

VILNIAUS UNIVERSITETAS

DIANA KARPEC

FOTOTERAPIJOS POVEIKIS SISTEMINĖS SKLEROZĖS GYVŪNŲ
MODELIUOSE

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta 2013–2017 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Reumatologijos, traumatologijos-ortopedijos ir rekonstrukcinės chirurgijos klinikoje

Mokslinis vadovas – prof. habil. dr. Algirdas Venalis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Mokslinė konsultantė – doc. dr. Rita Rugienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Skiriu vyrui Laurynui

SUTARTINIAI ŽYMĖJIMAI

AECA (angl. *Anti-endothelial cells antibody*) – antikūnas prieš endotelines ląsteles

AIKT – atsitiktinių imčių kontroliuojamieji tyrimai

Apaf-1 (angl. *Apoptosis proteases activating factor*) – apoptozės proteazės aktyvinantis faktorius

BLM – bleomicinas

BMPRII (angl. *Bone morphogenetic protein receptor II*) – kaulų morfogenetinio baltymo II tipo receptoriaus

CD (angl. *Cluster of differentiation*) – leukocitų diferenciacijos grupė

CTGF (angl. *Connective tissue growth factor*) – jungiamojo audinio augimo faktorius

DAB – 3,3-diaminobenzidino tetrahydrochloridas

DNR – dezoksiribonukleorūgštis

ECM (angl. *Extracellular matrix*) – tarpląstelinis matriksas

EPCs (angl. *Endothelial progenitor cells*) – kamieninės endotelinės ląstelės

ET-1 – endotelinas-1

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

H&E – hematoksilinas ir eozinas

ICAM-1 (angl. *Intercellular adhesion molecule-1*) – tarpląstelinė adhezijos molekulė

IFN γ (angl. *Interferon gamma*) – gama interferonas

IL – interleukinas

IL-1 α – interleukinas-1 alfa

KO (angl. *Knock out*) – pašalinti genai

LED (angl. *Light emitting diode*) – šviesą skleidžiantis diodas

LXR (angl. *Liver X receptor*) – kepenų receptoriaus X

MMP-1 – matrikso metaloproteinazė 1

MMP-3 – matrikso metaloproteinazė 3

MMPs – matrikso metaloproteinazės

mRNR – matricinė ribonukleorūgštis

NaCl – natrio chloridas

PBS (angl. *Phosphate buffered saline*) – fosfato buferio tirpalas

PDGF (angl. *Platelet-derived growth factor*) – trombocitų kilmės augimo faktorius

PDGFR (angl. *Platelet-derived growth factor receptor*) – trombocitų kilmės augimo faktoriaus receptorius

PPAR γ (angl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) – peroksisomų proliferatoriaus aktyvinamas gama receptorius

PUVA – psoralenas ir ultravioletinė spinduliuotė A

R – receptorius

RNR – ribonukleorūgštis

ROS (angl. *Reactive oxygen species*) – laisvieji deguonies radikalai

SAM – Sveikatos apsaugos ministerija

sav. – savaitė

SD – standartinis nuokrypis

SS – sisteminė sklerozė

STAT4 (angl. *Signal transducer and activator of transcription-4*) – signalo perdavimo ir transkripcijos aktyvacijos faktorius-4

TGF- β (angl. *Transforming growth factor beta*) – transformuojantis augimo faktorius beta

TGF β RI (angl. *Transforming growth factor beta receptor I*) – transformuojančio augimo faktoriaus beta I tipo receptorius

TGF β RII (angl. *Transforming growth factor beta receptor II*) – transformuojančio augimo faktoriaus beta II tipo receptorius

Th (angl. *T helpers*) – limfocitai pagalbininkai

TNF α (angl. *Tumor necrosis factor alpha*) – naviko nekrozės faktorius alfa

Tsk-1 (angl. *Tight skin-1*) – sustandėjusios odos modelis 1

Tsk-2 (angl. *Tight skin-2*) – sustandėjusios odos modelis 2

UCD-200 (angl. *University of California Davis line-200*) – Kalifornijos universiteto Davis-200 linija

UCD-206 (angl. *University of California Davis line-206*) – Kalifornijos universiteto Davis-206 linija

UV – ultravioletinė spinduliuotė

UVA – ultravioletinė spinduliuotė A

UVA1 – ultravioletinė spinduliuotė A1

UVA2 – ultravioletinė spinduliuotė A2

UVB – ultravioletinė spinduliuotė B

UVC – ultravioletinė spinduliuotė C

VASPT – Valstybinė akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnyba

VCAM-1 (angl. *Vascular cell adhesion molecule-1*) – kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė

VEGF (angl. *Vascular endothelial growth factor*) – kraujagyslių endotelio augimo faktorius

VEGFR1 (angl. *Vascular endothelial growth factor receptor 1*) – kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptorius 1

VEGFR2 (angl. *Vascular endothelial growth factor receptor 2*) kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus receptorius 2

α -SMA (angl. *Alpha smooth muscle actin*) – α -lygiųjų raumenų aktinas

TURINYS

SUTARTINIAI ŽYMĖJIMAI.....	4
1. ĮVADAS	10
1.1. Įžanga	10
1.2. Aktualumas.....	12
1.3. Naujumas.....	14
1.4. Darbo tikslas ir uždaviniai	15
1.5. Ginamieji teiginiai	15
1.6. Autorės indėlis.....	16
1.7. Publikacijų sąrašas	17
1.8. Padėka	19
2. LITERATŪROS APŽVALGA	20
2.1. Sisteminės sklerozės patogenezės grandys	20
2.1.1. Vaskulopatija.....	21
2.1.2. Autoimunitetas	24
2.1.3. Fibrozė.....	28
2.2. Eksperimentiniai sklerodermos gyvūnų modeliai.....	31
2.2.1. Bleomicinu sukeltas sklerodermos modelis	31
2.2.2. Transgeniniai pelių sklerodermos modeliai	33
2.2.3. Spontaniniai sklerodermos modeliai	34
2.2.4. Pašalintų genų sklerodermos modeliai	35
2.3. Fototerapija.....	36
2.3.1. Ultravioletinė spinduliuotė	36
2.3.2. UVA1 poveikis ląstelėms	39
2.3.3. UVA1 fototerapijos klinikinės indikacijos.....	39
2.3.4. UVA1 fototerapijos poveikis lokaliai sklerodermai ir sisteminei sklerozei	42
2.3.5. Fototerapijos nepageidaujamos reakcijos.....	48
2.3.6. Fototerapijos šaltiniai	49

3. METODAI	50
3.1. Eksperimentiniai gyvūnai.....	50
3.2. Eksperimentinis pelių sisteminės sklerozės modelis	51
3.3. Fototerapijos prietaisas.....	52
3.3.1. UVA1 spinduliuotės šaltinis.....	53
3.3.2. UVA1 spinduliuotės galios tankis ir spektrinės savybės	54
3.4. Fototerapijos kursas	55
3.4.1. Fototerapijos kurso schema bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės pelių modelyje.....	56
3.4.2. Fototerapijos kurso schema bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės pelių modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį	57
3.5. Tyrimų schema.....	59
3.5.1. Biopsinės medžiagos paruošimas mikroskopijai.....	59
3.5.2. Tyrimai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje	59
3.5.3. Tyrimai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį	60
3.6. Histologinė analizė.....	60
3.6.1. Histologinė odos storio analizė	60
3.6.2. Histologinė putliųjų ląstelių infiltracijos analizė	61
3.7. Aktyvios kaspazės-3, p53, Ki-67, MMP-1, MMP-3, kolageno I ir III tipo imunohistocheminė analizė	61
3.7.1. Imunohistocheminio dažymo atlikimo metodika.....	61
3.7.2. Imunohistocheminio dažymo mėginių vertinimo metodika.....	63
3.8. Statistika	64
4. REZULTATAI	65
4.1. Tyrimų rezultatai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje	65
4.1.1. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis odos storiui.....	65

4.1.2.	Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis putliųjų ląstelių infiltracijai	67
4.1.3.	Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis apoptozei	70
4.1.4.	Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis karcinogenezei	73
4.1.4.1.	p53 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai	73
4.1.4.2.	Ki-67 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai.....	76
4.2.	Tyrimų rezultatai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį	79
4.2.1.	Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių dozių poveikis odos storiui 79	
4.2.2.	Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių dozių poveikis MMP-1 ir MMP-3 raiškoms.....	81
4.2.2.1.	MMP-1 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai	81
4.2.2.2.	MMP-3 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai	82
4.2.3.	Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių dozių poveikis kolageno I ir III tipų raiškoms.....	84
4.2.3.1.	I tipo kolageno imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai	84
4.2.3.2.	III tipo kolageno imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai 86	
5.	REZULTATŲ APTARIMAS	88
5.1.	Tyrimų, atliktų bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės modelyje, rezultatų aptarimas	88
5.2.	Tyrimų, atliktų bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį, rezultatų aptarimas ...	94
6.	REZULTATŲ APIBENDRINIMAS.....	97
7.	IŠVADOS.....	100
8.	MOKSLINIO DARBO TRŪKUMAI	101
9.	PRAKTINĖ NAUDA	102
10.	LITERATŪRA	104
11.	PRIEDAI.....	119

1. ĮVADAS

1.1. Įžanga

Sisteminė sklerozė (SS) – viena iš sunkiausių ir fatališkiausių autoimuninių reumatinių ligų, nuo kurios dažniausiai nukenčia gana jauni, darbingo amžiaus žmonės. Moterys SS serga 3–6 kartus dažniau negu vyrai [1]. SS paplitimas Europoje – 13 sergančiųjų milijonui vyrų ir 48 sergančiosios milijonui moterų [1]. 85 % atvejų liga prasideda 20–60 gyvenimo metais [2]. Skirtingų tyrimų duomenimis, SS paplitimas pasaulyje yra 31–350 sergančiųjų milijonui suaugusiųjų, kasmet nustatomi 1,2–23 nauji atvejai/mln. gyventojų [1, 3]. Remiantis Lietuvos Higienos instituto Sveikatos informacijos centro duomenimis, 2016 m. Lietuvoje buvo nustatyti 68 nauji SS atvejai, o iš viso SS sirgo 339 asmenys (<http://stat.hi.lt>).

Pirmasis klinikinis SS simptomas yra Reino sindromas, palapsniui sukeliantis audinių išemiją [4]. Dėl progresuojančios vaskulopatijos pirštų galų opų atsiranda nuo 31,8 iki 71,4 % ligonių [5]. Dėl lėto opų gijimo, skausmingos išeminės nekrozės, infekcinių komplikacijų 14–29 % pacientų pasireiškia pirštų gangrena [5]. SS patogenezės esmę sudaro tarpusavyje susiję ir vienas kitą palaikantys procesai – audinių išemija su uždegiminiais veiksniais ir įvairių organų fibrozė. Sustorėjęs kraujagyslių sienelės jungiamasis audinys mažina kraujagyslių spindį, dėl to sutrinka audinių aprūpinimas deguonimi, o audinių išemija stimuliuoja ir taip jau aktyvią fibroblastų veiklą bei padidėjusią jungiamojo audinio gamybą [6]. Vystantis SS, be plaučių, virškinimo trakto ir kitų organų sistemų pažeidimo, pasireiškia progresuojantis odos kietėjimas – fibrozė, sąnarių fleksinės kontraktūros, minkštųjų audinių kalcinatai, inervacijos sutrikimai, osteolizė [7]. Šie veiksniai neigiamai veikia darbinę veiklą bei sąlygoja su rankų funkcija susijusios kasdieninės veiklos apribojimą. Remiantis sisteminės apžvalgos duomenimis, pacientų, sergančių sisteminė skleroze, nedarbo lygis sudaro 18–61 % [8].

Nors liga nėra dažna, tačiau smarkiai blogina ligonių gyvenimo kokybę, mažina amžiaus trukmę ir yra susijusi su sunkia socioekonominė našta visuomenei. Remiantis turimais duomenimis, visiems pacientams, sergantiems SS, Europoje išleidžiama apie 3,1 bilijono Eur per metus [9]. Medicininės išlaidos, susijusios su SS, yra didesnės nei sergant tokiais negalia sukeliančiomis ligomis kaip reumatoidinis ar psoriatinis artritas [8].

Pastaraisiais metais pasiekta didžiulė daugelio autoimuninių reumatinių ligų gydymo pažanga. Pirmiausia tai yra susiję su biologinės terapijos įdiegimu į klinikinę praktiką. Deja, to negalima pasakyti apie SS gydymą. Nors SS yra negalia sukelianti, bloginanti gyvenimo kokybę liga, veiksmingo gydymo, stabdančio ligos progresavimą ir sukeliančio ilgalaikę remisiją, nėra. Atliktais kontroliniais atsitiktinių imčių tyrimais yra nustatyta, kad metotreksatas gali būti veiksmingas gydant odos fibrozę [10], o ciklofosfamidą – plaučių fibrozę [11]. Tačiau ilgalaikis citostatikų, ypač ciklofosfamido, vartojimas yra susijęs su daugybe nepageidaujamų reakcijų, kai kurios iš jų yra pavojingos gyvybei. Nepaisant sisteminio gydymo, pacientų kasdieninės veiklos funkcijos būna apribotos dėl progresuojančio galūnių, ypač rankų, odos pažeidimo. Ankstyvas odos fibrozės gydymas yra būtinas ne tik dėl paciento diskomforto pojūčio, bet ir dėl vėlyvų komplikacijų: judesių amplitudės sumažėjimo, kontraktūrų, negyjančių žaizdų bei kalcinatų susidarymo. Todėl ne tik sisteminis, bet ir lokalus gydymas turi būti nepavėluotas ir kompleksinis. Tačiau neinvazinio, nemedikamentinio gydymo galimybės stabdyti odos fibrozės progresavimą yra ribotos.

Per paskutinius du dešimtmečius fototerapija ultravioletiniais spinduliais (UV) tapo viena iš odos ligų, tokių kaip atopinis dermatitas, psoriazė, dilgėlinė, niežulys, neinvazinio gydymo galimybių [12]. Fototerapijos vieta gydant SS nėra aiškiai apibrėžta. Atliktais tyrimais parodyta, kad ultravioletiniai A1 (UVA1) 340–400 nm bangos ilgio spinduliai pasižymi uždegimą slopinančiu ir imunomoduliaciniu poveikiu [13]. *In vitro* ir *in vivo* atliktais tyrimais nustatyta, kad plataus spektro

UVA1 spinduliuotė slopina fibroblastų proliferaciją, blokuoja kolageno gamybą, skatina kolageno skaidymą, sukelia T ląstelių apoptozę ir reguliuoja tokių veiksnių kaip transformuojantis augimo faktorius beta (TGF- β , angl. *Transforming growth factor beta*), gama interferonas, matrikso metaloproteinazių (MMPs) raišką [14-17]. Atsižvelgiant į šiuos pirminius duomenis, UVA1 fototerapija galėtų būti viena iš neinvazinio antifibrozinio gydymo galimybių.

Remiantis literatūros duomenimis, šiuo metu nėra atlikta atsitiktinių imčių, placebo kontroliuojamų, dvigubai aklų tyrimų siekiant nustatyti UVA1 fototerapijos efektyvumą gydant SS ar sklerodermą. Su lokalia skleroderma ar SS sergančiais pacientais atlikta keliolika studijų, iš kurių tik trys kontrolinės, ir jose įvertintas UVA1 klinikinis poveikis [18-20]. Pateiktose studijose buvo naudojamas platus UVA1 spinduliuotės spektras (340–400 nm), kartais apimantis tiek ultravioletinę A2 (bangos ilgis < 340 nm), tiek regimosios spinduliuotės sritis (bangos ilgis > 400 nm). Plati spektrinė UVA1 sritis reaguoja su daugeliu chromoforų odoje, taip sukeldama skirtingus imuninius atsakus [21]. Tad plataus UVA1 spinduliuotės spektro naudojimas gali būti susijęs su didesne šalutinių reakcijų, kaip eritema ar piktybinių navikų išsivystymas, rizika, silpnesniu terapiniu poveikiu ir mažesne spinduliuotės skvarba į audinius. Šio tyrimo metu buvo iškelta hipotezė, kad siauro spektro UVA1 spinduliuotė gali būti veiksminga ir saugi fototerapijos rūšis odos fibrozei gydyti.

