kolagenazės II tirpalas (angl. collagenase II solution) (545U/ml), (Biochrom AG: C2-22);

0.25% vidutinės molekulinės masės (800-1500 kDa) natrio hialuronato tirpalas (angl. sodium hyaluronate) – HA, (GO-ON[®], Rottapharm, Airija).

3.1.4. Audinių preparatų mikroskopijai paruošimui

Aerolis audinių šaldymui Solidofix[®], (Carl Roth GmbH + Co.KG, Didžioji Britanija);

Silanizuoti, teigiamu krūviu įkrautu paviršiumi, stikliukai mikroskopijai Histobond[®]+ (76x26 mm), (Carl Roth GmbH + Co. KG, Didžioji Britanija);

Hematoksilinas 2, (Fisher Scientific, Didžioji Britanija);

Eozinas Y 0,5 %, (Fisher Scientific, Didžioji Britanija);

Etanolis 99,5 %, ekstra švarus, (Fisher Scientific, Didžioji Britanija);

Tirpalas ryškinimui, naudojamas po dažymo hematoksilinu. Sudėtis: 70% etanolis ir 0.5% HCl;

Ksilenas >98 %, (Fisher Scientific, Didžioji Britanija).

3.2. Prietaisai


Spektrofluorimetras USB 2000-FL (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida, JAV), matavimo ribos 339-1026 nm);

Spektrofluorimetras QE65000 (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida, JAV) matavimo ribos 348-1115 nm);

CASY[®] (Roche Innovatis AG) – ląstelių skaičiavimui;

Fast-read 102 vienkartiniai stiklukai ląstelių skaičiavimui (Biosigma: BVS100) – chondronų skaičiavimui;

Šviesos šaltinis LS-450-L (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida, JAV) su įmontuotu šviesos diodu (403/20 nm, FWHM);

Bifurkacinis šviesolaidis (SOMTA, Latvia). Naudotas „saulutės“ tipo šviesolaidis , kuriame viena 200 µm šviesolaidžio gija yra centrinė, o kitos šešios 200 µm gijos išsidėstę aplink ją ratu.

Filtras praleidžiantis ilgesnę nei 500 nm bangos ilgio spinduliuotę (ЖС18, „Красный Гигант“, Penza, Rusija);

Pagaminta speciali stiklinė kiuvetė, kurią būtų galima pozicionuoti virš šviesolaidžio ir matuoti bandinių fluorescenciją mikro tūriuose (5-50 µl);

Fluorescencinis mikroskopas TE-2000U su konfokalinio skanavimo sistema C1si (Nikon, Japonija);

Impulsinis diodinis lazeris, kurio emituojamos spinduliuotės smailė yra ties 405 nm PDL 800-B, (PicoQuant GmbH, Berlynas, Vokietija);

Vieno kanalo pavienių laiکه koreliuotų fotonų registravimo modulis (angl. time correlated single photon counting – TCSPC) PicoHarp 300, (PicoQuant GmbH, Berlynas, Vokietija);

Vieno kanalo pavienių fotonų registravimo detektorius (angl. Single photon avalanche diode – SPAD), (PicoQuant GmbH, Berlynas, Vokietija);

Kriotomas Leica CM1100 (Leica Biosystems, Vokietija);

Programinė įranga: SymPhoTime v.5.2 (PicoQuant GmbH, Berlynas, Vokietija), OOIBase32TM ir SpectraSuite (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida, JAV), OriginPro v.8 (Northamptonas, JAV), Nikon EZ-C1 Bronze v.3.80 (Nikon, Japonija), ImageJ 1.43.

3.3. Pacientų tiriamoji medžiaga

Reumatoidiniu artritu (RA, $n_p = 6$) ir osteoartritu (OA, $n_p = 15$) sergančių pacientų sinovijos ir kremzlės audiniai buvo paimti iš pooperacinės sąnarių transplantacijos medžiagos. Pacientams osteoartritas buvo diagnozuotas remiantis radiologiniais kriterijais, o reumatoidinis artritas remiantis Amerikos reumatologų klasifikaciniais kriterijais²³⁸. Darbui su iš pacientų paimtais bandiniais buvo gautas Bioetikos komiteto leidimas – Nr. 158200-12-270-63.

3.3.1. Sinoviocitų paruošimas

Sinoviocitai buvo išskirti iš OA ($n_p = 6$) ir RA ($n_p = 6$) pacientų sinovijos audinio pooperacinės medžiagos. Susmulkintas sinovijos audinys 12 valandų buvo inkubuojamas DMEM (su 1g/1 dm³ D-gliukozės, natrio piruvato, L-Glutamino, fenolio raudonojo) be FBS 5 % CO₂ ir 37°C sąlygomis. Audinio fermentacija vykdoma beseruminėje terpėje su 0,1% I tipo kolagenazės tirpalu, pastoviai purtant 4 val. 37 °C vandens vonioje. Fermentu paveiktas audinys

filtruojamas per 40 µm filtrą. Išskirtos ląstelės 10 min centrifuguojamos 400g sąlygomis ir resuspenduojamos DMEM terpėje, kurioje yra 10% FBS, penicilino (10 000 units/ml), streptomicino (10 mg/ml) ir amfotericino B (0,025 mg/ml). Ląstelių tankiui viršijus 95 % priaugę sinoviocitai buvo persėjami naudojant 0,25 % tripsino/ 0,2 % EDTA tirpalą ląstelių atskyrimui. Eksperimentams naudotos 2 - 4 persėjimo ląstelės. Ląstelės buvo patalpintos į 75 cm² kultūrų auginimo kolbas su DMEM ir 10% FBS. 12 val. iki inkubacijos su ALA ar ALA-Me eksperimentų, ląstelės buvo išsėtos į 12 šulinėlių auginimo plokšteles su DMEM. Eksperimentams naudota po 200 000 ląstelių, toks ląstelių skaičius gaunamas esant 95 % ląstelių monosluoksniu tankiui konfluencijai. Neprikibusios ląstelės buvo nuplautos PBS ir terpė pakeista į Tyroido terpę. Inkubacijai buvo naudotas 1 mM ALA ar ALA-Me koncentracijos tirpalas. Kiekvienam prekursoriui, kontrolinei grupei bei visiems laiko taškams buvo užsėta po du šulinėlius ląstelių. Po inkubacijos su šiais preparatais terpė buvo pašalinta ir ląstelės skalautos tris kartus su PBS. Tada ląstelės buvo nugramdytos ir resuspenduotos 20 µl tūryje. Suspenduotos ląstelės buvo skaičiuojamos naudojant ląstelių skaičiuotuvą CASY[®]. Ląstelių suspensijų fluorescencijos spektrai buvo matuojami po 2, 4, 8 ir 24 valandų inkubacijos su ALA arba ALA-Me. Taip pat matuota ir inkubacinės terpės fluorescencija.

3.3.2. Kremzlės bandiniai

Kremzlės audinys buvo paimtas iš pacientų sergančių OA ($n_p = 15$) pooperacinės medžiagos, nuplautos PBS ir susmulkintas į 2-3 mm dydžio (visomis kryptimis) kremzlės bandinius (KB). Iki eksperimentų KB buvo laikomi inkubatoriuje 37°C, terpėje be serumo (DMEM, 1 g/ 1 dm³ gliukozės ir antibiotikai). KB buvo inkubuojami 2, 4, 8 ir 24 valandas su 1 mM ALA ar ALA-Me. Kontroliniai KB inkubuoti Tytoide. Prieš spektroskopinius tyrimus inkubacinė terpė pašalinta ir bandiniai tris kartus skalauti PBS. Atlikti visų bandinių ir inkubacinės terpės spektroskopiniai tyrimai.

3.3.3. Chondronų išskyrimas

Chondronai buvo išskirti iš pacientų sergančių OA ($n_p = 9$) sąnarių kremzlės audinio. Kremzlės audinys praskalautas PBS ir susmulkintas į 1-3 mm dydžio gabaliukus. Tyrimams naudota apie 7 g kiekvieno paciento kremzlės audinio. Chondronų išskyrimui kremzlės gabaliukai buvo inkubuojami 12 valandų (37°C ir 5 % CO_2) kolagenazės II tirpale (545U/ml) nuolat maišant (purtant). 1 g kremzlės audinio naudota 10 ml kolagenazės II tirpalo (545U/ml). Po inkubacijos chondronai buvo centrifuguojami 5 min. ties 400 g ir pašalintas supernatantas. Tada chondronai resuspenduoti 1 ml Tyroido terpės (be serumo ir antibiotikų) ir suskaičiuoti naudojant Fast-read 102 vienkartinis ląstelių skaičiavimo stikliukus. Vėliau išskirti chondronai išsėti į 12 šulinėlių ląstelių auginimo plokšteles po 2×10^5 chondronų į šulinėlį ir inkubuoti 12 valandų Tyroido terpėje iki eksperimentų su ALA. Kiekvieno paciento ($n_p = 3$) chondronai buvo padalinti į kontrolinę grupę, kuri inkubuota tik su Tyroido terpe, ir eksperimentinę grupę inkubuotą su 1 mM ALA. Endogeninių porfirinų kaupimasis buvo matuojamas po 2, 4, 8 ir 24 valandų inkubacijos. Eksperimentuose su hialurono rūgštimi chondronai ($n_p = 6$) padalinti į kontrolinę grupę, inkubuotą su 1 mM ALA, ir eksperimentinę, kuri buvo inkubuota su 1 mM ALA ir 0,25 % vidutinės molekulinės masės (800-1500 kDa) natrio hialuronato (HA) preparatu (GO-ON[®]). Chondronai inkubuoti 12 val. Visiems eksperimentiniams taškams buvo paruošti dublikatai. Po inkubacijos terpė buvo pašalinama, chondronai tris kartus nuplauti su PBS ir resuspenduoti 20 μl tūryje. Spektroskopiniai tyrimai atlikti su visų chondronų suspensijų ir inkubacinės terpės bandiniais.

Chondronai išskirti iš pacientų sergančių OA kremzlės bandinių yra sudaryti iš vieno ar daugiau chondrocitų, jį supančios matricos ir dengiančios kapsulės²³⁹⁻²⁴¹. Pasirenkant chondronus kaip kremzlės modelį *in vitro* nulėmė tai, kad žmogaus chondrocitus yra labai sunku išlaikyti normalios būsenos *in vitro*, kai jų natūralios augimo sąlygos ir aplinkos struktūra yra pakitusios. Be to, išskirti

chondronai su išlikusia chondrocitus supančia matrica yra fiziologiškai artimesnis chondrocitų metabolizmo *in vivo* vertinimo modelis.

Visi inkubacijos tyrimai buvo atliekami prieblandoje.

3.4. Eksperimentiniai gyvūnai

Eksperimentinio reumatoidinio artrito modelinei sistemai sukurti buvo naudotos šinšilų veislės triušių patelės. Gyvūno pasirinkimą lėmė tai, kad triušio kelio sąnarys yra didesnis negu pelės ar žiurkės, primenantis žmogaus rankos sąnarį, taip pat kitų mokslininkų darbuose triušiai naudojami FDT tyrimams. 34 triušiai, kurių svoris apie 3,5 kg, buvo laikomi standartinėmis sąlygomis po vieną narve neribojant triušių ėdalo ir švaraus vandens. Gyvūnai buvo laikomi pastovios temperatūros, drėgnumo ir apšvietimo ciklo (12 val. šviesos/12 val. tamsos) sąlygomis. Eksperimento metu triušiai buvo šeriami avižomis norint sumažinti chlorofilo degradacijos produktų fluorescenciją raudonojoje spektro srityje. Triušių kelių depiliacija atlikta prieš 5 dienas iki spektroskopinių tyrimų naudojant normalios odos depiliavimo kremą „Veet“. Visi veiksmai su gyvūnais buvo atliekami laikantis Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2010/63/ES ir Lietuvos Respublikos įstatymų. Eksperimentams buvo gautas Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas Nr. 0218 atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais.

3.4.1. Eksperimentinio antigeno indukuoto reumatoidinio artrito modelio sukėlimas

Triušių kelio sąnario monoartikulinis antigeno indukuotas artritas (AIA) yra vienas iš reumatoidinio artrito (RA) modelių, kuris panašus į jį pagal histopatologinius pokyčius, priešūždegiminių/priešreumatinių vaistų aktyvumo veikimo profilį. Tai yra lėtinis artritas, kurio metu persistuojantys pokyčiai

stebimi net iki trijų mėnesių²⁴²⁻²⁴⁴. Beveik visos triušių rūšys gali būti naudojamos, tačiau egzistuoja rūšinės jautrumo variacijos. Naujosios Zelandijos triušiai yra jautresni ir dažniausiai naudojami šiose studijose. AIA yra artimiausias eksperimentinis žmonių artrito modelis dėl sinovinio audinio infiltracijos limfoidinėmis ląstelėmis (limfocitai, polimorfonuklearai, sustorėjusi infiltruota sinovija). Požymių pasireiškimas priklauso nuo antigeno dozės ir artrito trukmės. Literatūroje aprašytos artrito sukėlimo procedūros varijuoja ir tai liečia antigeno prigimtį, sensibilizacijos sąlygas, naudojamo antigeno dozę. Pavyzdžiui, triušiams imunizuotiems nepilnu FA neišsivysto uždelsto tipo hiperjautrumas ir neišsivysto lėtinis artritas. Kaip antigenai gali būti naudojami ovalbuminas (AL), jaučio serumo albuminas (JSA) bei kiti baltyminiai preparatai. Taip pat labai svarbus faktorius yra antigeno dozė, minimali AL būtina sukelti lėtinį artritą yra 0,1 mg²⁴⁵.

Šiame darbe tirtiems triušiams monoartritas sukeltas atliekant tris AL ir pilno Froindo adjuvanto (CFA) imunizacijas. Šios imunizacijos įšvirksčiant preparatus į nugaros sritį buvo kartotos kas 2 savaites. Pirmoms dviem imunizacijoms leidžiamas 1 ml AL ir CFA mišinys izotoniniame steriliame tirpale, kurį sudaro 0,5 ml su 20 mg/ml AL ir 0,5 ml CFA, o trečiai imunizacijai naudojamas 0,5 ml su 10 mg/ml AL ir 0,5 ml CFA mišinys. Trečios imunizacijos metu sumažinama AL koncentracija, kad neišsivystytų imuninė tolerancija AL. Nugaros srityje į odą keturiose vietose leidžiama po 0,25 ml tirpalo. Praėjus 5 dienoms po trečios imunizacijos į nugarą, visiems triušiams depiliuotos užpakalinių galūnių sąnarių sritys, odos paviršius sterilizuotas spiritu ir atlikta imunizacija į dešinės kojos sąnario ertmę suleidžiant 1 ml AL tirpalo (5 mg/ml). Į kairės kojos sąnario ertmę suleidžiama 1 ml sterilaus izotoninio tirpalo. Taip yra sukeliamas lėtinis artritas, kurio metu persistuojantys pokyčiai stebimi net iki trijų mėnesių. AIA sukėlimo schema pavaizduota 4 lentelėje.

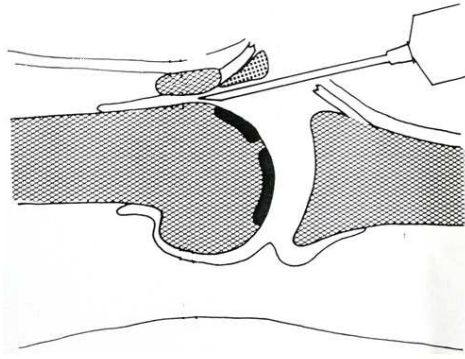
4 lentelė. Antigenų indukuoto artrito sukėlimas.

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

Antigenų indukuoto gyvūnų artrito raidai įvertinti buvo matuojamas kelio sąnarių patinimas, nes artrito išsivystymas susijęs su persistuojančiu uždegiminiu atsaku paveiktame kelio sąnaryje ir pasireiškia sąnario apimties padidėjimu. Literatūroje nurodoma, kad sąnario patinimas po intrasąnarinės AL injekcijos CFA imunizuotiems triušiams maksimumą pasiekia po 24 val. ir nestebi patikimo sąnarių patinimo sumažėjimo per 42 tyrimo dienas²⁴⁶.

3.4.2. Tyrimų triušių eksperimentinio reumatoidinio artrito modelinėje sistemoje eiga

Triušiai suskirstyti į tris grupes ir ne anksčiau kaip trys dienos po ovalbumino suleidimo į dešinės kojos sąnario ertmę buvo leidžiami sensibilizatoriaus protoporfirino IX pirmtakai – ALA arba ALA-Me preparatai. Atlikto tyrimo metu buvo panaudoti du prekursorių suleidimo būdai: intrasąnarinis ir intraveninis, norint įvertinti prekursoriaus įvedimo į organizmą privalumus ir trūkumus. Intrasąnarinė injekcija atliekama ALA ar ALA-Me tirpalą leidžiant į centrinę sąnario dalį po girnele (10 pav.).



10 pav. ALA ar ALA-Me preparato suleidimas²⁴⁷

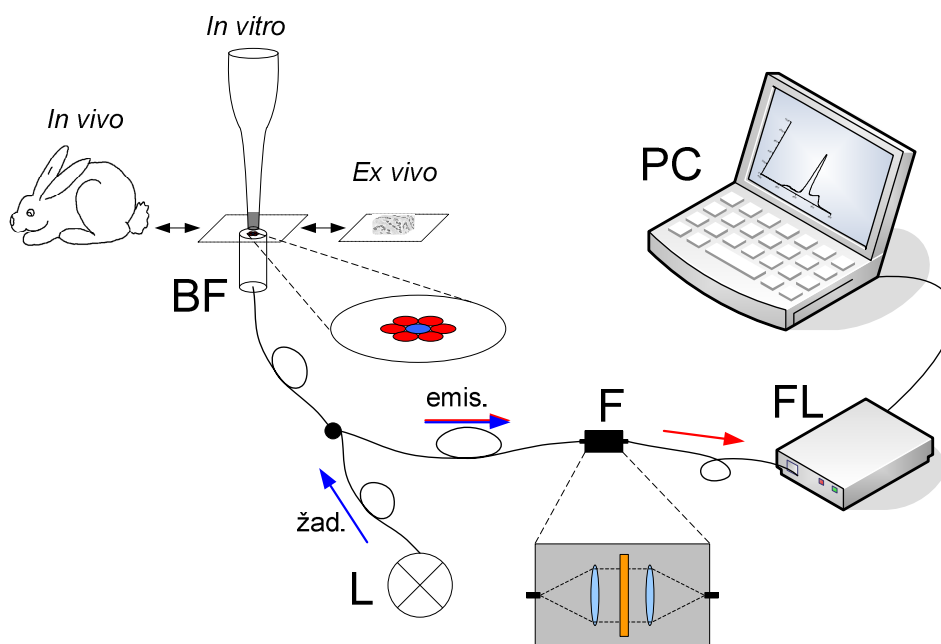
Pirmą tiriųjų grupę sudarė 12 triušių, kuriems po 1 ml 16 mM (2,69 mg/ml, t.y. 0,9 mg/kg) ALA tirpalo suleista į sąnario ertmę ($n_{tr} = 7$) ar į ausies veną ($n_{tr} = 5$).

Antrą grupę sudarė 16 triušių, kuriems po 1 ml 16 mM (2,92 mg/ml, t.y. 0,97 mg/kg) ALA-Me tirpalo suleista į sąnario ertmę ($n_{tr} = 9$) ar į ausies veną ($n_{tr} = 5$).


Trečią kontrolinę grupę sudarė 4 triušiai, kuriems nebuvo leistas nei ALA nei ALA-Me tirpalas.

Praėjus 4 val. nuo ALA ar ALA-Me preparato suleidimo ir atlikus audinių fluorescencijos matavimus *in vivo* triušiai buvo numarinti ir paimti audinių bandiniai jų fluorescencijos matavimams *ex vivo*.

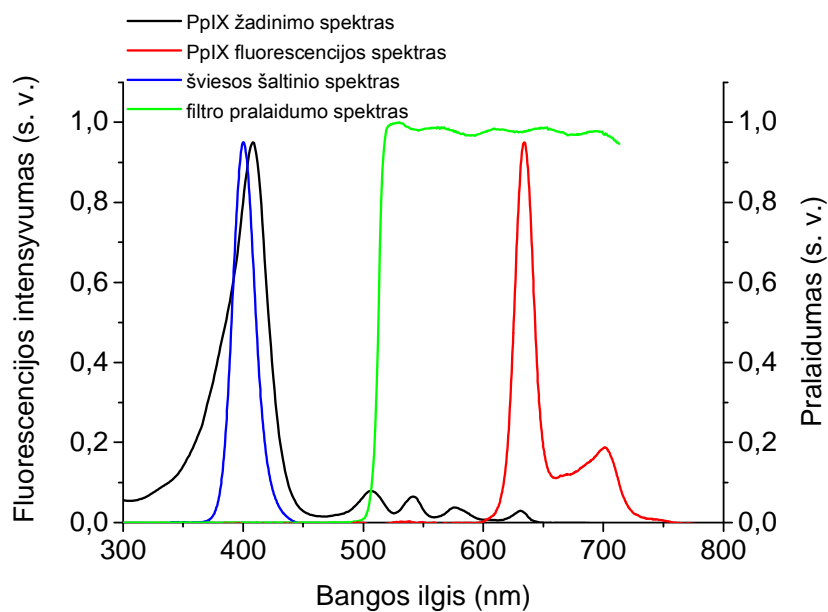
3.5. Fluorescencinė spektroskopija



11 pav. Fluorescencijos spektrų registravimo shema

11 pav. pavaizduota fluorescencijos spektrų registravimo sistema. Fluorescencijos spektrai *in vitro*, *ex vivo* ir *in vivo* buvo registruojami spektrofluorimetru Ocean Optics USB 2000 (FL), kurio matavimo ribos yra nuo 339 nm iki 1026 nm. Fluorescencijos žadinimui naudota Ocean Optics LS-450 lempa (L) su įmontuotu mėlynos šviesos diodu, kurio emituojamos spinduliuotės smailė yra ties 403 nm (403/20 nm, FWHM) (FWHM – spektro plotis pusės intensyvumo aukštyje). Lempos jungties dėka diodo emituojama spinduliuotė sufokusuojama į bifurkacinį šviesolaidį. Bifurkacinį šviesolaidį (BF) sudaro du tarpusavyje sujungti šviesolaidžiai, o trečiame gale atskirų šviesolaidžių optinės skaidulos sueina į vieną. Naudotas „saulutės“ tipo šviesolaidis , kuriame viena šviesolaidžio gija yra centrinė, o kitos šešios išsidėstę aplink ją ratu. Fluorescencijos žadinimui naudota centrinė gija, o fluorescencijos signalo surinkimui naudojamos aplink centrinę giją išdėstytos šviesolaidinės skaidulos. Kiekvienos šviesolaidžio gijos diametras 200 μm. Siekiant atskirti bandinių fluorescenciją nuo išsklaidytos žadinimo

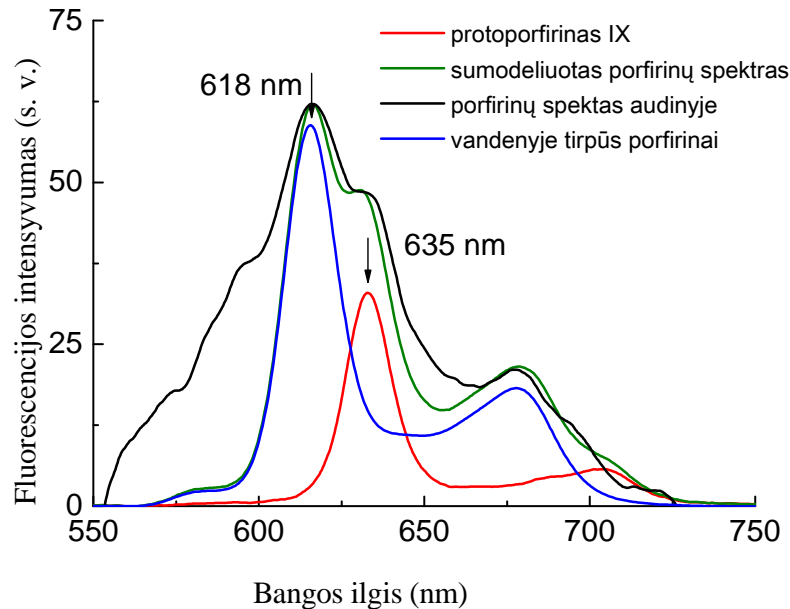
spinduliuotės, bifurkacinio šviesolaidžio išvado gale statoma sistema iš dviejų lęšių ir filtro (F), nepraleidžiančio žadinimui skirtis spinduliuotės (12 pav.), pro kurią bandinio sklaidžiama šviesa šviesolaidžiu patenka į spektrofluorimetrą. Iš spektrofluorimetro signalai perduodami į kompiuterį (PC), kuriame jie registruojami ir išsaugomi OOIBASE32 programa.



12 pav. Protoporfirino IX žadinimo (juodas) ir fluorescencijos (raudonas) spektrai, bei spektroskopinėje sistemoje naudoto šviesos šaltinio spektras (mėlynas) ir emisijos filtro pralaidumo charakteristika

PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės buvo gaunamos iš sensibilizuotų audinių atėmus kontrolinių audinių spektrus, sunormuotus į sensibilizuotų audinių spektrus ties 600 nm, ir intensyvumas matuojamas ties porfirinų smailės maksimalia verte. Audiniuose, kurių endogeninių porfirinų spektruose registruojamos persidengiančios PpIX ir vandenyje tirpių porfirinų fluorescencijos juostos, fluorescencijos intensyvumas vertinamas matuojamas sumodeliuojant PpIX ir vandenyje tirpių porfirinų fluorescencijos spektrų indėlių į bendrą spektrą (13 pav.). Tada ties atitinkamais bangos ilgiais išmatuojami kiekvieno iš porfirinų fluorescencijos intensyvumai. PpIX fluorescencijos intensyvumas registruotas ties 635 nm, o vandenyje tirpių porfirinų – 615-620 nm intervale. Matome, kad jei sumodeliuotas porfirinų

spektras ne visiškai atitinka audinyje išmatuotą porfirinų spektrą, tai reiškia, kad be PpIX ir vandenyje tirpių porfirinų, yra ir kitų fluorofortų fluorescuojančių šioje spektro srityje, juos sužadinus 403 nm spinduliuote (pvz., fotoproduktų).



13 pav. Porfirinų spektras audinyje (juodas) ir protoporfirino IX (raudonas) ir vandenyje tirpių porfirinų (mėlynas) spektrai, žalias – suminis PpIX ir vandenyje tirpių porfirinų spektras

3.5.1. In vitro

Visų bandinių fluorescencijos spektrai buvo matuojami po 2, 4, 8 ir 24 valandų inkubacijos su ALA arba ALA-Me. Iš kiekvieno paciento audinių išskirtų ląstelių ir chondronų buvo paruošiami dvigubi bandiniai kiekvienam laiko taškui. Kiekvienas bandinys buvo matuojamas po 5 kartus. Kiekvieno paciento bandiniams būdingas porfirinų fluorescencijos intensyvumas kiekvienu laiko momentu buvo gautas suvidurkinus visas apskaičiuotas porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertes (viso – $n = 10$). Tada apskaičiuotos kiekvieno paciento bandiniams būdingos porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertės buvo suvidurkintos ir taip gautos eksperimentinės grupės

porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertės kiekvienu laiko momentu. Taip pat matuota ir inkubacinės terpės fluorescencija.

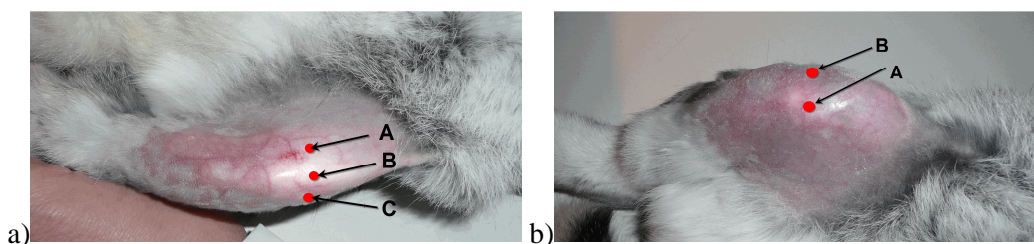
3.5.2. Ex vivo

Kremzlės bandinių fluorescencijos spektrai buvo matuojami po 2, 4, 8 ir 24 valandų inkubacijos su ALA arba ALA-Me. Buvo paruošti kiekvieno paciento kremzlės audinio gabaliukų dvigubi bandiniai kiekvienam laiko taškui. Tolimesnis matavimų protokolai buvo analogiškas tyrimams *in vitro*. Kiekvienas kremzlės bandinys buvo matuojamas po 5 kartus. Kiekvieno paciento kremzlės bandiniams būdingas porfirinų fluorescencijos intensyvumas kiekvienu laiko momentu buvo gautas suvidurkinus visas išmatuotas porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertes ($n = 10$). Tada apskaičiuotos kiekvieno paciento bandiniams būdingos porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertės buvo suvidurkintos ir gautos eksperimentinės grupės porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertės kiekvienu laiko momentu. Taip pat matuota ir inkubacinės terpės fluorescencija.

Po triušių audinių fluorescencijos matavimų *in vivo* atrinkti triušiai buvo numarinti ir paimami audinių pavyzdžiai. Endogeninių porfirinų fluorescencijos tyrimams *ex vivo*, buvo imami sinovijos, kremzlės, odos, raumens, raiščio, sausgyslės audiniai iš uždegiminės dešinės ir kontrolinės kairės kojų. Audinių fluorescencijos spektrai *ex vivo* buvo matuojami praėjus 4 valandoms po ALA ar ALA-Me preparato suleidimo, iškart po to, kai triušiai buvo numarinti. Kiekvienas audinio bandinys matuotas 5 kartus. Tada apskaičiuoti porfirinų fluorescencijos intensyvumai suvidurkinti ir gauti vieno triušio audiniams būdingi porfirinų fluorescencijos intensyvumai. Vėliau apskaičiuoti vieno triušio audiniuose esančių porfirinų fluorescencijos intensyvumai suvidurkinti su kitų triušių ir gauta eksperimentinei grupei būdinga vidutinė vertė.

3.5.3. In vivo

Praėjus trims dienoms po AL suleidimo į dešinės kojos sąnario ertmę buvo išmatuoti visų triušių autofluorescencijos spektrai. Visi fluorescencijos spektrai matuoti trijuose kiekvieno sąnario taškuose: vienas – vidinėje sąnario pusėje, vienas – centrinėje ir vienas – išorinėje (14 pav.).



14 pav. a) kairė koja – sveikas kelias; b) dešinė koja – reumatoidinio artrito pažeistas kelias; fluorescenciniams matavimams pasirinktos sritys: A – vidinėje; B – centrinėje; C – išorinėje sąnario pusėse

Praėjus 1, 2, 3 ir 4 valandoms po intrasąnarinės ar intraveninės ALA ar ALA-Me injekcijos buvo išmatuota po du fluorescencijos spektrus kiekviename taške. Tada apskaičiuoti porfirinų fluorescencijos intensyvumai suvidurkinti ir gauta vienam triušiui būdinga porfirinų intensyvumo vertė kiekvienu laiko momentu. Vėliau triušiams būdingos porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertės suvidurkintos ir gauta eksperimentinei grupei būdinga vertė tam tikru laiko momentu po pirmtakų suleidimo.

3.6. Biologinių audinių sensibilizuotų endogeniniai porfirinai paruošimas mikroskopijai

Po intrasąnarinės ALA-Me injekcijos praėjus 3 valandoms triušių kremzlės ir sinovijos audiniai ruošiami mikroskopijos tyrimams. Kadangi PpIX yra nestabilus šviesoje, visas bandinių paruošimas turi vykti minimalaus apšvietimo sąlygomis. Be to, endogeniniais porfiriniais sensibilizuotų audinių negalima fiksuoti formaldehido tirpalu. Todėl audinių preparatai buvo šaldomi

aerozoliu Solidofix[®] (propano/ butano dujos), kuris bandinius sušaldo iki -50 °C, ir pjaustomi kriomikrotomu 15 µ storio pjūviais. Bandinių pjaustymas kriomikrotomijos būdu atliktas praėjus ne daugiau kaip 30 min. nuo audinių išpreparavimo.

Norint gauti tos pačios vietos histologinį vaizdą, atlikus fluorescencinės intensyvumo ir gyvavimo trukmių mikroskopijos tyrimus, audiniai nudažyti greituoju hematoksilino – eozino (HE) dažymo metodu. Greito dažymo metodas buvo optimizuotas kremzlės ir sinovijos audinių dažymui. Dažymo eiga:

Etanolis 96 % – 1 min.;

Vanduo – 1 min.;

Hematoksilinas – 40 sek.;

Vanduo – 3 min.;

70% etanolis ir 0.5% HCl – kol išsiryškina (5 – 10 sek.);

Vanduo – 2 min.;

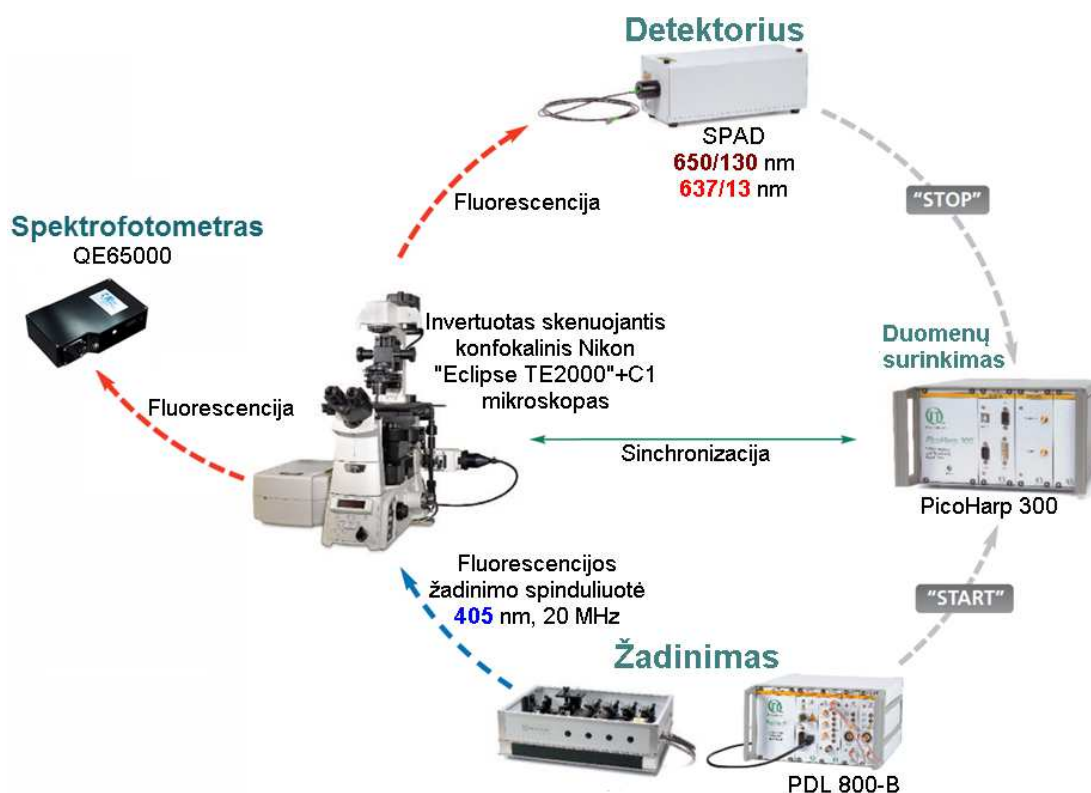
Etanolis 80 %, 96 % – po 5 pamerkimus;

Eosinas Y 0,1% – 20 sek.;

Etanolis 96 %, 100 % – po 10 pamerkimų;

Ksilolas.

3.7. Biologinių audinių pjūvių mikroskopija ir spektroskopija



15 pav. Fluorescencijos intensyvumo ir gyvavimo trukmių mikroskopijos schema su fluorescencijos spektrų registravimo galimybe

3.7.1. Pralaidumo mikroskopija

Histologiniai vaizdai buvo gauti pralaidumo mikroskopijos režimu naudojant Eclipse TE2000 mikroskopą (Nikon, Japonija) ir x40 NA 0,95 Plan Fluor objektyvą. Pralaidumo mikroskopijos vaizdai registruoti spalvota DFC-290 RGB CCD (Leica, Vokietija) kamera.

3.7.2. Fluorescencinė mikroskopija

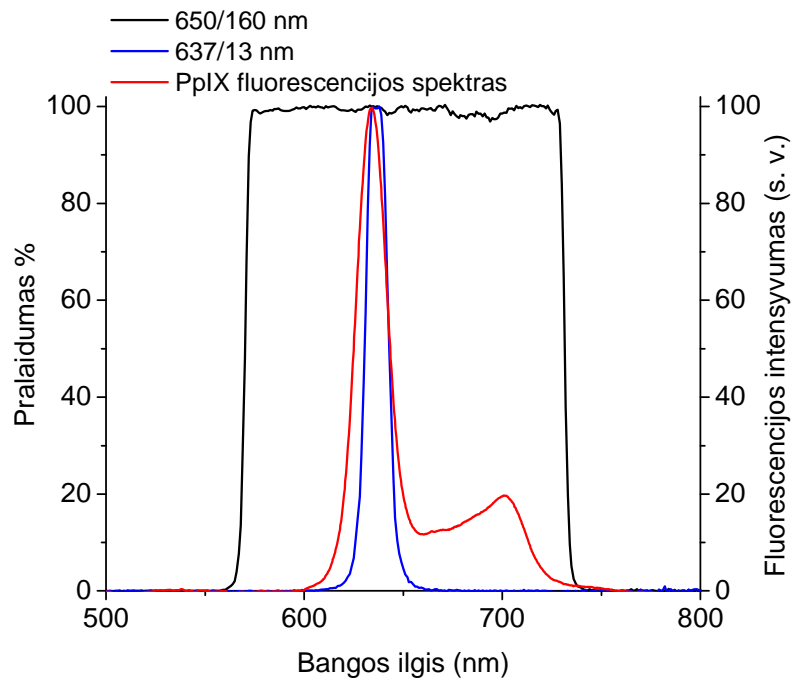
Lazerinė konfokalinė fluorescencinė mikroskopija atlikta Nikon Eclipse TE2000 mikroskopu su Nikon C1si skenavimo sistema ir x40 NA 0,95 Plan Fluor objektyvu. Fluorescencijos žadinimui naudotas diodinis lazeris, kurio

emituojamos spinduliuotės smailė yra ties 405 nm. Detekcijai naudotas standartinis trijų spalvų RBG detektorius, kurio spektrinio pralaidumo sritys yra: B – mėlynas kanalas, 433-467 nm; G – žalias kanalas, 500-590 nm; R – raudonas kanalas, 620-755 nm. Vaizdai apdoroti Nikon EZ-C1 Bronze version 3.80 ir ImageJ 1.43 programine įranga.

3.7.3. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopija (FLIM)

Audinių fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdinimas atliktas Nikon Eclipse TE2000 mikroskopu su Nikon C1si skenavimo sistema ir x40 NA 0,95 Plan Fluor objektyvu. Fluorescencijos sužadinimui naudotas impulsinis diodinis lazeris (PDL 800-B), kurio emituojamos spinduliuotės smailė yra ties 405 nm. Impulsų pasikartojimo dažnis 20 MHz leidžia patikimai registruoti fluorescencijos gyvavimo trukmes iki 50 ns. FLIM atlikta vieno kanalo laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo (time correlated single photon counting – TCSPC) moduliu PicoHarp 300 su 16 ps skyra panaudojant 3200 detektoriaus kanalų. Fluorescencijos gyvavimo trukmės registruotos vieno kanalo pavienių fotonų registravimo detektoriumi (angl. Single photon avalanche diode – SPAD) 650/160 nm ir 637/13 nm spektrinėse srityse (16 pav.). Vieno matavimo metu fluorescencijos gyvavimo trukmės matuojamos viename spektriniame intervale, todėl norint atlikti registravimą kitame intervale reikia pakartoti matavimą pakeitus filtrą. FLIM vaizdai registruojami tol, kol maksimali įvykių vertė pasiekia 1000 vienetų. Vaizdų dydis 256×256 ar 512×512 pikselių. Fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdai apskaičiuoti SymPhoTime v.5.2 programa. Charakteringos gyvavimo trukmės τ ir komponentų skaičius bei santykiniai jų kiekiai apskaičiuoti naudojant SymPhoTime v.5.2 programą. Vertinant itin trumpas fluorescencijos gyvavimo trukmes (ps eilės) buvo atliekama fluorescencijos gesimo signalo dekonvoliucijos procedūra. Šios procedūros metu, skaičiuojant gyvavimo trukmes, yra atsižvelgiama į lazerio spinduliuotės impulso trukmę bei paties prietaiso techninius parametrus ir pasirinktą signalo registravimo schemą. Visa

tai vadinama prietaiso atsako funkcija (IRF - angl. instrument response function), kuri buvo išmatuojama naudojant eritrozina b²⁴⁸.



16 pav. FLIM naudotų filtrų pralaidumo charakteristikos ir PpIX fluorescencijos spektras

3.7.4. Fluorescencinė audinių pjūvių spektroskopija

Fluorescencinė audinių pjūvių spektroskopija atlikta naudojant Nikon Eclipse TE2000 mikroskopą su Nikon C1si skenavimo sistema ir x20 NA 0,95 Plan Fluor objektyvu bei OceanOptics QE65000 spektrofotometrą. Fluorescencijos žadinimui naudotas diodinis lazeris, kurio emituojamos spinduliuotės smailė yra ties 405 nm. Vienas fluorescencijos spektras registruojamas 5 sekundes pažymėtą bandinio vietą skenuojant žadinančia spinduliuote. Atliekant PpIX fotoblukimo (šviesos sukkelto fluorescencijos intensyvumo mažėjimo) eksperimentą pažymėta bandinio vieta buvo skenuojama iki 15 min., nuolat registruojant fluorescencijos spektrus. Matavimai atlikti naudojant Nikon EZ-C1 Bronze version 3.80 ir OOIBASE32 programas.

3.8. Statistika

Rezultatų išsibarstymui grupėse įvertinti buvo apskaičiuoti vidurkių standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklovimo intervalai. Standartinis nuokrypis nusako atsitiktinio dydžio įgyjamų reikšmių sklaidą apie vidurkį. Pasiklovimo intervalas, tai intervalas, kuriame, tikėtina, yra tikroji matuojamo dydžio vertė. Reikšmingumo lygmuo (pvz. 95 %) yra tikimybė, jog tikrasis matuojamo dydžio vidurkis iš tiesų yra šiame intervale. Pasiklovimo intervalai apskaičiuojami pagal formules:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}; \quad a = \frac{t(n,P)\sigma}{\sqrt{n}},$$

kur σ – standartinis nuokrypis, n – matavimų skaičius, \bar{x} – matavimų aritmetinis vidurkis, x_i – i -ojo matavimo reikšmė, $t(n,P)$ – Stjudento koeficientas esant $n-1$ laisvės laipsnių (mūsų atveju n yra pacientų ar triušių grupėje skaičius) ir P pasiklovimo lygmeniui, a – didžiausia reikšmė, kuria gali skirtis nustatytas vidurkis nuo realiai esančio (esant pasirinktam pasiklovimo lygmeniui). Taigi, didinant imtį, mažinamas pasiklovimo intervalo ilgis. Kuo didesnis n , tuo trumpesnis pasiklovimo intervalas. Pasiklovimo intervalo ilgis su 95 % pasiklovimo lygmeniu apytiksliai lygus $2 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, esant matavimų skaičiui $n = 10$, ir $4 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, kai $n = 3$ ²⁴⁹, čia $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ – standartinė paklaida.

Porfirinų fluorescencijos intensyvumų skirtumams toje pačioje eksperimentinėje grupėje įvertinti (pvz., PpIX intensyvumų skirtumams RA sergančių pacientų ląstelėse po inkubacijos ALA ar ALA-Me; triušių kontrolinėje ir uždegiminėje kojose) buvo taikomas Vilkoksono ženklų kriterijus priklausomoms imtims. Skirtumų įvertinimui skirtingose eksperimentinėse grupėse (pvz., PpIX intensyvumų skirtumai RA ar OA sergančių pacientų ląstelėse po inkubacijos ALA; triušių uždegiminės kojos

audiniuose po ALA ar ALA-Me injekcijos) buvo taikomas Manio-Vitnio-Vilkoksono kriterijus.

Duomenys pateikti atvaizduojant aritmetinį vidurkį, standartinę nuokrypį ir pasiklovimo intervalus esant 95 % pasiklovimo lygmeniui. Apskaičiuotai tikimybės reikšmei (p) esant mažesnei už pasirinktą reikšmingumo lygmenį 0,05, įvertinti dviejų imčių skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais.

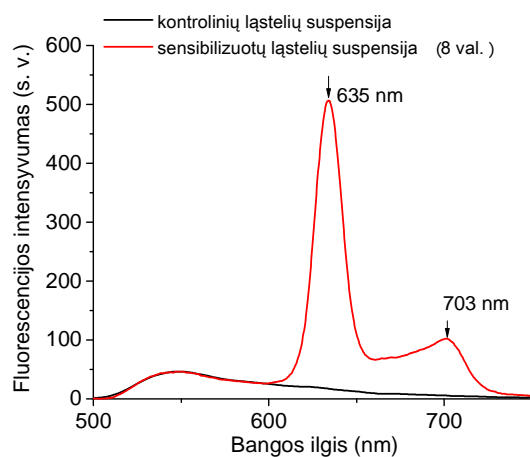
4. REZULTATAI

4.1. RA ir OA pacientų sinoviocitų bei OA pacientų chondronų ir kremzlės bandinių, sensibilizuotų endogeniniais porfiriniais, spektroskopiniai tyrimai

Norint išsiaiškinti, ar didesnis RA sergančių pacientų sąnarių uždegimas negu OA atveju daro įtaką endogeninių porfirinų kaupimuisi audiniuose, jų sintezę indukavus ALA ar ALA-Me pirmtakais, buvo atlikti sensibilizacijos eksperimentai iš RA ar OA sergančių pacientų išskirtuose sinoviocituose. Taip pat endogeninių porfirinų kaupimasis buvo tirtas OA pacientų chondronuose *in vitro* ir kremzlės bandiniuose *ex vivo*.

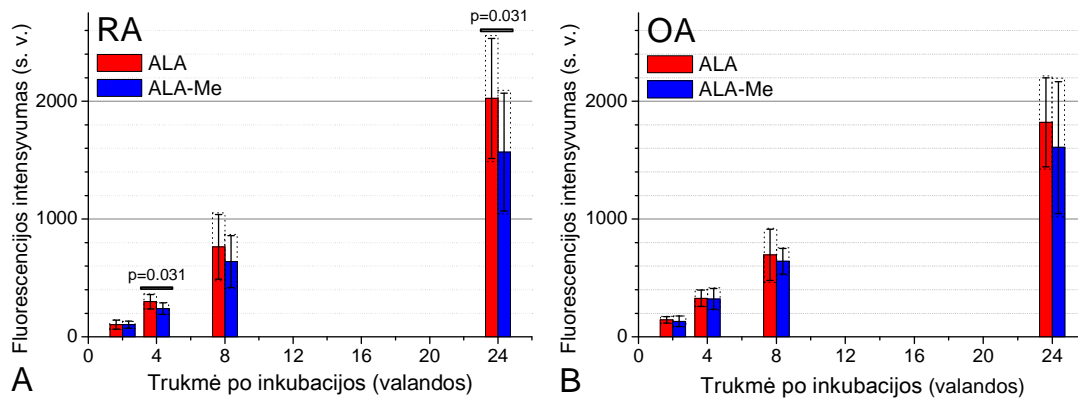
4.1.1. Sinoviocitų sensibilizacijos tyrimai

Atlikti spektroskopiniai tyrimai patvirtino, kad RA ar OA sergančių pacientų sinoviocitai sugeba sukaupti perteklinius endogeninių porfirinų kiekius po inkubacijos su ALA ar ALA-Me. Būdingi kontrolinių ar inkubuotų su ALA ar ALA-Me sinoviocitų suspensijų spektrai pateikti 17 pav. Sensibilizuotų ląstelių suspensijų spektruose aiškiai matomos PpIX fluorescencijai būdingos dvi smailės ties 635 nm ir 700 nm. Kontrolinių ląstelių suspensijų, nepaveiktų jokių pirmtaku, fluorescencijos spektruose nebuvo užregistruotos jokios smailės būdingos endogeniniams porfirinams 24 valandų laikotarpiu inkubuojant ląsteles Tyroido terpėje.



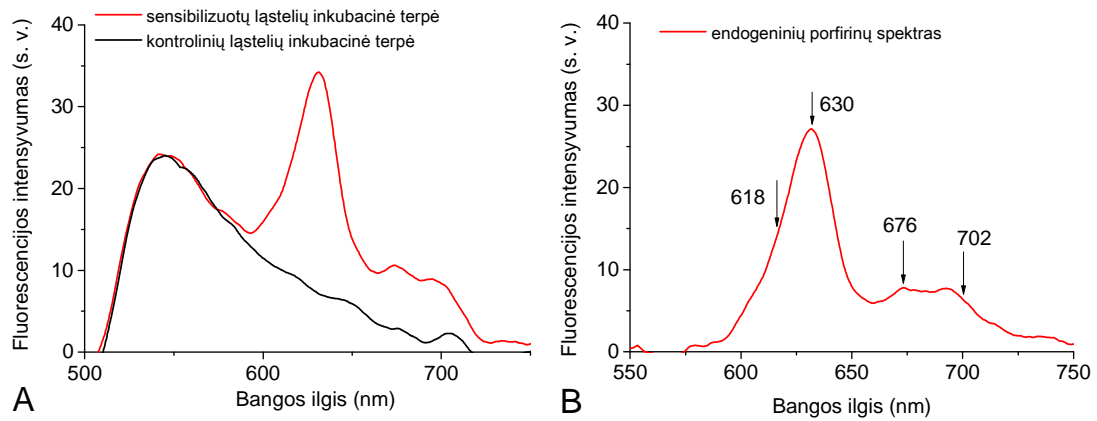
17 pav. Būdingi kontrolinių ir sensibilizuotų (inkubuota 8 val. su ALA arba ALA-Me) sinoviocitų suspensijų PBS fluorescencijos spektrai

Apskaičiuotas vidutinių PpIX fluorescencijos intensyvumų kitimas RA ($n_p = 6$) ir OA ($n_p = 6$) pacientų sinoviocituose per 24 valandas pavaizduotas 18 pav. Didesnis vidutinis PpIX fluorescencijos intensyvumas tiek RA, tiek OA pacientų sinoviocituose buvo po inkubacijos su ALA, lyginant su ALA-Me. Didžiausi skirtumai stebimi po 24 valandų inkubacijos, tačiau statistškai patikimas skirtumas nustatytas tik RA sinoviocituose po 4 ir 24 valandų inkubacijos. Remiantis spektroskopiniais matavimais, nėra statistškai patikimo skirtumo ($p > 0,128$) ir tarp RA bei OA sinoviocitų sukaupto PpIX kiekio, įvertinto tais pačiais laiko momentais. Tačiau reiktų paminėti, kad ryškių PpIX fluorescencijos intensyvumų ir kaupimosi skirtumų buvo pastebėta tarp individualių pacientų ląstelių bandinių tiek RA, tiek OA pacientų grupėse.



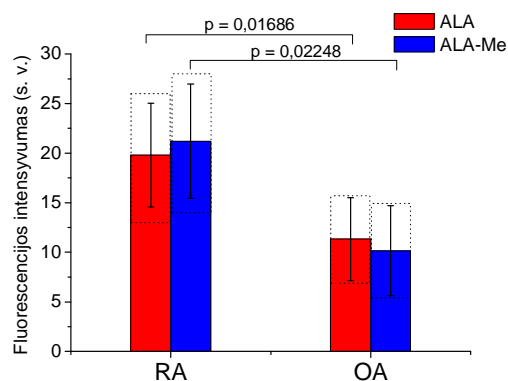
18 pav. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės sinoviocitų, išskirtų iš RA (A, $n_p = 6$) ar OA (B, $n_p = 6$) sergančių pacientų, suspensijose skirtingais laiko momentais po inkubacijos su 1 mM ALA ar 1 mM ALA-Me. Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklioavimo intervalai (taškinės linijos)

Iš karto po sinoviocitų suspensijų spektrų matavimų buvo matuojami ir inkubacinės terpės fluorescencijos spektrai. Jokių endogeniniams porfirinams būdingų smailių nebuvo užregistruota inkubacinėje terpėje po 2, 4 ir 8 valandų inkubacijos su ALA ar ALA-Me. Po 24 valandų inkubacijos su ALA ar ALA-Me RA ir OA pacientų sinoviocitų inkubacinėje terpėje buvo užregistruota endogeninių porfirinų fluorescencija (19 pav. A). Endogeninių porfirinų spektre matomos smailės ties 630 nm ir 700 nm atitinka PpIX fluorescencijos smailės vandeninėje terpėje (19 pav. B). Taip pat porfirinų spektre matoma ir vandenyje tirpių porfirinų fluorescencijai būdingos juostos.



19 pav. A – išmatuoti kontrolinių ir sensibilizuotų ląstelių inkubacinės terpės fluorescencijos spektrai po 24 val. inkubacijos su ALA ar ALA-Me; B – skirtuminis endogeninių porfirinų spektras

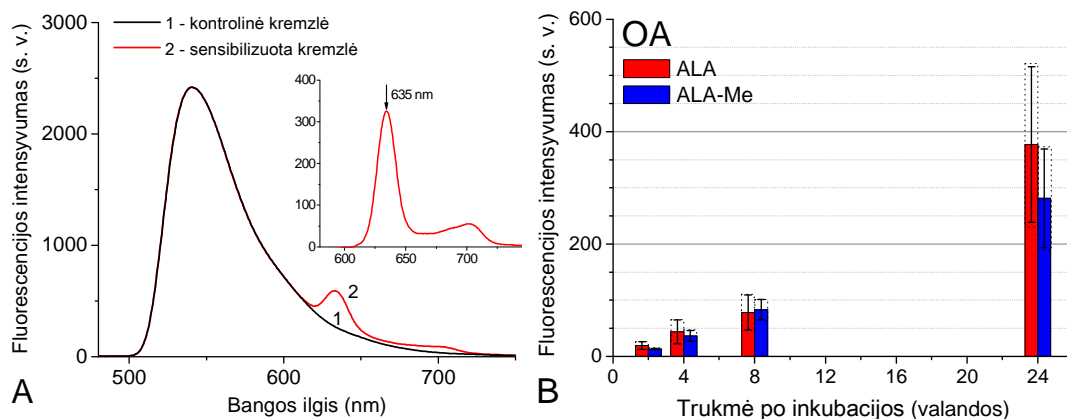
Apskaičiuoti vidutiniai PpIX fluorescencijos intensyvumai inkubacinėje ląstelių terpėje po 24 valandų inkubacijos su ALA ar ALA-Me yra apie 100 kartų mažesni RA atveju ir 200 kartų – OA atveju negu pačiuose sinoviocituose (20 pav.). Remiantis spektroskopiniais duomenimis inkubacinėje terpėje esančio PpIX kiekis nepriklauso nuo naudoto pirmtako, tačiau statistiškai patikimas PpIX kiekio skirtumas yra RA ir OA pacientų sinoviocitų inkubacinėse terpėse (20 pav.).



20 pav. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės sinoviocitų, išskirtų iš RA (A, $n_p = 6$) ar OA (B, $n_p = 6$) sergančių pacientų, inkubacinėse terpėse praėjus 24 valandoms po inkubacijos su 1 mM ALA ar 1 mM ALA-Me. Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklioavimo intervalai (taškinės linijos)

4.1.2. Kremzlės bandinių sensibilizacijos tyrimai

Būdingi kremzlės savitosios fluorescencijos ir sensibilizuotų kremzlės bandinių spektrai pavaizduoti 21 pav. A. Skirtuminiame jų spektre aiškiai galima identifikuoti tik PpIX fluorescenciją su smailėmis ties 635 nm ir apie 700 nm. Viso tyrimo metu kontroliniuose kremzlės bandiniuose nebuvo užregistruota jokių endogeninių porfirinų fluorescencija.