1.2. Aktualumas

Pagrindiniai SS patogenetiniai mechanizmai yra vaskulopatija, kuriai būdingas ryškus kraujagyslių spazmas, dėl padidėjusių kolagenų sancaupų progresuojanti fibrozė ir pakitęs imuninis atsakas [6]. UVA1 spinduliuotės sugertis paviršiniuose ir giliausiuose odos sluoksniuose lemia biologinį fototerapinį atsaką visose SS patogenezės grandyse.

Jungtinių Amerikos Valstijų maisto ir vaistų administravimo tarnyba (angl. *United States Food and Drug Administration*) patvirtino plačiajuostės UVA1 spinduliuotės fototerapijos prietaisą (Daavlin©, UVA1 (340–400 nm, smailė ties 365–375 nm) psoriazei, baltmei (vitiligui) ir atopiniam dermatitui gydyti [22]. Tačiau fototerapijos šaltinis gali būti ir šviesą spinduliuojantys diodai – LED'ai (LED, angl. *Light emitting diodes*), kurie skleidžia tik tam tikros bangos ilgio srities spinduliuotę. Prietaiso ilgaamžiškumas, mažas svoris ir gabaritai, patvarumas, temperatūrinis stabilumas, mažas šilumos kiekio išspinduliavimas ir ekonomiškumas (maitinimui reikalinga nedidelė įtampa) yra svarbūs veiksniai, lemiantys LED'ų pranašumą prieš įprastines fluorescencines lempas [23]. Rengiant šią disertaciją buvo sukonstruotas specialiosios paskirties medicinos prietaisas „IMC-Light“, sudarytas iš 365 ± 5 nm UVA1 skleidžiančių diodų. Pasirinktas bangos ilgis atitinka fluorescencinių UVA1 lempų spektrinės srities smailę. Trumpesnis nei 365 ± 5 nm bangos ilgis yra susijęs su didesne fototerapijos karcinogenezės rizika, nes trumpesnio bangos ilgio ir didesnės energijos fotonai pasiekia tik viršutinius odos sluoksnius, sukeldami epidermio pažaidas. Nustatyta, kad purino ir pirimidino bazės sugeria 230–300 nm spinduliuotę, ir ši sugertis yra atsakinga už DNR pažaidas. Įvertinus fizikines UVA1 ir optines odos savybes, siaurajuostės 365 ± 5 nm UVA1 spinduliuotės fotonai, pasiekdami tikrosios odos sluoksnius, tiesiogiai ir selektyviai veiktų kolageno ir elastino sankaupas mažesniu šalutinių reakcijų pasireiškimo dažniu. Siauros spektrinės UVA1 srities poveikis gydant odos pažeidimus buvo tirtas tik keliose studijose. Nistico su bendraautorais [24] nustatė, kad monochromatinis UVA1 lazeris (355 nm) buvo veiksmingas gydant delnų ir pėdų pustulinę psoriazę. Iki šiol nėra atlikta tyrimų, kurių metu būtų įvertintas siaurajuostės UVA1 spinduliuotės, skleidžiamos LED, poveikis odos fibrozei.

Tyrimai su gyvūnais leidžia įvertinti naujo gydymo metodo veiksmingumą ir saugumą bei gyvo organizmo atsaką į fototerapiją [25]. Šiems tikslams pasirinktas

eksperimentinis bleomicinu sukeltas SS modelis, naudojant DBA/2 linijos peles. Moksliniame darbe buvo tirtas 365 ± 5 nm UVA1 antifibrozinis efektyvumas, fototerapijos įtaka fibrozinių pokyčių regresijai ir fibrozės progresavimui bei karcinogenezės išsivystymui bleomicinu sukeltuose SS pelių modeliuose.

1.3. Naujumas

- Šiame moksliniame darbe pirmą kartą buvo įrodyta, kad siauro spektro UVA1 (365 ± 5 nm) spinduliuotė ne tik sustabdo odos fibrozės progresavimą, bet ir sukelia jau buvusių fibrozinių pokyčių regresiją bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės gyvūnų modelyje.
- Gauti rezultatai rodo, kad siaurajuostės UVA1 didelių ir vidutinių (atitinkamai suminės $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$ ir $600\ \text{J}/\text{cm}^2$) dozių fototerapija nesukelia padidėjusios karcinogenezės rizikos sisteminės sklerozės gyvūnų modelyje.
- Sukurtas specialiosios paskirties medicinos prietaisas „IMC-Light“, kuris bus naudojamas klinikiame sisteminė skleroze sergančių pacientų tyrime (prietaisas yra įregistruotas Europos medicininių prietaisų duomenų banke).

1.4. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Ištirti siauro spektro (365 ± 5 nm) ultravioletinės A1 (UVA1) spinduliuotės poveikį fibrozės procesui ir saugumą sisteminės sklerozės (SS) eksperimentiniuose gyvūnų modeliuose.

Uždaviniai

1. Įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės didelių ir vidutinių dozių poveikį skleroderminės odos storiui, putliųjų ląstelių infiltracijai ir aktyvios kaspazės-3 raiškai, taikant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės gyvūnų modelį.
2. Ištirti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės didelių ir vidutinių dozių poveikį karcinogenezės išsivystymui, naudojant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės gyvūnų modelį.
3. Įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės didelių dozių poveikį fibrozinių pokyčių išsivystymui ir fibrozės regresijai, taikant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės gyvūnų modelį, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį.

1.5. Ginamieji teiginiai

1. Siaurajuostė UVA1 fototerapija sumažina skleroderminės odos storį, sustabdo fibrozės progresavimą ir sukelia fibrozinių pokyčių regresiją bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės gyvūnų modelyje.
2. Siaurajuostė UVA1 spinduliuotė nesukelia padidėjusios karcinogenezės rizikos bleomicinu sukeltame SS gyvūnų modelyje.

1.6. Autorės indėlis

Bendradarbiaujant su Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Kvantinės elektronikos katedros mokslininkais, Valstybiniame mokslinių tyrimų institute, Inovatyvios medicinos centre, sukurtas specialiosios paskirties medicinos prietaisas „IMC-Light“, skleidžiantis ultravioletinę ir infraraudonąją spinduliuotes.

Prof. A. Venalis, dr. Rita Rugienė, dr. Romualdas Rudys, dr. Gailutė Kirdaitė ir disertacijos autorė pateikė pranešimą-prašymą (iš viso 160 psl.) Valstybinei akreditavimo sveikatos priežiūros veiklos tarnybai (VASPT) prie Sveikatos apsaugos ministerijos (SAM) dėl specialiosios paskirties medicinos prietaiso „IMC-Light“ naudojimo klinikiame tyrime, vykstančiame Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose. Akreditacijos duomenys ir suteiktas leidimas (D2-11748 - (5.19) (Nr. S8-5)) yra įregistruoti Europos medicininių prietaisų duomenų banke EUDAMED; klinikinio tyrimo identifikacijos Nr. (CIV-ID): CIV-15 - 10-013898 (1 priedas).

Darbo vadovas prof. Algirdas Venalis suformulavo disertacijos idėją ir temą, konsultavo eksperimentų atlikimo klausimais, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas.

Konsultantė dr. Rita Rugienė konsultavo rengiant mokslinio darbo klinikinę dalį, dalyvavo ruošiant medžiagą pristatymui konferencijose.

Dr. Gailutė Kirdaitė konsultavo eksperimentinių tyrimų organizavimo ir rezultatų interpretavimo klausimais, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas ir medžiagą pristatymui konferencijose.

Dr. Romualdas Rudys atliko sukonstruoto prietaiso skleidžiamos spinduliuotės testavimą Nacionalinio vėžio instituto Mokslinių tyrimų centro Biomedicininės fizikos laboratorijoje, konsultavo fizikiniais klausimais, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas.

Dr. Laima Leonavičienė, dr. Rūta Bradūnaitė ir veterinarijos gydytoja Diana Kazlauskaitė vykdė visas procedūras su eksperimentiniais gyvūnais. Laboratorijos darbuotoja Roma Grininė konsultavo atliekant bandinių histologinius ir imunohistocheminius dažymus.

Prof. Zygmunt Mackiewicz konsultavo interpretuojant histologinių ir imunohistocheminių preparatų mikroskopijos vaizdus.

Pagrindiniai mokslinių publikacijų bendraautorai yra prof. Algirdas Venalis, prof. Zygmunt Mackiewicz, dr. Gailutė Kirdaitė, dr. Romualdas Rudys, dr. Laima Leonavičienė ir dr. Rūta Bradūnaitė. Visi bendraautorai dalyvavo rengiant mokslines publikacijas.

Autorė organizavo eksperimentinius tyrimus, paruošė bandinius mikroskopijai, atliko bandinių histologinius ir imunohistocheminius dažymus, apdorojo ir interpretavo gautus rezultatus, juos pristatė mokslinėse konferencijose ir parengė publikacijas.

1.7. Publikacijų sąrašas

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

1. D. Karpec, R. Rudys, L. Leonaviciene, Z. Mackiewicz, R. Bradunaite, G. Kirdaite, A. Venalis. The impact of high-dose narrowband ultraviolet A1 on dermal thickness, collagen and matrix-metalloproteinases in animal model of scleroderma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017, 173: 448–455.

Priimta spaudai:

2. D. Karpec, R. Rudys, L. Leonaviciene, Z. Mackiewicz, R. Bradunaite, G. Kirdaite, A. Venalis. The safety and efficacy of light emitting diodes-based ultraviolet A1 phototherapy in bleomycin-induced scleroderma in mice. *Advances in Medical Science*. 2018, 63.

Publikacijos kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose:

1. D. Karpec, L. Leonavičienė, R. Bradūnaitė, A. Venalis, G. Kirdaitė. Gyvūnų sklerodermos modeliai ir jų naudojimo galimybės. *Laboratorinė medicina*. 2014, t. 16, Nr. 4, p. 187–193.
2. D. Karpec, R. Rudys, L. Leonavičienė, Z. Mackiewicz, R. Bradūnaitė, G. Kirdaitė, A. Venalis. Siaurajuostės ultravioletinės A1 spinduliuotės poveikis aktyviai kaspazės-3 raiškiai sisteminės sklerozės gyvūnų modelyje. *Laboratorinė medicina*. 2017, t. 19, Nr. 3 (75), p. 151–157.

Pranešimai mokslinėse konferencijose:

1. D. Karpec, R. Rudys, Z. Mackiewicz, L. Leonaviciene, R. Bradunaite, R. Rugiene, G. Kirdaite, A. Venalis. Narrowband 365 nm ultraviolet A1 light therapy in bleomycin induced scleroderma animal model. 4-asis sisteminės sklerozės kongresas (angl. *4th Systemic Sclerosis Congress*), 2016 m. vasario 18–20 d., Lisabona, Portugalija.
2. D. Karpec, R. Rudys, L. Leonaviciene, Z. Mackiewicz, R. Bradunaite, G. Kirdaite, R. Rugiene, A. Venalis. The effect of narrowband ultraviolet A1 light on bleomycin-induced mouse model of scleroderma. Amerikos reumatologų kolegijos kongresas (ACR – angl. *American College of Rheumatology Congress*), 2016 m. lapkričio 12–16 d., Vašingtonas, Jungtinės Amerikos Valstijos.
3. D. Karpec, R. Rudys, Z. Mackiewicz, L. Leonaviciene, R. Bradunaite, R. Rugiene, G. Kirdaite, A. Venalis. The impact of narrowband ultraviolet A1 on proliferation and apoptosis markers in animal model of scleroderma. Europos antireumatinės lygos kongresas (EULAR – angl. *European League Against Rheumatism*), 2017 m. birželio 14–18 d., Madridas, Ispanija.
4. D. Karpec, R. Rudys, Z. Mackiewicz, L. Leonaviciene, R. Bradunaite, R. Rugiene, G. Kirdaite, A. Venalis. The impact of high-dose narrowband ultraviolet A1 on dermal thickness in pre-established, bleomycin-induced

mouse model of scleroderma. Baltijos šalių reumatologų konferencija (angl. *Baltic Rheumatology Conference*), 2017 m. rugsėjo 21–22 d., Vilnius, Lietuva.

5. D. Karpec, R. Rudys, Z. Mackiewicz, L. Leonaviciene, R. Bradunaite, R. Rugiene, G. Kirdaite, A. Venalis. The impact of high-dose narrowband ultraviolet A1 on dermal fibrosis in pre-established, bleomycin-induced mouse model of scleroderma. 19-as Azijos ir Ramiojo vandenyno regiono šalių reumatologų asociacijų kongresas (angl. *APLAR – 19th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress*), 2017 m. spalio 16–20 d., Dubajus, Jungtiniai Arabų Emyratai.

Akademiniai pasiekimai:

1. 2017 m. Lietuvos mokslo tarybos stipendija už akademinis pasiekimus;
2. 2017 m. Pasaulio mokslininkų federacijos Lietuvos nacionalinė stipendija už akademinis pasiekimus.

1.8. Padėka

Visų pirma dėkoju savo Mamai ir Tėčiui už gyvybę ir suteiktą meilę gyvenimui bei mokslui.

Ačiū darbo vadovui prof. Algirdui Venaliui už disertacijos idėją, įdomias diskusijas ir galimybę atlikti šį darbą. Dėkoju konsultantei doc. Ritai Rugienei už įkvėpimą, vertingus patarimus, visapusišką palaikymą ir konstruktyvias mintis, kai labiausiai jų reikia.

Esu labai dėkinga dr. Gailutei Kirdaitei už nuoširdžias diskusijas, pamokas, komentarus ir pagalbą ruošiant pranešimus, publikacijas bei disertaciją. Ir už tai, kad labai gera kartu dalytis pasiekimų džiaugsmu.

Dėkoju dr. Romualdai Rudžiui už konstruktyvias konsultacijas, fizikines žinias ir bendradarbiavimą. Ačiū dr. Rūtai Bradūnaitei ir dr. Laimai Leonavičienei už darbo su eksperimentiniais gyvūnais patirtį, už vertingus pataisymus ir pagalbą ruošiant publikacijas. Dėkoju prof. Zygmunt Mackiewicz už pamokymą mikroskopuoti mėginius, už komentarus ir diskusijas ruošiant bei taisant publikacijas. Esu dėkinga laborantei Romai Grinienei už pamokas ir jos kantrybę mano darbo laboratorijoje metu. Dėkoju dr. Inesai Arštikytei už pagalbą atliekant statistinę analizę.

Dėkoju visam Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Reumatologijos centro kolektyvui už pagalbą, gerą nuotaiką ir puikią darbo atmosferą.

Ačiū kolegėms Eglei, Reginai ir Ievai už juoko ir kitokias ašaras kartu. Ir, be abejo, esu dėkinga artimiausiems draugams bei vyrui Laurynui už jų kantrybę, palaikymą ir sveiką požiūrį.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Sisteminės sklerozės patogenezės grandys

Skleroderma – nežinomos etiologijos jungiamojo audinio liga, pasireiškianti odos ir vidaus organų pažeidimu. Ši liga skirstoma į dvi pagrindines formas: lokali skleroderma ir sisteminė sklerozė. Lokaliai sklerodermai būdingi fibroziniai pokyčiai odoje, poodyje, raumenyse ir giliuosiuose audiniuose, tačiau nėra nustatomas vidaus organų pažeidimas [26]. Sisteminės sklerozės metu pasireiškia Reino sindromas, sklerodaktilija ir progresuojanti vidaus organų fibrozė [6]. Vaskulopatija, kuriai būdingas išreikštas kraujagyslių spazmas, dėl padidėjusių kolagenų sankaupų besivystanti fibrozė ir pakitęs imuninis atsakas dėl uždegimą sukeliančių ląstelių infiltracijos yra pagrindinės patogenezės grandys [6]. Skirtingi ligos išsivystymo būdai lemia ligos heterogeniškumą [6].