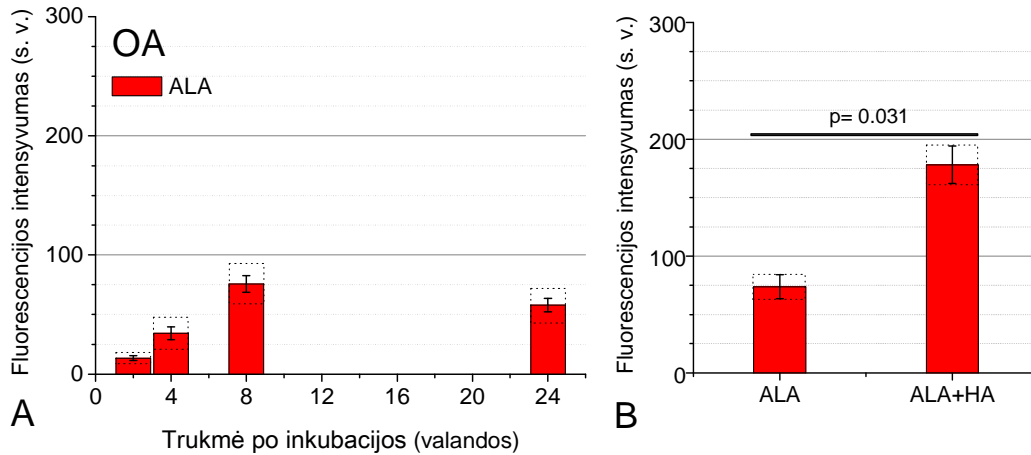


21 pav. A – būdingi kontrolinių (juoda linija) ir sensibilizuotų (raudona linija), t.y., inkubuotų 24 val. su 1 mM ALA ar ALA-Me, OA sergančių pacientų kremzlės bandinių fluorescencijos spektrai; įklija – skirtuminis spektras. B – vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumų vertės OA pacientų ($n_p = 6$) kremzlės bandiniuose skirtingais laiko momentais po inkubacijos su 1 mM ALA ar 1 mM ALA-Me pirmtakais. Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklovimo intervalai (taškinės linijos)

Vidutinių PpIX fluorescencijos intensyvumų verčių kitimas OA pacientų ($n_p = 6$) kremzlės bandiniuose skirtingais laiko momentais po inkubacijos su 1 mM ALA ar 1 mM ALA-Me pirmtakais pavaizduotas 21 pav., B. Nei vienu laiko momentu nebuvo gautas statistiškai patikimas skirtumas ($p > 0,184$) tarp PpIX fluorescencijos intensyvumų kremzlės bandiniuose po inkubacijos su ALA ar ALA-Me. Tačiau svarbu yra tai, kad PpIX fluorescencijos intensyvumas kremzlės bandiniuose yra nuo penkių iki dešimt kartų mažesnis negu sinoviocitų suspensijose ($p = 0,005$ kiekvienu laiko momentu). Didžiausias intensyvumų santykis (8-10) yra iki 8 valandų inkubacijos laikotarpiu, o po 24 valandų šis santykis (apie 5) sumažėja. Kontrolinių ir sensibilizuotų kremzlės bandinių inkubacinėse terpėse nebuvo užregistruota jokių endogeninių porfirinų fluorescencija viso tyrimo metu.

Kadangi sinoviocitų ir kremzlės bandinių paruošimo būdas buvo skirtingas, siekiant tiksliau įvertinti endogeninių porfirinų kaupimąsi kremzlės audinyje,

buvo atlikti tyrimai kremzlės modelyje *in vitro* – chondronuose. Pasirinkus chondronų modelį iki minimumo sumažinamos galimos paklaidos dėl nevienodo chondrocytų ir ląstelių kiekio bei jų fluorescencijos sužadavimo sąlygų.



22 pav. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumų vertės OA pacientų chondronų suspensijose: A – skirtingais laiko momentais po inkubacijos su 1 mM ALA ($n_p = 3$); B – po 12 valandų inkubacijos tik su 1 mM ALA ar kartu su 0,25 % natrio hialuronatu (HA) ($n_p = 6$). Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklovimo intervalai (taškinės linijos)

Apskaičiuotos vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės chondronų suspensijose (22 pav. A) ir kremzlės bandiniuose nėra reikšmingai skirtingos ($p > 0,366$) per pirmas 8 inkubacijos valandas su ALA. Tačiau po 24 valandų inkubacijos, PpIX fluorescencijos intensyvumas reikšmingai ($p = 0,028$) sumažėjo, lyginant su intensyvumu kremzlės bandiniuose. Remiantis spektroskopiniais duomenimis gauta, kad OA sergančių pacientų chondronai, panašiai kaip ir kremzlės bandiniai, sukauptė apie dešimt kartų mažiau PpIX negu sinoviocitai (18 pav.). Kaip ir tikėtasi, porfirinų fluorescencija kontrolinės grupės chondronuose ir visose inkubacinėse terpėse užregistruota nebuvo.

Norint išsiaiškinti, ar HA turi įtakos endogeninių porfirinų sintezei chondronuose, juos inkubuojant su 1 mM ALA, į inkubacinę terpę buvo pridėta 0,25 % natrio hialuronato preparato ir inkubuota 12 valandų.

Kontrolinės grupės chondronai buvo inkubuojami tik su 1 mM ALA. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės sensibilizuotų tik su ALA bei su ALA ir HA OA sergančių pacientų ($n_p = 6$) chondronų suspensijose palygintos 22 pav. B. Šios vertės po 12 valandų inkubacijos yra reikšmingai ($p = 0,031$) didesnės grupėje inkubuotoje kartu su HA. Taigi HA daro įtaką PpIX sintezei chondronuose.

4.1.3. Tyrimų su pacientų pooperacine medžiaga rezultatų aptarimas

Kadangi vis dar nėra minimaliai invazinio metodo, ypač smulkiųjų sąnarių atveju, RA sergančių pacientų uždegiminei sinovijai pašalinti, bandoma endogeniniais porfiriniais pagrįstą sensibilizaciją taikyti diagnostikai ir terapijai reumatoidinio artrito atveju. Kad fotodinaminė terapija būtų saugus ir tinkamas metodas slopinti sinovijos uždegimą sąnariuose, pirmiausia reikia įsitikinti, ar nebus sukelti kremzlės pažeidimai. Todėl labai svarbu ištirti endogeninių porfirinų kaupimosi skirtumus sinovijos ir kremzlės audiniuose po ALA ar jos darinių panaudojimo.

RA ir OA sergančių pacientų sinoviocitų spektroskopiniai tyrimai parodė, kad dominuojantis endogeninis porfirinas po inkubacijos su ALA ar ALA-Me yra PpIX. Vidutinis PpIX fluorescencijos intensyvumas abiejose ląstelių grupėse buvo nereikšmingai didesnis beveik visais laiko momentais po inkubacijos su ALA negu su ALA-Me (18 pav.). Toks pat rezultatas buvo gautas ir Dietze ir kt. darbe²⁵, kuriame pademonstruota, kad nėra PpIX kaupimosi skirtumų po ALA ar ALA-Me inkubacijos sinoviocituose, išskirtuose iš pacientų sergančių RA bei OA. Šis PpIX kaupimosi skirtumų nebuvimas patvirtina ir kitų tyrimų rezultatus, kad *in vitro* ALA-Me indukuoja mažesnius ar beveik tokius pat PpIX kiekius, kaip ir ALA^{140,250}. Tuo tarpu tyrimuose *in vivo* yra pademonstruoti priešingi rezultatai, ir ALA-Me pateikiamas kaip pranašesnis PpIX pirmtakas^{27,167}. Skirtingai negu Dietze ir kt.²⁵, kurie pademonstravo, kad

RA sergančių pacientų sinoviocitai sukaupia dvigubai daugiau PpIX negu OA pacientų, mes negavome reikšmingų skirtumų tarp šių pacientų grupių sinoviocitų. Šis nesutapimas gali būti dėl į mūsų tyrimą įtraukto didesnio individualių pacientų skaičiaus (RA $n_p = 6$; OA $n_p = 6$) grupėse, kuriose buvo aptikta žymių PpIX kaupimosi skirtumų tarp individualių pacientų ląstelių. Taip pat Dietze ir kt.²⁵ PpIX fluorescencijos intensyvumo vertes pateikia sunormuotas į baltymų kiekį ląstelėse, o tai apsunkina rezultatų interpretavimą ir vertinimą. Mūsų tyrime apskaičiuotas panašus PpIX kiekis RA ar OA sergančių pacientų sinoviocituose *in vitro* gali būti sąlygotas specifinės mikroaplinkos, būdingos sinoviocitams *in vivo* tam tikros ligos atveju, nebuvimo. Pavyzdžiui, aktyvesnis uždegimas RA atveju gali labiau skatinti sinoviocitų metabolizmą negu OA atveju ir, tikėtina, kaupti didesnius PpIX kiekius^{251,252}.

Remiantis atlikto tyrimo duomenimis akivaizdžiai matoma, kad OA sergančių pacientų kremzlės bandiniai (21 pav.) ir chondronai (22 pav.) kaupia PpIX po inkubacijos su ALA, tačiau žymiai mažiau negu sinoviocitai. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės reikšmingai nesiskyrė kremzlės bandiniuose po inkubacijos su ALA ar ALA-Me, ir buvo beveik tokios pat kaip, ir chondronuose pradinio inkubacijos laikotarpiu (per pirmas 8 valandas). PpIX fluorescencijos intensyvumas chondronuose po 24 valandų inkubacijos su ALA buvo apie 6 kartus mažesnis negu kremzlės bandiniuose, kuriuose PpIX fluorescencijos intensyvumas augo viso eksperimento metu (21 pav. B). Toks PpIX fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas chondronuose negali būti paaiškintas PpIX išskyrimu į inkubacinę terpę, nes jos fluorescencijos spektruose nebuvo užregistruota jokių porfirinų fluorescencija. Žinoma, kad OA sergančių pacientų chondrocitai gamina perteklinius tarpląstelinės matricos metaloproteinazių (MMP) ir reaktyviųjų deguonies formų (ROS) kiekius, kurie aktyviai dalyvauja RA ir OA patologijoje^{253,254}. Gauti spektroskopiniai duomenys neleidžia tiksliai paaiškinti PpIX kiekio sumažėjimo chondronuose,

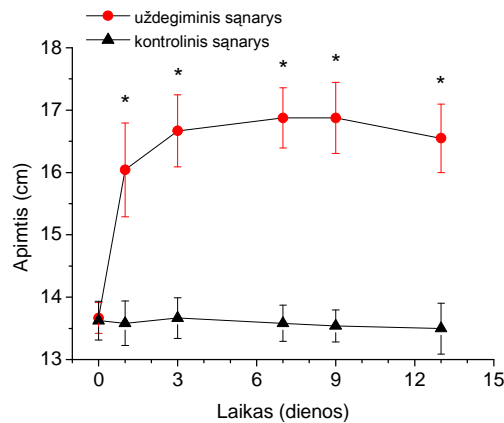
todėl vienas iš galimų veiksnių, paaiškinančių šį sumažėjimą, galėtų būti oksidacinė PpIX degradacija sukelta padidėjusio ROS kiekio chondronuose.

Norint išsiaiškinti, kokią įtaką hialurono rūgšties preparatų naudojimas galėtų turėti PpIX indukcijai kremzlės audinyje, chondronai, kaip kremzlės modelis, buvo inkubuojami kartu su ALA ir HA. Spektroskopiniai duomenys parodė, kad chondronuose po 12 val. inkubacijos su ALA ir HA PpIX kiekis buvo reikšmingai ($p = 0,031$) didesnis negu chondronuose inkubuotuose tik su ALA. Didesnis PpIX kaupimasis chondronuose pridėjus HA gali būti sąlygotas keleto faktorių. Remiantis literatūra, HA palengvina vaistų pernašą į ląsteles²⁵⁵, taigi HA galėjo palengvinti ir ALA patekimą į chondrocitus per juos gaubiančią matricą. Be to, ALA sąveikaujant su HA galėjo padidėti jos stabilumas, sumažėjus dimerizacijos galimybei. Yra žinoma, kad HA sinoviniame skystyje prie chondrocitų jungiasi per CD44 receptorių^{256,257} ir taip stimuliuoja chondrocitų metabolinį aktyvumą ir proliferaciją, o tai juose galėtų padidinti ir PpIX sintezės aktyvumą. HA pasižymi antioksidaciniu poveikiu ir yra taikinyms reaktyviesiems deguonies formoms²⁵³, todėl taip gali būti sumažinta oksidacinė chondrocituose esančio PpIX degradacija.

4.2. Spektroskopiniai EP tyrimai eksperimentiniame triušių AIA modelyje

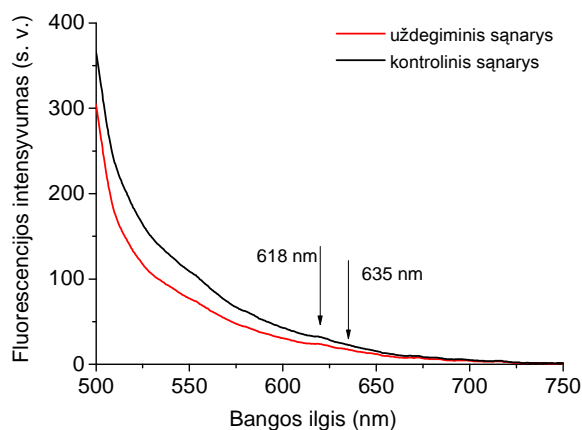
4.2.1. In vivo

Kadangi *in vitro* tyrimų metu gauti rezultatai dažnai būna netapatūs ar netgi priešingi *in vivo* gautiems rezultatams, ALA ir ALA-Me savybės indukuoti PpIX kaupimąsi reumatoidinio artrito atveju buvo tiriamos triušių AIA monoartikulinio artrito modelyje. Gyvūnų pasirinkimą lėmė tai, kad triušio kelio sąnarys yra didesnis negu pelės ar žiurkės ir primena žmogaus rankos sąnarį²⁵⁸. Kitų mokslininkų darbuose triušiai kaip eksperimentiniai gyvūnai naudojami FDT vyksmams tirti. Spektroskopiškai buvo vertinamas PpIX susikaupimas gyvūnų odoje *in vivo* bei audiniuose *ex vivo* po intrasąnarinės (i.a.) ar intraveninės (i.v.) ALA ar ALA-Me injekcijos. Artrito išsivystymas susijęs su persistuojančiu uždegiminiu atsaku imunizuotame kelio sąnaryje ir pasireiškia sąnario apimties padidėjimu, todėl viso eksperimento metu buvo matuojamos triušių kelių apimtys. 23 pav. matyti, kad po AL injekcijos į sąnario ertmę staigiai padidėjo imunizuoto kelio apimtis, t.y. buvo sukeltas ūmus uždegimas, kuris skatina artrito išsivystymą. Šis uždegiminio kelio sąnario apimties padidėjimas išliko reikšmingai nepakitęs viso eksperimento metu. Tuo tarpu kontrolinės kojos sąnario apimtis nepakito po AL injekcijos bei išliko tokia pati viso eksperimento metu.



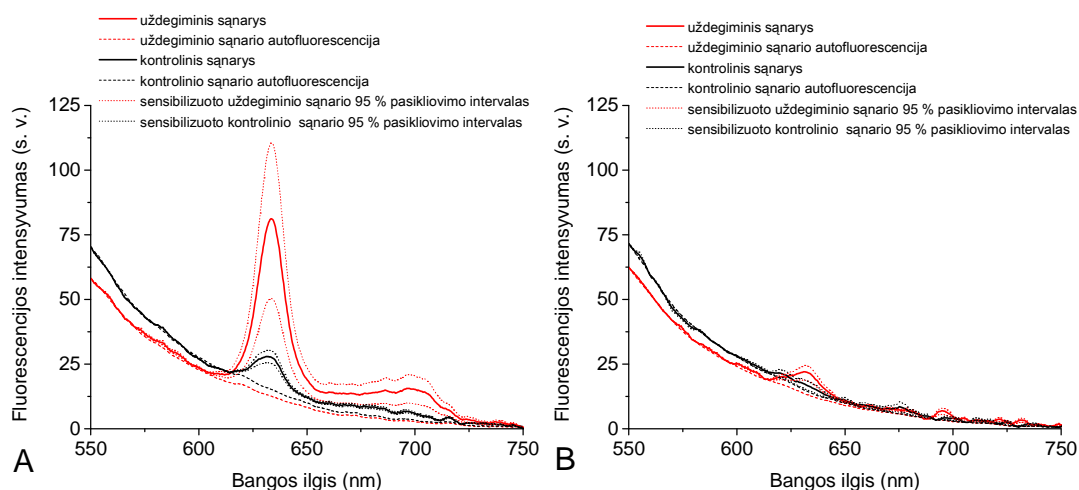
23 pav. Triušių ($n_{tr} = 28$; kiekviename eksperimentiniame taške ne mažiau kaip 4) sąnarių apimtys po intrasąnarinės AL injekcijos. ● – uždegiminis sąnarys, ▲ – kontrolinis sąnarys. Statistiškai patikimas apimčių skirtumas: * – $p < 0,05$

Praėjus ne mažiau kaip trims dienoms po intrasąnarinės AL injekcijos buvo išmatuoti visų triušių uždegiminės ir kontrolinės kojos sąnarių savitosios fluorescencijos spektrai. Užregistruotų savitosios fluorescencijos spektrų didžiausias intensyvumas yra trumpabangėje spektro srityje ir mažėja ilgėjant bangos ilgiui. Vidutinis uždegiminių sąnarių savitosios fluorescencijos spektro intensyvumas srityje nuo 500 nm iki 700 nm yra mažesnis negu kontrolinių kelio sąnarių (24 pav.). Taip pat net 61 % triušių savitosios fluorescencijos spektruose buvo aptikti vandenyje tirpių porfirinų fluorescencijos pėdsakai, kurių fluorescencijos juosta yra ties 620 nm, tačiau nebuvo aptikta PpIX fluorescencija.



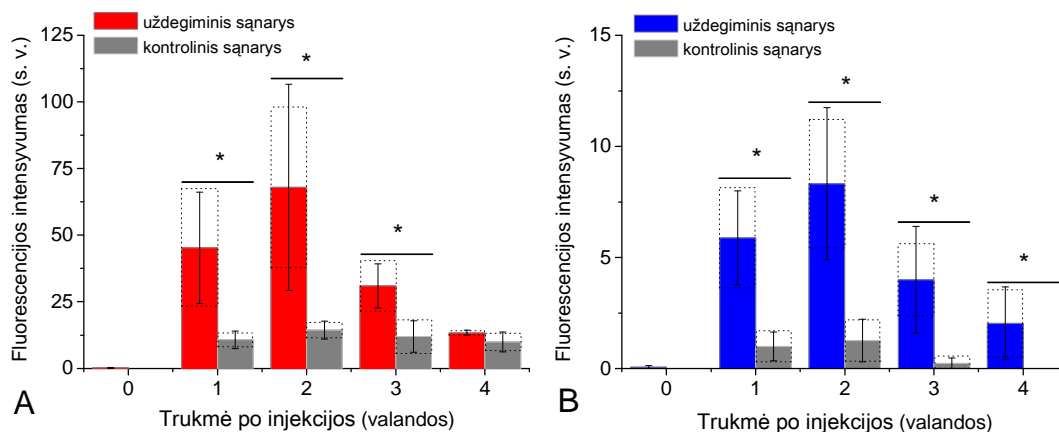
24 pav. Vidutiniai triušių ($n_{tr} = 28$) uždegiminių (raudona linija) ir kontrolinių (juoda linija) kelio sąnarių savitosios fluorescencijos spektrai

Atlikus sveikų ir uždegiminių sąnarių spektroskopinius matavimus, į triušių uždegiminio sąnario ertmę ar į ausies veną buvo suleidžiamas ALA ar ALA-Me tirpalas. Po preparatų suleidimo fluorescencijos spektrai matuoti kas valandą iki 4 valandų. Skirtingai negu savitosios fluorescencijos spektruose, sensibilizuotų audinių spektruose matoma PpIX fluorescencija su smailėmis ties 635 nm ir 700 nm (25 pav.). Didžiausias vidutinis PpIX fluorescencijos intensyvumas matuojant odos paviršiuje buvo uždegiminiame sąnaryje po 2 valandų nuo i.a. ALA injekcijos. Ši vertė buvo apie penkis kartus didesnė negu kontroliniame sąnaryje. Tuo tarpu po i.a. ALA-Me injekcijos PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminiame sąnaryje buvo labai silpnas ir beveik neaptinkamas kontroliniame sąnaryje (25 pav.).



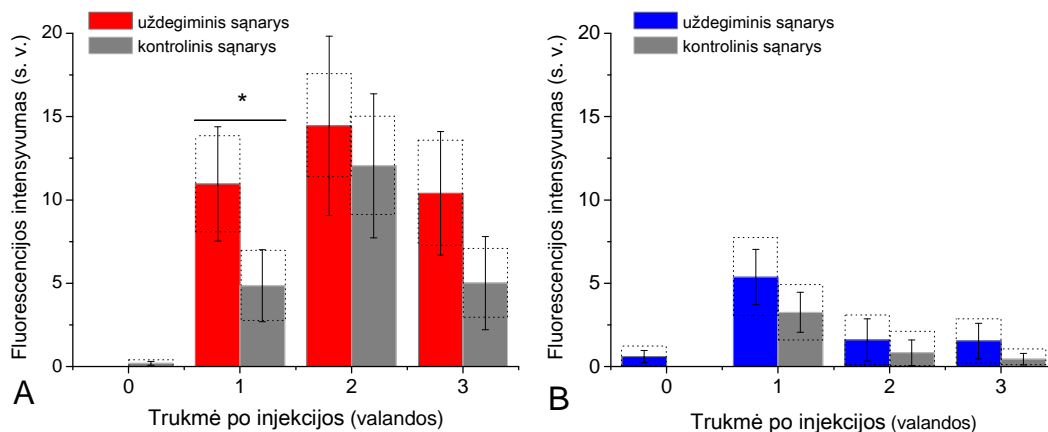
25 pav. Vidutiniai uždegiminių (raudona linija) ir kontrolinių (juoda linija) kelio sąnarių fluorescencijos spektrai praėjus 2 valandoms po i.a. ALA ($n_{tr} = 7$) (A) ar ALA-Me ($n_{tr} = 9$) (B) injekcijos. Brūkšninėmis linijomis pavaizduoti atitinkamų sąnarių savitosios fluorescencijos spektrai, taškinėmis – 95 % pasiklovimo intervalai

26 pav. pateiktos vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės skirtingais laiko momentais. Remiantis spektroskopiniais duomenimis didžiausias PpIX kiekių skirtumas tarp uždegiminio ir kontrolinio sąnario buvo praėjus 2 val. po i.a. ALA injekcijos, o statistiškai patikimas skirtumas išliko 3 valandas (26 pav., A). Po i.a. ALA-Me injekcijos patikimas PpIX kiekio skirtumas buvo viso tyrimo metu, tačiau PpIX fluorescencijos intensyvumas buvo nykstamai mažas, o didžiausia vertė net 8 kartus mažesnė negu po ALA injekcijos.



26 pav. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose registruojant odos paviršiuje skirtingais laiko momentais po i.a. ALA ($n_{tr} = 7$) (A) ar ALA-Me ($n_{tr} = 9$) (B) injekcijos. Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklivimo intervalai (taškinės linijos). Statistiškai patikimas intensyvumų skirtumas: * – $p < 0,05$

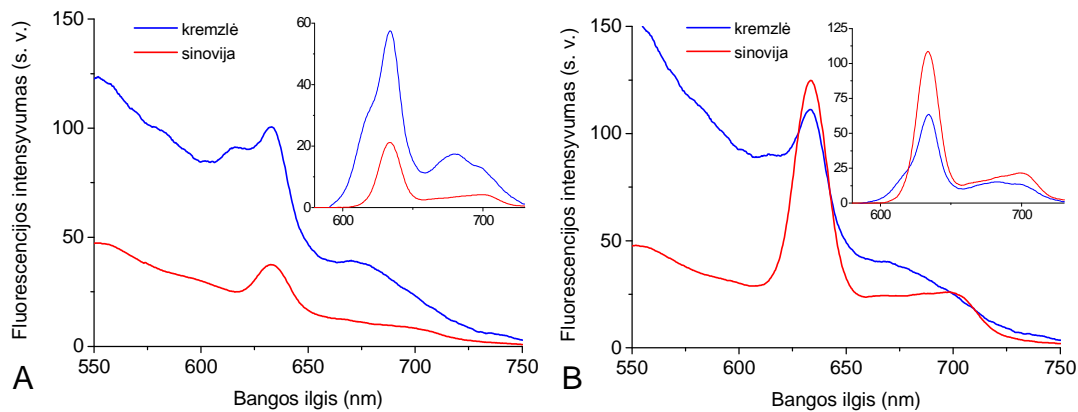
Po intraveninės ALA injekcijos PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės matuojant odos paviršiuje buvo apie penkis kartus mažesnės negu po i.a. injekcijos, o statistiškai patikimas skirtumas tarp uždegiminio ir kontrolinio sąnario buvo tik pirmą valandą po suleidimo (27 pav. A). Suleidus ALA-Me intraveniškai, tiek uždegiminiame, tiek kontroliniame sąnariuose buvo registruojamas nykstamai mažas PpIX fluorescencijos intensyvumas (27 pav. B).



27 pav. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose registruojant odos paviršiuje skirtingais laiko momentais po i.v. ALA ($n_{tr} = 5$) (A) ar ALA-Me ($n_{tr} = 3$) (B) injekcijos. Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklivimo intervalai (taškinės linijos). Statistiškai patikimas intensyvumų skirtumas: * – $p < 0,05$

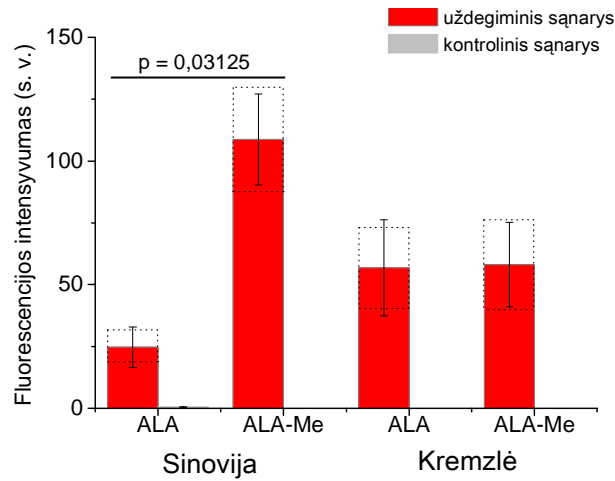
4.2.2. Ex vivo

Atlikus spektroskopinius tyrimus *in vivo* triušiai buvo numarinti ir paimti audinių bandiniai tyrimams *ex vivo*. Audinių fluorescencijos spektrai išmatuoti ne vėliau kaip 5 min. po bandinių paėmimo. Sinovijos ir kremzlės audinių fluorescencijos spektrai po i.a. ALA ar ALA-Me injekcijos skyrėsi endogeninių porfirinų juostų sudėtimi bei intensyvumu. Kremzlės bandiniuose raudonojoje spektro srityje užregistruotos daugiau nei dvi fluorescencijos juostos. Tai reiškia, kad kremzlėje yra kelių rūšių endogeninių porfirinų. Atlikus spektrų modeliavimą (žiūrėti skyrelį 6.5.) buvo išsiaiškinta, kad, be PpIX fluorescencijos smailių, spektruose yra ir fluorescencijos juostos ties 620 nm ir 650-680 nm. Remiantis literatūra šios fluorescencijos smailės buvo priskirtos endogeniniams vandenyje tirpiems uroporfirinams ir koproporfirinams^{106,107,259}. Tuo tarpu sensibilizuotos sinovijos audinyje po i.a. ALA ar ALA-Me injekcijos užregistruota tik PpIX fluorescencija (28 pav.).