2.1.1. Vaskulopatija

Pirminis ir pagrindinis SS patogenezės veiksnys yra kraujagyslių pažeidimas su endotelio disfunkcija [27]. Šią hipotezę patvirtina Reino sindromas, pasireiškiantis keletą metų iki fibrozinų odos pokyčių išsivystymo [4]. Reino sindromas dažniausiai yra pirmasis su difuzine ligos forma susijęs simptomas [28]. Smulkiųjų kraujagyslių pažeidimą SS patogenezės pradžioje įrodo ir nago guolio kapiliaroskopijos tyrimas. Šakoti kapiliarai, mikrohemoragijos ir išsiplėtę kapiliarai būdingi ankstyvam SS kapiliaroskopiniam vaizdui [29]. Gyvūnų fibrozės modeliuose taip pat patvirtinama, kad smulkiųjų kraujagyslių vaskulopatija yra pirminis būdingas SS pažeidimas. Maurer su bendraautoriais [30] tyrė Fra-2 (angl. *Fos-related antigen-2* – su Fos susijęs antigenas-2; transkripcijos faktorius) transgenines peles, kurioms būdingi fibroziniai odos ir plaučių pokyčiai. Nustatyta, kad, prieš išsivystant fibroziniams pokyčiams, pradžioje atsiranda plaučių arterijų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija ir endotelinių ląstelių apoptozė, kartu smarkiai sumažėja kapiliarų skaičius dermoje [30]. Kalifornijos universiteto Davis-200 viščiukų linijos (UCD-200, angl. *University of California Davis line*) SS modelyje taip pat buvo nustatytas pirminis kraujagyslių pažeidimas ir endotelinių ląstelių apoptozė, o tik paskui išsivystė fibrozė [25].

Smulkiųjų kraujagyslių pažeidimo patogenezė iki šiol nėra tiksliai žinoma [31]. Manoma, kad išoriniai veiksniai tiesiogiai pažeidžia endotelines ląsteles arba aktyvina imuninę sistemą, o tai lemia tolesnes endotelinių ląstelių pažaidas. Jau prieš du dešimtmečius buvo įrodyta, kad lėtinis uždegimas yra vienas iš pagrindinių veiksnių, sukeliančių pirmines kraujagyslių pažaidas [32]. Uždegiminių ląstelių, tokių kaip T ir B limfocitų, putliųjų ląstelių bei makrofagų sankaupos aplink kraujagysles patvirtina aktyvią imuninės sistemos veiklą SS patogenezėje [31]. Aktyvintos uždegiminės ląstelės, trombocitai ir endotelinės ląstelės išskiria uždegimą skatinančius citokinus ir augimo faktorius, o dėl to dar paspartėja patologinių ląstelių kaupimasis [6]. Tad progresuojanti vaskulopatija ir uždegiminis

procesas suformuoja ydingą ratą SS patogenezėje. Aktyvios endotelinės ląstelės išskiria tirpias adhezijos molekules, tokias kaip tarpląstelinė adhezijos molekulė (ICAM-1, angl. *Intercellular adhesion molecule-1*), kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė (VCAM-1, angl. *Vascular cell adhesion molecule-1*) ir kt., kurios yra tiesiogiai susijusios su ankstyva ligos pradžia ir vidaus organų pažeidimo laipsniu [33]. Leukocitų migraciją per endotelinių ląstelių tarpus į audinius veikia tokios adhezijos molekulės kaip CD31 (angl. *Cluster of differentiation* – leukocitų diferenciacijos antigenas), CD99, VCAM-1 ir ICAM-1 [34]. Imuninių ląstelių migracija iš kraujo į periferinius audinius taip pat priklauso nuo chemokinių gradiento. Padidėjusi chemokinių raiška yra susijusi su perivaskuliniu uždegimu ankstyvoje SS stadijoje [35]. Nustatyta, kad sergančiųjų SS odoje padaugėja gama interferono indukuoto monokino, gama interferono indukuoto baltymo-10, monocitų chemotaksinių baltymų 1 ir 3, o tai skatina T ląstelių, makrofagų ir kitų imuninių ląstelių migraciją iš kraujo į audinius [36-38].

Endotelinių ląstelių apoptozę lemia išoriniai ir vidiniai veiksniai. Tiesioginį citotoksinį poveikį endotelinėms ląstelėms turi T ląstelės – natūralūs žudikai [39], o infekciniai sukėlėjai, kaip antai citomegalo virusas, apoptozę lemia dėl molekulinės mimikrijos mechanizmo [40]. Naudojant paukščių sklerodermos modelį buvo įrodyta, kad antikūnai prieš endotelines ląsteles (AECA, angl. *Anti-endothelial cells antibodies*) taip pat gali sukelti šių ląstelių apoptozę [41]. Išemijos / reperfuzijos procesai, susiję su Reino sindromu, skatina laisvųjų deguonies radikalų (ROS, angl. *Reactive oxygen species*) susidarymą, o tai sukelia endotelio pažaidas [42]. Be to, padidėjęs oksidacinio streso žymenų kiekis tiesiogiai koreliuoja su ligos aktyvumu [43]. Įrodyta, kad ROS sukelia tolesnę kraujagyslių pažeidimą, sutrikdo normalią imuninės sistemos veiklą ir skatina fibrozės išsivystymą [42]. Padidėjusį endotelinių ląstelių apoptozinį aktyvumą lemia kaulų morfogenetinio baltymo II tipo receptoriaus (BMPRII, angl. *Bone morphogenetic protein receptor II*) veiklos sutrikimas [44]. SS sergantiems pacientams nėra

nustatoma BMPRII geno mutacija. Tačiau SS gyvūnų modeliuose yra įrodyta, kad BMPRII kiekis sumažėja ir šio receptoriaus signalo perdavimo funkcija sutrinka dėl proteosominės degradacijos [45]. Tad epigenetiniai pokyčiai fibroblastuose, endotelinėse, B ir T ląstelėse taip pat dalyvauja SS patogenezėje [46].

Endotelio pažaidoms progresuojant, sutrinka normalus kraujagyslių tonusas: sumažėja vazodilatatorių, tokių kaip azoto oksidas, ir padidėja vazokonstriktorių, tokių kaip endotelinas-1 (ET-1), išsiskyrimas [47]. Be to, ET-1 sukelia fibroblastų proliferaciją ir didina kolageno gamybą [48]. Endotelinių ląstelių apoptozė ir progresuojantis kapiliarų nykimas lemia sutrikusį audinių aprūpinimą deguonimi bei angiogenezę skatinančių veiksnių, kaip antai kraujagyslių endotelio augimo faktorius (VEGF, angl. *Vascular endothelial growth factor*), raišką [49]. Paradoksalu, tačiau sergantiesiems SS angiogenezė yra sutrikusi, nors VEGF raiška yra gerokai padidėjusi epidermio ir dermos sluoksnio ląstelėse bei kraujo serume [50, 51]. Manoma, kad angiogenezę slopinanti VEGF izoforma (VEGF165b), kurios raiška yra padidėjusi sergančiųjų SS odoje ir serume, sutrikdo angiogenezę skatinančios VEGF izoformos signalo perdavimą per tirozinkinazės receptorius (VEGFR1 ir VEGFR2) [52].

Kamieninės endotelinės ląstelės (EPCs, angl. *Endothelial progenitor cells*) iš kaulų čiulpų taip pat dalyvauja SS vaskulogenezės procese. Tiesa, atliktų studijų rezultatai yra priešaringi. Keli autoriai parodė, kad sergant SS $CD34^+/CD133^+/VEGFR2^+$ cirkuliuojančių EPC kiekis yra sumažėjęs [53, 54]. Kitų studijų duomenimis, šių ląstelių, galinčių diferencijuotis į endotelines ląsteles, skaičius, ypač aktyvios SS stadijos metu [55, 56], būna padidėjęs. Taigi, sutrikęs EPC patekimas į periferinę kraujo sistemą ir nepakankama mobilizacija į pažeistą išeminį audinį lemia prastą endotelio sluoksnio atsikūrimo funkciją.

Progresuojant endotelinių ląstelių pažeidimui ir išliekant lėtiniam uždegimui, formuojasi kraujagyslių sienelės pokyčiai: proliferuoja intimos ir medijos sluoksniai, atsiranda adventicijos sluoksnio fibrozė, susiaurėja kraujagyslės spindis,

sulėtėja kraujo tėkmė [4]. Atsiradus subendotelinio sluoksnio kontaktui su kraujo srove, cirkuliuojantys trombocitai prikimba prie sienelės, dėl to susidaro fibrino sankaupos ir vystosi smulkiųjų kraujagyslių trombozė. Trombocitai gali būti laikomi patofiziologine jungtimi tarp kraujagyslių pažeidimo ir fibroblastų aktyvacijos [57]. Aktyvūs trombocitai išskiria fibrozę skatinančius mediatorius, tokius kaip transformuojantis augimo faktorius beta (TGF- β , angl. *Transforming growth factor beta*), trombocitų kilmės augimo faktorius (PDGF, angl. *Platelet-derived growth factor*) ir serotoninas. Įrodyta, kad serotoninas stimuliuoja kolageno gamybą, veikdamas per 5-hidroksitriptamino 2 B receptorių, kurių kiekis sergant SS būna gerokai padidėjęs [57].

Taigi, SS būdingas kraujagyslių pažeidimas priklauso nuo kompleksinės endotelinių, imuninių, lygiųjų raumenų ląstelių, fibroblastų ir tarpląstelinio matrikso komponentų sąveikos, o tai lemia kraujagyslių sienelės struktūros pokyčius ir progresuojančią vaskulopatiją. Pasikeitus kraujagyslės sienelės struktūrai, atsiranda pakitusi išorinių žymenų raiška ant leukocitų ir endotelinių ląstelių paviršiaus. O aktyvių ląstelių išskiriami chemokinai, citokinai ir augimo faktoriai skatina fibroblastus diferencijuotis į miofibroblastus, kurie gausiai gamina tarpląstelinio matrikso komponentus.

2.1.2. Autoimunitetas

Sisteminė sklerozė yra autoimuninė liga, kurios patogenezėje svarbų vaidmenį turi tiek įgimtas, tiek įgyti ląstelinis bei humoralinis imunitetas [58]. Ląstelinio imuniteto įtaką SS patogenezėje patvirtina ankstyva ir gausi uždegiminių ląstelių infiltracija odoje ir vidaus organuose [58]. Svarbiausios uždegiminės ląstelės yra CD4⁺ T limfocitai (angl. *T helpers* – Th, limfocitai pagalbininkai), kurie ir dominuoja sergančiųjų SS odos uždegiminiuose infiltratuose [59]. T limfocitų pagalbininkų (Th) vaidmuo SS patogenezėje buvo įrodytas bleomicinu sukeltame pelių sklerodermos modelyje. Signalo perdavimo ir transkripcijos aktyvacijos

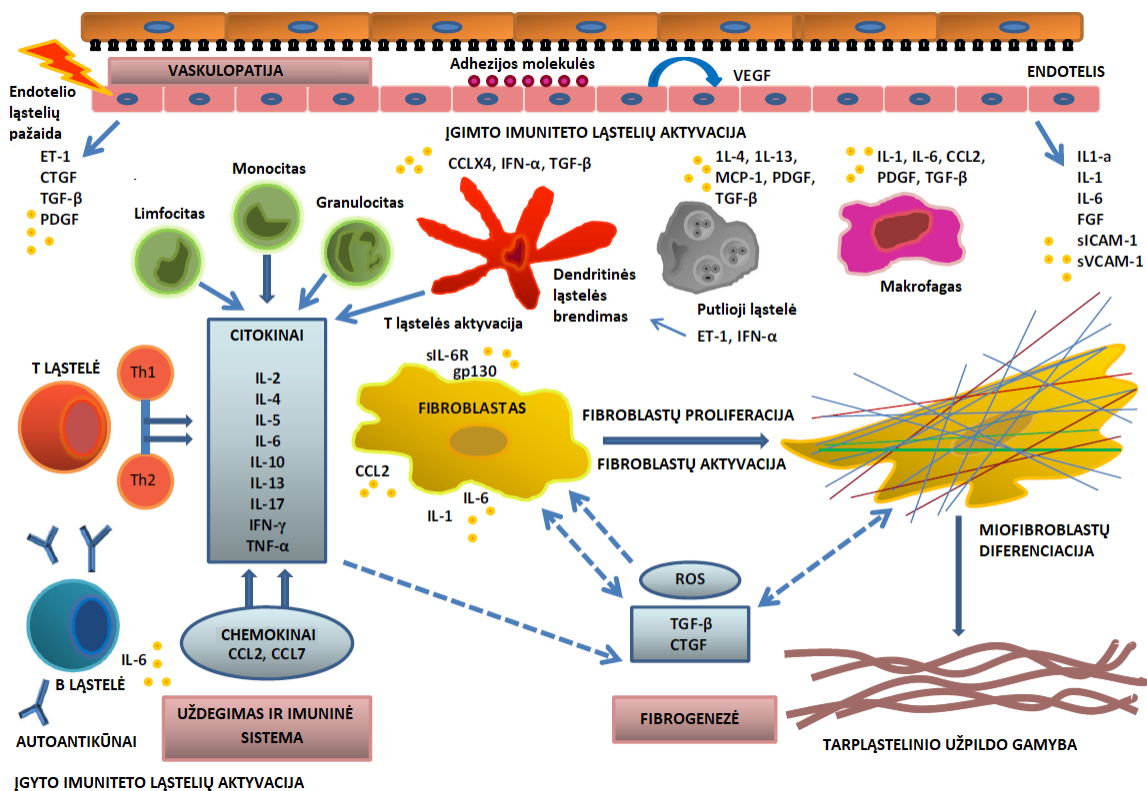
faktorių-4 (STAT4, angl. *Signal transducer and activator of transcription-4*) yra būtinas CD4⁺ T ląstelių veiklai ir diferenciacijai. Pelėms, kurios neturi STAT4, fibrozė po bleomicino injekcijų neišsivysto [60]. Tai rodo, kad T ląstelės ir STAT4 dalyvauja ankstyvoje, nuo uždegimo priklausančioje SS stadijoje. Atliktais tyrimais įrodyta, kad T limfocitai pagalbininkai išskiria citokinus, kurie dalyvauja SS būdingų autoantikūnų gamyboje [61] ir fibroblastų aktyvacijos procese [62]. Nustatyta, kad 1-o ir 17-o tipų T limfocitai pagalbininkai (Th1 ir Th17) dalyvauja ankstyvoje SS uždegiminėje stadijoje, o 2-o tipo T limfocitai (Th2) – vėlyvoje fibrozės stadijoje [63]. Aktyvūs Th2 išskiria fibrozę skatinančius interleukinus, tokius kaip IL-4, IL-5 ir IL-13 [64]. Šie citokinai tiesiogiai ir netiesiogiai dalyvauja imuninės sistemos veikloje. Nustatyta, kad IL-13 sukelia fibroblastų, epitelinių ir lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją [65], o IL-4 reguliuoja humoralinio imuniteto atsaką, skatina kolageno gamybą ir fibroblastų diferenciaciją į miofibroblastus [64]. Be to, IL-4 aktyvina fibrozę skatinančių mediatorių, tokių kaip TGF-β ir jungiamojo audinio augimo faktoriaus (CTGF, angl. *Connective tissue growth factor*), gamybą [64]. Reguliacinės T ląstelės normaliomis sąlygomis slopina T limfocitų pagalbininkų veiklą. Pavyzdžiui, CD4⁺CD25⁺ T reguliacinės ląstelės, kurių pagrindinė funkcija yra T ląstelių proliferacijos stabdymas, dalyvauja imuninės tolerancijos procese [66]. Yra nustatyta, kad sergant SS šių CD4⁺CD25⁺ ląstelių padaugėja, tačiau jų fenotipinių žymenų raiška būna sutrikusi, todėl šios ląstelės nepakankamai stabdo T limfocitų pagalbininkų proliferaciją [66]. Be CD4⁺ T limfocitų, sergančiųjų SS odos ir plaučių infiltratuose aptinkama ir CD8⁺ T citotoksinių (efektorinių) ląstelių [67]. Įrodyta, kad citotoksinių CD8⁺ ląstelių paviršiuje yra padidėjusi CD226 raiška, o tai lemia fibrozę skatinančio IL-13 gamybą [68].

Humoralinio imuniteto įtaka SS patogenezėje taip pat nėra iki galo aiški. B ląstelių kiekis uždegiminiuose SS infiltratuose yra minimalus, tačiau autoantikūnai prieš branduolio išskiriamus antigenus yra nustatomi net 90 % pacientų, sergančių SS

[69, 70]. Atliktais tyrimais nustatyta, kad B ląstelių funkcija sergant SS yra sutrikusi dėl tam tikrų antigenų raiškos šių ląstelių paviršiuje. Visų pirma, sergančiųjų SS odoje aptinkama B ląstelių, kurių paviršiuje randamas CD19 žymuo [71]. CD19 yra pagrindinė viduląstelinio signalo perdavimo molekulė, teigiamai aktyvinanti B ląstelių veiklą [72]. Tačiau sergant SS B ląstelių veiklą slopinančio specifinio CD22 receptoriaus funkcija yra sutrikusi. Be to, sergančiųjų SS kraujyje nustatomi antikūnai prieš CD22, kurie taip pat turi įtakos nepakankamam B ląstelių veiklos slopinimui [69]. Tad nuolatinė B ląstelių aktyvacijos būklė yra susijusi su silpnesne imunine tolerancija ir padidėjusia autoantikūnų gamyba [70]. Tačiau tiesioginė dažniausiai aptinkamų antikūnų prieš specifinius branduolio išskiriamus antigenus (pvz., anticentromeriniai ir antikūnai prieš topoizomerezę-1) reikšmė SS patogenezėje nėra aiški [73]. Jie yra svarbūs prognostiniai veiksniai, susiję su tam tikrų vidaus organų pažeidimu ir skirtingomis klinikinėmis išaitimis [73]. O autoantikūnų, nukreiptų į specifinius ląstelės paviršiaus antigenus ar neląstelinius baltymus, reikšmė SS patogenezėje yra patvirtinta atliktais tyrimais. Minėta, kad antikūnai prieš endotelines ląsteles (AECA) sukelia šių ląstelių apoptozę [41]. Be to, AECA atsiranda kaip atsakas į ląstelių žūtį, tad formuojasi ydingas ratas imuninės tolerancijos procese. Ne mažiau svarbūs yra antikūnai prieš fibroblastus, sąlygojantys aktyvių fibroblastų fenotipą. Stimuliuojantys antikūnai prieš trombocitų kilmės augimo faktoriaus (PDGF, angl. *Platelet-derived growth factor*) receptorių skatina kolageno gamybą ir laisvųjų deguonies radikalų susidarymą [74]. Neseniai atliktais tyrimais yra įrodyta, kad sergančiųjų SS kraujyje taip pat aptinkama antikūnų prieš II tipo angiotenzinino-1 ir endotelino-1 A tipo receptorių, kurie stimuliuoja fibroblastus ir yra tiesiogiai susiję su kraujagyslių pažeidimu [75]. Tačiau nė vienas iš minėtų antikūnų nėra specifiškas SS. Be autoantikūnų gamybos, padidėjęs B ląstelių aktyvumas lemia citokinų pusiausvyros sutrikimą, o tai palaiko T ląstelių veiklą [64]. Nustatyta, kad aktyvios B ląstelės taip pat gamina IL-6 ir IL-8, kurie stimuliuoja fibroblastų proliferaciją ir padidėjusią kolageno gamybą [75].

Taigi, sutrikusi B limfocitų veikla yra susijusi tiek su kraujagyslių pažeidimu, tiek su fibroblastų aktyvacija vėlyvoje ligos stadijoje.

Ląstelinio ir humoralinio imuniteto funkcijos sutrikimas skatina uždegimines ląsteles gaminti IL-4, naviko nekrozės faktorių alfa (TNF α , angl. *Tumor necrosis factor alpha*) PDGF ir kitus citokinus, kurie tiesiogiai dalyvauja fibrogenzės procese [58]. Be to, sveikos ląstelės, tokios kaip keratinocitai ar endotelinės ląstelės, taip pat išskiria fibrozę skatinančius citokinus – TGF- β ir CTGF [76]. Net ir sumažėjus uždegimui, padidėjusi šių faktorių raiška išlieka sveiko audinio ląstelių paviršiuje. Tad palapsniui išsivysto autonominė SS fibroblastų aktyvacija ir progresuoja fibroziniai pokyčiai [6] (1 pav.).



1 pav. Sisteminės sklerozės patogenezės schema. Išoriniai ir vidiniai veiksniai sukelia endotelinių ląstelių pažeidimą. Pasikeitus kraujagyslės sienelės struktūrai, atsiranda pakitusi išorinių žymenų raiška ant leukocitų ir endotelinių ląstelių paviršiaus. Aktyvių ląstelių išskiriami chemokinais, citokinais ir augimo faktoriais skatina fibroblastus diferencijuotis į miofibroblastus, kurie gausiai gamina tarpląstelinio matricos komponentus. Adaptuota iš [77]

2.1.3. Fibrozė

Pagrindinė SS klinikinė išraiška yra fibrozė, paveikianti odą, sausgysles, raiščius, plaučius, inkstus, širdį ir virškinimo traktą [78]. Progresuojantis odos pažeidimas sergant SS pasireiškia kaip odos fibrozė, sąnarių fleksinės kontraktūros, minkštųjų audinių kalcinatai, inervacijos sutrikimai, osteolizė [7]. Dėl lėto opų gijimo, skausmingos išeminės nekrozės, infekcinių komplikacijų 14–29 % pacientų pasireiškia pirštų gangrena [5]. Šie veiksniai neigiamai veikia darbinę veiklą ir sąlygoja su rankų funkcija susijusios kasdieninės veiklos apribojimą. Progresuojantys fibroziniai pokyčiai taip pat lemia vidaus organų funkcijos sutrikimą ir padidėjusį mirtingumą [79]. Plaučių fibrozė, plaučių arterinė hipertenzija ir širdies pažeidimas yra pagrindinės su SS susijusios mirties priežastys [80, 81].

Fiziologinėmis sąlygomis tarpląstelinio matrikso komponentų sudėtis odoje priklauso nuo fibroblastų gaminamo kolageno kiekio ir jį skaidančių proteazių aktyvumo. Odos biopsijos biocheminės analizės duomenimis, sergant SS vyrauja I ir III tipų kolagenas, fibronektinas, proteoglikanai, elastinas ir padidėjęs fermentų, tokių kaip hidroksilazė, kurie sutvirtina jungtis tarp tarpląstelinio matrikso komponentų, aktyvumas [82]. Matrikso metaloproteinazės – tai proteolitiniai fermentai, kurie skaido ir keičia beveik visas tarpląstelinio matrikso sankaupas. SS patogenezėje svarbiausios yra matrikso metaloproteinazė 1 (MMP-1) arba kolagenazė-1 ir matrikso metaloproteinazė 3 (MMP-3) arba stromelizinas-1, kurių susilpnėjęs aktyvumas ir sumažėjęs kiekis lemia padidėjusį I ir III tipo kolageno kaupimąsi [83, 84]. Tiksliai nėra žinoma, ar padidėjęs jungiamojo audinio komponentų kiekis yra atsakas į kraujagyslių ir imunines pažeidas, ar tai yra matrikso gamybą koduojančių genų reguliacijos sutrikimo pasekmė. Nuolatinis už kolageno gamybą atsakingų genų aktyvumas sergant SS lemia nekontroliuojamą fibrozės vystymąsi. Be to, daugelis citokinų ir augimą reguliuojančių faktorių, kuriuos gamina uždegiminės ląstelės, skatina kolageno genų ekspresiją [85].

Fibroblastai – pagrindinės ląstelės, dalyvaujančios fibrogenezės procese. Normaliomis sąlygomis fibroblastai saikingai gamina tarpląstelinio matrikso komponentus ir išskiria juos skaidančius fermentus [86]. Veikiant ląstelių išskiriamiems citokinams ir augimo faktoriams, fibroblastai diferencijuojasi į aktyvias ląsteles – miofibroblastus, kurių paviršiuje yra nustatoma α -lygiųjų raumenų aktino (α -SMA, angl. *Alpha smooth muscle actin*) raiška [87]. Miofibroblastai gausiai gamina kolageną ir kitus tarpląstelinio matrikso komponentus, išskiria fibrozę skatinančius augimo faktorius ir citokinus (pvz., TGF- β), o tai toliau stimuliuoja fibrozės vystymąsi parakrininiu ir autokrininiu būdu [88]. Šis procesas yra griežtai reguliuojamas ir sustabdomas normalaus žaizdų gijimo metu, tačiau SS patogenezeje fibrogenezė išlieka aktyvi. Nustatyta, kad SS būdingas nuolatinis aktyvių miofibroblastų kiekis, kuris tiesiogiai koreliuoja su odos pažeidimo laipsniu [89].

Pagrindinis mediatorius, skatinantis fibrogenezę, yra TGF- β [90]. Fiziologinėje aplinkoje TGF- β dalyvauja embriogenezeje ir gyjant žaizdoms, tačiau, vykstant uždegiminiam procesui, augimo faktoriaus funkcijos sutrinka [91]. Fibroblastai, monocitai, makrofagai, limfocitai, trombocitai ir endotelinės ląstelės gamina TGF- β , kuris stimuliuoja fibroblastų proliferaciją ir jų diferenciaciją į aktyvius miofibroblastus [92]. Išskirtas į tarpląstelinį matriksą, TGF- β yra biologiškai neaktyvi molekulė, kurią gali aktyvinti proteazės, trombospondinas-1 arba integrinai [92]. TGF- β aktyvacija ir signalo perdavimas yra sudėtingas kompleksinis procesas, kuriame dalyvauja įvairios ląstelinės molekulės ir transkripcijos faktoriai [93]. Aktyvi dimerinė TGF- β forma jungiasi prie serintreoninkinazės, žinomos kaip II tipo TGF- β (TGF β RII) receptorius [94]. Prisijungimas prie TGF β RII paleidžia intraląstelinio signalo perdavimo kaskadą per Smad baltymų fosforilinimą [94]. Fosforilinti Smad baltymai patenka į branduolį, kur, veikiant transkripcijos kofaktoriams, indukuojama genų transkripcija [95]. Nuo Smad baltymų priklausomą TGF- β aktyvaciją stabdo Smad7, kurio veikla sergant

SS yra sutrikusi [96]. Nuo Smad baltymų nepriklausomas TGF- β signalo perdavimo kelias veikia per tirozinkinazę (Abelsono kinazę), p38 baltymą ar fokalinę adhezijos kinazę [95]. Kad ir koks būtų aktyvacijos kelias, TGF- β intraląstelinis signalas lemia kolageno I tipo, CTGF, α -SMA ir kitų genų ekspresiją [97]. Wnt kanoninis signalo perdavimo kelias taip pat dalyvauja SS patogenezeje [98]. Nustatyta, kad TGF- β sumažina Wnt antagonisto baltymo raišką ir taip aktyvina signalo perdavimą kanoniniu Wnt keliu, o tai skatina fibrozės išsivystymą [99]. Tad endogeninis fibroblastų aktyvumas yra susijęs su TGF- β autokrinine aktyvacija. Nustatyta, kad fibroblastų paviršiuje po aktyvaus TGF- β signalo perdavimo padidėja TGF- β , PDGF ir CTGF receptorių kiekis [62]. Šių receptorių kiekis tiesiogiai koreliuoja su padidėjusia matricinės ribonukleorūgšties mRNR kolageno raiška. Tad TGF- β autokrininė aktyvacija lemia gausią matrikso komponentų gamybą [95].

Be minėtų funkcijų, TGF- β stimuliuoja CTGF veiklą, o tai skatina fibroblastų proliferaciją [100]. Kelios studijos įrodė, kad CTGF ir TGF- β aktyvinant kolageną koduojančius genus veikia sinergiškai [101]. Kitas svarbus fibrozę skatinantis mediatorius – PDGF, kurį išskiria aktyvūs makrofagai, trombocitai ir fibroblastai [102]. Padidėjęs PDGF kiekis lemia plaučių fibrozės išsivystymą [85]. Nustatyta, kad PDGF ir jo receptorių PDGFR yra išreikšti tik sergančiųjų SS organizmo ląstelių paviršiuje, o sveiko organizmo ląstelių paviršiuje jų nėra [102].

Be TGF- β , SS fibrogenezeje dalyvauja kanoninis Notch signalo perdavimo kelias [103]. Signalas, perduodamas per Notch signalinio kelio receptorių ir veikdamas kartu su įvairiais ląstelės komponentais, daro įtaką ląstelės diferenciacijos, proliferacijos, apoptozės ir fibrozės procesams [104]. Nustatyta, kad SS fibroblastams būdinga nuolatinė Notch signalo perdavimo aktyvacija, o tai lemia aktyvaus fibroblastų fenotipo išsivystymą [103].

Neseniai atliktais tyrimais įrodyta ląstelių branduolinių receptorių įtaka fibrozės vystymuisi. Palumbo-Zerr su bendraautoriais parodė, kad branduolinis 4A1 receptorių kontroliuoja TGF- β signalo perdavimą ir fibrogenezę [105]. Sumažėjęs

šio receptoriaus kiekis lemia nuolatinę TGF- β aktyvaciją [105]. Kitas transkripcijos faktorius – peroksisomų proliferatoriaus aktyvinamas gama receptorius (PPAR γ -, angl. *Peroxisome proliferator-activated receptor γ*), yra svarbus kontroliuojant ląstelių diferenciaciją, o PPAR γ receptoriai gali modifikuoti uždegimą ir fibrozinis procesus [106]. SS būdingas sumažėjęs PPAR γ kiekis stimuliuoja TGF- β signalo perdavimą [107]. Nepakankamas kepenų branduolinio receptoriaus (LXR, angl. *Liver X receptor*) aktyvumas lemia uždegiminę infiltraciją makrofagais ir padidėjusią IL-6 raišką, o tai toliau skatina fibrozės vystymąsi [108].

Veikiant minėtoms fibrogenzės grandims, SS pažeistoje odoje ir vidaus organuose kaupiasi perteklinis jungiamasis audinys, sukeliantis pagrindinius klinikinius ligos požymius [82].

2.2. Eksperimentiniai sklerodermos gyvūnų modeliai

Tinkamai parinkti gyvūnų SS modeliai yra labai reikšmingi išsamiau tyrinėjant ligos patogenezę ir jos gydymo būdus. Šiuo metu yra nemažai panašių į SS modelių, kai kuriuose iš jų vyrauja uždegiminiai procesai, vėliau sukeliantys fibrozę, kituose pirmiausia vystosi autonominė fibroblastų aktyvacija ir vyksta fibroziniai pokyčiai. Tyrimams naudojami įvairūs indukuoti (tam tikromis medžiagomis sukelti), spontaniniai (savaiminiai, dėl genetinių defektų besivystantys) bei transgeniniai (genetiškai modifikuoti) gyvūnų, dažniausiai pelių, SS modeliai [109, 110]. Pagrindiniai SS patogenezės požymiai (uždegimas, autoimuniniai pokyčiai ir fibrozė) yra būdingi bleomicinu (BLM), hipochloro rūgštimi, vinilo chloridu, topoizomerase-I ir pilnu Froindo adjuvantu sukeltiems modeliams bei skleroderminės transplantato prieš šeimininką ligos modeliui [111-115].