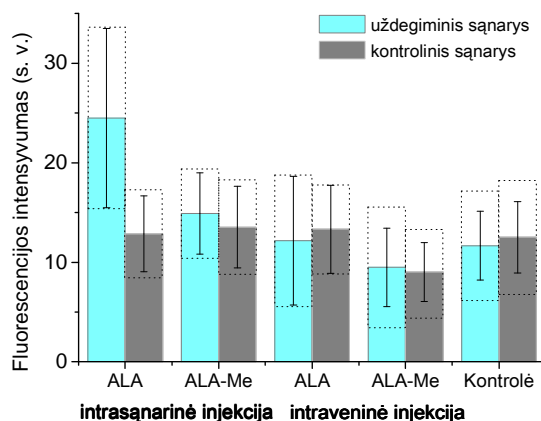
28 pav. Vidutiniai išmatuoti sensibilizuotų sinovijos ir kremzlės audinių fluorescencijos spektrai *ex vivo* po intrasąnarinės ALA ($n_{tr} = 7$) (A) ar ALA-Me ($n_{tr} = 6$) (B) injekcijos. Įklijos – skirtuminiai porfirinų spektrai sinovijos ir kremzlės audiniuose, apskaičiuoti atėmus atitinkamų audinių savitosios fluorescencijos spektrus

Palyginus vidutinius PpIX fluorescencijos intensyvumus sinovijos ir kremzlės audiniuose po i.a. ALA injekcijos nustatyta, kad kremzlėje intensyvumas buvo daugiau nei du kartus didesnis negu sinovijoje (29 pav.). Tačiau priešingi rezultatai gauti po i.a. ALA-Me injekcijos, šiuo atveju dvigubai didesnis PpIX fluorescencijos intensyvumas gautas sinovijoje negu kremzlėje. Taigi, remiantis spektroskopiniais duomenimis, sinovijoje po i.a. ALA-Me injekcijos susikaupė apie penkis kartus daugiau PpIX nei po ALA injekcijos. Po i.v. ALA ar ALA-Me injekcijos uždegiminio sąnario sinovijoje užregistruotas nykstamai mažas PpIX fluorescencijos signalas, o kremzlėje bei kontrolinio sąnario audiniuose signalas visiškai neužregistruotas.



29 pav. Vidutinės PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės sinovijos ir kremzlės audiniuose *ex vivo* po i.a. ALA ($n_{tr} = 7$) ar ALA-Me ($n_{tr} = 6$) injekcijos. Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklovimo intervalai (taškinės linijos)

Vandenyje tirpių porfirinų fluorescencija, kurių pagrindinė smailė yra apie 620 nm, kremzlės audinyje buvo užregistruota ne tik po i.a. pirmtakų injekcijos bet ir po i.v. injekcijos (30 pav.). Net ir kontrolinių triušių kelio sąnarių kremzlėse buvo užregistruota vandenyje tirpių porfirinų fluorescencija. Be to, šių endogeninių porfirinų fluorescencijos intensyvumas buvo beveik vienodas tiek uždegiminio ir kontrolinio sąnario kremzlėse, tiek ir visose triušių grupėse. Tik po i.a. ALA injekcijos buvo užregistruotas statistiškai nepatikimas didesnis intensyvumas.



30 pav. Vidutinės vandenyje tirpių porfirinų fluorescencijos intensyvumo vertės uždegiminio ir kontrolinio sąnario kremzlės audiniuose *ex vivo* po i.a. ALA ($n_{tr} = 7$) ar ALA-Me ($n_{tr} = 6$) bei i.v. ALA ($n_{tr} = 5$) ar ALA-Me ($n_{tr} = 3$) injekcijų, ir kontrolinių triušių ($n_{tr} = 4$) atveju. Pavaizduoti vidurkiai, standartiniai nuokrypiai ir 95 % pasiklovimo intervalai (taškinės linijos)

4.2.3. Tyrimų atliktų triušių eksperimentinio AIA modelyje, rezultatų aptarimas

Uždegiminių ir kontrolinių sąnarių spektroskopiniai tyrimai *in vivo*, matuojant fluorescencijos spektrus odos paviršiuje, atskleidė, kad vidutinis uždegiminių sąnarių savitosios fluorescencijos spektro intensyvumas srityje nuo 500 nm iki 650 nm yra mažesnis negu kontrolinių kelio sąnarių. Remiantis literatūra, panaši tendencija matoma ir lyginant navikinių bei sveikų audinių savitąją fluorescenciją^{2,260,261}.

Atlikus sensibilizuotų audinių fluorescencijos matavimus, nustatyta, kad nepaisant to, koks ALA injekcijos būdas buvo naudotas, endogeninių porfirinų spektruose dominavo PpIX fluorescencija. Tačiau PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose priklauso nuo pirmtako injekcijos būdo. Didžiausias PpIX fluorescencijos intensyvumas ir jo santykis tarp uždegiminio ir kontrolinio sąnario buvo užregistruotas praėjus 2 valandoms po i.a. ALA injekcijos. Po i.v. ALA injekcijos patikimas kontrastas

buvo tik pirmą valandą po suleidimo, o vėliau PpIX fluorescencijos intensyvumas buvo beveik vienodas uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose (27 pav., A). Šis kontrasto išnykimas, lyginant su anksčiau atliktų tyrimų rezultatais, kuriuose kontrastas išliko net tris valandas po i.v. ALA injekcijos²⁶, gali būti dėl šiame tyrime naudotos dvigubai didesnės ALA dozės. Palyginus PpIX fluorescencijos intensyvumą po skirtingų ALA injekcijos būdų nustatyta, kad uždegiminiame sąnaryje po i.a. injekcijos jis buvo apie penkis kartus didesnis, o kontroliniuose sąnariuose šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (26 pav., A ir 27 pav., A). Nors yra daugybė tyrimo metodų taikomų aptikti įvairius reumatoidinio artrito požymius, tačiau kol kas nėra nė vieno, kuris galėtų galutinai patvirtinti RA diagnozę. Norint gauti objektyvius diagnostinius rezultatus ir sekti ligos būklę, turi būti kartu taikomi keli metodai. Taigi spektroskopinis uždegiminių sričių identifikavimas, taikant i.v. ALA injekciją, galėtų būti išplėtotas į vieną iš pagalbinių diagnostikos metodų. Remiantis gautais duomenimis, diagnostikos tikslais, kad išliktų patikimas kontrastas tarp uždegiminių ir kontrolinių audinių, reikėtų naudoti mažesnes ALA dozes arba spektroskopinius matavimus atlikti ne vėliau kaip 1 valandą po pirmtako injekcijos.

Po i.a. ALA-Me injekcijos PpIX fluorescencija taip pat dominavo endogeninių porfirinų spektre. PpIX kaupimosi audiniuose farmakokinetika bei fluorescencijos intensyvumų santykis uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose buvo toks pat, kaip ir po ALA i.a. injekcijos. Tačiau PpIX, indukuoto po ALA-Me injekcijos, fluorescencijos intensyvumai buvo apie aštuonis kartus mažesni negu po ALA injekcijos (26 pav.). Tuo tarpu ALA-Me suleidus į audies veną, tiek uždegiminiuose, tiek kontroliniuose audiniuose buvo užregistruota nykstamai silpna PpIX fluorescencija. Toks mažas PpIX fluorescencijos intensyvumas odos paviršiuje po i.v. ALA-Me injekcijos yra sąlygotas ir pirmtako suleidimo būdo, nes ir ALA indukavo žymiai mažesnius PpIX kiekius, ir paties pirmtako savybių.

PpIX kaupimosi skirtumai audiniuose, kurie pasireiškė mažesniu PpIX fluorescencijos intensyvumu odos paviršiuje po i.a. ALA-Me injekcijos negu po ALA, gali atsirasti dėl skirtingo pirmtakų pasiskirstymo audiniuose. Kadangi pirmtakas, o ne endogeninis PpIX patenka į kraujotaką¹⁴⁷, PpIX fluorescencijos detektavimas neilgai trukus po suleidimo reiškia, kad PpIX buvo indukuotas būtent tirtuose audiniuose ir netiesiogiai nusako ALA ir ALA-Me, prasiskverbusių į kelio paviršių, kiekį. Kitų autorių darbuose mažesnis ALA-Me skverbimasis į kraujotaką, lyginant su ALA, buvo įrodytas pelės odoje stebėta lokalia PpIX fluorescencija po vietinio ALA-Me taikymo¹⁴⁷, bei mažesne kepenų sensibilizacija naudojant ALA esterius²⁶². Taigi, didesnis PpIX fluorescencijos intensyvumas odos paviršiuje po ALA injekcijos negu po ALA-Me reiškia, kad ALA sukelia didesnę sisteminių efektą, bendrą audinių sensibilizaciją. Taip pat, greitesnis ALA pasiskirstymas organizme galėjo sąlygoti PpIX fluorescencijos santykio uždegiminiame ir kontroliniame sąnaryje sumažėjimą praėjus 2 valandoms po i.v. ALA injekcijos. Nykstamai maža PpIX fluorescencija užregistruota uždegiminiame bei kontroliniame sąnariuose po i.v. ALA-Me injekcijos gali būti paaiškinta apsunkintu ALA-Me pasišalinimu iš kraujotakos ir sąveika su plazmos baltymais bei greitesniu ALA-Me indukuoto PpIX pasišalinimu iš audinių^{147,263-265}.

Norėdami sužinoti, ar endogeninių porfirinų fluorescencijos skirtumai, stebėti *in vivo* po ALA ar ALA-Me injekcijos, atspindi uždegiminio ir kontrolinio sąnario vidiniuose audiniuose susikaupusių porfirinų kiekį, buvo atlikti sinovijos ir kremzlės audinių spektroskopiniai tyrimai *ex vivo*. Remiantis spektroskopiniais duomenimis, uždegiminio sąnario sinovijoje po i.a. ALA injekcijos susikaupė du kartus mažiau PpIX negu kremzlėje (28 pav.). Toks endogeninių porfirinų pasiskirstymas sinovijos ir kremzlės audiniuose galėtų būti nulemtas daug greitesnės jų farmakokinetikos sinovijoje ir mažo susikaupusio ALA kiekio dėl labai intensyvios kraujotakos joje. Pradiniu laikotarpiu, po injekcijos, kremzlėje susikaupęs ALA kiekis nebuvo kraujo išnešiotas po organizmą, o buvo paverstas PpIX. Kontrolinio sąnario

audiniuose PpIX fluorescencija nebuvo užregistruota, tai reiškia, kad ALA kiekis kraujotakoje buvo per mažas sukelti vidinių audinių sensibilizaciją, kurią būtų galima užregistruoti praėjus 4 val. po injekcijos. ALA darinių pranašumas pasireiškia derinant tokias savybes kaip tikslinę sritį pasiekusio preparato kiekis, geresnis jų prasiskverbimas per biologines membranas ir patekimas į ląsteles bei fermentinių reakcijų greitis, juos paverčiant fotoaktyviomis medžiagomis²⁶⁶. Uždegiminių audinių spektroskopiniai tyrimai *ex vivo* pademonstravo priešingus PpIX kaupimosi audiniuose rezultatus po i.a. ALA ar ALA-Me injekcijos negu *in vivo*. Po ALA-Me injekcijos PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminėje sinovijoje buvo apie 2 kartus didesnis negu kremzlėje ir net apie penkis kartus didesnis negu po ALA injekcijos (29 pav.). Tai galėtų būti paaiškinta geresniu ALA-Me gebėjimu prasiskverbti per biologines membranas ir susikaupti aplinkiniuose audiniuose, taigi, po suleidimo į sąnario ertmę daugiausia ALA-Me susikaupė vidiniuose sąnario audiniuose. ALA ir ALA-Me aliejaus/ vandens pasiskirstymo koeficientas, kuris nulemia junginių gebėjimą prasiskverbti per biologines membranas, yra neigiamas, rodantis šių junginių hidrofiliškas savybes¹⁴³. Tačiau ALA-Me pasiskirstymo koeficientas tarp raginio odos sluoksnio/ vandens, kuris parodo junginių gebėjimą kirsti biologinius barjerus, yra teigiamas ir artimesnis ilgesnes grandines turinčių esterų koeficientui negu ALA, todėl galėjo sąlygoti tai, kad sąnario vidiniuose audiniuose susikaupė didesnis ALA-Me kiekis negu ALA. Selektivesnis ALA-Me susikaupimas ir mažesnis paplitimas po organizmą sukėlė mažesnę organizmo sensibilizaciją, ką patvirtina ir kitų tyrėjų atlikti tyrimai²⁶⁷. Taigi, dėl mažesnio ALA kiekio ir greitesnio jos pavertimo PpIX, lyginant su ALA-Me, tirtu farmamakokinetikos momentu (po 4 val. po injekcijos) ALA selektyviai neindukavo didesnio PpIX kiekio sinovijoje negu kremzlėje.

Po intraveninio ALA ar ALA-Me preparatų suleidimo nykstamai maža PpIX fluorescencija buvo užregistruota uždegiminio sąnario sinovijoje, o kremzlėje ir kontrolinio sąnario sinovijoje bei kremzlėje ji nebuvo užregistruota. Kitų

autorių atliktuose darbuose, naudojant apie 250 kartų didesnes ALA preparato dozes, teigiama, kad po 4 val. nuo intraveninės ALA injekcijos didžiausias PpIX intensyvumas užregistruojamas odoje ir sinovijoje, o kremzlėje apie 9 kartus mažesnis²³². Šie rezultatai neprieštaruoja šio tyrimo rezultatams, kad PpIX fluorescencija užregistruota uždegiminio sąnario odoje ir sinovijoje, o kremzlėje neaptiktas dėl naudotos mažos, bet netoksiškos, ALA preparato dozės.

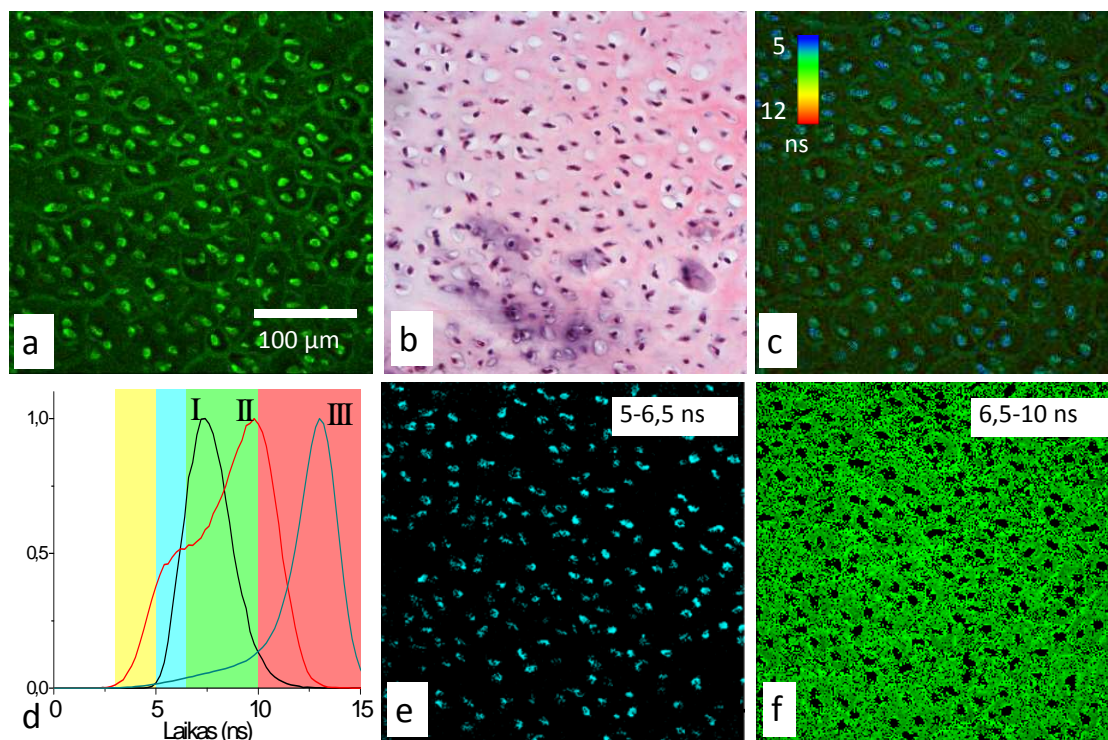
Kremzlės audiniuose, be PpIX fluorescencijos, buvo aptikta ir vandenyje tirpių porfirinų fluorescencija, kurios nebuvo sinovijoje (28 pav.). Panašus vidutinis vandenyje tirpių porfirinų fluorescencijos intensyvumas išmatuotas tiek uždegiminio sąnario, tiek kontrolinio sąnario kremzlėse, nepaisant, koks pirmtakas ar jo suleidimo būdas buvo naudotas, patvirtina, kad artrito sukėlimas sąlygoja silpną viso organizmo sensibilizaciją (30 pav.). Tikėtina, kad šie porfirinai yra sintetiniai uždegiminiame sąnaryje, per tam tikrą laiką pasklinda po visą organizmą, ir gali būti absorbuoti bei susikaupti uždegiminio ir kontrolinio sąnario kremzlėse. Kadangi kremzlėje nėra nervų, kraujotakos ir limfinės sistemų, bei jai būdinga elastinga struktūra, kurios tarpląstelinėje matricoje yra apie 65-80 % vandens, o medžiagų apykaita vyksta difuzijos būdu per sinovinį skystį, kremzlė gali sukaupti vandenyje tirpius porfirinus, kurių metabolinis pašalinimas, atrodo, yra lėtas.

4.3. EP lokalizacijos tyrimai triušių AIA modelio audiniuose

Atliekant fluorescencinės spektroskopijos tyrimus negalima nustatyti fluoroforų pasiskirstymo audinyje. Rezultatams įtakos turi audinio optinės savybės, fluoroforų skaičius ir koncentracija, jų kvantinis našumas, kiti chromoforai, sugeriantys fluorescenciją (reabsorbicija). Be to, gaunami rezultatai labai priklauso nuo registravimo sistemos parametrų bei procedūros. Su šiais trūkumais susiduria ir fluorescencinė mikroskopija. Suderinti visus parametrus, ypač dirbant su biologiniais objektais, yra labai sudėtinga, todėl yra kuriamos įvairios naujos metodikos, tobulinamos sistemos ar drauge apjungiamos kelios metodikos. Šiuo metu tyrimuose plačiai taikoma fluorescencijos gyvavimo trukmių spektroskopija, kurios metu registruojamos fluoroforų sužadintos būsenos gyvavimo trukmės. Kiekvienas fluoroforas pasižymi savita fluorescencijos gyvavimo trukme, kuri gali kisti nuo aplinkos pH, lūžio rodiklio, temperatūros ir kt., tačiau nepriklauso nuo fluoroforo koncentracijos, sklaidos, reabsorbicijos bei tyrimo sąlygų. Fluorescencijos gyvavimo trukmių mikroskopija (FLIM) apjungia mikroskopiją ir fluoroforų gyvavimo trukmių matavimą. Taigi, pritaikant šią metodiką galima ne tik tiksliai aptikti fluoroforų lokalizaciją, bet ir įvertinti fluoroforų skaičių ar jų būseną tam tikroje aplinkoje. Kadangi FDT atveju labai svarbi yra sensibilizatorių lokalizacija, nes fotopažaidos sukeliamos tik fotovaisto aplinkoje, reikia tiksliai nustatyti, kur audinyje yra sukaupę sensibilizatorius. RA atveju labai svarbu yra sužinoti, kur sinovijos ir kremzlės audiniuose yra pasiskirstę pirmtakų indukuotas PpIX. Remiantis spektroskopiniais tyrimais buvo nustatyta, kad kremzlės audinyje yra ne tik PpIX, bet ir vandenyje tirpių porfirinų, kurių fluorescencijos spektrai yra persidengę su PpIX spektru. Todėl vien tik fluorescencinė mikroskopija negali užtikrinti, ar PpIX yra vienintelis audinyje fluorescuojantis porfirinas. PpIX fotoblukimas yra spartus, jį apšvietus spinduliuote, kuri atitinka PpIX sugerties spektro Soret juostą. Taigi, atliekant ilgesnius fluorescencinės mikroskopijos tyrimus, PpIX fluorescencijos intensyvumas labai greitai sumažėja. Šioms problemoms

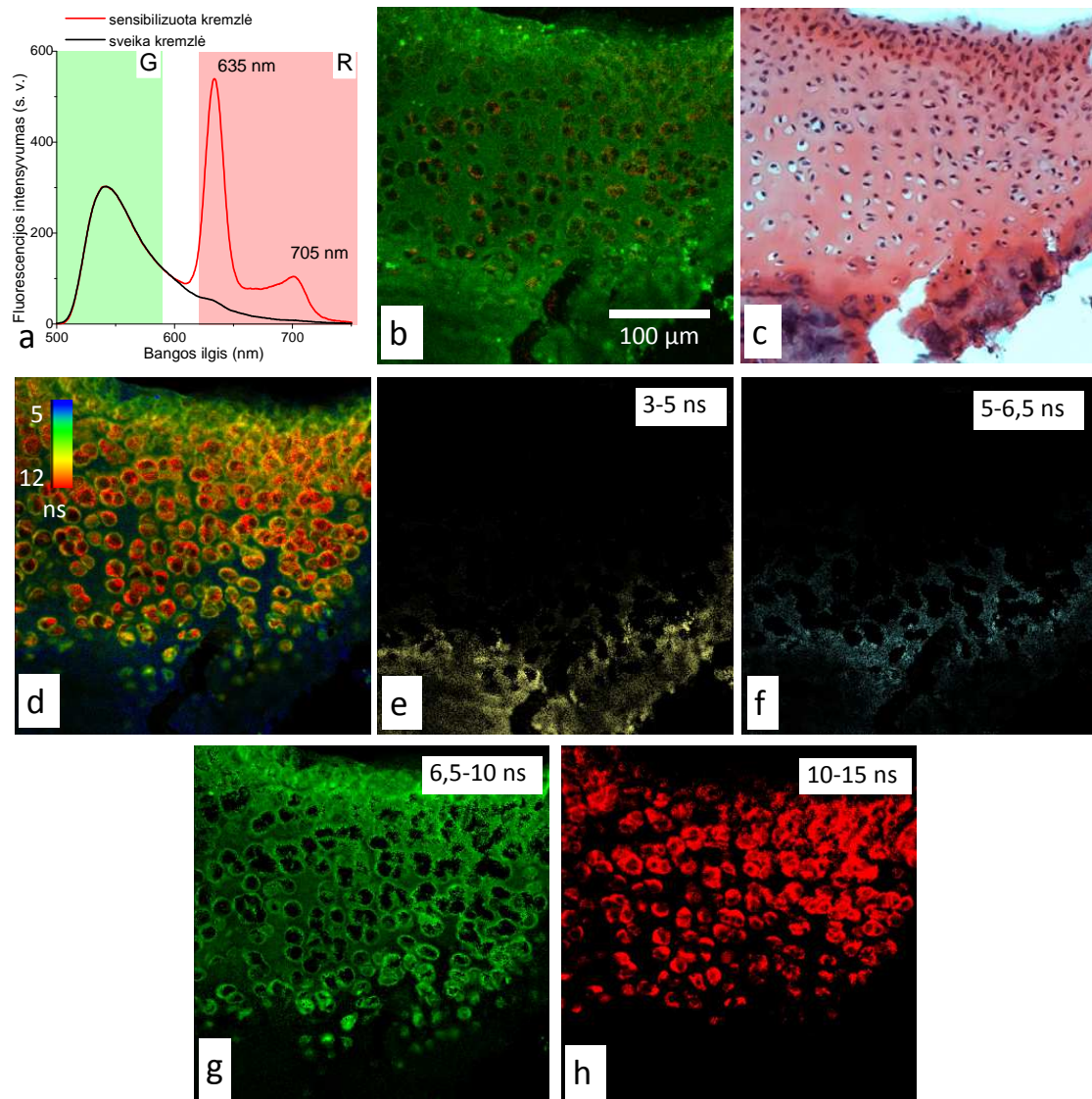
išspręsti buvo surinkta sistema ir sukurta metodika, įgalinanti iš tos pačios bandinio vietos gauti fluorescencinės intensyvumo ir gyvavimo trukmių mikroskopijos vaizdus, kurie vėliau sulyginami su HE dažytais histologiniais vaizdais, ir fluorescencijos spektrus.

4.3.1. Vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdų analizė



31 pav. Sveiko triušio kelio kremzlės bandinio vaizdai: a – konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdas G ir R kanaluose; b – HE dažyto bandinio pralaidumo mikroskopijos vaizdas; c – vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdas **650/160** nm spektrinėje srityje; d – normuoti vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių skirstiniai sveikoje kremzlėje **650/160** nm spektrinėje srityje (I kreivė) bei sensibilizuotoje kremzlėje **650/160** nm (II kreivė) ir **637/13** nm (III kreivė) spektrinėse srityse, laiko intervalai: geltonas – 3-5 ns, mėlynas – 5-6,5 ns, žalias – 6,5-10 ns, raudonas – 10-15 ns; e, f – vaizdai atitinkamų fluorescencijos gyvavimo trukmių laiko intervaluose. Didinimas x40

31 pav. pavaizduoti sveiko triušio kremzlės bandinio fluorescencijos intensyvumo ir gyvavimo trukmių bei to paties bandinio histologiniai vaizdai. Didžiausias sveikos kremzlės fluorescencijos intensyvumas užregistruotas žaliojoje spektro srityje 520-590 nm, kuri registruojama mikroskopo G kanalu, o raudonojoje spektro srityje 621-755 nm fluorescencija nebuvo užregistruota. Remiantis histologiniu vaizdu (31 pav., b) nustatyta, kad tai yra sveikas sąnario pereinamasis kremzlės sluoksnis. Histologiniame vaizde matomi tamsūs taškai yra ląstelių, chondrocitų, branduoliai, o šviesiai rausva spalva nudažytos sritys yra tarpląstelinis matriksas. Fluorescenciniame vaizde matomi ryškiai žali taškai tiksliai atitinka histologiniame vaizde esančių tamsių taškų lokalizaciją. Atlikus FLIM matavimus (31 pav., c) nustatyta, kad sveikoje kremzlėje esančių endogeninių fluoroforų vidutinės gyvavimo trukmės yra pasiskirsčiusios tarp 5 ns ir 10 ns (31 pav., d, I kreivė). Taip pat pastebėta, kad ląstelės pasižymi trumpesnėmis gyvavimo trukmėmis negu tarpląstelinis matriksas. Kadangi FLIM vaizdus galima išskaidyti į skirtingus laiko intervalus, kuriuose vidutinės gyvavimo trukmės atitinka tam tikrus fluoroforus tam tikroje aplinkoje, sveiko triušio bendras FLIM vaizdas buvo išskaidytas į trumpesnius vidutinių gyvavimo trukmių intervalus. Ieškant, kokiuose laiko intervaluose galima geriausiai išskirti ląsteles ir tarpląstelinį matriksą, buvo nustatyta, kad ląstelių fluoroforų savitosios fluorescencijos vidutinės gyvavimo trukmės yra tarp 5 ns ir 6,5 ns, o tarpląstelinio matrikso – 6,5-10 ns (31 pav., e, f).



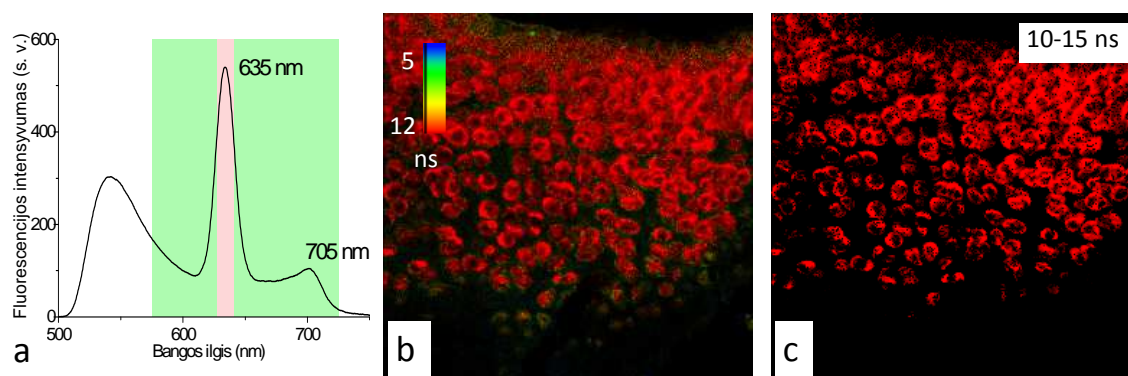
32 pav. a – būdingi sveikos ir sensibilizuotos kremzlių fluorescencijos spektrai, spalvotos sritys atitinka fluorescencinio mikroskopo „žalio“ G ir „raudono“ R kanalų registravimo sritis. Sensibilizuotos triušio kelio kremzlės bandinio vaizdai: b – konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdas G ir R kanaluose; c – HE dažyto bandinio pralaidumo mikroskopijos vaizdas; d – vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdas **650/160** nm spektrinėje srityje; e-h – vaizdai, gauti atitinkamų fluorescencijos gyvavimo trukmių laiko intervaluose (intervalai pavaizduoti paveiksluose). Didinimas x40

Būdingi sveiko triušio kremzlės ir triušio su AIA uždegiminio kelio kremzlės mikronuopjovų fluorescencijos spektrai, išmatuoti praėjus 3 valandoms po

ALA-Me injekcijos, pavaizduoti 32 pav., a. Fluorescencijos spektruose, taip pat, kaip ir matuojant kremzlės gabaliukuose, matoma endogeninių porfirinų fluorescencija raudonojoje spektro srityje, kurios nebuvo sveiko triušio kremzlėse. Tačiau, skirtingai negu matuojant kremzlės gabaliukuose *ex vivo*, endogeninių porfirinų spektrą sudarė tik PpIX fluorescencija, o vandenyje tirpių porfirinų nebuvo užregistruota. Nepaisant to, kad sensibilizuotos kremzlės fluorescencijos spektruose registruojamas endogeninių porfirinų signalas, fluorescencinės mikroskopijos vaizde jis labai silpnas (32 pav., b). PpIX fluorescencijos signalo lokalizacija labai tiksliai atitinka ląstelių lokalizaciją histologiniame vaizde (32 pav., c). Histologiniame vaizde, be tamsių taškų, kurie žymi chondrocitų branduolius, viršuje matoma ir tangentinė kremzlės sritis su paplokščiais chondrocitais, žemiau – pereinamosios ir kalcifikuotos kremzlės sritys. Apačioje tamsiai nusidažiusi sritis yra subchondrinio kaulo sritis. Jokių kremzlės pažeidimų histologiniame vaizde nematyti.

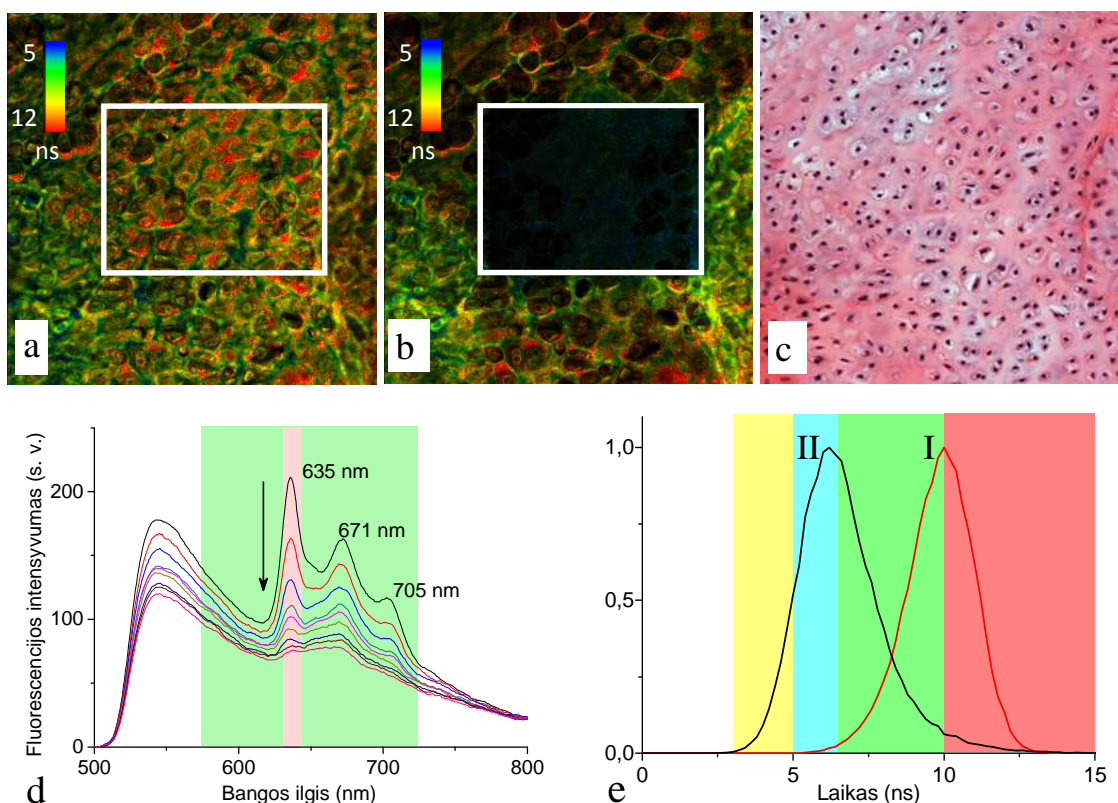
Atlikus sensibilizuotos kremzlės FLIM matavimus (32 pav., d) nustatyta, kad juose yra ilgesnių ir trumpesnių vidutinių gyvavimo trukmių negu sveikoje kremzlėje. Sensibilizuotoje kremzlėje esančių fluoroforų fluorescuojančių 650/160 nm spektrinėje srityje vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės pasiskirsčiusios 3-13 ns intervale (31 pav., d). Išskaidžius FLIM vaizdą į trumpesnius fluorescencijos gyvavimo trukmių laiko intervalus, matoma, kad intervale nuo 3,5 ns iki 5 ns fluorescuoja subchondrinis kaulas (32 pav., e), o tarpląstelinis matriksas, taip pat kaip ir sveikoje kremzlėje, fluorescuoja 6,5-10 ns intervale (32 pav., g). Priešingai negu sveikoje kremzlėje, vidutinių gyvavimo trukmių intervale nuo 5 ns iki 6,5 ns negalima išskirti ląstelių, tačiau galima atskirti silpnai fluorescuojančią kalcifikuotos kremzlės struktūrą (32 pav., f). Sensibilizuotos kremzlės ląstelių vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra 10-15 ns intervale (32 pav., h), o jų fluorescencijos lokalizacija labai tiksliai sutampa su ląstelių padėtimi histologiniame vaizde ir raudonos fluorescencijos signalų lokalizacija fluorescencinės mikroskopijos vaizde.

Taigi, atsižvelgiant į sensibilizuotos kremzlės fluorescencijos spektrą, matyti, kad didžiausią įtaką ilgiausioms vidutinėms fluorescencijos gyvavimo trukmėms 650/160 nm spektrinėje srityje daro PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmės.



33 pav. a – sensibilizuotos kremzlės fluorescencijos spektras, spalvotos sritys atitinka FLIM registravimo sritis: žalia – **650/160** nm, raudona – **637/13** nm. b – sensibilizuotos kremzlės vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdas **637/13** nm spektrinėje srityje; c – FLIM vaizdas 10-15 ns gyvavimo trukmių laiko intervale. Didinimas x40

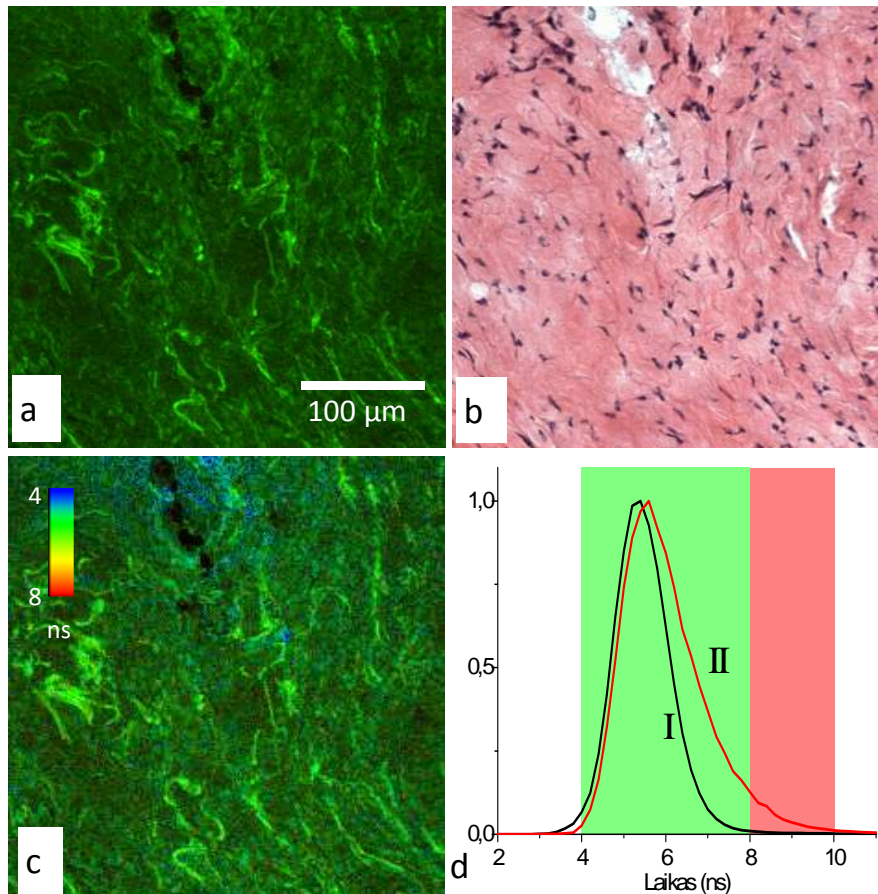
Norint įsitikinti, kad sensibilizuotoje kremzlėje ilgiausioms vidutinėms gyvavimo trukmėms didžiausią įtaką turi PpIX, to paties bandinio FLIM buvo atlikta pasirinkus siauresnę spektrinę sritį – 637/13 nm. Šioje spektrinėje srityje didžiausias fluorescencijos intensyvumas tenka PpIX, o kremzlės savitosios fluorescencijos intensyvumas santykinai mažas (33 pav., a). FLIM vaizdai 650/160 nm (32 pav., d) ir 637/13 nm (33 pav., b) spektrinėse srityse yra panašūs, tačiau fluoroforų vidutinių gyvavimo trukmių pasiskirstymas yra skirtingas (31 pav., d, III kreivė). Sensibilizuotos kremzlės fluoroforų vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės, išmatavus siauresnėje spektrinėje srityje, pasiskirstė daug siauresniame, 10-16 ns, gyvavimo trukmių intervale (31 pav., d, III kreivė) ir buvo ilgesnės negu išmatuotos plačioje spektrinėje srityje. Kaip ir buvo tikėtasi, pasirinkus gyvavimo trukmių intervalą nuo 10 ns iki 15 ns, abiejose spektrinėse srityse buvo gauta tokia pati PpIX fluorescencijos signalo lokalizacija (32 pav. h, 33 pav. c).



34 pav. a, b – sensibilizuotos kremzlės vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdai, pažymėta sritis (ROI) prieš (a) ir po (b) švitinimo; c – HE dažyto bandinio pralaidumo mikroskopijos vaizdas; d – sensibilizuotos kremzlės fluorescencijos spektrų kitimas švitinimo metu; e – normuoti vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių skirstiniai ROI **650/160** nm spektrinėje srityje prieš (I kreivė) ir po (II kreivė) švitinimo, laiko intervalai: geltonas – 3-5 ns, mėlynas – 5-6,5 ns, žalias – 6,5-10 ns, raudonas – 10-15 ns. e – fluorescencijos spektrų kitimas ROI švitinant 405 nm spinduliuote

Sensibilizuotos kremzlės FLIM vaizduose pažymėta sritis, kuri buvo švitinama lazerine spinduliuote (34 pav., a ir b). Švitinimas buvo atliekamas 10 min. skenuojant ROI sritį 405 nm skenuojančio konfokalinio mikroskopo spinduliuote, ta pačia, kuri naudojama fluorescencijos vaizdų registravimui. Prieš švitinimą vidutinės fluoroforų gyvavimo trukmės ROI matuojant 650/160 nm spektrinėje srityje buvo pasiskirsčiusios nuo 6,5 ns iki 13 ns (34 pav., d, I kreivė). Toks vidutinių gyvavimo trukmių skirstinys būdingas visiems sensibilizuotos kremzlės bandiniams, ir kinta tik esant kitoms ar papildomoms

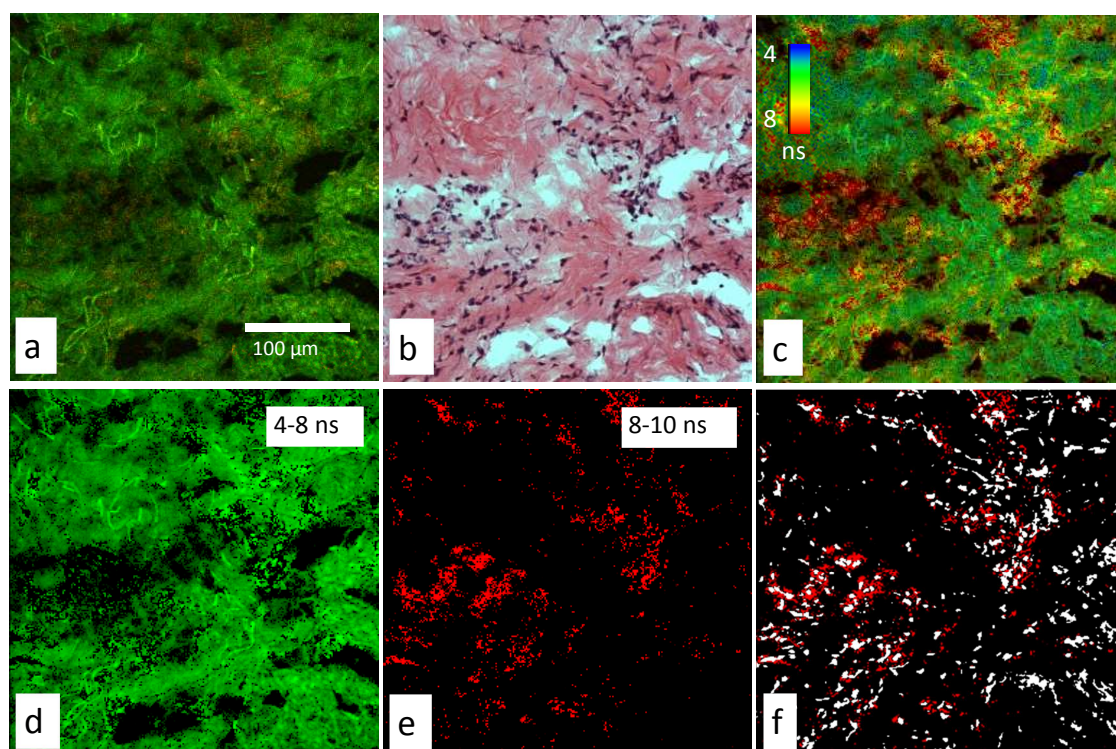
morfologinėms struktūroms (32 pav.). Po švitinimo vidutinės fluoroforų gyvavimo trukmės ROI pasislinko link trumpesnių verčių (4-10 ns) (34 pav., d, II kreivė) ir tapo tokiomis, kaip sveikos kremzlės fluoroforų (31 pav., d). Viso švitinimo metu buvo matuojami ROI fluorescencijos spektrai (34 pav., d). Juose matomos ne tik PpIX fluorescencijos smailės raudonojoje spektro srityje ties 635 nm ir 700 nm, bet ir jo fotoproduktų smailė ties 671 nm, kuri buvo spektre jau ir pradiniu laiko momentu. Švitinimo metu sparčiausiai mažėjo PpIX fluorescencijos juostų intensyvumas, kurių beveik neliko po švitinimo. Tačiau šiek tiek mažėjo ir kremzlės savitosios fluorescencijos intensyvumas. Taigi, ilgiausių vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių išnykimas po švitinimo yra nulemtas PpIX fotovirsmų, nes PpIX yra labai nestabilus švitinant spinduliuote, kurios bangos ilgis patenka į PpIX Soret juostos sugerties sritį.



35 pav. Sveiko triušio sinovijos bandinio vaizdai: a – konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdas G ir R kanaluose; b – HE dažyto bandinio pralaidumo mikroskopijos vaizdas; c – vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdas **650/160** nm spektrinėje srityje; d – normuoti vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių pasiskirstymai sveikoje (I kreivė) ir sensibilizuotoje (II krevė) sinovijoje **650/160** nm spektrinėje srityje, laiko intervalai: žalias – 4-8 ns, raudonas – 8-10 ns. Didinimas x40

Sveiko triušio sinovijos fluorescencinės intensyvumo ir gyvavimo trukmių vaizdai bei histologinis vaizdas pavaizduoti 35 pav. Fluorescenciniame sveikos sinovijos vaizde dominuoja žalia savitoji fluorescencija, o raudonojoje spektro srityje ji yra per silpna ir neužregistruojama (35 pav., a). Tamsūs taškai histologiniame vaizde yra atskiri sinoviocitai, o šviesiai rausva spalva yra nudažyti skaiduliniai sinovijos audinio elementai (35 pav., b). Morfologiškai

patvirtinta, kad tai yra sveikos sinovijos audinys. Atlikus sveikos sinovijos FLIM matavimus gauta, kad vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra pasiskirsčiusios intervale nuo 4 ns iki 8 ns (35 pav. d, I kreivė). Skaidant FLIM vaizdą į trumpesnių vidutinių gyvavimo trukmių laiko intervalų vaizdus, nepavyko atskirti ląstelių ir skaidulinio audinio ir surasti jiems būdingų vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių.



36 pav. Sensibilizuotos triušio sinovijos bandinio vaizdai: a – konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdas G ir R kanaluose; b – HE dažyto bandinio pralaidumo mikroskopijos vaizdas; c – vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdas **650/160** nm spektrinėje srityje; d, e – vaizdai atitinkamų fluorescencijos gyvavimo trukmių laiko intervaluose (intervalai pavaizduoti paveiksluose); f – FLIM vaizdas 8-10 ns gyvavimo trukmių intervale (e) ir ląstelių lokalizacijos vaizdas gautas iš histologinio vaizdo. Didinimas x40

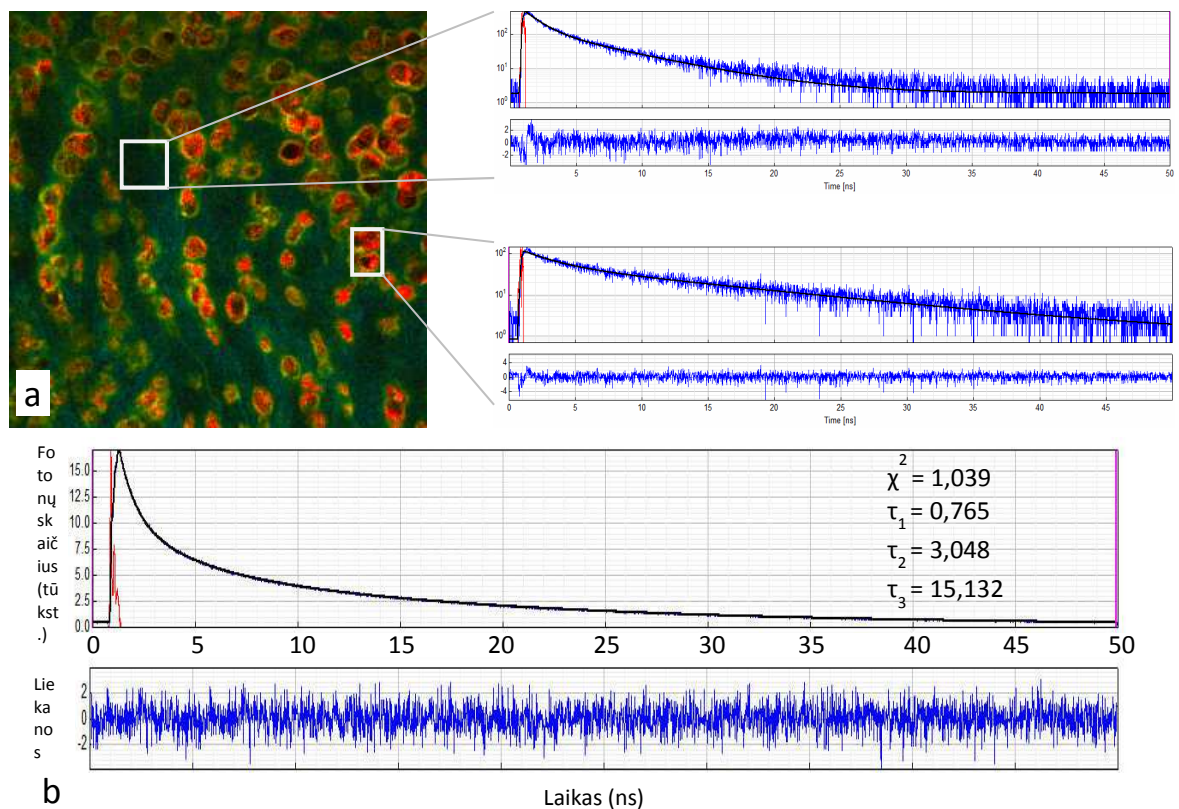
Būdinga žalia audinių fluorescencija taip pat dominavo sensibilizuotos sinovijos audinyje, o PpIX fluorescencijos intensyvumas buvo labai silpnas (36 pav. a). Aktyvuoti sinovijos fibroblastai ir uždegiminės ląstelės, pasižyminčios apvaliais branduoliais, histologiniame vaizde yra uždegiminės sinovijos ženklai (36 pav., b). Sensibilizuotos uždegiminės sinovijos FLIM vaizduose pastebimos struktūros su ilgesnėmis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis, kurių nebuvo sveikoje sinovijoje (36 pav., c). Vidutinės sensibilizuotos sinovijos fluorescencijos gyvavimo trukmės yra pasiskirsčiusios intervale nuo 4 ns iki 10 ns (35 pav., d, II kreivė). Išskaidžius FLIM vaizdą į trumpesnių vidutinių gyvavimo trukmių intervalų vaizdus, gauta, kad skaidulinės sinovijos struktūros gali būti atskirtos, kaip ir sveikos sinovijos audinyje, 4-8 ns laiko intervale (36 pav., d). Tuo tarpu fluorescencija, kurios vidutinės gyvavimo trukmės yra 8-10 ns intervale (36 pav., e), labai tiksliai atitinka ląstelių lokalizaciją histologiniame vaizde.

4.3.2. Apskaičiuotų FLIM vaizdų analizė

Sensibilizuotoje kremzlėje ją apšvietus 405 nm spinduliuote galime sužadinti kolageną, elastiną, PpIX bei jo fotoproduktą²⁶⁸. Vidutinė fluorescencijos gyvavimo trukmė susideda iš skirtingo visų tam tikrame taške esančių fluoroforų, kuriuos sužadina pasirinkta spinduliuotė, fluorescencijos gyvavimo trukmių indėlio. Skirtinguose audiniuose yra skirtingas fluoroforų skaičius bei kiekis, o jų fluorescencijos gyvavimo trukmės priklauso nuo aplinkos, kuri skirtinguose audiniuose yra skirtinga. Todėl norint FLIM vaizde tiksliai surasti tik PpIX fluorescenciją, reikia žinoti ne tik jo, bet ir jo fotoproduktų bei audinio savitosios fluorescencijos sužadintos būsenos gyvavimo trukmes. Audinio savitoji fluorescencija taip pat susideda iš keletos fluoroforų gyvavimo trukmių. Tačiau sensibilizuotuose audiniuose esant dideliame skaičiui fluoroforų, beveik neįmanoma išskirti visų fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmių. Tuomet, pasirinkus fluoroforus ir žinant jų fluorescencijos

gyvavimo trukmes, galima apskaičiuoti FLIM vaizdus tik tam tikroms fluorescencijos gyvavimo trukmėms.

Sensibilizuotų audinių FLIM vaizdai buvo registruojami dviejose spektrinėse srityse, kuriose vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra pasiskirsčiusios skirtingai dėl skirtingo fluoroforų fluorescencijos indėlio. Atlikus FLIM matavimus, gauta ir kiekviename bandinio vaizdo taške esančių fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmių nulemta gesimo kreivė (37 pav., b). Tokią gesimo kreivę galima gauti ir iš didesnės pasirinktos srities, ar viso paveikslo. Tada buvo pasirinktos vaizdo sritys, kuriose yra skirtingas skirtingų fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmių indėlis, ir atliktas matematinis gesimo kreivių modeliavimas keičiant kintamųjų skaičių (37 pav., a).



37 pav. a – fluorescencijos gesimo kreivės išmatuotos tam tikrose audinio vietose. b – būdinga fluorescencijos gyvavimo trukmių nulemta gesimo kreivė audinyje aproksimuota trimis eksponentėmis. Raudona linija – prietaiso atsako funkcija (IRF)

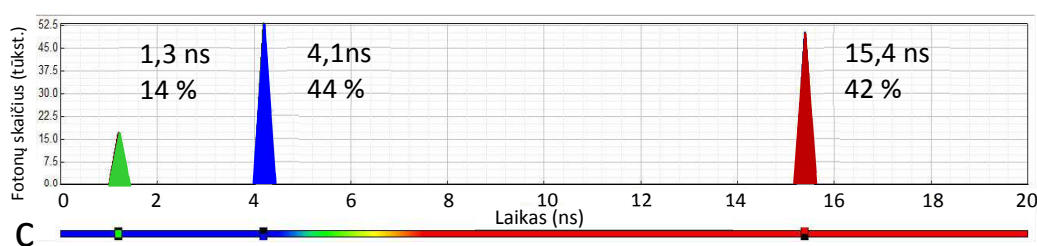
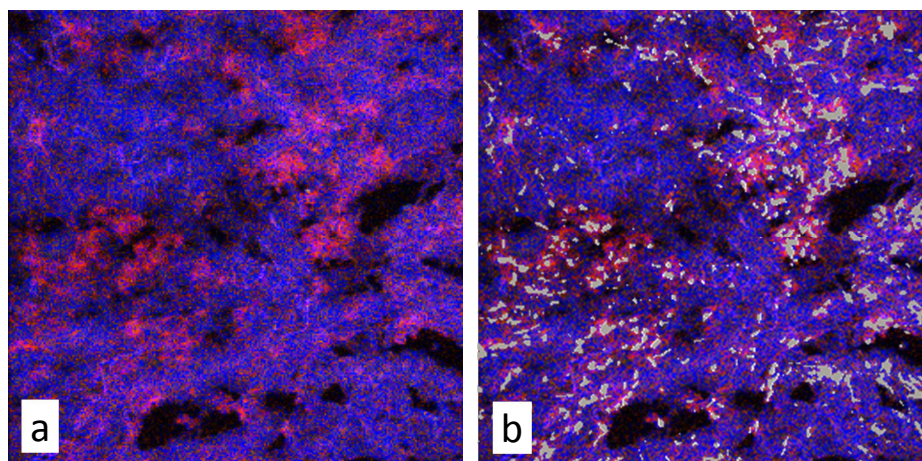
Fluorescencijos gyvavimo trukmių sąlygotos gesimo kreivės buvo aproksimuojamos dviejų arba trijų eksponenčių suma. Kaip ir tikėtasi, dėl kiekviename audinyje esančių kelių fluoroforų, daug tikslesnis rezultatas buvo gaunamas aproksimuojant trimis eksponentėmis. Gautos fluorescencijos gyvavimo trukmės sinovijos ir kremzlės audiniuose pateiktos 5 lentelėje. Kiekvienos komponentės amplitudės nėra pateiktos, nes kiekviename bandinyje jų dydis gali labai skirtis. Amplitudžių dydis priklauso nuo audinio morfologijos, sukaupto PpIX ir jo fotoproduktų kiekių, spektrinės registravimo srities, todėl kiekvienam bandiniui ar jo sričiai jos turi būti apskaičiuojamos atskirai.

5 lentelė. Skirtinguose audiniuose esančių fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės apskaičiuotos iš FLIM matavimų 650/160 nm ir 637/13 nm spektrinėse srityse. Pateikti apskaičiuotų trukmių vidurkiai ir jų standartiniai nuokrypiai (bandinių skaičius $n = 10$).