2.2.1. Bleomicinu sukeltas sklerodermos modelis

Vienas tipiškiausių atkartojančių sisteminę sklerozę modelių yra bleomicinu (BLM) sukelta pelių skleroderma [112, 116, 117]. BLM – tai antibiotikas,

gaunamas iš bakterijos *Streptomyces ventricillus*. Jis slopina auglius ir dažnai naudojamas vėžiui gydyti. BLM pasižymi tokiomis biocheminėmis savybėmis: ląstelių ciklo G2 blokavimas, viengubos ir dvigubos dezoksiribonukleorūgšties (DNR) grandies suskaldymas, ląstelinės RNR suardymas, laisvųjų radikalų gamyba ir apoptozės sukėlimas [111]. BLM įvairiai veikia odoje esančias ląsteles, tokias kaip fibroblastai, keratinocitai ir endotelinės ląstelės [118], *in vitro* tyrimuose didina kolageno sankaupą ir TGF- β 1 raišką žiurkių plaučių ląstelėse ir žmogaus odos fibroblastuose [119]. Taip pat BLM sustiprina tarpląstelinio matrikso baltymų genų raišką ir fibrogeninius citokinus, kurie gali prisidėti prie fibrozės sukėlimo [119].

Kaip parodė pirmieji Yamamoto su bendraautorais [112] atlikti darbai, kasdieninės 4 savaičių trukmės BLM injekcijos po 100 μ L (dozė 1 mg/ml) BALB/c veislės 6 savaičių amžiaus patelėms sukelia ryškią odos fibrozę, apibūdinamą odos sustorėjimu bei homogeninėmis kolageno skaidulomis, perivaskuliniais uždegiminiais infiltratais, sustorėjusiomis kraujagyslių sienelėmis. Odos fibrozė taip pat gali būti sukeliama ir taikant mažesnes, 10 μ g/ml ir 100 μ g/ml, BLM dozes bei suleidžiant jį kas antrą dieną. BLM injekcijos sukelia sklerotinius pokyčius, kurie persistuoja mažiausiai 6 savaites, nutraukus BLM injekcijas [112]. Šis modelis atspindi uždegiminiuos pokyčius, kurie vyksta ankstyvoje SS ligos stadijoje. Histopatologiškai stebima aiški odos fibrozė, apibūdinama sustorėjusiomis kolageno skaidulomis, homogeninės medžiagos atsidėjimu sustorėjusioje odoje su ląsteliniiais infiltratais, kurie atkartoja žmogaus SS histologinius požymius. Be to, daugeliu tyrimų nustatyta, kad BLM stimuliuoja endotelines ląsteles ir fibroblastus, aktyvina uždegimą ir fibrozę skatinančius citokinus, sukelia aktyvių deguonies radikalų gamybą, endotelių ir kitų ląstelių pažeidimą bei adhezijos molekulių ekspresiją [117], o uždegiminės ląstelės infiltruoja pažeistą odą ir aktyvina esančius fibroblastus [112]. Aktyvinti fibroblastai gamina ir išlaisvina didelį tarpląstelinio matrikso komponentų kiekį, besikaupiantį jungiamajame audinyje. Šiame gyvūnų modelyje stebima dermos

sluoksniu infiltracija leukocitais, aktyvinamas fibrozę skatinantis TGF- β . Be TGF- β , kitų profibrozinių mediatorių, tokių kaip monocitų chemotaksinis baltymas-1, trombocitų kilmės augimo faktorius (PDGF) bei interleukinai (IL-4, IL-6 ir IL-13), yra nustatomas padidėjęs aktyvumas [25, 117]. Įrodyta, kad antitopoizomerazės-I, antikūnų prieš uridino turinčius ribonukleoproteinus ir antikūnų prieš histonus yra aptinkama gyvūnams BLM sukeltame modelyje [72, 120]. Šį modelį galima sukelti gana lengvai daugumai pelių rūšių. Nors reikia pažymėti, kad įvairių pelių linijų odos fibrozės išsivystymo laipsnis skiriasi. Ypač jautrios BLM sukeltai fibrozei yra C3H/He, DBA/2, B10D2 ir B10.A pelės [111].

Taigi, pakartotinės BLM injekcijos sukelia fibrozę, atspindinčią uždegiminius pokyčius, kurie dažnai būna būdingi ankstyvoje ligos stadijoje [121]. Šiame modelyje molekuliniai mechanizmai yra panašūs į būdingus SS atvejus, kai pažeistoje odoje vyksta T ląstelių bei makrofagų infiltracija ir nuo TGF- β bei PDGF priklausoma fibroblastų aktyvacija [122]. Sukeltam modeliui būdingi tokie požymiai kaip aiški odos fibrozė su odos sustorėjimu, plaučių fibrozė ir persistuojantys autoantikūnai serume [111]. Šio modelio pranašumas tas, kad jis lengvai sukeliamas ir atkartojamas, nebūna jokių histologinių skirtumų tarp patinų ir patelių. Tačiau, nors ir aptinkamas kraujagyslių sienelių sustorėjimas giliose odos sluoksniuose, nėra tipiškos generalizuotos mikroangiopatijos, kuri prasideda SS sergantiems žmonėms iki išsivystant fibrozei.

2.2.2. Transgeniniai pelių sklerodermos modeliai

Transgeniniams modeliams priskiriami du eksperimentiniai modeliai: nedominuojantis II tipo transformuojančio augimo faktoriaus beta receptoriaus (DN TGF- β RII, angl. *Dominant-negative type II transforming growth factor receptor*) modelis, naudojant transgenines DN TGF- β RII peles, kurioms vystosi uždegimas ir fibrozė, tačiau neaptinkama nei vaskulopatijos, nei autoimuniteto pokyčių, bei sąlyginis I tipo transformuojančio augimo faktoriaus beta receptoriaus (TGF- β RI, angl. *Conditional transforming growth factor type I receptor*) modelis,

kuris pasižymi vaskulopatija, uždegimu ir fibroze, tačiau jam nebūdingi autoimuniniai pokyčiai [110].

2.2.3. Spontaniniai sklerodermos modeliai

Natūraliai atsirandantiems, spontaniniams sklerodermos modeliams priskiriami sustandėjusios odos (Tsk-1, Tsk-2, angl. *Tight skin model*) pelių modeliai, Kalifornijos universiteto Davis linijos 200 ir 206 (UCD-200, UCD-206; angl. *University of California Davis line*) veislinių viščiukų modeliai [6, 25, 89, 113].

Pagrindiniai pirmųjų dviejų modelių požymiai yra genų defektai ar mutacijos. Tsk-1 modelyje nustatytos mutacijos gene, koduojančiame fibriliną-1, kuris lemia fibrozės vystymąsi, o pagrindiniai šio SS modelio patogenezės ypatumai – tai kraujagyslių pažeidimas, autoimuniniai pokyčiai ir fibrogenėzė [113]. Tsk-1 pelėms būdingas kolageno skaidulų susikaupimas hipodermyje, o tai sukelia progresuojantį poodžio storėjimą. Šioms pelėms neaptikta uždegiminių infiltratų, o pakitusi fibroblastų aktyvacija nesukelia uždegiminių mediatorių išsilaisvinimo iš leukocitų, priešingai nei BLM-indukuotos fibrozės modelyje. Vertinant Tsk-1 ir BLM-sukeltos SS panašumus ir skirtumus, reikia pažymėti, kad Tsk-1 pelių modelyje fibroblastai yra endogeniškai aktyvinami, būdinga padidėjusi kolageno gamyba ir išlaisvinimas, ši savybė išlieka ir išskirtose ląstelių kultūrose, persėjant net keletą kartų *in vitro*. Esant BLM modeliui, sukelta fibrozė būdinga ankstyvoms, nuo uždegimo priklausančioms SS stadijoms [123].

Antrajame Tsk-2 modelyje yra nežinomas genetinis defektas, lemiantis audinių fibrozę, kuriai būdingi ankstyvi uždegiminių ląstelių infiltratai. Nors abu Tsk-1 ir Tsk-2 modeliai imituoja kai kuriuos SS požymius odoje ir poodyje, nė vienas iš jų tiksliai neatspindi ligos [113]. Manoma, kad šie abu modeliai gali būti svarbūs, analizuojant įvairius molekulinis ir fiziologinius procesus, sukeliančius audinių fibrozę, ir gilinant žinias apie fibrozės ir autoimuninių pokyčių sąveiką SS atveju. Spontaniniame viščiukų SS modelyje ryškiai matomas kraujagyslių pažeidimas, būdingi uždegiminiai ir autoimuniniai pokyčiai ir išplitusi fibrozė. Reikia

pažymėti, kad tik keletas modelių, tokių kaip UCD-200 ir UCD-206 viščiukų ar Fra-2 pelių modelis, yra tinkami tirti smulkių kraujagyslių vaskulopatiją [25].

2.2.4. Pašalintų genų sklerodermos modeliai

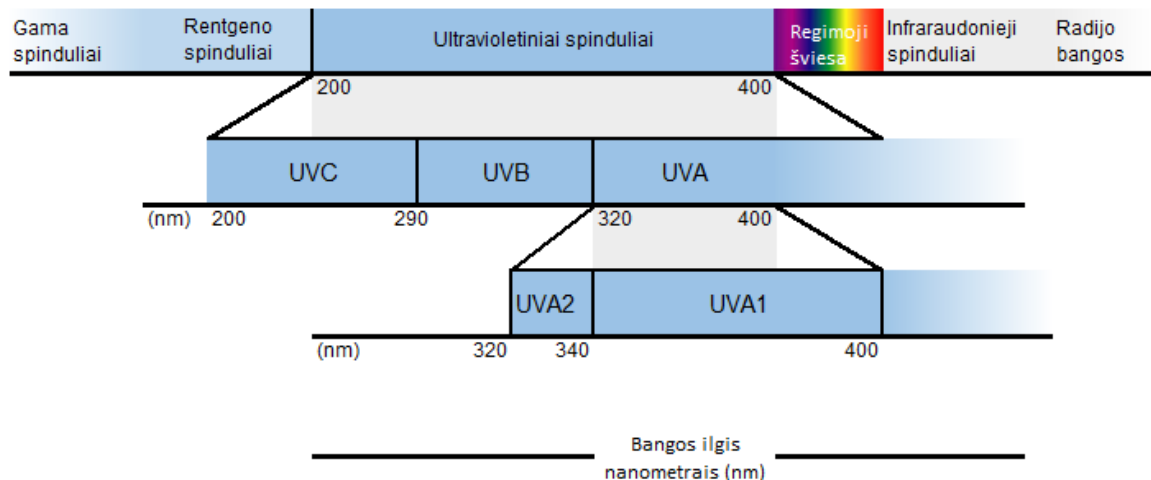
Tyrinėjant SS eigą, naudojamos pelės, kurioms pašalinti genai (angl. *Knock-out* – *KO* pelės). Nustatyta, kad transkripcijos faktorius – peroksisomų proliferatoriaus aktyvinamas gama receptorių (PPAR γ , angl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) yra svarbus kontroliuojant ląstelių diferenciaciją, o PPAR γ ligandai gali modifikuoti uždegimą ir fibrozinį procesą [106]. Tiriant PPAR γ -KO peles ir peles, kurioms nepašalintas PPAR γ genas, nustatyta, kad PPAR γ -KO pelės jautresnės BLM sukeliama odos fibrozei [124], taigi, PPAR γ slopina fibrogenę. Reikėtų paminėti ir neseniai identifikuotą transkripcijos faktorių STAT-4, kuris yra genetiškai jautrus veiksnys sergant SS. Jis pasižymi stipriu profibroziniu poveikiu, kontroliuojant T ląstelių aktyvaciją ir proliferaciją bei citokinų išsilaisvinimą [60]. STAT-4 trūkumas apsaugo abiejų lyčių BALB/c peles nuo BLM-indukuotos odos fibrozės [60].

Eksperimentinių sklerodermos modelių pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslo. Siekiant išsiaiškinti ankstyvus pokyčius, dažnai pasirenkamas BLM indukuotas modelis, kuris atkartoja žmogaus SS, būdingą ankstyvai, ypač nuo uždegimo priklausančiai, susirgimo stadijai. Dėl genų defektų išsivystęs Tsk pelių modelis atspindi vėlesnes fibrozines ir mažesniu laipsniu nuo uždegimo priklausančias SS stadijas. Reikia pažymėti, kad antifibroziniai vaistai, priskiriami įrodytam akivaizdžiam A lygiui, turi būti ištirti mažiausiai dviejuose gyvūnų modeliuose, atspindinčiuose skirtingus ligos ypatumus, o geriausias variantas, kai gydymasis efektas nustatomas skirtinguose organuose, kurie pažeidžiami sergant SS.

2.3. Fototerapija

2.3.1. Ultravioletinė spinduliuotė

Ultravioletiniai spinduliai (UV) – tai elektromagnetinių bangų spektro dalis, prasidedanti nuo ilgesnio nei rentgeno spindulių (10 nm) bangos ilgio ir siekianti violetinės – regimosios šviesos bangos ilgį (400 nm). Pagal bangos ilgį, biologines ir fizikines savybes UV spinduliai skirstomi į vakuumo UV (10–200 nm), UVC (200–290 nm), UVB (290–320 nm) ir UVA (320–400 nm) spindulius [125]. UVA dar skirstomi į UVA2 (320–340 nm) ir UVA1 (340–400nm). Tokį UVA ruožo suskirstymą lemia tai, kad UVA2 spindulių savybės panašios į UVB, o UVA1 – į regimąją šviesos sritį (2 pav.) [125].



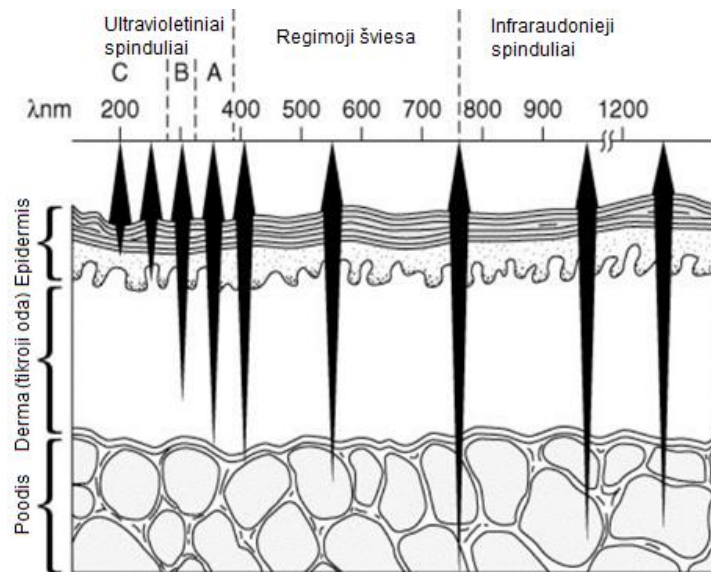
2 pav. Elektromagnetinis bangų spektras

Fotono energija (E), išreikšta džauliais (J), aprašoma formule:

$$E = hc/\lambda,$$

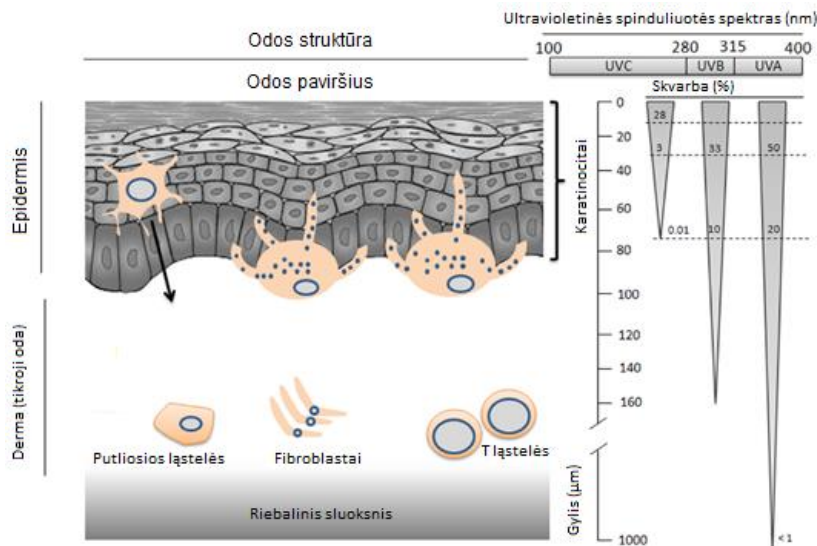
čia h – Planko konstanta ($6,63 \times 10^{-34}$), c – šviesos greitis vakuume (3×10^8), λ – bangos ilgis. Taigi fotono energija yra atvirkščiai proporcinga bangos ilgiui – didėjant bangos ilgiui, fotono energijos kiekis mažėja. Ilgesnio bangos ilgio UVA1 spinduliuotė stipriau skverbiasi į odą ir gali pasiekti gilesnius sluoksnius, net ir

poodį, kitaip nei UVA2 ir UVB spinduliai, kurie pasiekia tik viršutinius tikrosios odos sluoksnius (3 pav.).