Audinys	Fluorescencijos gyvavimo trukmė (ns)		
	τ_1	τ_2	τ_3
Sveika kremzlė	0,75±0,1	3,1±0,2	9,7±0,5
Sensibilizuota kremzlė (637/13 nm)	0,8±0,3	3,0±0,1	15,7±0,3
Sensibilizuota kremzlė (650/160 nm)	1,2±0,2	4,3±0,3	15,6±0,7
Sveika sinovija	0,8±0,1	2,9±0,2	8,9±0,2
Sensibilizuota sinovija (637/13 nm)	0,9±0,2	2,8±0,3	15,4±0,6
Sensibilizuota sinovija (650/160 nm)	1,2±0,1	4,2±0,4	15,2±0,9

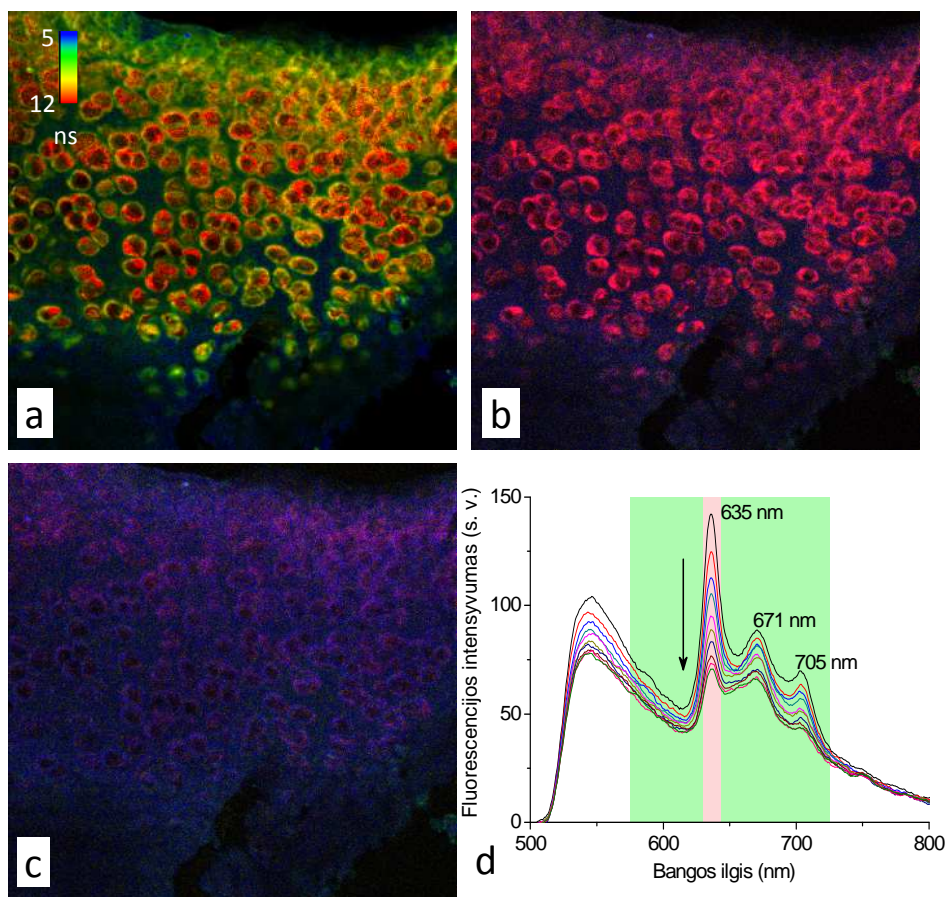
Apskaičiavus fluorescencijos gyvavimo trukmes sveikuose ir sensibilizuotuose audiniuose, buvo apskaičiuojami tik trijų fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdai. Šiuose vaizduose galima tiksliai matyti, kur lokalizuojasi fluoroforai su tam tikromis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis, o iš intensyvumo įvertinti fluoroforų kiekį tam tikrame taške. Apskaičiuotame

sensibilizuotos sinovijos FLIM vaizde matyti, kad fluoroforai su skirtingomis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis yra pasiskirstę skirtingose bandinio vietose (38 pav., a). Taip pat matyti, kad šiame bandinyje 650/160 nm spektrinėje srityje τ_2 (4,1 ns) ir τ_3 (15,4 ns) fluorescencijos gyvavimo trukmių indėlis yra beveik vienodas (38 pav., c). Sulyginus apskaičiuotą FLIM vaizdą su ląstelių lokalizacija histologiniame vaizde, nustatyta, kad τ_3 fluorescencijos gyvavimo trukmės yra ląstelėse esančio PpIX (38 pav. b), nes sveikoje sinovijoje fluoroforų su tokiais ilgomis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis nėra (5 lentelė). Be to, sensibilizuotoje sinovijoje 637/13 nm spektrinėje srityje ir sveikoje sinovijoje τ_2 yra trumpesnės negu sensibilizuotos sinovijos 650/160 nm spektrinėje srityje (5 lentelė).



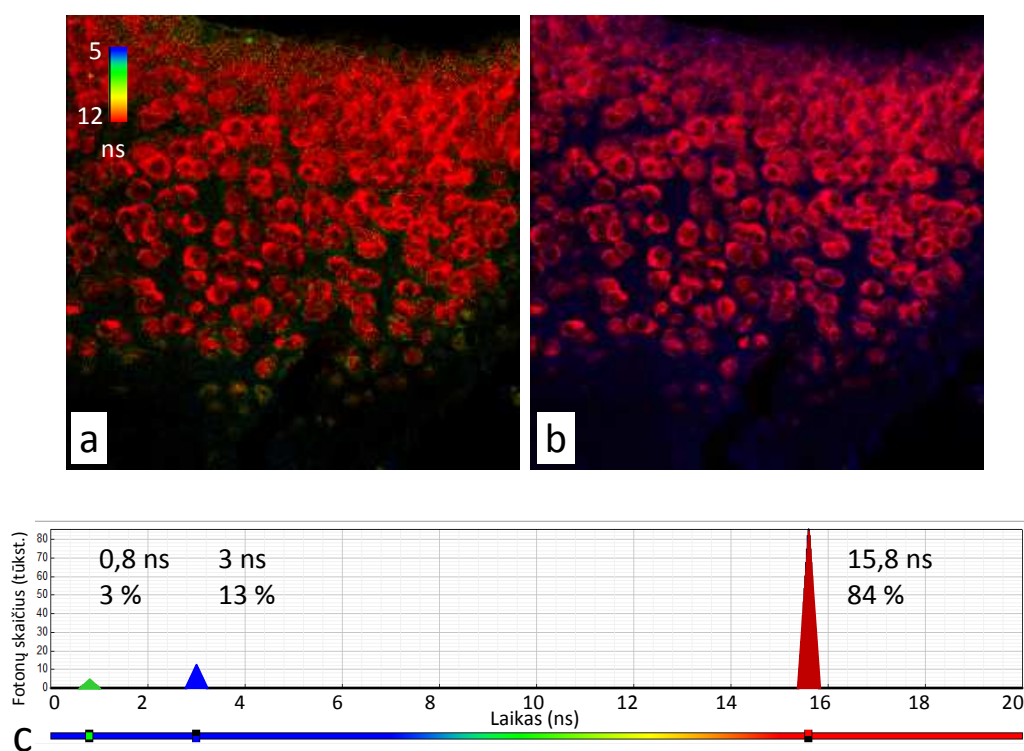
38 pav. a – apskaičiuotas sensibilizuotos sinovijos su išskirtomis tam tikromis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis FLIM vaizdas (650/160 nm): žalia spalva – $\tau_1 = 1,3$ ns, mėlyna spalva – $\tau_2 = 4,1$ ns, raudona spalva – $\tau_3 = 15,4$ ns. b – apskaičiuotas FLIM vaizdas (a) sudėtas kartu su ląstelių lokalizacijos vaizdu gautu iš histologinio vaizdo. c – apskaičiuotos fluorescencijos gyvavimo trukmės ir jų amplitudžių indėliai sensibilizuotos sinovijos bandinyje

Apskaičiuotame sensibilizuotos kremzlės FLIM vaizde didžiausias τ_3 fluorescencijos gyvavimo trukmių intensyvumas yra ląstelėse (39 pav., b). Lyginant su vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdu, matoma, kad τ_3 trukmių lokalizacija ir didžiausias intensyvumas sutampa su ilgiausių vidutinių trukmių lokalizacija (39 pav., a, b). Be to, srityse, kur vidutinės gyvavimo trukmės yra trumpesnės, apskaičiuotų gyvavimo trukmių τ_3 intensyvumas yra mažesnis. Atlikus bandinio švitinimą 405 nm spinduliuote, fluorescencijos spektruose matomas PpIX fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas, ir jo fotoprodukto padidėjimas (39 pav., d). Apskaičiuoti FLIM vaizdai prieš švitinimą ir po švitinimo yra skirtingi. Šis skirtumas yra dėl skirtingo fluorescencijos gyvavimo trukmių indėlio. Prieš švitinimą didžiausia amplitudė buvo τ_3 apskaičiuotos fluorescencijos gyvavimo trukmės (39 pav., e), o po švitinimo – τ_2 (39 pav., f).



39 pav. a – sensibilizuotos kremzlės vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdas 650/160 nm spektrinėje srityje. Apskaičiuoti sensibilizuotos kremzlės su tam tikromis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis FLIM vaizdai prieš švitinimą (b) ir po jo (c): žalia spalva – $\tau_1 = 1,2$ ns, mėlyna spalva – $\tau_2 = 4,2$ ns, raudona spalva – $\tau_3 = 15,7$ ns. d – sensibilizuotos kremzlės fluorescencijos spektrų kitimas švitinimo metu. Apskaičiuotos fluorescencijos gyvavimo trukmės ir jų amplitudžių indėliai sensibilizuotos kremzlės bandinyje prieš švitinimą (e) ir po jo (f)

Apskaičiuotas sensibilizuotos kremzlės FLIM vaizdas 637/13 nm spektrinėje srityje yra labai panašus į apskaičiuotą FLIM vaizdą atlikus matavimus 650/130 nm spektrinėje srityje, tačiau apskaičiuotos gyvavimo trukmės ir jų intensyvumai yra skirtingi. Vidutinė fluorescencijos gyvavimo trukmė (3 ns) yra pasislinkusi į trumpesnių verčių pusę lyginant su platesnėje spektrinėje srityje apskaičiuota verte (5 lentelė). Fluorescencijos gyvavimo trukmės τ_3 nėra statistškai patikimai skirtingos, tačiau jų amplitudžių indėliai yra labai skirtingi. Sensibilizuotos kremzlės fluorescencijoje, išmatuotoje 637/13 nm spektrinėje srityje, gyvavimo trukmės τ_3 amplitudė yra dominuojanti (40 pav., c).



40 pav. a – sensibilizuotos kremzlės vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizdas 637/13 nm spektrinėje srityje. b – apskaičiuotas sensibilizuotos kremzlės su tam tikromis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis FLIM vaizdas: žalia spalva – $\tau_1 = 0,8$ ns, mėlyna spalva – $\tau_2 = 3$ ns, raudona spalva – $\tau_3 = 15,8$ ns. c – apskaičiuotos fluorescencijos gyvavimo trukmės ir jų amplitudžių indėliai sensibilizuotos kremzlės bandinyje

4.3.3. Vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių vaizdų analizės rezultatų aptarimas

Endogeninių porfirinų detekcijai spektroskopiniais ir mikroskopiniais metodais sinovijos ir kremzlės audiniuose fluorescencijos žadinimui buvo pasirinkta 405 nm bangos ilgio spinduliuotė. Šios spinduliuotės bangos ilgis patenka į PpIX intensyvios sugerties Soret juostą, tuo tarpu savitajai fluorescencijai žadinti tinkamesnė yra trumpesnio bangos ilgio spinduliuotė. Tad gaunamas santykinai didesnis porfirinų fluorescencijos, o ne savitosios fluorescencijos signalas.

Atlikus fluorescencinės spektroskopijos ir mikroskopijos tyrimus, nustatyta, kad sveiko triušio kelio sąnario kremzlė pasižymi intensyvia fluorescencija žaliojoje registruojamo spektro srityje, o endogeniniams porfirinams būdinga raudona fluorescencija nėra registruojama. Fluorescencinės mikroskopijos vaizdas, kuriame matyti ryškesnė ląstelių savitoji fluorescencija tarpląstelinio matrikso fone, tiksliai sutampa su histologiniu vaizdu. Papildomos informacijos suteikė ir FLIM tyrimai, kuriais remiantis nustatyta, kad vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra pasiskirsčiusios 5-10 ns intervale (31 pav., d). FLIM vaizdą išskaidžius į trumpesnius laiko intervalus galima atskirti struktūras, kurių vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra 5-6,5 ns ir 6,5-10 ns intervaluose, o remiantis histologiniu vaizdu identifikuoti, kad tas struktūras atitinka ląstelės ir tarpląstelinis matriksas. Nustatytos sveikos kremzlės vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės sutampa su literatūroje pateiktomis sveikos kremzlės fluorescencijos gyvavimo trukmėmis (~6 ns)¹⁹⁹, FLIM tyrimų metu gautus duomenis aproksimavus viena eksponente (kas atitiktų vidutinę visų fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmę).

Sensibilizuotos kremzlės fluorescencijos spektruose, išmatuotuose kremzlės pjūviuose, matyti, kad po i.a. ALA-Me injekcijos kremzlėje susikaupė PpIX (32 pav., a). Nors sensibilizuotos kremzlės fluorescencinės mikroskopijos vaizde raudonos endogeninių porfirinų fluorescencijos intensyvumas mažas ir

žalia kremzlės savitoji fluorescencija yra dominuojanti, FLIM vaizdas yra visiškai kitoks negu sveikos kremzlės. Jame matomos struktūros turinčios ilgesnes ir trumpesnes vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės. Išskaidžius FLIM vaizdą į trumpesnius laiko intervalus, nustatyta, kad trumpesnės negu sveikoje kremzlėje vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra sąlygotos skirtingų morfologinių struktūrų, kurių nebuvo pateiktame sveikos kremzlės bandinio vaizde. Tikėtina, kad tokių pat morfologinių struktūrų vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės tokios pat būtų ir sveikoje kremzlėje. Tačiau, kadangi triušio kremzlės storis yra tik apie 0,3 mm (žmogaus 2,2-2,5 mm), nebuvo atliktas skersinis sveikos kremzlės pjūvis²⁶⁹. Tuo tarpu sensibilizuotos kremzlės FLIM vaizde ląstelės pasižymėjo ilgiausiomis vidutinėmis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis (10-15 ns) (32 pav., h), kuriose didžiausias indėlis tenka PpIX fluorescencijai. Kad ilgiausios vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra nulemtos PpIX, įrodė ir švitinimo eksperimentas. Sensibilizuotos kremzlės fluorescencijos spektruose, bandinį švitinant 405 nm spinduliuote, galima stebėti PpIX fotoblukimą (34 pav., d) ir fotoproduktų susidarymą. Taigi vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių skirstinys sensibilizuotos kremzlės bandinyje po švitinimo pasislinko į trumpesnių verčių pusę ir tapo beveik toks, kaip sveikos kremzlės, netgi su šiek tiek trumpesnėmis gyvavimo trukmėmis. Šios trumpesnės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra nulemtos PpIX fotoproduktų fluorescencijos, kuri taip pat yra registruojama 650/160 nm spektrinėje srityje.

Atlikus sveikos sinovijos FLIM tyrimus nustatyta, kad vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra pasiskirsčiusios nuo 4 ns iki 8 ns (35 pav., d) ir yra panašios į ląstelių gyvavimo trukmes sveikoje kremzlėje. Tačiau remiantis vidutinėmis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis sinovijos ląstelių atskirti nuo fibrilinio audinio neįmanoma. Ankstesniuose darbuose buvo parodyta, kad ir sinovijoje galima atskirti didesnes morfologines struktūras, pvz. kraujagysles, nuo fibrilinio audinio²⁷⁰. Sensibilizuotos sinovijos, kaip ir kremzlės, fluorescencinės mikroskopijos vaizduose sunku identifikuoti silpną

raudoną porfirinų fluorescenciją. Tačiau FLIM vaizde aiškiai matomos struktūros, kurių vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės yra 8-10 ns (36 pav., e). Sulyginus su histologiniu vaizdu aiškiai matoma, kad šios struktūros atitinka ląstelių lokalizaciją. Sensibilizuotos sinovijos trumpesnės vidutinės fluorescencijos gyvavimo trukmės 650/160 nm spektrinėje srityje lyginant su sensibilizuotos kremzlės, gali būti dėl santykinai mažesnio PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmių indėlio.

4.3.4. Apskaičiuotų FLIM vaizdų analizės rezultatų aptarimas

Apskaičiuotos sveikos sinovijos ir kremzlės fluorescencijos 650/160 nm spektrinėje srityje, gyvavimo trukmės yra beveik vienodos (5 lentelė). Tai sąlygoja panašios audinį sudarančios medžiagos. Yra žinoma, kad sinovijos tarpląstelinėje medžiagoje yra I, III, V, VI tipo kolagenų ir labai mažas kiekis elastino^{271,272}. Kremzlė sudaryta iš II tipo kolageno ir agrekano, kurių kiekvieno yra apie 45 %, mažo kiekio kitų proteoglikanų ir IX bei XI tipo kolagenų²⁷³. Kremzlės paviršiniuose sluoksniuose yra ir elastino²⁷⁴. Sveikuose sinovijos ir kremzlės audiniuose fluorescencijos gyvavimo trukmės τ_1 amplitudė yra mažiausia, todėl ši trukmė galėtų būti priskirta elastinui, kurio labai maži kiekiai yra abiejuose audiniuose. Literatūroje 1 ns fluorescencijos gyvavimo trukmė yra priskiriama ląstelių savitajai fluorescencijai, taigi tai tikrai ne kolageno gyvavimo trukmė²⁰⁸. Apskaičiuotos trumpesnės fluorescencijos gyvavimo trukmės (apie 3 ns) amplitudė sveikuose audiniuose yra apie 10 % didesnė negu ilgiausios (apie 10 ns) trukmės. Gryno I-IV tipo kolagenų fluorescencijos gyvavimo trukmės 510-700 nm spektriniame intervale yra 2,8-4,04 ns⁵. Panašus fluorescencijos gyvavimo trukmių amplitudžių skirstinys, kaip ir gautasis sveikoje sinovijoje bei kremzlėje, buvo apskaičiuotas kitų autorių matavimus atlikus jungiamajame audinyje²⁷⁵. Kadangi sinovijoje yra daugiausia III tipo, o kremzlėje – II tipo kolageno, todėl fluorescencijos gyvavimo trukmė apie 3 ns galėtų būti priskirta jiems. Ilgiausia fluorescencijos gyvavimo trukmė, tikėtina, yra sąlygota kito tipo kolagenų.

Sensibilizuotų sinovijos ir kremzlės audinių fluorescencijos gyvavimo trukmės taip pat yra panašios (5 lentelė). Didžiausias fluorescencijos gyvavimo trukmių skirtumas sensibilizuotuose audiniuose yra nulemtas fluorescencijos registravimo spektrinės srities. Sensibilizuotos sinovijos fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės τ_2 ir τ_3 650/160 nm spektrinėje srityje, lyginant su sveikos sinovijos trukmėmis, yra pasislinkusios į ilgesnių verčių pusę. PpIX fotoproduktų, kurių fluorescencijos smailė yra apie 670 nm, fluorescencijos gyvavimo trukmė terpėje su baltymu yra 6,1-8,2 ns, ląstelėse 3,6-5 ns, o audinyje *in vivo* 5-5,2 ns^{20,23,207,276,277}. Todėl apskaičiuota 4,2 ns vidutinė fluorescencijos gyvavimo trukmė sensibilizuotoje sinovijoje 650/160 nm spektrinėje srityje yra suminė III tipo kolageno (3 ns) ir fotoproduktų fluorescencijos gyvavimo trukmė. Tai taip pat patvirtita ir matavimai 637/13 nm spektrinėje srityje, į kurią nepatenka fotoproduktų fluorescencija. Šioje spektrinėje srityje apskaičiuota fluorescencijos gyvavimo trukmė τ_2 yra 3 ns, tokia pat kaip ir sveikoje sinovijoje (5 lentelė). Apskaičiuotame sensibilizuotos sinovijos FLIM vaizde matoma, kad ląstelėse esantis PpIX pasižymi ilgiausiomis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis (38 pav.). Dėl santykinai didelio fotoproduktų kiekio šios trukmės amplitudė 650/160 nm spektrinėje srityje nėra didžiausia (38 pav., c). Sensibilizuotų audinių FLIM tyrimais apskaičiuota PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmė, 15,2-15,7 ns, yra labai artima literatūroje pateikiamai pelėje *in vivo* išmatuotai PpIX trukmei, kuri yra 17-20 ns^{21,276,277}. Tuo tarpu ALA indukuoto PpIX FLIM tyrimai yra atlikti tik ląstelėse, ir jų metu apskaičiuotos PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmės yra 6,3-14 ns^{20,23,208}. Tačiau šiuose tyrimuose fluorescencijos gesimo charakteristikos aproksimuotos viena arba dviem eksponentėmis, o į fluorescencijos registravimo sritį patenka ir fotoprodukto fluorescencija, kurios gesimo trukmė yra trumpesnė. Taip pat autoriai, kurie ląstelėse apskaičiavo 6,3 ns PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmę, ląstelių suspensijoje, kurioje tikėtina buvo mažiau susidariusio fotoprodukto, fluorescencijos gyvavimo trukmę gavo apie 13 ns²⁰⁸. Ilgiausios, 14 ns, ir artimiausios šiame darbe

apskaičiuotoms trukmėms, vertės buvo gautos kai kuriose ląstelių linijose PpIX fluorescenciją matuojant siaurose spektrinėse srityse²³.

Sensibilizuotoje kremzlėje fluorescencijos gyvavimo trukmės ir jų skirstinys yra beveik tokie patys kaip ir sensibilizuotoje sinovijoje (5 lentelė). Kad apskaičiuota 4,2 ns fluorescencijos gyvavimo trukmė yra savitosios fluorescencijos ir PpIX fotoproducto suminė vertė, parodo ir švitinimo eksperimentas. Prieš švitinimą sensibilizuotoje kremzlėje 650/160 nm spektrinėje srityje didžiausias yra PpIX fluorescencijos indėlis bendroje viso paveikslo fluorescencijos gesimo kreivėje, o po švitinimo – fotoproducto ir savitosios fluorescencijos indėliai (39 pav., e, f). Šis skirtumas aiškiai matomas ir apskaičiuotuose FLIM vaizduose (39 pav., b, c). Užregistravus fluorescencijos gesimo kreivę siauroje 637/13 nm spektrinėje srityje ir apskaičiavus sudėtines jos gesimo trukmes matome, kad jas sudaro tik PpIX fluorescencijos ir savitosios fluorescencijos gesimo trukmės (5 lentelė). Taip pat labai svarbu, kad savitosios fluorescencijos gesimo trukmių amplitudės yra labai mažos palyginus su PpIX (40 pav., c). Tai reiškia, kad ilgiausia sveikų audinių fluorescencijos gesimo trukmė daro labai mažą įtaką ilgiausiai sensibilizuoto audinio fluorescencijos gesimo trukmei, kuri priskirta PpIX. Be to, tai patvirtina ir FLIM vaizdų registravimo trukmė, kuri sveikų audinių atveju yra apie 10 kartų ilgesnė.

5. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Šie tyrimai atlikti tikintis ateityje endogeniniais porfiriniais pagrįstą sensibilizaciją pritaikyti diagnostikos ir terapijos tikslais reumatoidinio artrito atveju. Kad fotodinaminė terapija būtų saugus ir tinkamas metodas slopinti sinovijos uždegimą sąnariuose, pirmiausia reikia įsitikinti, ar nebus sukelti kremzlės pažeidimai. Todėl yra svarbi optimalių ALA ar jos darinių panaudojimo sąlygų, tinkančių FDT ar FD, paieška, siekiant padidinti endogeninių porfirinų kaupimosi sinovijoje selektyvumą ir kartu apsaugoti kremzlines struktūras nuo fotosensibilizuotų pažeidimų bei sumažinti sisteminį endogeninių porfirinų poveikį organizmui. Šiame darbe buvo atlikti endogeninių porfirinų detekcijos tyrimai *in vitro*, *ex vivo* ir *in vivo* pacientų pooperacinėje medžiagoje ir triušių antigenų indukuoto monoartrito modelyje.

Atlikus tyrimus su pacientų pooperacine medžiaga, buvo nustatyta, kad vidutinis PpIX fluorescencijos intensyvumas RA ar OA sinoviocituose beveik visais laiko momentais buvo nereikšmingai didesnis po inkubacijos su ALA negu su ALA-Me (18 pav). Šie pirmtakai taip pat indukavo vienodus PpIX kiekius ir OA kremzlės bandiniuose. Taigi, ląstelėse *in vitro* ar kremzlės bandiniuose *ex vivo* šie pirmtakai vienodai veiksmingai indukuoja PpIX sintezę.

Spektroskopiškai nenustatytas PpIX kaupimosi skirtumas RA ar OA sergančių pacientų sinoviocituose *in vitro* po inkubacijos su ALA ar ALA-Me gali būti dėl savitos mikroaplinkos, būdingos sinoviocitams *in vivo* tam tikros ligos atveju, nebuvimo. Tačiau abiejose ląstelių grupėse buvo aptikta žymių PpIX kaupimosi skirtumų tarp individualių pacientų ląstelių populiacijų. Manoma, kad aktyvesnis uždegimas RA atveju gali labiau skatinti sinoviocitų metabolizmą negu OA atveju ir, tikėtina, kaupti didesnius PpIX kiekius^{251,252}. Kita vertus, atlikta tyrimų parodžiučių, kad ir OA sergančių pacientų sąnario dangalo biopsijai dažnai būdingi uždegiminiai pokyčiai²²¹. Taigi, tikėtina, kad RA ir OA pacientų grupėse galėjo būti RA pacientų su silpnesniu uždegimu ir

OA pacientų su aktyvesniu uždegimu. Todėl, negalima atmesti prielaidos, kad FDT galėtų būti pritaikyta uždegimui mažinti ir OA ligos atveju.

Svarbiausias tyrimų su pacientų pooperacine medžiaga rezultatas yra tai, kad OA sergančių pacientų kremzlės bandiniai (21 pav.) ir chondronai (22 pav.) po inkubacijos su PpIX pirmtakais 24 valandų laikotarpiu sukaupia nuo 5 iki 10 kartų mažiau PpIX negu RA ar OA pacientų sinoviocitai. Didžiausias PpIX intensyvumų skirtumas yra stebimas pradiniu inkubacijos su pirmtakais laikotarpiu (iki 8 val.). Šis PpIX fluorescencijos intensyvumų skirtumas tarp kremzlės bandinių ar chondronų ir sinoviocitų gali būti nulemtas apie šešis kartus mažesnio mitochondrijų kiekio chondrocituose, kurių metabolizmas prisitaikęs prie hipoksinės aplinkos *in vivo*, kurioje deguonies koncentracija yra nuo 1 iki 7 proc.^{278,279}. Tai patvirtina galimybę selektyviai sensibilizuoti uždegiminę sinoviją ir atliekant FDT išvengti kremzlės pažaidų, nes fotopažaidas daugiausia sukelia aktyvių deguonies formų inicijuotos citotoksinės reakcijos.

Kadangi RA ir OA gydymui yra naudojami įvairūs hialurono rūgšties preparatai bei uždegiminio proceso metu sąnariuose yra pakitusi hialurono rūgšties sudėtis, buvo atlikti tyrimai, siekiant išsiaiškinti, kokią įtaką hialurono rūgšties preparatų panaudojimas galėtų turėti indukuotai PpIX sintezei kremzlės audinyje. Spektroskopiniai duomenys parodė, kad PpIX kiekis chondronuose po 12 val. inkubacijos su ALA ir HA buvo reikšmingai didesnis negu chondronuose inkubuotuose tik su ALA. Atliktų tyrimų duomenimis ALA ir HA sąveikos sąlygotas didesnis PpIX kaupimasis chondronuose negali būti paaiškintas, todėl reikalingi tolimesni *in vitro* ir *in vivo* įvairių audinių tyrimai šiai ALA ir jos darinių sąveikai su hialurono rūgšties preparatais iširti, kuri gali būti svarbi ir kitose FDT taikymo srityse, pvz., dermatologijoje.

Kadangi *in vitro* tyrimų metu gauti rezultatai dažnai būna netapatūs ar netgi priešingi *in vivo* gautiems rezultatams, ALA ir ALA-Me savybės indukuoti PpIX sintezę reumatoidinio artrito atveju buvo tiriamos triušių antigeno

indukuoto monoartrito modelyje. Uždegiminių ir kontrolinių sąnarių spektroskopiniai tyrimai *in vivo*, matuojant fluorescencijos spektrus odos paviršiuje, atskleidė, kad vidutinis uždegiminių sąnarių savitosios fluorescencijos spektro intensyvumas srityje nuo 500 nm iki 650 nm yra mažesnis negu kontrolinių kelio sąnarių. Tačiau dėl daugybės veiksnių, darančių įtaką absoliutaus fluorescencijos intensyvumo matavimams audiniuose, šis užregistruotas skirtumas yra per mažas, kad juo remiantis būtų galima diagnozuoti uždegimines vietas.

Atlikus sensibilizuotų audinių fluorescencijos matavimus *in vivo*, nustatyta, kad nepaisant to, koks ALA injekcijos būdas buvo naudotas, endogeninių porfirinų spektruose dominavo PpIX fluorescencija, tačiau jo fluorescencijos intensyvumas priklauso nuo pirmtako injekcijos būdo.

Po i.a. ALA injekcijos PpIX fluorescencijos intensyvumai uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose *in vivo* matuojant odos paviršiuje buvo apie aštuonis kartus didesni negu po i.a. ALA-Me injekcijos. Didžiausias PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose buvo užregistruotas praėjus 2 valandoms po i.a. pirmtakų injekcijos. Didesnis PpIX fluorescencijos intensyvumas odos paviršiuje po ALA injekcijos negu po ALA-Me reiškia, kad ALA sukelia didesnę sisteminę efektą – bendrą audinių sensibilizaciją, kuri yra nepageidautina.

Po i.v. ALA injekcijos patikimas kontrastas buvo tik pirmą valandą po suleidimo, o vėliau PpIX fluorescencijos intensyvumas buvo beveik vienodas uždegiminiame ir kontroliniame sąnariuose (27 pav., A), tačiau maksimalus intensyvumas uždegiminiame sąnaryje buvo apie penkis kartus mažesnis negu po i.a. ALA injekcijos. Taigi, remiantis šiais rezultatais, kad išliktų patikimas kontrastas tarp uždegiminių ir kontrolinių audinių, diagnostikos tikslais reikėtų naudoti mažesnes ALA dozes arba spektroskopinius matavimus atlikti ne vėliau kaip 1 valandą po i.v. pirmtako injekcijos.

Siekiant sužinoti, ar endogeninių porfirinų fluorescencijos skirtumai, stebėti *in vivo* po ALA ar ALA-Me injekcijos, atspindi uždegiminio ir kontrolinio sąnario vidiniuose audiniuose susikaupusių porfirinų kiekį, buvo atlikti sinovijos ir kremzlės audinių spektroskopiniai tyrimai *ex vivo*. Uždegiminių audinių spektroskopiniai tyrimai *ex vivo* pademonstravo priešingus PpIX kaupimosi audiniuose rezultatus po i.a. ALA ar ALA-Me injekcijos negu *in vivo*. Po ALA-Me injekcijos PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminėje sinovijoje buvo apie 2 kartus didesnis negu kremzlėje ir net apie penkis kartus didesnis negu po ALA injekcijos (29 pav.). Be to, ALA indukavo apie du kartus daugiau PpIX kremzlėje negu uždegiminėje sinovijoje tirtu farmakokinetikos momentu (praėjus 4 val. po injekcijos). Šis rezultatas yra prieštaringas *in vitro* atliktų tyrimų rezultatams, kurių metu ALA OA kremzlės bandiniuose indukavo apie 8 kartus mažiau PpIX negu RA ar OA sinoviocituose. Taigi, FDT tikslais tik ALA-Me, o ne ALA, galėtų būti naudojamas mažinti sinovijos uždegimui.

Kremzlės audiniuose, be PpIX fluorescencijos, buvo aptikta ir vandenyje tirpių porfirinų fluorescencija, kurios nebuvo sinovijoje (28 pav.). Panašus vidutinis vandenyje tirpių porfirinų fluorescencijos intensyvumas išmatuotas tiek uždegiminio sąnario, tiek kontrolinio sąnario kremzlėse, nepaisant, koks pirmtakas ar jo suleidimo būdas buvo naudotas, patvirtina, kad artrito sukėlimas sąlygoja silpną viso organizmo sensibilizaciją (30 pav.). Tačiau šių porfirinų buvimas kremzlės audinyje nesukelia problemų FDT metu, nes jų kiekiai, palyginus su PpIX, yra maži ir jie greičiausiai lokalizavęsi ne gyvybiškai svarbiose ląstelės srityse.

Kadangi FDT atveju labai svarbi yra sensibilizatorių lokalizacija, nes fotopažaidos sukeliama tik fotovaisto aplinkoje, reikia tiksliai nustatyti, kur audinyje yra sukaukęs sensibilizatorius. Remiantis spektroskopiniais tyrimais buvo nustatyta, kad sensibilizuotame triušiu kremzlės audinyje yra ne tik PpIX, bet ir vandenyje tirpių porfirinų, kurių fluorescencijos spektrai yra persidengę su PpIX spektru. Atlikti fluorescencinės spektroskopijos tyrimai neįgalina

nustatyti fluoroforų pasiskirstymo audinyje. Todėl triušių sinovijos ir kremzlės audinių pjūviuose endogeninių porfirinų detekcija buvo atlikta fluorescencijos intensyvumo ir gyvavimo trukmių mikroskopijos metodikomis, kurių rezultatai vėliau sulyginti su HE dažytais histologiniais vaizdais, ir fluorescencinės spektroskopijos rezultatais. Atlikus sensibilizuotų audinių pjūvių fluorescencinės mikroskopijos tyrimus, nustatyta, kad tirtame spektriniame intervale žalia audinių savitoji fluorescencija yra dominuojanti, o raudona endogeninių porfirinų fluorescencija yra labai silpna. Tačiau vidutinių fluorescencijos gyvavimo trukmių FLIM vaizduose galima nustatyti endogeninių porfirinų lokalizaciją. Be to, FLIM vaizdą išskaidžius į trumpesnius laiko intervalus, galima atskirti skirtingas audinių morfologines struktūras. Sulyginus tų pačių bandinių FLIM ir histologinius vaizdus, nustatyta, kad sensibilizuotoje sinovijoje ir kremzlėje endogeniniai porfirinai yra ląstelėse. Sensibilizuotų sinovijos ir kremzlės bandinių fluorescencinės spektroskopijos tyrimų rezultatai atskleidė, kad endogeninių porfirinų spektruose užregistruotos tik PpIX ir jo fotoproducto spektrų juostos. Tačiau reikia paminėti, kad bandinių paruošimo metodai galėjo turėti įtakos vandenyje tirpių endogeninių porfirinų neaptikimui bandiniuose. Atlikus detalesnę FLIM vaizdų analizę, buvo apskaičiuotos tikrosios fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės. PpIX fluorescencijos gyvavimo trukmė yra daug ilgesnė negu savitąją sveikų audinių fluorescenciją sudarančių fluoroforų, todėl ji galėtų būti panaudota tiksliai navikinių darinių ar uždegiminių sričių, kuriose aptinkami didesni PpIX kiekiai, diagnostikai. Taip pat apskaičiuotos ir fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmių amplitudės. Jų kitimas, pvz., blunkant PpIX mažėjantis jo gyvavimo trukmės indėlis, galėtų būti panaudoti tobulinant FDT procesų eigos ir dozių vertinimą *in vivo*.

Taigi, suleidus ALA-Me intrasąnarinį būdu, galima sukelti didenę uždegiminę sinovijos sensibilizaciją, negu aplinkinių audinių. Tačiau, norint selektyviai atlikti sinovijos abliaciją FDT, dar reikia tiksliai kiekybiškai

įvertinti PpIX kiekį audiniuose ir apskaičiuoti šviesos sklaidimą sąnario audiniuose, kad būtų galima tiksliai apskaičiuoti FDT dozę.

6. IŠVADOS

1. Atlikus spektroskopinius tyrimus, nustatyta, kad RA ir OA sergančiųjų sinoviocitai po inkubacijos su 1 mM ALA ar ALA-Me sukaupia nuo 5 iki 10 kartų didesnius PpIX kiekius, negu OA sergančiųjų kremzlės bandiniai ir chondronai. Tačiau RA ir OA sinoviocituose po inkubacijos su šiais pirmtakais PpIX kaupimosi skirtumai nenustatyti.
2. PpIX fluorescencijos intensyvumas chondronuose inkubuotuose kartu su ALA ir hialurono rūgšties preparatu reikšmingai didesnis negu inkubuotuose tik su ALA.
3. Didžiausias PpIX fluorescencijos intensyvumas triušių AIA modelio uždegiminio sąnario odos paviršiuje, užregistruotas *in vivo* praėjus 2 valandoms po intrasąnariinių 16 mM ALA ar ALA-Me injekcijų, buvo apie 8 kartus didesnis ALA atveju. Po intraveninės 16 mM pirmtakų injekcijos PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminio kelio odos paviršiuje ALA atveju buvo apie 5 kartus mažesnis negu po intrasąnarinės injekcijos, o ALA-Me atveju – praktiškai neregistruojamas.
4. PpIX fluorescencijos intensyvumas uždegiminėje sinovijoje *ex vivo* po intrasąnarinės 16 mM ALA-Me injekcijos buvo apie 5 kartus didesnis negu ALA atveju ir apie 2 kartus viršijo intensyvumą išmatuotą kremzlėje. Triušių uždegiminio ir kontrolinio sąnario kremzlės audiniuose *ex vivo* užregistruota ir vandenyje tirpių porfirinų fluorescencija.
5. Ištyrus triušių sąnarių audinius fluorescencinės spektroskopijos, fluorescencijos intensyvumo ir gyvavimo trukmių mikroskopijos metodais bei gautus vaizdus sulyginus su HE dažytais histologiniais vaizdais nustatyta, kad po intrasąnarinės ALA-Me injekcijos praėjus 3 valandoms PpIX yra susikaupęs uždegiminio sąnario sinovijos ir kremzlės audinių ląstelėse.

7. LITERATŪROS SARAŠAS

1. Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*: Springer; 2007.
2. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annual review of physical chemistry*. 1996;47:555-606.
3. Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol*. Nov 1998;68(5):603-632.
4. Elson DS, Galletly N, Talbot C, et al. Multidimensional fluorescence imaging applied to biological tissue. *Reviews in Fluorescence 2006*: Springer; 2006:477-524.
5. Chorvat D, Chorvatova A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Phys Lett*. Mar 2009;6(3):175-193.
6. Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chemical reviews*. May 12 2010;110(5):2641-2684.
7. Haj-Hosseini N, Richter J, Andersson-Engels S, Wardell K. Optical Touch Pointer for Fluorescence Guided Glioblastoma Resection Using 5-Aminolevulinic Acid. *Lasers in Surgery and Medicine*. Jan 2010;42(1):9-14.
8. Andersson-Engels S, Klinteberg C, Svanberg K, Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. *Physics in medicine and biology*. May 1997;42(5):815-824.
9. Cubeddu R, Comelli D, D'Andrea C, Taroni P, Valentini G. Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine. *J Phys D Appl Phys*. May 7 2002;35(9):R61-R76.
10. Bigio IJ, Mourant JR. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Physics in medicine and biology*. May 1997;42(5):803-814.
11. Marcu L. Fluorescence lifetime techniques in medical applications. *Annals of biomedical engineering*. Feb 2012;40(2):304-331.
12. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chemical reviews*. May 12 2010;110(5):2620-2640.
13. Dognitz N, Salomon D, Zellweger M, et al. Comparison of ALA- and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth distribution in human skin carcinoma. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Dec 11 2008;93(3):140-148.
14. Das BB, Liu F, Alfano RR. Time-resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and model random media. *Rep Prog Phys*. Feb 1997;60(2):227-292.
15. Marcu L. Fluorescence lifetime in cardiovascular diagnostics. *Journal of biomedical optics*. Jan-Feb 2010;15(1):011106.
16. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 1988;10(4):128-138.
17. Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. Apr 6 1990;248(4951):73-76.
18. Phipps J, Sun Y, Saroufeem R, Hatami N, Marcu L. Fluorescence lifetime imaging microscopy for the characterization of atherosclerotic plaques. *Proceedings - Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers*. 2009;7161:71612G.
19. Siegel J, Elson DS, Webb SED, et al. Studying biological tissue with fluorescence lifetime imaging: microscopy, endoscopy, and complex decay profiles. *Applied Optics*. Jun 1 2003;42(16):2995-3004.
20. Kress M, Meier T, Steiner R, et al. Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode

- lasers in laser scanning microscopes. *Journal of biomedical optics*. Jan 2003;8(1):26-32.
21. Cubeddu R, Pifferi A, Taroni P, et al. Fluorescence lifetime imaging: An application to the detection of skin tumors. *IEEE J Sel Top Quant*. Jul-Aug 1999;5(4):923-929.
 22. Scully A, Ostler R, Phillips D, et al. Application of fluorescence lifetime imaging microscopy to the investigation of intracellular PDT mechanisms. *Bioimaging*. 1997;5(1):9-18.
 23. Ruck A, Lorenz S, Hauser C, Mosch S, Kalinina S. Multiwavelength FLIM: New concept for fluorescence diagnosis. *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences Xii*. 2012;8226.
 24. Kirdaite G, Lange N, Busso N, Van Den Bergh H, Kucera P, So A. Protoporphyrin IX photodynamic therapy for synovitis. *Arthritis and rheumatism*. May 2002;46(5):1371-1378.
 25. Dietze A, Berg K. ALA-induced porphyrin formation and fluorescence in synovitis tissue: In-vitro and in vivo studies. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2005;2(4):299-307.
 26. Bagdonas S, Kirdaite G, Streckyte G, et al. Spectroscopic study of ALA-induced endogenous porphyrins in arthritic knee tissues: targeting rheumatoid arthritis PDT. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. Jul 2005;4(7):497-502.
 27. Rudys R, Kirdaite G, Bagdonas S, et al. Spectroscopic assessment of endogenous porphyrins in a rheumatoid arthritis rabbit model after the application of ALA and ALA-Me. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Feb 5 2013;119:15-21.
 28. Hasan T, Trauner K. Photodynamic therapy for the destruction of the synovium in the treatment of rheumatoid arthritis and the inflammatory arthritides: Google Patents; 1994.
 29. Torikai E, Kageyama Y, Kohno E, et al. Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats. *Clinical rheumatology*. Jun 2008;27(6):751-761.
 30. Trauner KB, Gandour-Edwards R, Hasan T, Shortkroff S, Sledge C, Bamberg M. Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Photochemistry and Photobiology*. 1/1/1998 1998;67(1):133-139.
 31. Jordan K, Clarke AM, Symmons DPM, et al. Measuring disease prevalence: a comparison of musculoskeletal disease using four general practice consultation databases. *Brit J Gen Pract*. Jan 2007;57(534):7-14.
 32. Kalla AA, Tikly M. Rheumatoid arthritis in the developing world. *Best Pract Res Cl Rh*. Oct 2003;17(5):863-875.
 33. Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *American family physician*. Dec 1 2011;84(11):1245-1252.
 34. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. Sep 25 2010;376(9746):1094-1108.
 35. Hamaoka T, Katsumura T, Murase N, et al. Quantification of ischemic muscle deoxygenation by near infrared time-resolved spectroscopy. *Journal of biomedical optics*. Jan 2000;5(1):102-105.
 36. Liu H, Song Y, Worden KL, Jiang X, Constantinescu A, Mason RP. Noninvasive investigation of blood oxygenation dynamics of tumors by near-infrared spectroscopy. *Appl Opt*. Oct 1 2000;39(28):5231-5243.

37. Zourabian A, Siegel A, Chance B, Ramanujan N, Rode M, Boas DA. Trans-abdominal monitoring of fetal arterial blood oxygenation using pulse oximetry. *Journal of biomedical optics*. Oct 2000;5(4):391-405.
38. Betz CS, Mehlmann M, Rick K, et al. Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer. *Lasers Surg Med*. 1999;25(4):323-334.
39. Andersson-Engels S, Canti G, Cubeddu R, et al. Preliminary evaluation of two fluorescence imaging methods for the detection and the delineation of basal cell carcinomas of the skin. *Lasers Surg Med*. 2000;26(1):76-82.
40. Bigio IJ, Bown SG, Briggs G, et al. Diagnosis of breast cancer using elastic-scattering spectroscopy: preliminary clinical results. *Journal of biomedical optics*. Apr 2000;5(2):221-228.
41. Benavides J, Chang S, Park S, et al. Multispectral digital colposcopy for in vivo detection of cervical cancer. *Opt Express*. May 19 2003;11(10):1223-1236.
42. Arnoldussen ME, Cohen D, Bearman GH, Grundfest WS. Consequences of scattering for spectral imaging of turbid biologic tissue. *Journal of biomedical optics*. Jul 2000;5(3):300-306.
43. Benaron DA, Hintz SR, Villringer A, et al. Noninvasive functional imaging of human brain using light. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Mar 2000;20(3):469-477.
44. Demos SG, Gandour-Edwards R, Ramsamooj R, deVere White R. Spectroscopic detection of bladder cancer using near-infrared imaging techniques. *Journal of biomedical optics*. Jul-Aug 2004;9(4):767-771.
45. Sadick NS, Weiss RA, Goldman MP. Advances in laser surgery for leg veins: bimodal wavelength approach to lower extremity vessels, new cooling techniques, and longer pulse durations. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*. Jan 2002;28(1):16-20.
46. Trelles MA, Brychta P, Stanek J, et al. Laser techniques associated with facial aesthetic and reparative surgery. *Facial plastic surgery : FPS*. May 2005;21(2):83-98.
47. Abela GS, Hage-Korban EE, Tomaru T, Barbeau GR, Abela OG, Friedl SE. Vascular procedures that thermo-coagulate collagen reduce local platelet deposition and thrombus formation: Laser and laser-thermal versus balloon angioplasty. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2001;29(5):455-463.
48. Ross EV, Domankevitz Y, Anderson RR. Effects of heterogeneous absorption of laser radiation in biotissue ablation: Characterization of ablation of fat with a pulsed CO2 laser. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1997;21(1):59-64.
49. Dougherty TJ. Photodynamic therapy. *Clinics in Chest Medicine*. 1985 1985;6(2):219-236.
50. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*. 1992;55(1):145-157.
51. Xu M, Alfano RR. Fractal mechanisms of light scattering in biological tissue and cells. *Optics letters*. Nov 15 2005;30(22):3051-3053.
52. Bard MPL, Amelink A, Hegt VN, et al. Measurement of hypoxia-related parameters in bronchial mucosa by use of optical spectroscopy. *American journal of respiratory and critical care medicine*. May 15 2005;171(10):1178-1184.
53. Bolin FP, Preuss LE, Taylor RC, Ference RJ. Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method. *Applied Optics*. 1989;28(12):2297-2303.
54. Duck FA. *Physical properties of tissue: a comprehensive reference book*: Academic Pr; 1990.

55. Tuchin VV, Tuchin V. *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis*. Vol 642: SPIE press Bellingham; 2007.
56. Cheong W-F, Prah SA, Welch AJ. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*. 1990;26(12):2166-2185.
57. Vo-Dinh T. *Biomedical photonics handbook*: CRC press; 2010.
58. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in medicine and biology*. Jun 7 2013;58(11):R37-61.
59. Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI, Tuchin VV. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *J Phys D Appl Phys*. Aug 7 2005;38(15):2543-2555.
60. Jacques SL, McAuliffe DJ. The melanosome: threshold temperature for explosive vaporization and internal absorption coefficient during pulsed laser irradiation. *Photochem Photobiol*. Jun 1991;53(6):769-775.
61. Prah S. Optical absorption of hemoglobin. <http://www.omlc.ogi.edu/spectra/>. 1999.
62. Smith RC, Baker KS. Optical properties of the clearest natural waters (200-800 nm). *Appl Opt*. Jan 15 1981;20(2):177-184.
63. Kou L, Labrie D, Chylek P. Refractive indices of water and ice in the 0.65- to 2.5-microm spectral range. *Appl Opt*. Jul 1 1993;32(19):3531-3540.
64. Wilson BC, Jeeves WP, Lowe DM. In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem Photobiol*. Aug 1985;42(2):153-162.
65. Roggan A, Schadel D, Netz U, Ritz JP, Germer CT, Muller G. The effect of preparation technique on the optical parameters of biological tissue. *Saratov Fall Meeting 2000: Optical Technologies in Biophysics and Medicine II*. 2001;4241:186-199.
66. Papazoglou TG. New Trends in Photobiology (Invited Review) - Malignancies and Atherosclerotic Plaque Diagnosis - Is Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy the Ultimate Solution. *J Photoch Photobio B*. Apr 1995;28(1):3-11.
67. Sweeny L, Dean NR, Magnuson JS, Carroll WR, Clemons L, Rosenthal EL. Assessment of Tissue Autofluorescence and Reflectance for Oral Cavity Cancer Screening. *Otolaryng Head Neck*. Dec 2011;145(6):956-960.
68. Richards-Kortum R, Drezek R, Sokolov K, Pavlova I, Follen M. Survey of endogenous biological fluorophores. *Handbook of Biomedical Fluorescence, Marcel Dekker Inc. New York, Basel*. 2003:237-264.
69. Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT. Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol*. Nov 1996;156(5):1597-1601.
70. Anidjar M, Etti D, Cussenot O, et al. Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumors: dependence on the excitation wavelength. *J Urol*. Nov 1996;156(5):1590-1596.
71. Richards-Kortum R, Rava RP, Petras RE, Fitzmaurice M, Sivak M, Feld MS. Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia. *Photochem Photobiol*. Jun 1991;53(6):777-786.
72. Stepp H, Sroka R, Baumgartner R. Fluorescence endoscopy of gastrointestinal diseases: basic principles, techniques, and clinical experience. *Endoscopy*. May 1998;30(4):379-386.
73. Schneckenburger H, Gschwend MH, Paul RJ, et al. Time-gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues. Paper presented at: International Symposium on Biomedical Optics Europe'94/1995.
74. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology annual review*. 2005;11:227-256.
75. Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. May 2003;42 Suppl 2:ii11-16.

76. Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annual review of biochemistry*. 1980;49:957-1003.
77. Heikal AA. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med*. Apr 2010;4(2):241-263.
78. Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, McKhann GM. Cellular autofluorescence--is it due to flavins? *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. Jan 1979;27(1):44-48.
79. Lohmann W, Mußmann J, Lohmann C, Künzel W. Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1989;31(3):249-253.
80. Lohmann W, Paul E. In situ detection of melanomas by fluorescence measurements. *Die Naturwissenschaften*. Apr 1988;75(4):201-202.
81. Sontag W, Weigezahn KF. Absorption of DNA in the region of vacuum-uv (3-25 eV). *Radiation and environmental biophysics*. Oct 2 1975;12(3):169-174.
82. Holiday ER. Spectrophotometry of proteins: Absorption spectra of tyrosine, tryptophan and their mixtures. II. Estimation of tyrosine and tryptophan in proteins. *The Biochemical journal*. Oct 1936;30(10):1795-1803.
83. A. P. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *CR Soc. Biol*. 1924;91:1423-1424.
84. Ghadially FN, Neish WJ. Porphyrin fluorescence of experimentally produced squamous cell carcinoma. *Nature*. Dec 24 1960;188:1124.
85. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*. Jul 2006;1763(7):723-736.
86. Ricchelli F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Aug 1995;29(2-3):109-118.
87. Josefsen LB, Boyle RW. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics*. 2012;2(9):916-966.
88. Auler H, Banzer G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1942;53(2):65-68.
89. Figge FH, Weiland GS, Manganiello LO. Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med*. Jul-Aug 1948;68(3):640.
90. Kelly J, Snell M, Berenbaum M. Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *British Journal of Cancer*. 1975;31(2):237.
91. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. Sep-Oct 2009;85(5):1053-1074.
92. Peng Q, Juzeniene A, Chen J, et al. Lasers in medicine. *Rep Prog Phys*. May 2008;71(5).
93. Albert A. Chemical aspects of selective toxicity. *Nature*. Aug 16 1958;182(4633):421-422.
94. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Jun 1990;6(1-2):143-148.
95. Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol*. 1997 1997;65(2):235-251.
96. Peng Q, Warloe T, Berg K, et al. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: clinical research and future challenges. *Cancer*. 1997 1997;79(12):2282-2308.

97. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* Jul 30 1992;14(4):275-292.
98. FRYDMAN RB, FRYDMAN B, VALASINAS A. Protoporphyrin: Synthesis and biosynthesis of its metabolic intermediates. *The Porphyrins V6: Biochemistry.* 1979.
99. Voet D, Voet J. *Biochemistry.* NY: John Wiley and Sons; 1990.
100. Rotomskis R. SG, Bagdonas S., Venius J. *Optinės diagnostikos technologijos (optinė biopsija):* Vilnius: VU leidykla; 2008.
101. Kondo M, Hirota N, Takaoka T, Kajiwara M. Heme-Biosynthetic Enzyme-Activities and Porphyrin Accumulation in Normal Liver and Hepatoma-Cell Lines of Rat. *Cell Biol Toxicol.* Jan-Mar 1993;9(1):95-105.
102. Hinnen P, de Rooij FWM, van Velthuysen MLF, et al. Biochemical basis of 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX accumulation: a study in patients with (pre)malignant lesions of the oesophagus. *British Journal of Cancer.* Sep 1998;78(5):679-682.
103. Gibson SL, Havens JJ, Metz L, Hilf R. Is delta-aminolevulinic acid dehydratase rate limiting in heme biosynthesis following exposure of cells to delta-aminolevulinic acid? *Photochem Photobiol.* Mar 2001;73(3):312-317.
104. Krieg RC, Messmann H, Rauch J, Seeger S, Knuechel R. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem Photobiol.* Nov 2002;76(5):518-525.
105. EL-FAR M, Ghoneim M, Ibraheim E. Biodistribution and selective in vivo tumour localization of endogenous porphyrins induced and stimulated by 5-aminolevulinic acid: a newly developed technique. *Journal of tumor marker oncology.* 1990;5(1):27-34.
106. Dietel W, Fritsch C, Pottier RH, Wendenburg R. 5-aminolaevulinic-acid-induced formation of different porphyrins and their photomodifications. *Lasers in Medical Science.* 1997 1997;12:226-236.
107. Dietel W, Bolsen K, Dickson E, Fritsch C, Pottier R, Wendenburg R. Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubate carcinoma cells. *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.* 1996 1996;33:225-231.
108. Jichlinski P, Forrer M, Mizeret J, et al. Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. *Lasers Surg Med.* 1997;20(4):402-408.
109. Baumgartner R, Kriegmair M, Stepp H, et al. Photodynamic Diagnosis Following Intravesical Instillation of Aminolevulinic Acid (Ala) - 1st Clinical-Experiences in Urology. *Proceedings of Optical Methods for Tumor Treatment and Detection : Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy li.* 1993;1881:20-25.
110. Baumgartner R, Huber RM, Schulz H, et al. Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* Nov 1996;36(2):169-174.
111. Friesen SA, Hjortland GO, Madsen SJ, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (review). *International journal of oncology.* Sep 2002;21(3):577-582.
112. Schucht P, Beck J, Abu-Isa J, et al. Gross Total Resection Rates In Glioblastoma Surgery: Combining 5-ALA Intraoperative Fluorescence Imaging And Brain Mapping. *J Neurosurg.* Aug 2013;119(2):A539-A540.
113. van der Beek N, de Leeuw J, Demmendaal C, Bjerring P, Neumann HAM. PpIX fluorescence combined with auto-fluorescence is more accurate than PpIX

- fluorescence alone in fluorescence detection of non-melanoma skin cancer: An intra-patient direct comparison study. *Lasers in Surgery and Medicine*. Apr 2012;44(4):271-276.
114. Morton CA. The emerging role of 5-ALA-PDT in dermatology: is PDT superior to standard treatments? *J Dermatol Treat*. Mar 2002;13(1):S25-S29.
 115. Darlenski R, Fluhr JW. Photodynamic therapy in dermatology: past, present, and future. *Journal of biomedical optics*. Jun 2013;18(6):061208.
 116. Soergel P, Loning M, Staboulidou I, Schippert C, Hillemanns P. Photodynamic Diagnosis and Therapy in Gynecology. *J Environ Pathol Tox*. 2008;27(4):307-320.
 117. Soergel P, Loning M, Staboulidou I, Schippert C, Hillemanns P. Photodynamic diagnosis and therapy in gynecology. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*. 2008;27(4):307-320.
 118. Webber J, Kessel D, Fromm D. Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *Journal of Surgical Research*. Feb 15 1997;68(1):31-37.
 119. Fiedler DM, Eckl PM, Krammer B. Does delta-aminolaevulinic acid induce genotoxic effects? *J Photoch Photobio B*. Mar 1996;33(1):39-44.
 120. Dalton JT, Yates CR, Yin D, et al. Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. *J Pharmacol Exp Ther*. May 2002;301(2):507-512.
 121. van den Boogert J, van Hillegersberg R, de Rooij FW, et al. 5-Aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Jun 15 1998;44(1):29-38.
 122. Waidelich R, Hofstetter A, Stepp H, Baumgartner R, Weninger E, Kriegmair M. Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of upper tract urothelial tumors. *J Urol*. Feb 1998;159(2):401-404.
 123. Waidelich R, Stepp H, Baumgartner R, Weninger E, Hofstetter A, Kriegmair M. Clinical experience with 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy for refractory superficial bladder cancer. *J Urol*. Jun 2001;165(6 Pt 1):1904-1907.
 124. Malik Z, Kostenich G, Roitman L, Ehrenberg B, Orenstein A. Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Jun 1995;28(3):213-218.
 125. De Rosa FS, Marchetti JM, Thomazini JA, Tedesco AC, Bentley MV. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. Apr 3 2000;65(3):359-366.
 126. Casas A, Fukuda H, Di Venosa G, Batlle AM. The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization. *The British journal of dermatology*. Sep 2000;143(3):564-572.
 127. Ziolkowski P, Osiecka BJ, Oremek G, et al. Enhancement of photodynamic therapy by use of aminolevulinic acid/glycolic acid drug mixture. *Journal of experimental therapeutics & oncology*. Jul 2004;4(2):121-129.
 128. Choudry K, Brooke RC, Farrar W, Rhodes LE. The effect of an iron chelating agent on protoporphyrin IX levels and phototoxicity in topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *The British journal of dermatology*. Jul 2003;149(1):124-130.
 129. Chang SC, MacRobert AJ, Porter JB, Bown SG. The efficacy of an iron chelator (CP94) in increasing cellular protoporphyrin IX following intravesical 5-aminolaevulinic acid