3 pav. Spinduliuotės skvarba į audinius

Ilgesnio bangos ilgio UVA1 spinduliai turi mažiau energijos, palyginti su UVA2 ir UVB spinduliuote. Spinduliuotės skverbimosi į audinius gylis priklauso ne nuo jos intensyvumo, o nuo odoje esančių chromoforų – molekulių, sugeriančių šviesos fotonus. Epidermyje yra gausu UVB sugeriančių molekulių, o UVA, ypač UVA1, skverbiasi giliau, nes pastaroji spinduliuotė yra sugerama ir giliai esančių atitinkamų chromoforų [126] (4 pav.).



4 pav. UV spinduliuotės skvarba į audinius. Adaptuota iš [127]

Taigi, biologinis UVA1 spindulių poveikis priklauso nuo odoje esančių chromoforų, kurie dėl spinduliuotės sugerties pavirsta į „naujas“ molekules, vadinamuosius šviesos nulemtus produktus [128]. Visiems chromoforams būdingos tam tikros, nuo bangos ilgio priklausomos, savybės [129]. Kai UVA1 žadinančios spinduliuotės fotonas yra sugeriamas chromoforo (tai gali būti chlorofilas, hemoglobinas, citochromo c oksidazė, mioglobinas, triptofanas, beta karotenai, bilirubinas, flavinai, flavoproteinai ar porfirinai), jis tampa sužadintas ir ši energija gali būti panaudota įvairiems ląstelėse vykstantiems procesams inicijuoti [130, 131]. Didžiausia UVA1 sugeriančių fotojautrių medžiagų koncentracija yra mitochondrijose, taigi šios organelės yra ypač jautrios ultravioletiniams spinduliams [132]. Veikiant UVA1, padidėja adenosino trifosfato gamyba, vyksta aktyvių deguonies formų (ROS, angl. *Reactive oxygen species*) moduliacija ir transkripcijos faktorių indukcija [133]. Šie transkripcijos faktoriai sukelia baltymų sintezę, o tai lemia tolesnius pokyčius, tokius kaip padidėjusi ląstelių proliferacija ir migracija, citokinų, augimo faktorių ir uždegimo mediatorių kiekio moduliacija [133].

2.3.2. UVA1 poveikis ląstelėms

UVA1 spinduliai, pasiekdami tikrosios odos sluoksni, veikia ne tik epidermio, bet ir giliai odoje esančias ląsteles [129]. Atliktais *in vivo* ir *in vitro* tyrimais įrodytas specifinis UVA1 poveikis keratinocitams, Langerhanso ląstelėms, melanocitams, T ir B ląstelėms, eozinofilams, endotelinėms ląstelėms bei fibroblastams [134]. Atliktų studijų rezultatai apibendrinti 1 lentelėje.

1 lentelė. Specifinis biologinis UVA1 spinduliuotės poveikis įvairioms ląstelėms

Ląstelių tipas	UVA1 biologinis poveikis	Literatūros šaltinis
Keratinocitai	IL-10 gamybos ↑ ICAM-1 raiškos ↓	[135] [136]
Langerhanso ląstelės	Langerhanso ląstelių skaičiaus ↓ Antigeną pristatančių ląstelių funkcijos ↓ CD80/CD86 raiškos ↓	[16, 137] [138] [139]
Melanocitai	Melanocitų skaičiaus ↑ (žmogaus ląstelių) Melanocitų skaičiaus ↓ (pelių ląstelių)	[140] [141]
T ląstelės	Apoptozė ↑ IFN γ gamybos ↓	[132, 142, 143] [136]
Eozinofilai	Eozinofilų skaičiaus ↓	[144]
Putliosios ląstelės	Putliųjų ląstelių skaičiaus ↓	[145, 146]
Fibroblastai	MMP-1, MMP-2, MMP-3 produkcijos ↑ I ir III tipo kolageno ↓ Elastinių skaidulų skaičiaus ↓	[15, 147] [148] [149]
B ląstelės	Imunoglobulinų gamybos ↓	[150]
Endotelinės ląstelės	VEGF gamybos ↑	[151]

Sutrumpinimai: ↑ – didėjimas; ↓ – mažėjimas; IL-10 – interleukinas 10; ICAM-1 (angl. *Intercellular cell adhesion molecule 1*) – tarpląstelinės adhezijos molekulė-1; IFN γ – gama interferonas; MMP-1, -2, -3 (angl. *Matrix metalloproteinase*) – matrikso metaloproteinazės 1, -2, -3; VEGF (angl. *Vascular endothelial growth factor*) – kraujagyslių endotelio augimo faktorius.

2.3.3. UVA1 fototerapijos klinikinės indikacijos

Dėl aprašyto biologinio poveikio ląstelėms, fototerapija UVA1 spinduliuote jau kelis dešimtmečius taikoma klinikinėje praktikoje įvairioms odos ligoms gydyti. Remiantis Didžiosios Britanijos fotobiologų darbo grupės ekspertų išvadomis, pateikiamos UVA1 gydymo indikacijos (2 lentelė), įrodymų kategorija / lygis (3 lentelė) ir poveikis žmogaus organizmui [12].

2 lentelė. UVA1 fototerapijos indikacijos

Liga	Klinikinis poveikis	UVA1	Įrodymų lygis / kategorija*	UVA1 gydymo eilės pasirinkimas
Lokali skleroderma	Veiksmingas		1–	Antros eilės (po vietinio gydymo steroidais)
Sisteminė sklerozė	Galimas		3	Pasirinkimo eilė nenustatyta
Nefrogeninė sisteminė sklerozė	Galimas		3	Antros eilės (po inkstų transplantacijos)
Hipereozinofilinis sindromas	Galimas		3	Pasirinkimo eilė nenustatyta
Sklerozinė kerpligė	Galimas		3	Antros eilės (po vietinio gydymo steroidais)
Skleredema	Galimas		3	Antros eilės
Sisteminė raudonoji vilkligė	Tikėtinas		1+	Pasirinkimo eilė nenustatyta
Odos T ląstelių limfoma	Galimas		3	Trečios eilės (po vietinio gydymo steroidais ir PUVA)
Pigmentinė dilgėlinė	Galimas		1–	Pasirinkimo eilė nenustatyta
Žiedinė eritema	Galimas		3	Trečios eilės (po vietinio gydymo steroidais ir PUVA)
Odos sarkoidozė	Galimas		3	Pasirinkimo eilė nenustatyta
Atopinė egzema	Veiksmingas		1+	Trečios eilės (po vietinio gydymo steroidais ir PUVA ar UVB)
Dishidrozinė rankų egzema	Galimas		1–	Trečios eilės (po vietinio gydymo steroidais ir PUVA)
Psoriazė	Galimas		3	Ketvirtos eilės (po vietinio gydymo steroidais ir PUVA ar UVB, ar sisteminiais vaistais)

Pastaba. UVA1 fototerapijos indikacijos, klinikinis poveikis, įrodymų lygis / kategorija ir gydymo eilės pasirinkimas [12]. Sutrumpinimai: **UVB** – ultravioletiniai B spinduliai; **PUVA** – psoraleno ir ultravioletinių spindulių terapija; **UVA1** – ultravioletiniai A1 spinduliai.

3 lentelė. Įrodymų lygio / kategorijos klasifikacija

Lygis / kategorija	Aprašymas
1 ++	Labai geros kokybės metaanalizės, sisteminės atsitiktinių imčių kontroliuojamųjų tyrimų (AIKT) apžvalgos ar AIKT, kurių tendencingumo tikimybė labai maža
1 +	Geros metaanalizės, sisteminės AIKT apžvalgos ar AIKT, kurių tendencingumo tikimybė labai maža
1–	Metaanalizės, sisteminės AIKT apžvalgos ar AIKT, kurių tendencingumo tikimybė didelė
2 ++	Geros kokybės atvejo ir kontrolės ar kohortinės studijos, kurių klaidinančio tendencingumo tikimybė labai maža, o tikimybė, kad nustatytas ryšys yra priežastinis, didelė
2+	Gerai organizuotos atvejo ir kontrolės ar kohortinės studijos, kurių klaidinančio tendencingumo tikimybė labai maža, o tikimybė, kad nustatytas ryšys yra priežastinis, vidutinė
2–	Atvejo ir kontrolės ar kohortinės studijos, kurių ir klaidinančio tendencingumo tikimybė, ir tikimybė, kad nustatytas ryšys nėra priežastinis, yra didelė
3	Neanalitinės studijos (pvz., klinikiniai atvejai)
4	Ekspertų nuomonė

Pastaba. Įrodymų lygis / kategorija apibrėžti remiantis Škotijos kolegijų gairių tinklo sutarimu (angl. *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*) [152].

Taigi, gydant sisteminę sklerozę, plataus spektro UVA1 spinduliuotė yra rekomenduojama kaip galimo teigiamo klinikinio poveikio metodas. UVA1 fototerapijos kurso vienos procedūros metu gali būti skiriama maža (10–20 J/cm²), vidutinė (20–70 J/cm²) arba didelė (70–130 J/cm²) UVA1 dozė. Atsižvelgiant į ligą, švitinimo procedūros atliekamos 3–5 kartus per savaitę, o fototerapijos kurso trukmė – 3–6 savaitės [13]. Dažniausios UVA1 fototerapijos indikacijos ir gydymo režimas pateikiami 4 lentelėje.

4 lentelė. UVA1 fototerapijos indikacijų ir dozių, skirtų vienam gydymo kursui, apžvalga, remiantis A ir B lygio rekomendacijomis [13]

Indikacija	Fototerapijos kursas
Atopinis dermatitas Dishidrozinis dermatitas Odos T ląstelių limfoma	Vidutinė 60 J/cm ² dozė, 3–5 kartus per savaitę, 3–6 savaites
Lokali skleroderma	Vidutinė 60 J/cm ² dozė, 3–5 kartus per savaitę, iš viso – 40 procedūrų
Skleredema	Vidutinė 50 J/cm ² , 5 kartus per savaitę, iš viso – 40 procedūrų
Sisteminė raudonoji vilkligė	Maža 10 J/cm ² dozė, 5 kartus per savaitę, 3 savaites
Poūmis niežulys	Vidutinė 50 J/cm ² , 5 kartus per savaitę, iš viso – 40 procedūrų
Pigmentinė dilgėlinė	Vidutinė 60 J/cm ² dozė, 5 kartus per savaitę, 3 savaites
Rožinė dedervinė	Vidutinė 30 J/cm ² dozė, 3 kartus per savaitę, 3 savaites

Pastaba. Rekomendacijų stiprumo lygis [153]:

A lygio rekomendacija tiesiogiai remiasi I kategorijos / lygio įrodymais;

B lygio rekomendacija tiesiogiai remiasi II lygio įrodymais arba iš I lygio įrodymų ekstrapoliuotomis rekomendacijomis.

2.3.4. UVA1 fototerapijos poveikis lokaliai sklerodermai ir sisteminei sklerozei

Lokaliai sklerodermai ir ankstyvoms SS stadijoms būdinga padidėjusi uždegiminių ląstelių infiltracija ir sumažėjusi jų apoptozė, o tai lemia tolesnius fibrozinus pokyčius. Kaip minėta, apoptozės proceso reguliavimo sutrikimas – viena iš sisteminės sklerozės patogenetinių grandžių. Apoptozėje dalyvauja fermentai, priklausantys peptidazių šeimai. Kaspazė – tai peptidazė, kurios aktyviajame centre yra aminorūgštis cisteinas ir kuri skelia asparto rūgšties karboksilinės grupės sudaromą peptidinį ryšį [154, 155]. Pagal veikimo mechanizmą kaspazės yra skirstomos į iniciacines (kaspazė-2, -8, -9, -10) ir vykdomąsias (kaspazė-3, -6, -7) [156]. Kaspazė-3 yra pagrindinė ir dominuojanti vykdančioji peptidazė, kuri gali būti aktyvinama tiek išoriniu, tiek vidiniu apoptozės reguliavimo būdu [157, 158]. Išorinis būdas yra susijęs su Fas arba TNF faktoriaus receptoriais ir prie jų prisijungiančiais tirpiaisiais baltymais (pvz., Fas ligandas, TNF), aktyvinančiais

kaspazę-8 [159]. Apoptozei vykstant vidiniu aktyvacijos būdu, dalyvauja mitochondrijos [160, 161]. Atsiradus DNR pažeidimų, iš mitochondrijų į citozolį patenka citochromas c. Padidėjęs mitochondrijos membranos laidumas ir citochromo c patekimas į citozolį skatina kaspazių šeimos aktyvinimą [159]. Citochromas c ir apoptozės proteazės aktyvinantis faktorius (Apaf-1, angl. *Apoptosis proteases activating factor*) suformuoja apoptosomą – baltymų kompleksą, aktyvinantį kaspazę-9 [162]. Apoptozę skatinančių (Bax, Bak ir Bid) ir ją slopinančių (Bcl-2 ir Bcl-x) Bcl šeimos baltymų balansas nulemia apoptozės proceso pradžią arba sustabdymą [160]. Tyrimais nustatyta, kad plačiajuostė UVA1 spinduliuotė sukelia uždegiminių ląstelių apoptozę tiek vidiniu, tiek išoriniu būdu [132]. Taigi, abiem būdais aktyvinant apoptozę, UVA1 spinduliai iš karto sukelia uždegiminių ląstelių žūtį ir tam nebereikia tam tikrų apoptotinių baltymų sintezės.

Be uždegiminių ląstelių apoptozės sukėlimo, UVA1 sumažina chemokinių ir citokinių, tokių kaip TNF α , IL-12 ICAM-1, IFN γ , kiekius [163, 164]. Įrodyta, kad UVA1 keičia endotelio ląstelių reguliacijos ir transformacijos procesus, o tai skatina neovaskuliarizaciją, sutrikusią SS metu [151]. Be to, UVA1 sukelia kolagenazių mRNR raišką ne tik fibroblastuose, bet ir epidermio sluoksnio keratinocituose, melanocituose ir endotelio ląstelėse [15]. Taigi UVA1 spinduliuotė, veikdama SS patogenezės grandis (pakitęs imuninis atsakas, kraujagyslių pažeidimas ir fibrozė), gali būtų viena iš neinvazinio lokalaus gydymo galimybių [134]. Remiantis atliktais tyrimais yra nustatyta, kad plačiajuostė UVA1 spinduliuotė sumažina sklerozinius židinius odoje, odos fibrozę, pažeistos odos sustorėjimą, padidina odos elastingumą ir pagerina mikrocirkuliaciją pacientams, sergantiems lokalia skleroderma ar SS [134]. Apibendrinus literatūros apžvalgos duomenis, 5 ir 6 lentelėse pateikiami UVA1 fototerapijos poveikis, gydymo kursas, pašaliniai reiškiniai, gydant pacientus, sergančius lokalia skleroderma ar SS.