- administration: an in vivo study. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* Apr 1997;38(2-3):114-122.
130. Turchiello RF, Vena FCB, Maillard P, Souza CS, Bentley MVBL, Tedesco AC. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). *J Photoch Photobio B.* Apr 2003;70(1):1-6.
 131. Auner BG, Valenta C, Hadgraft J. Influence of lipophilic counter-ions in combination with phloretin and 6-ketocholestanol on the skin permeation of 5-aminolevulinic acid. *International journal of pharmaceutics.* Apr 14 2003;255(1-2):109-116.
 132. Hurlimann AF, Hanggi G, Panizzon RG. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas using topical 5-aminolevulinic acid in a nanocolloid lotion. *Dermatology.* 1998;197(3):248-254.
 133. Lopez RF, Bentley MV, Delgado-Charro MB, Guy RH. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. *Pharmaceutical research.* Mar 2001;18(3):311-315.
 134. Fang JY, Lee WR, Shen SC, Fang YP, Hu CH. Enhancement of topical 5-aminolaevulinic acid delivery by erbium:YAG laser and microdermabrasion: a comparison with iontophoresis and electroporation. *The British journal of dermatology.* Jul 2004;151(1):132-140.
 135. Moan J, Van den Akker JTHM, Juzenas P, et al. On the basis for tumor selectivity in the 5-aminolevulinic acid-induced synthesis of protoporphyrin IX. *J Porphyr Phthalocya.* Feb 2001;5(2):170-176.
 136. Juzeniene A, Juzenas P, Kaalhus O, Iani V, Moan J. Temperature effect on accumulation of protoporphyrin IX after topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester and hexylester derivatives in normal mouse skin. *Photochem Photobiol.* Oct 2002;76(4):452-456.
 137. Ma L, Moan J, Peng Q, Iani V. Production of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in transplanted human colon adenocarcinoma of nude mice can be increased by ultrasound. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* Nov 9 1998;78(4):464-469.
 138. Marti A, Lange N, Van den Bergh H, Sedmera D, Jichlinski P, Kucera P. Optimisation of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: An in vitro approach. *J Urology.* Aug 1999;162(2):546-552.
 139. Kloek J, Beijersbergen van H. Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* Dec 1996;64(6):994-1000.
 140. Kloek J, Akkermans W, Beijersbergen van Henegouwen GM. Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem Photobiol.* Jan 1998;67(1):150-154.
 141. Gaullier JM, Berg K, Peng Q, et al. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Research.* 4/15/1997 1997;57(8):1481-1486.
 142. Lange N, Jichlinski P, Zellweger M, et al. Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *Br J Cancer.* Apr 1999;80(1-2):185-193.
 143. Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* Jan 2000;54(1):72-80.
 144. De Rosa FS, Tedesco AC, Lopez RF, et al. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. *Journal of*

- controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* Apr 29 2003;89(2):261-269.
145. Rud E, Gederaas O, Høgset A, Berg K. 5-Aminolevulinic Acid, but not 5-Aminolevulinic Acid Esters, is Transported into Adenocarcinoma Cells by System BETA Transporters. *Photochemistry and Photobiology.* 2000;71(5):640-647.
 146. Rick K, Sroka R, Stepp H, et al. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood. *J.Photochem.Photobiol.B:Biol.* 1997 1997;40:313-319.
 147. Moan J, Ma LW, Juzeniene A, et al. Pharmacology of protoporphyrin IX in nude mice after application of ALA and ALA esters. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* Jan 1 2003;103(1):132-135.
 148. Marti A, Jichlinski P, Lange N, et al. Comparison of aminolevulinic acid and hexylester aminolevulinate induced protoporphyrin IX distribution in human bladder cancer. *J Urol.* Aug 2003;170(2 Pt 1):428-432.
 149. Tunstall RG, Barnett AA, Schofield J, et al. Porphyrin accumulation induced by 5-aminolaevulinic acid esters in tumour cells growing in vitro and in vivo. *Br J Cancer.* Jul 15 2002;87(2):246-250.
 150. Fraga CG, Onuki J, Lucesoli F, Bechara EJ, Di Mascio P. 5-Aminolevulinic acid mediates the in vivo and in vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis.* Oct 1994;15(10):2241-2244.
 151. Hermes-Lima M. How do Ca²⁺ and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? *Free Radic Biol Med.* Sep 1995;19(3):381-390.
 152. Berg K, Anholt H, Bech O, Moan J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *Br J Cancer.* Sep 1996;74(5):688-697.
 153. Krammer B, Uberriegler K. In-vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* Nov 1996;36(2):121-126.
 154. Fuchs C, Riesenberger R, Siegert J, Baumgartner R. pH-Dependent formation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX in fibrosarcoma cells. *J Photoch Photobio B.* Aug 1997;40(1):49-54.
 155. Wyld L, Reed MWR, Brown NJ. The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro. *British Journal of Cancer.* May 1998;77(10):1621-1627.
 156. Novo M, Huttmann G, Diddens H. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* Jul 1996;34(2-3):143-148.
 157. Gadmar OB, Moan J, Scheie E, Ma LW, Peng Q. The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* Jul 2002;67(3):187-193.
 158. de Blois AW, Grouls RJ, Ackerman EW, Wijdeven WJ. Development of a stable solution of 5-aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):208-215.
 159. Bunke A, Zerbe O, Schmid H, Burmeister G, Merkle HP, Gander B. Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. *J Pharm Sci.* Oct 2000;89(10):1335-1341.
 160. Elfsson B, Wallin I, Eksborg S, Rudaeus K, Ros AM, Ehrsson H. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences.* Jan 1999;7(2):87-91.

161. McCarron PA, Donnelly RF, Andrews GP, Woolfson AD. Stability of 5-aminolevulinic acid in novel non-aqueous gel and patch-type systems intended for topical application. *J Pharm Sci.* Aug 2005;94(8):1756-1771.
162. Vena FC, Turchiello RF, Laville I, Pigaglio S, Blais J, Tedesco AC. 5-aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line. *Lasers Med Sci.* 2004;19(2):119-126.
163. Brunner H, Hausmann F, Knuechel R. New 5-aminolevulinic acid esters - Efficient protoporphyrin precursors for photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology.* Nov 2003;78(5):481-486.
164. Sorensen R, Juzenas P, Iani V, Moan J. Formation of protoporphyrin IX in mouse skin after topical application of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester. Paper presented at: BIOS Europe'98/1999.
165. Fritsch C, Homey B, Stahl W, Lehmann P, Ruzicka T, Sies H. Preferential relative porphyrin enrichment in solar keratoses upon topical application of delta-aminolevulinic acid methylester. *Photochem Photobiol.* Aug 1998;68(2):218-221.
166. van den Akker JT, Iani V, Star WM, Sterenborg HJ, Moan J. Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum. *Photochem Photobiol.* Nov 2000;72(5):681-689.
167. Juzeniene A, Juzenas P, Iani V, Moan J. Topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: Considerations for dosimetry in mouse skin model. *Photochemistry and Photobiology.* Sep 2002;76(3):329-334.
168. van den Akker JTHM, Iani V, Star WM, Sterenborg HJCM, Moan J. Systemic component of protoporphyrin IX production in nude mouse skin upon topical application of aminolevulinic acid depends on the application conditions. *Photochemistry and Photobiology.* Feb 2002;75(2):172-177.
169. Hedstrom J, Sedarous S, Prendergast F. Measurements of fluorescence lifetimes by use of a hybrid time-correlated and multifrequency phase fluorometer. *Biochemistry.* 1988;27(17):6203-6208.
170. Gilbert D, Franjic-Wurtz C, Funk K, Gensch T, Frings S, Mohrlen F. Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience.* Nov 2007;25(7):479-489.
171. Kuchibhotla KV, Lattarulo CR, Hyman BT, Bacskai BJ. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science.* Feb 27 2009;323(5918):1211-1215.
172. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem.* Jun 10 1979;254(11):4764-4771.
173. Paul RJ, Schneckenburger H. Oxygen concentration and the oxidation-reduction state of yeast: determination of free/bound NADH and flavins by time-resolved spectroscopy. *Die Naturwissenschaften.* Jan 1996;83(1):32-35.
174. Ghukasyan VV, Kao FJ. Monitoring Cellular Metabolism with Fluorescence Lifetime of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *J Phys Chem C.* Jul 9 2009;113(27):11532-11540.
175. Skala MC, Riching KM, Bird DK, et al. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *Journal of biomedical optics.* Mar-Apr 2007;12(2).

176. Hanson KM, Barry NP, Behne MJ, Mauro TM, Gratton E, Clegg RM. Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin's stratum corneum pH gradient. *Biophys J*. Jan 2002;82(1):494a-494a.
177. Bugiel I, König K, Wabnitz H. Investigation of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution. *Lasers Life Sci*. 1989;3(1):47-53.
178. Webb SED, Gu Y, Leveque-Fort S, et al. A wide-field time-domain fluorescence lifetime imaging microscope with optical sectioning. *Rev Sci Instrum*. Apr 2002;73(4):1898-1907.
179. Becker W, Bergmann A, Hink MA, König K, Benndorf K, Biskup C. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy research and technique*. Jan 1 2004;63(1):58-66.
180. Becker W. *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. Vol 81: Springer; 2005.
181. Dimitrow E, Riemann I, Ehlers A, et al. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis. *Experimental dermatology*. Jun 2009;18(6):509-515.
182. Dowling K, Dayel MJ, Lever MJ, French PM, Hares JD, Dymoke-Bradshaw AK. Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications. *Opt Lett*. May 15 1998;23(10):810-812.
183. Tadrous PJ, Siegel J, French PM, Shousha S, Lalani el N, Stamp GW. Fluorescence lifetime imaging of unstained tissues: early results in human breast cancer. *The Journal of pathology*. Mar 2003;199(3):309-317.
184. Siegel J, Elson DS, Webb SE, et al. Studying biological tissue with fluorescence lifetime imaging: microscopy, endoscopy, and complex decay profiles. *Appl Opt*. Jun 1 2003;42(16):2995-3004.
185. König K, Schneckenburger H, Hibst R. Time-gated in vivo autofluorescence imaging of dental caries. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. Mar 1999;45(2):233-239.
186. Mycek M-A, Pogue BW. *Handbook of biomedical fluorescence*: CRC Press; 2003.
187. Park J, Pande P, Shrestha S, Clubb F, Applegate BE, Jo JA. Biochemical characterization of atherosclerotic plaques by endogenous multispectral fluorescence lifetime imaging microscopy. *Atherosclerosis*. Feb 2012;220(2):394-401.
188. Phipps J, Sun Y, Saroufeem R, Hatami N, Fishbein MC, Marcu L. Fluorescence lifetime imaging for the characterization of the biochemical composition of atherosclerotic plaques. *Journal of biomedical optics*. Sep 2011;16(9):096018.
189. Hegyi L, Talbot C, Monaco C, et al. Fluorescence lifetime imaging of unstained human atherosclerotic plaques. *Heart*. Feb 2007;93(2).
190. Galletly NP, McGinty J, Dunsby C, et al. Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin. *The British journal of dermatology*. Jul 2008;159(1):152-161.
191. Provenzano PP, Eliceiri KW, Keely PJ. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment. *Clinical & experimental metastasis*. 2009;26(4):357-370.
192. Kantelhardt S, Leppert J, Petkus N, Huttmann G, Rohde V, Giese A. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging of brain and brain tumor tissue. *Neuro-Oncology*. Oct 2006;8(4):494-494.
193. Sun YH, Hatami N, Yee M, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery. *Journal of biomedical optics*. Sep-Oct 2010;15(5).
194. Roberts MS, Dancik Y, Prow TW, et al. Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with

- multiphoton and confocal microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Apr 2011;77(3):469-488.
195. Sanchez WY, Prow TW, Sanchez WH, Grice JE, Roberts MS. Analysis of the metabolic deterioration of ex vivo skin from ischemic necrosis through the imaging of intracellular NAD(P)H by multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Journal of biomedical optics*. Jul-Aug 2010;15(4).
 196. Schweitzer D, Hammer M, Schweitzer F, et al. In vivo measurement of time-resolved autofluorescence at the human fundus. *Journal of biomedical optics*. Nov-Dec 2004;9(6):1214-1222.
 197. Schweitzer D, Quick S, Klemm M, Hammer M, Jentsch S, Dawczynski J. Time-resolved autofluorescence in retinal vascular occlusions. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. Dec 2010;107(12):1145-1152.
 198. Schweitzer D, Quick S, Schenke S, et al. Comparison of parameters of time-resolved autofluorescence between healthy subjects and patients suffering from early AMD. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. Aug 2009;106(8):714-722.
 199. Manning HB, Nickdel MB, Yamamoto K, et al. Detection of cartilage matrix degradation by autofluorescence lifetime. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. Jan 2013;32(1):32-38.
 200. Connelly JP, Botchway SW, Kunz L, Pattison D, Parker AW, MacRobert AJ. Time-resolved fluorescence imaging of photosensitizer distributions in mammalian cells using a picosecond laser line-scanning microscope. *J Photoch Photobio A*. Sep 14 2001;142(2-3):169-175.
 201. Scully AD, Ostler RB, MacRobert AJ, et al. Laser line-scanning confocal fluorescence imaging of the photodynamic action of aluminum and zinc phthalocyanines in V79-4 Chinese hamster fibroblasts. *Photochem Photobiol*. Aug 1998;68(2):199-204.
 202. Ardeshipour Y, Chernomordik V, Hassan M, Zielinski R, Capala J, Gandjbakhche AH. In-vivo fluorescence lifetime imaging for monitoring the efficacy of the cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. Mar 26 2014.
 203. Sparks H, Warren S, Guedes J, et al. A flexible wide-field FLIM endoscope utilising blue excitation light for label-free contrast of tissue. *Journal of biophotonics*. Feb 27 2014.
 204. Elson DS, Jo JA, Marcu L. Miniaturized side-viewing imaging probe for fluorescence lifetime imaging (FLIM): validation with fluorescence dyes, tissue structural proteins and tissue specimens. *New journal of physics*. 2007;9:127.
 205. Munro I, McGinty J, Galletly N, et al. Toward the clinical application of time-domain fluorescence lifetime imaging. *Journal of biomedical optics*. Sep-Oct 2005;10(5).
 206. Requejo-Isidro J, McGinty J, Munro I, et al. High-speed wide-field time-gated endoscopic fluorescence-lifetime imaging. *Optics letters*. Oct 1 2004;29(19):2249-2251.
 207. Brancalion L, Magennis SW, Samuel ID, Namdas E, Lesar A, Moseley H. Characterization of the photoproducts of protoporphyrin IX bound to human serum albumin and immunoglobulin G. *Biophys Chem*. Jun 1 2004;109(3):351-360.
 208. Russell JA, Diamond KR, Collins TJ, et al. Characterization of fluorescence lifetime of Photofrin and delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in living cells using single- and two-photon excitation. *Ieee J Sel Top Quant*. Jan-Feb 2008;14(1):158-166.
 209. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. May 15 2003;423(6937):356-361.

210. Anderson KO, Bradley LA, Young LD, McDaniel LK, Wise CM. Rheumatoid arthritis: review of psychological factors related to etiology, effects, and treatment. *Psychological bulletin*. Sep 1985;98(2):358-387.
211. Aoki S, Ikuta K, Shimizu M. [Symposium: Etiology of rheumatic diseases. 3. (A) Their relationship with infection--the role of bacterial component in the course of experimental induction of chronic rheumatoid arthritis]. *Ryumachi. [Rheumatism]*. Oct 1973;13(4):338-341.
212. Bennett JC. The infectious etiology of rheumatoid arthritis. New considerations. *Arthritis and rheumatism*. Jun 1978;21(5):531-538.
213. Smith MD. The normal synovium. *The open rheumatology journal*. 2011;5:100-106.
214. Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet*. Oct 17 1981;2(8251):839-842.
215. Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis and rheumatism*. Oct 1994;37(10):1415-1420.
216. Hau M, Schultz H, Tony HP, et al. Evaluation of pannus and vascularization of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis by high-resolution ultrasound (multidimensional linear array). *Arthritis and rheumatism*. Nov 1999;42(11):2303-2308.
217. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *The Journal of experimental medicine*. Jul 1 1994;180(1):341-346.
218. O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. Jun 17 2004;350(25):2591-2602.
219. Gelderman KA, Hultqvist M, Olsson LM, et al. Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies. *Antioxidants & redox signaling*. Oct 2007;9(10):1541-1567.
220. Garnero P, Delmas PD. Biomarkers in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*. Sep 2003;15(5):641-646.
221. Brooks P. Inflammation as an important feature of osteoarthritis. *B World Health Organ*. 2003;81(9):689-690.
222. V. Žalgevičienė, Laurinavičienė A. *Bendrosios histologijos pradžios*. Vilnius: Vaistų žinios; 2012.
223. James CB, Uhl TL. A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *J Athl Training*. Oct-Dec 2001;36(4):413-419.
224. Tauraitis VA, Shishporenok SI, Grubina LA, et al. [Assessment of the possibility of using the photodynamic effect in rheumatology]. *Biofizika*. Mar-Apr 1992;37(2):345-351.
225. Chowdhary RK, Ratkay LG, Neyndorff HC, et al. The Use of Transcutaneous Photodynamic Therapy in the Prevention of Adjuvant-Enhanced Arthritis in Mrl/Lpr Mice. *Clin Immunol Immunop*. Aug 1994;72(2):255-263.
226. Ratkay LG, Chowdhary RK, Neyndorff HC, Levy JG, Waterfield JD. Treatment of Experimental Murine Arthritis with Transdermal Photodynamic Therapy. *5th International Photodynamic Association Biennial Meeting*. 1995;2371:596-600.
227. Ratkay LG, Chowdhary RK, Iamaroon A, et al. Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits by induction of apoptosis of inflammatory cells with local application of transdermal photodynamic therapy. *Arthritis and rheumatism*. Mar 1998;41(3):525-534.
228. Trauner KB, Hasan T. Photodynamic treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis. *Photochem Photobiol*. Nov 1996;64(5):740-750.

229. Chowdhary RK, Ratkay LG, Canaan AJ, Waterfield JD, Richter AM, Levy JG. Uptake of verteporfin by articular tissues following systemic and intra-articular administration. *Biopharmaceutics & drug disposition*. Sep 1998;19(6):395-400.
230. Hendrich C, Huttmann G, Vispo-Seara JL, Houserek S, Siebert WE. Experimental photodynamic laser therapy for rheumatoid arthritis with a second generation photosensitizer. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2000;8(3):190-194.
231. Trauner K, Gandour-Edwards R, Bamberg M, et al. Influence of light delivery on photodynamic synovectomy in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Lasers Surg Med*. 1998;22(3):147-156.
232. Huttmann G, Hendrich C, Birngruber R, et al. Protoporphyrin IX distribution after intra-articular and systemic application of 5-aminolevulinic acid in healthy and arthritic joints. *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy V, Proceedings Of*. 1996;2675:238-242.
233. Hendrich C, Hüttmann G, Dröge G, et al. Experimental Photodynamic Laser Therapy for Rheumatoid Arthritis Using Photosan-3, 5-ALA-Induced PPIX and BPD Verteporfin in an Animal Model. *Lasers in the Musculoskeletal System*: Springer; 2001:69-74.
234. Funke B, Jungel A, Schastak S, Wiedemeyer K, Emmrich F, Sack U. Transdermal photodynamic therapy--a treatment option for rheumatic destruction of small joints? *Lasers Surg Med*. Oct 2006;38(9):866-874.
235. Hansch A, Frey O, Gajda M, et al. Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2008;40(4):265-272.
236. Egli RJ, Di Criscio A, Hempfing A, et al. In vitro resistance of articular chondrocytes to 5-Aminolevulinic acid based photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. Apr 2008;40(4):282-290.
237. Bastian JD, Egli RJ, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Differential response of porcine osteoblasts and chondrocytes in cell or tissue culture after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. Apr 2009;17(4):539-546.
238. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. Mar 1988;31(3):315-324.
239. Poole CA, Ayad S, Schofield JR. Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J Cell Sci*. Aug 1988;90 (Pt 4):635-643.
240. Horikawa O, Nakajima H, Kikuchi T, et al. Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2004;9(1):29-36.
241. Ross JM, Sherwin AF, Poole CA. In vitro culture of enzymatically isolated chondrons: a possible model for the initiation of osteoarthritis. *Journal of anatomy*. Dec 2006;209(6):793-806.
242. Henderson B. Alterations in the activity of lysosomal hydrolases in the synovial lining cell population of the knee joint of the rabbit during the development of chronic arthritis. *Pathology, research and practice*. Oct 1981;172(4):363-371.
243. Henderson B, Glynn LE. Metabolic alterations in the synoviocytes in chronically inflamed knee joints in immune arthritis in the rabbit: comparison with rheumatoid arthritis. *British journal of experimental pathology*. Feb 1981;62(1):27-33.

244. Etherington DJ, Taylor MA, Henderson B. Elevation of cathepsin L levels in the synovial lining of rabbits with antigen-induced arthritis. *British journal of experimental pathology*. Apr 1988;69(2):281-289.
245. Howson P, Shepard N, Mitchell N. The antigen induced arthritis model: the relevance of the method of induction to its use as a model of human disease. *J Rheumatol*. Apr 1986;13(2):379-390.
246. Pettipher ER, Henderson B. The relationship between cell-mediated immunity and cartilage degradation in antigen-induced arthritis in the rabbit. *British journal of experimental pathology*. Feb 1988;69(1):113-122.
247. Edwards JC, Read N, Trefty B, Coulstock J, Henderson B. Quantitative histological analysis of antigen-induced arthritis in the rabbit. *British journal of experimental pathology*. Oct 1988;69(5):739-748.
248. Szabelski M, Ilijev D, Sarkar P, et al. Collisional Quenching of Erythrosine B as a Potential Reference Dye for Impulse Response Function Evaluation. *Applied spectroscopy*. Mar 2009;63(3):363-368.
249. Cumming G, Fidler F, Vaux DL. Error bars in experimental biology. *The Journal of cell biology*. Apr 9 2007;177(1):7-11.
250. Rodriguez L, de Bruijn HS, Di Venosa G, et al. Porphyrin synthesis from aminolevulinic acid esters in endothelial cells and its role in photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Sep 4 2009;96(3):249-254.
251. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature medicine*. Dec 2009;15(12):1414-1420.
252. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews*. Jan 2010;233(1):233-255.
253. Henrotin Y, Kurz B. Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Current drug targets*. Feb 2007;8(2):347-357.
254. Henrotin Y, Bruckner P, Pujol J-P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003;11(10):747-755.
255. Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate polymers*. 2011;85(3):469-489.
256. Salter DM, Godolphin JL, Gourlay MS, Lawson MF, Hughes DE, Dunne E. Analysis of human articular chondrocyte CD44 isoform expression and function in health and disease. *The Journal of pathology*. Aug 1996;179(4):396-402.
257. Knudson W, Loeser RF. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Jan 2002;59(1):36-44.
258. Hendrich C, Huttmann G, Lehnert C, Diddens H, Siebert WE. Photodynamic laser therapy for rheumatoid arthritis. Cell culture studies and animal experiments. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 1997;5(1):58-63.
259. Dietel W, Pottier R, Pfister W, Schleier P, Zinner K. 5-Aminolaevulinic acid (ALA) induced formation of different fluorescent porphyrins: a study of the biosynthesis of porphyrins by bacteria of the human digestive tract. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. Jan 3 2007;86(1):77-86.
260. Haringsma J, Tytgat GN. Fluorescence and autofluorescence. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol*. 4/1999 1999;13(1):1-10.
261. Lycette RM, Leslie RB. Fluorescence of Malignant Tissue. *Lancet*. Aug 28 1965;2(7409):436.
262. Endlicher E, Rummele P, Hausmann F, et al. Detection of dysplastic lesions by fluorescence in a model of chronic colitis in rats after local application of 5-

- aminolevulinic acid and its esterified derivatives. *Photochem Photobiol.* Feb 2004;79(2):189-192.
263. Juzenas P, Sorensen R, Iani V, Moan J. Clearance of protoporphyrin IX from mouse skin after topical application of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester. *Photochemotherapy of Cancer and Other Diseases, Proceedings.* 1999;3563:161-166.
264. Kristiansson S, Juzeniene A, Juzenas P, Iani V, Lofgren L, Moan J. Kinetics of protoporphyrin IX formation in rat oral mucosa and skin after application of 5-aminolevulinic acid and its methylester. *Photochemistry and Photobiology.* Mar-Apr 2005;81(2):394-397.
265. Donnelly RF, McCarron PA, Woolfson AD. Derivatives of 5-aminolevulinic Acid for photodynamic therapy. *Perspectives in medicinal chemistry.* 2008;1:49-63.
266. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochem Photobiol.* Jul-Aug 2006;82(4):994-1015.
267. Krammer B, Verwanger T. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid or its methyl ester: Which one is superior? *Medical Laser Application.* 2009;24(4):221-226.
268. He B, Wu JP, Chen HH, Kirk TB, Xu J. Elastin fibers display a versatile microfibril network in articular cartilage depending on the mechanical microenvironments. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* Sep 2013;31(9):1345-1353.
269. Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthopaed.* 2006;19(3):142-146.
270. Rudys R, Bagdonas S, Kirdaite G, Papeckiene J, Rotomskis R. FLUORESCENCE MORPHOLOGY AND FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING MICROSCOPY (FLIM) OF RABBIT KNEE TISSUES IN THE EXPERIMENTAL ARTHRITIS MODEL. In: Adliene D, ed. *Medical Physics in the Baltic States*2012:56-61.
271. Ashhurst DE, Bland YS, Levick JR. An immunohistochemical study of the collagens of rabbit synovial interstitium. *J Rheumatol.* Nov 1991;18(11):1669-1672.
272. Lovell CR, Nicholls AC, Jayson MI, Bailey AJ. Changes in the collagen of synovial membrane in rheumatoid arthritis and effect of D-penicillamine. *Clinical science and molecular medicine.* Jul 1978;55(1):31-40.
273. Kelley WN, Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. *Kelley's textbook of rheumatology.* Vol 1: Elsevier Health Sciences; 2012.
274. He B, Wu JP, Chen HH, Kirk TB, Xu JK. Elastin fibers display a versatile microfibril network in articular cartilage depending on the mechanical microenvironments. *J Orthopaed Res.* Sep 2013;31(9):1345-1353.
275. Venius J, Bagdonas S, Zurauskas E, Rotomskis R. Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of the Heart Tissues. *Lithuanian Journal of Physics.* 2011;51(4):370-376.
276. Schneckenburger H, König K, Kunzi-Rapp K, Westphal-Frösch C, Rück A. Time-resolved *in-vivo* fluorescence of photosensitizing porphyrins. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* 1993 1993;21:143-147.
277. König K, Schneckenburger H, Rück A, Steiner R. *In vivo* photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* 1993 1993;18:287-290.
278. Mignotte F, Champagne AM, Froger-Gaillard B, et al. Mitochondrial biogenesis in rabbit articular chondrocytes transferred to culture. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization.* 1991;71(1-2):67-72.

- 279.** Grimshaw M, Mason R. Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression in vitro by oxygen tension. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2001;9(4):357-364.