5 lentelė. UVA1 spinduliuotės poveikis sergantiesiems lokalia skleroderma

Lit.	N	Suminė dozė	Gydymo kursas	Klinikinis/ radiologinis atsakas	Pašalinis poveikis
[165]	10	480 J/cm ²	20 J/cm ² keturis kartus per savaitę, 6 savaites	Odos pažeidimas išnyksta daugiau nei 80 % pacientų	Nenustatytas
[166]	17	600 J/cm ² arba 3900 J/cm ²	20 J/cm ² arba 130 J/cm ² keturis kartus per savaitę, 5 savaites, vėliau – du kartus per savaitę, 5 savaites	Teigiamas klinikinis efektas: odos elastingumo padidėjimas abiejose grupėse; odos suplonėjimas įvertintas ir patvirtintas ultragarso tyrimu	Nenustatytas nė vienoje grupėje
[167]	20	600 J/cm ²	20 J/cm ² keturis kartus per savaitę, 6 savaites, vėliau – vieną kartą per savaitę, 6 savaites	Odos pažeidimas išnyksta daugiau nei 80 % pacientų (18 iš 20). Teigiamas atsakas įvertintas kliniškai ir ultragarsu	Nenustatytas
[168]	7	900 J/cm ²	30 J/cm ² tris kartus per savaitę	Klinikinis odos būklės pagerėjimas, išliekantis 6–9 mėnesius; vienam pacientui nustatytas judesių amplitudės padidėjimas per alkūnės sąnarius	Galvos skausmas keliems pacientams
[169]	64	800 J/cm ² arba 2000 J/cm ² ; lyginama su siaurajuostės UVB fototerapija	20 J/cm ² arba 50 J/cm ² penkis kartus per savaitę, 8 savaites; UVB fototerapijos grupėje – 0,1–1,5 J/cm ²	Odos sustandėjimo sumažėjimas visose grupėse; skirtumas tarp gavusiųjų skirtingas UVA1 dozes grupių nenustatytas; fototerapija vidutinėmis UVA1 dozėmis efektyvesnė nei gydymas UVB	Laikina odos eritema UVB fototerapijos grupėje
[170]	16	600 J/cm ² arba 2 100 J/cm ²	20 J/cm ² arba 70 J/cm ² keturis kartus per savaitę, 5 savaites, vėliau – du kartus per savaitę, 5 savaites	Didelis odos fibrozių židinių sumažėjimas, ryškesnis taikant vidutines dozes; pokyčiai įvertinti kliniškai ir ultragarso tyrimu	Nenustatytas nė vienoje grupėje

Lit.	N	Suminė dozė	Gydymo kursas	Klinikinis/ radiologinis atsakas	Pašalinis poveikis
[171]	30	750–1250 J/cm ²	50 J/cm ² 5 kartus per savaitę, 3–6 savaites	Sklerotinių odos židinių skaičiaus sumažėjimas, odos elastingumo padidėjimas (įvertinta kliniškai, kutometru ir ultragarso tyrimu)	Nenustatytas
[172]	35	900–1350 J/cm ²	30 J/cm ² tris–penkis kartus per savaitę, 10–15 savaitių	Nustatytas odos pažeidimo suminkštėjimas, klinikinis pagerėjimas buvo 29 iš 35 pacientų; odos suplonėjimas įvertintas ir patvirtintas ultragarso tyrimu	Nenustatytas
[173]	37	Vidutinės suminės dozės: 683,9 J/cm ² , 1 468 J/cm ² , 2 560 J/cm ²	20 J/cm ² , 50–60 J/cm ² arba 50–120 J/cm ² nuo dviejų iki 5 kartų per savaitę	26–100 % odos būklės pagerėjimas nustatytas 42,6 % pacientų, gydytų mažomis, 72,7 % – vidutinėmis ir 70 % – didelėmis UVA1 dozėmis	15% pacientų pasireiškė deginimo jausmas, eritema, niežėjimas, ypač taikant dideles dozes
[174]	54	1203,15 ± 1133,95 J/cm ²	59,81 ± 27,40 J/cm ² , skirta 21,10 ± 13,1 kartų	Klinikinis odos būklės pagerėjimas nustatytas 79,6 % pacientų	Nenustatytas
[18]	8	960 J/cm ²	48 J/cm ² keturis kartus per savaitę, 5 savaites	Klinikinis odos būklės pagerėjimas visiems pacientams; odos elastingumo padidėjimas buvo įvertintas ir patvirtintas kutometru	Nenustatytas
[20]	14	800 J/cm ²	20 J/cm ² penkis kartus per savaitę, 8 savaites	Klinikinis odos būklės pagerėjimas visiems pacientams	Nenustatytas
[175]	3	600 J/cm ²	20 J/cm ² keturis kartus per savaitę 6 savaites, vėliau – vieną kartą per savaitę, 6 savaites	Sklerotiniai odos pažeidimai išnyksta visiems pacientams; odos pažeidimas neatsirado stebint pacientus dvejus metus	Nenustatytas
[176]	47	5239 ± 4398 J/cm ²	50–60 J/cm ² arba 120 J/cm ² tris kartus per savaitę	Visiems pacientams buvo bent 25 % klinikinis odos būklės pagerėjimas	Nenustatytas

Lit.	N	Suminė dozė	Gydymo kursas	Klinikinis/ radiologinis atsakas	Pašalinis poveikis
[177]	30	200 J/cm ² arba 400 J/cm ²	10 J/cm ² arba 20 J/cm ² tris kartus per savaitę, 6 savaites	18 iš 30 pacientų nustatytas sklerozinių odos pažeidimų suminkštėjimas; klinikinio poveikio skirtumo tarp grupių neaptikta	Nenustatytas
[178]	18	1 662 J/cm ² (310–4270 J/cm ²)	31 J/cm ² tris kartus per savaitę, 8–12 savaitių	77,8 % pacientų stebėtas didelis, 11,1 % – vidutinis, 5,6 % – mažas odos būklės pagerėjimas; 5,6 % pacientų teigiamo klinikinio efekto nebuvo	Vienam pacientui atsirado pūsleliniai odos bėrimai

Lit. – literatūros šaltinis; N – pacientų skaičius; UVB – ultravioletinė B spinduliuotė; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė.

6 lentelė. UVA1 spinduliuotės poveikis sergantiesiems sistetine skleroze

Lit.	N	Suminė dozė	Gydymo kursas	Klinikinis atsakas	Pašalinis poveikis
[179]	8	1500 J/cm ²	30 J/cm ² keturis kartus per savaitę, 8 savaites; vėliau – tris kartus per savaitę, 6 savaites	Teigiamas klinikinis atsakas: taikant modifikuotą Rodnano odos pažeidimo skalę, nustatytas balų sumažėjimas	Nenustatytas
[180]	4	510–1740 J/cm ²	60 J/cm ² penkis kartus per savaitę	Teigiamas klinikinis atsakas: visiems pacientams nustatytas odos elastingumo padidėjimas, laisvesni plaštakų smulkiųjų sąnarių judesiai	Nenustatytas
[181]	18	1500 J/cm ²	30 J/cm ² keturis kartus per savaitę, 8 savaites; vėliau 3 kartus per savaitę, 6 savaites	Teigiamas klinikinis atsakas: 16 iš 18 pacientų suminkštėjo oda, padidėjo plaštakų smulkiųjų sąnarių judesių amplitudės	Nenustatytas

Lit.	N	Suminė dozė	Gydymo kursas	Klinikinis atsakas	Pašalinis poveikis
[19]	9	1680 J/cm ²	40 J/cm ² tris kartus per savaitę, 14 savaitių	Naudojant modifikuotą Rodnano odos pažeidimo skalę, neaptikta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp gydytos ir kontrolinės grupių rezultatų	Nenustatytas
[182]	8	529–1029 J/cm ²	15 J/cm ² tris kartus per savaitę, 1 savaitę; vėliau 30–40 J/cm ² tris kartus per savaitę	Visiems pacientams nustatytas klinikinis pagerėjimas: naudojant modifikuotą Rodnano odos pažeidimo skalę balų skaičius sumažėjo 57 %	Nenustatytas
[183]	1	2222 J/cm ²	50 J/cm ² du tris kartus per savaitę	Mikrostomijos (susiaurėjusio burnos plyšio) padidėjimas	Nenustatytas
[178]	3	660–1695 J/cm ² (vidutinė suminė dozė – 1160 J/cm ²)	30 J/cm ² tris kartus per savaitę, 8–12 savaitių	Naudojant modifikuotą Rodnano odos pažeidimo skalę, balų skaičius sumažėjo 15 %, 73 % ir 100 %	Nenustatytas

Lit. – literatūros šaltinis; N – pacientų skaičius; UVB – ultravioletinė B spinduliuotė; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė

Remiantis literatūros apžvalga, tik trys iš visų atliktų studijų yra kontrolinės. Pacientai, sergantys sisteminė skleroze, buvo gydyti vidutinėmis ir didelėmis (suminės dozės iki 2 222 J/cm²) UVA1 spinduliuotės dozėmis. Visose pateiktose klinikinėse studijose buvo naudojamas platus UVA1 spinduliuotės spektras, kartais apimantis tiek regimosios šviesos (bangos ilgis > 400 nm), tiek UVA2 spinduliuotės sritis (bangos ilgis > 320 nm ir < 340 nm). Šio tyrimo metu buvo iškelta hipotezė, kad siauro spektro (365 ± 5 nm) UVA1 spinduliuotė yra veiksminga ir saugi fototerapijos rūšis odos fibrozei gydyti.

2.3.5. Fototerapijos nepageidaujamos reakcijos

Pašaliniai reiškiniai, atsiradę po gydymo UVA1, skirstomi į ūmius ir lėtinius. Įprastai jie yra gana reti, lyginant UVA1 su kitomis fototerapijos rūšimis, pavyzdžiui, ultravioletiniais B spinduliais (UVB) ar psoralenu ir ultravioletiniais A spinduliais (PUVA). Pagrindiniai UVA1 fototerapijos ūmūs pašaliniai reiškiniai yra odos paraudimas, niežėjimas, deginimo jausmas [134, 184]. Įrodyta, kad eritema ir odos nudegimas yra gerokai mažesni gydant UVA1 nei PUVA ar taikant UVB fototerapiją [185]. Dažniausiai ūmių pašalinių reakcijų atsiranda skiriant didelių dozių, daugiau nei 130 J/cm^2 , plataus spektro UVA1 spinduliuotę. Hiperpigmentacija gali atsirasti po pakartotinių fototerapijos procedūrų tose pačiose odos srityse. Kai kuriais atvejais buvo nustatytas herpes infekcijos paūmėjimas ir polimorfiniai šviesos sukelti bėrimai [186]. Lėtinės pašalinės reakcijos, susijusios su UVA1 fototerapijos taikymu pacientams, sergantiems sisteminė skleroze ar lokalia skleroderma, yra retos. Trijų retrospektyvių studijų duomenimis, 423 pacientams, gydytiems plačiajuoste UVA1 (340–400 nm), kuriems buvo skirta nuo 4 iki 116 fototerapijos procedūrų, lėtinių pašalinių reakcijų tokių kaip fotokarcinogenezė, nustatyta nebuvo [173, 174, 176].

Literatūroje yra minimi keli klinikiniai atvejai, kai po UVA1 fototerapijos išsivystė piktybinės odos ligos [185]. Iki šiol yra aprašytas vienas melanomos atvejis, gydant mastocitozę UVA1 spinduliais, tačiau reikia pažymėti, kad šiam pacientui anksčiau buvo skirta ir PUVA terapija [187]. Aprašomi du Merkelio karcinomos atvejai, kai išryškėjo kraujo diskrazijos požymiai po plačiajuostės UVA1 fototerapijos, tačiau pacientai kartu buvo gydomi ir imunosupresantais [188]. Be to, naudotas UVA1 spinduliuotės ruožas (320–400 nm) apėmė ir UVA2 spektrinę sritį.

Kitaip nei UVA1 fototerapija, gydymas UVB spinduliais sukelia odos senėjimą, imuninės sistemos susilpnėjimą ir turi įtakos melanomos ir kitų odos piktybinių navikų išsivystymui [189, 190]. Plataus spektro UVB spinduliuotė yra 1000–10 000 kartų karcinogeniškesnė nei UVA, nors ir silpniau skverbiasi į giliuosius odos

sluoksnius [190, 191]. Atliktoje studijoje su pelėmis buvo nustatyta, kad, kitaip nei siaurajuostė UVB ar plačiajuostė UVA1, plataus spektro UVB spinduliuotė skatina piktybinių ląstelių proliferaciją [192].

2.3.6. Fototerapijos šaltiniai

Pagrindiniai fototerapijos šaltiniai, kurie yra naudojami klinikinėje praktikoje, skleidžia plataus spektro UVB (290–320 nm), siaurajuostę UVB (311–313 nm), plačiajuostę UVA (320–340 nm) ar plačiajuostę UVA1 (340–400 nm) spinduliuotes. Fototerapijoje naudojami plataus spektro šviesos šaltiniai yra fluorescencinės lempos. Tačiau fototerapijos šaltinis gali būti ir šviesą spinduliuojantys diodai – LED'ai (LED – angl. *Light emitting diodes*), kurie skleidžia tik tam tikros bangos ilgių srities spinduliuotę. Prieš kelerius metus Inada su bendraautoriais [23] atliko tyrimą, kurio metu pelės buvo apšvitintos UVA1 spinduliais, naudojant 2 skirtingus UVA1 šaltinius: fluorescencinę UVA1 lempą (spektrinė sritis – 340–400 nm) arba UVA1 šviesą spinduliuojančių diodų (UVA1 LED) įrenginį (bangos ilgis – 365 nm). Autoriai palygino abiejų šaltinių galios sąnaudas, apšvitos intensyvumą, pastovaus intensyvumo pasiekimo trukmę bei stabilumą ir šiluminus efektus. Tyrimo rezultatai parodė, kad UVA1 LED įrenginys sunaudojo tik vieną trečdalį elektros energijos, palyginti su UVA1 lempa. Buvo nustatyta, kad UVA1 lempos intensyvumas pasiekė pastovumo būseną maždaug per minutę, o UVA1 LED įrenginio pastovaus intensyvumo kilimo trukmė buvo tik kelios sekundės, ir šis intensyvumas išliko stabilus vienos valandos stebėjimo laikotarpiu. Be to, UVA1 LED šaltinis taip pat turėjo mažiau šiluminių efektų, palyginti su įprastine UVA1 lempa. Tad pagal visas minėtas charakteristikas UVA1 LED įrenginys pasižymėjo palankesnėmis fizikinėmis savybėmis nei UVA1 lempa. Be to, Inada su bendraautoriais ankstesniu *in vivo* tyrimu nustatė, kad UVA1 fototerapija, naudojant tiek fluorescencinę UVA1 lempą, tiek UVA1 LED įrenginį, sėkmingai sukėlė *Jurkat* ląstelių apoptozę ir nekrozę [193]. Tad biologinis efektas *in vitro* nepriklausė nuo UVA1 fototerapijos šaltinio [193]. Ilgas veikimo laikas,

mažas svoris ir gabaritai, šaltinio patvarumas, temperatūrinis stabilumas, mažo šilumos kiekio išspinduliavimas ir ekonomiškumas (maitinimui reikalinga nedidelė įtampa) yra pagrindiniai veiksniai, lemiantys LED'ų pranašumą prieš įprastines fluorescencines lempas.

3. METODAI

3.1. Eksperimentiniai gyvūnai

Gavus Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (VMVT) leidimus atlikti bandymus su gyvūnais (Nr. G2-15, 2 priedas ir Nr. G2-42, 3 priedas), eksperimentams buvo pasirinktos DBA/2 linijos 6–8 savaičių pelių patelės. Šiame tyrime DBA/2 linijos pelės buvo pasirinktos dėl didelio jautrumo bleomicinu sukeltam fibrozės modeliui. Yamamoto su kolegomis palygino Balb/c, C3H/He, C57BL/6J, A/J, DBA/2, B10.BR, B10.A, ir B10.D2 pelių linijų jautrumą bleomicinu sukeltam fibrozės išsivystymui. Autoriai nustatė, kad ryški odos sklerozė, kai susidaro homogeninis tarpląstelinis užpildas ir sustorėja kolageno skaidulos, yra būdinga C3H/He, DBA/2, B10.D2, ir B10.A linijos pelėms po pakartotinių bleomicino injekcijų [119]. Be to, vėliau kiti autoriai patvirtino, kad DBA/2 linijos pelės yra ypač jautrios bleomicinu sukeltam odos fibrozei [123].

84 pelių patelės, kurių svoris buvo apie 20–22 g, buvo laikomos standartinėmis sąlygomis po šešias narvelyje (plotas ne mažiau nei 100 cm² vienai pelei). Pelės buvo laikomos pastovios temperatūros (20 ± 3 C°), drėgnumo (55–60 %) ir apšvietimo ciklo (12 val. šviesos/12 val. tamsos) sąlygomis, neribojant visaverčio pelių pašaro ir švaraus vandens. Viso eksperimento metu gyvūnai buvo laikomi numatyta tvarka, remiantis Europos Sąjungos direktyva ir kitais norminiais bandomųjų gyvūnų naudojimo eksperimentams aktais (Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES, VMVT direktoriaus įsakymas 2012-10-31 Nr. B1-866 „Dėl mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“).

3.2. Eksperimentinis pelių sisteminės sklerozės modelis

BLM – tai antibiotikas, gaunamas iš bakterijos *Streptomyces verticillus*. Fibrozė yra gerai žinomas pašalinis BLM poveikis, todėl poodinis BLM yra naudojamas eksperimentinei fibrozei sukelti gyvūnų modeliuose [112]. Histologiškai matoma pakitusi audinių struktūra, uždegiminių ląstelių infiltracija, padidėjęs jungiamojo audinio ląstelių – fibroblastų kiekis. Tad šis sklerodermos modelis atspindi uždegiminius pokyčius, kurie vyksta esant ankstyvai SS stadijai [25]. Šiame tyrime odos fibrozė pelėms buvo sukelta vietinėmis BLM (bleomicino sulfatas iš *Streptomyces verticillus*, vaistinė forma – milteliai; gamintojas – *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Vokietija) injekcijomis į apibrėžtą 1 cm² ploto nugaros zoną. Iš pradžių nuo pažymėto ploto buvo pašalinti plaukai, naudojant depiliacinę kremą (Veet®, Anglija). BLM tirpintas 0,9 % natrio chlorido tirpale (NaCl) ir injekcijoms naudotas 0,5 mg/ml koncentracijos BLM. Poodinės 100 µl BLM injekcijos buvo leistos į penkis taškus pažymėtoje nugaros srityje kas antrą dieną (5 pav.). Injekcijų kurso trukmė – 3 arba 8 savaitės. Kontrolinių grupių gyvūnams skirtos poodinės 100 µl 0,9 % NaCl injekcijos.



5 pav. Bleomicino leidimas DBA/2 linijos pelėms į depiliuotą odos sritį nugaroje

3.3. Fototerapijos prietaisas

Bendradarbiaujant su Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Kvantinės elektronikos katedros mokslininkais, Valstybiniame mokslinių tyrimų institute, Inovatyvios medicinos centre, sukurtas specialiosios paskirties medicinos prietaisas „IMC-Light“, skleidžiantis siaurajuostas ultravioletinę ir infraraudonąją spinduliuotes bei kontrolines mėlyną ir raudoną šviesas. Šis prietaisas sukurtas siekiant įvertinti siauro spektro UVA1 ir infraraudonosios A spinduliuotės poveikį SS sergančių pacientų odos elastingumui, mikrocirkuliacijai ir bendrai organizmo būklei, remiantis specifiniais imunobiocheminiais, kapiliaroskopijos, lazerinės doplerografijos ir imunohistocheminės analizės duomenimis. Siekiant šį prietaisą naudoti pacientams, sergantiems SS, gydyti, pateiktas pranešimas-prašymas atlikti medicinos prietaiso „IMC-Light“ klinikinius tyrimus, remiantis teorine ir praktine moksline medžiaga (iš viso 160 psl.). Valstybinė akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnyba (VASPT) prie Sveikatos apsaugos ministerijos (SAM) suteikė leidimą 2015 m. spalio 16 d. [D2-11748 - (5.19) (Nr. S8-5)]. Akreditacijos duomenys ir leidimas įregistruoti Europos medicininių prietaisų duomenų banke EUDAMED; klinikinio tyrimo identifikacijos Nr. (CIV-ID): CIV-15 - 10-013898 (1 priedas). Remiantis minėta registracija, detalūs prietaiso brėžiniai ir specifikacijos apie kitas spinduliuotes, išskyrus UVA1, šioje disertacijoje nebus pateikiami.

Eksperimente naudotas fototerapijos prietaisas sudarytas iš 20 šviesos diodų (angl. *Light emitting diode* – LED), skleidžiančių UVA1 spinduliuotę, kurios bangos ilgis – 365 ± 5 nm, o galios tankis – 21 mW/cm^2 . Šviesos diodai yra sumontuoti į bendrą karkasą su aušinimo sistema (6 pav.).



6 pav. Specialiosios paskirties medicinos prietaiso „IMC-Light“ vaizdas iš vidinės, spinduliuotę skleidžiančios, pusės

3.3.1. UVA1 spinduliuotės šaltinis

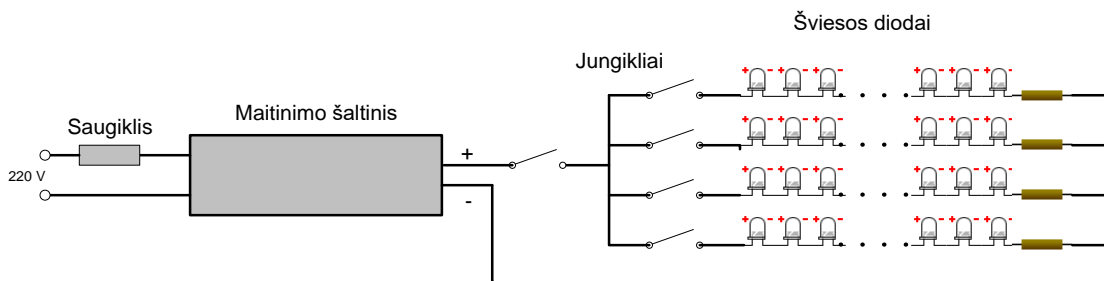
1. Prietaise naudojamų UVA1 LED specifikacijos (7 lentelė).

7 lentelė. UVA1 LED specifikacijos

Bangos ilgis (nm)	Srovė (mA)	Įtampa (V)	Matmenys (mm)	Švietimo kampas	Intensyvumas (mW)
365 ± 5 nm	500 mA	3,8 V	6,6 x 6,6	120°	330mW

2. LED jungimo schema (8 pav.):

- Šaltinio įtampa – 20 V.
- LED naudojama įtampa – 3,8 V.
- LED naudojama srovė – 500 mA.
- LED skaičius – 20.
- 20 (5 x 4) LED jungimas.



8 pav. LED sujungimo schema

3.3.2. UVA1 spinduliuotės galios tankis ir spektrinės savybės

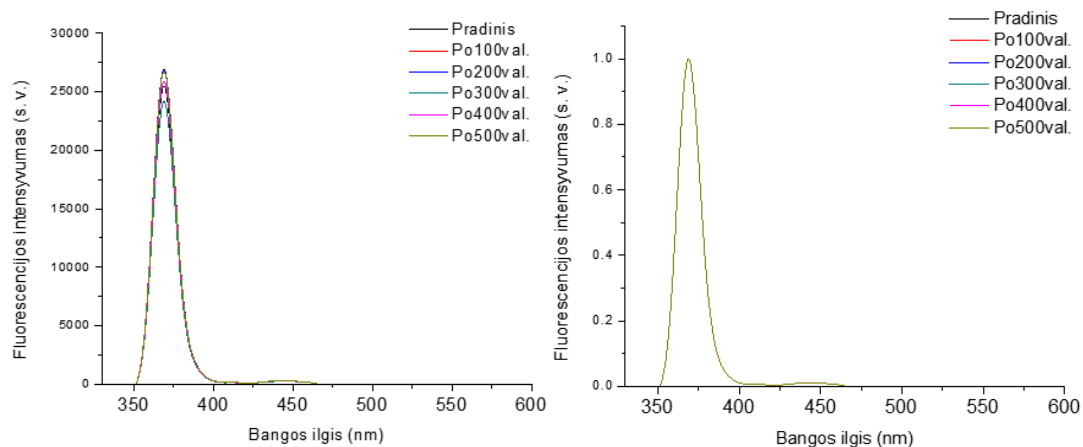
Prieš pradėdant naudoti šį prietaisą eksperimente, buvo išmatuoti pradiniai galios tankiai ir spektrinės UVA1 spinduliuotės savybės. Tyrimams naudoti prietaisai: galios matuoklis SOLO2 („Gentec Electro-Optics“, Kanada), spektrofluorimetras QE65000 („OceanOptics“, JAV), spektrofluorimetras AvaSpec-2048-4-RM („Avantes“, Olandija). Spinduliuočių galios tankiai matuoti 4 cm atstumu nuo šviesos diodų (8 lentelė).

8 lentelė. Galios tankio matavimo rezultatai

Matavimas	Pradinis	Po 100 val.	Po 200 val.	Po 300 val.	Po 400 val.	Po 500 val.	Vidurkis
UVA1galios tankis	20,9 ± 0,3 mW/cm ²	21,0 ± 0,2 mW/cm ²	20,9 ± 0,2 mW/cm ²	21,1 ± 0,3 mW/cm ²	21,0 ± 0,1 mW/cm ²	20,9 ± 0,2 mW/cm ²	20,97 ± 0,08 mW/cm ²

Išvada. 500 valandų matuotas spinduliuotės galios tankis kito matavimo paklaidų ribose. Nustatytas UVA1 galios tankis: UVA1 – 21 mW/cm².

Siekiant įvertinti UVA1 spinduliuotės spektrines savybes (9 pav.), atlikti matavimai.



9 pav. UVA1 spinduliuotės spektrinės savybės. Remiantis sunormuotais spinduliuotės fluorescencijos spektrais, nustatyta, kad, prietaisui veikiant 500 valandų, UVA1 spinduliuotės spektrinės savybės išliko nepakitusios

3.4. Fototerapijos kursas

Spinduliuotės dozė yra apskaičiuojama pagal formulę:

Spinduliuotės galios tankis (W/cm^2) x laikas (s) = dozė (J/cm^2). Taigi, norėdami sukaupti vienos procedūros metu $40 \text{ J}/\text{cm}^2$ arba $80 \text{ J}/\text{cm}^2$ UVA1 spinduliuotės dozes, kurių galios tankis – $21 \text{ mW}/\text{cm}^2$, švitinant 4 cm atstumu, apskaičiuavome švitinimo trukmę (9 lentelė).

9 lentelė. Švitinimo trukmė, reikalinga tam tikrai dozei sukaupti

		Dozė	
		$40 \text{ J}/\text{cm}^2$	$80 \text{ J}/\text{cm}^2$
Spinduliuotė	UVA1	31 min. 45 s	63 min. 30 s

Pastaba. Prietaiso sklaidžiamos spinduliuotės testavimas buvo atliktas Nacionalinio vėžio instituto Mokslinių tyrimų centro Biomedicininės fizikos laboratorijoje (P. Baublio g 3b., LT-08406 Vilnius). Testavimą atliko dr. Romualdas Rudys. Naudotos nuotraukos paimtos iš VASPVT pateikto pranešimo apie klinikinį tyrimą.

Švitinimo procedūros buvo atliekamos specialioje metalinėje dėžėje su atskirais narveliais kiekvienai pelei (10 pav.).



10 pav. Specialiosios paskirties medicinos prietaisas „IMC-light“, uždėtas ant dėžės su atskirais narveliais, skirtos pelėms apšvitinti

Fototerapijos kursas – 15 procedūrų (3 kartai per savaitę, trukmė – 5 savaitės). Kaip minėta, vienos procedūros metu skiriama vidutinė – 40 J/cm² arba didelė – 80 J/cm² UVA1 dozė (suminės dozės – 600 J/cm² arba 1 200 J/cm²). Tokia gydymo schema pasirinkta atsižvelgiant į sisteminę sklerozę sergančių pacientų tyrimų duomenis. Remiantis literatūros apžvalga, rekomenduojama 20–50 J/cm² UVA1 dozė, ji skiriama 3–4 kartus per savaitę (gydymo kursas – 30 procedūrų) [184].

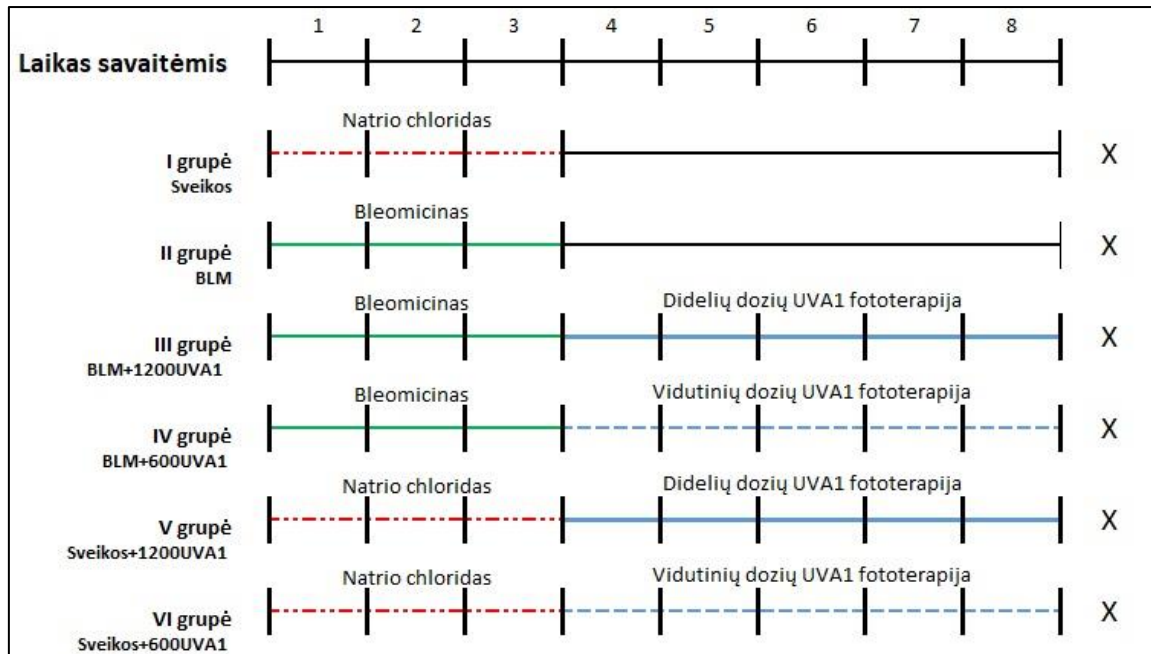
3.4.1. Fototerapijos kurso schema bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės pelių modelyje

DBA/2 linijos pelės suskirstytos į 6 grupes (po 7 gyvūnus kiekvienoje):

- I grupė (Sveikos) – sveikų pelių grupė;
- II grupė (BLM) – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė;
- III grupė (BLM + 1 200 UVA1) – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis;
- IV grupė (BLM + 600 UVA1) – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis;
- V grupė (sveikos + 1 200 UVA1) – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis;
- VI grupė (sveikos + 600 UVA1) – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis.

II, III ir IV grupių gyvūnams sukeltas eksperimentinis sisteminės sklerozės modelis, taikant BLM injekcijas pagal aprašytą metodiką. Sukėlus fibrozę, III grupės pelėms buvo skirtas gydymas didelėmis – 80 J/cm², o IV grupės pelėms – vidutinėmis – 40 J/cm² 365 ± 5 nm UVA1 dozėmis tris kartus per savaitę penkias savaites (fototerapijos kurso suminės dozės – atitinkamai 1 200 J/cm² ir 600 J/cm²). I grupė – kontrolinė; šios grupės sveikoms pelėms 8 savaites buvo leidžiamas 0,9 % natrio chlorido tirpalas; II grupė – kontrolinė pelių, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, grupė. Siekiant įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės poveikį sveikai

odai, V ir VI grupių sveikiems gyvūnams skirtos didelės ir vidutinės UVA1 dozės pagal aprašytą schemą. Eksperimento pabaigoje, kitą dieną po paskutinės fototerapijos procedūros, visi gyvūnai buvo numarinti ir iš pažymėtos nugaros srities paimtos biopsinės medžiagos. Schema pateikiama 11 pav.



11 pav. Fototerapijos kurso schema

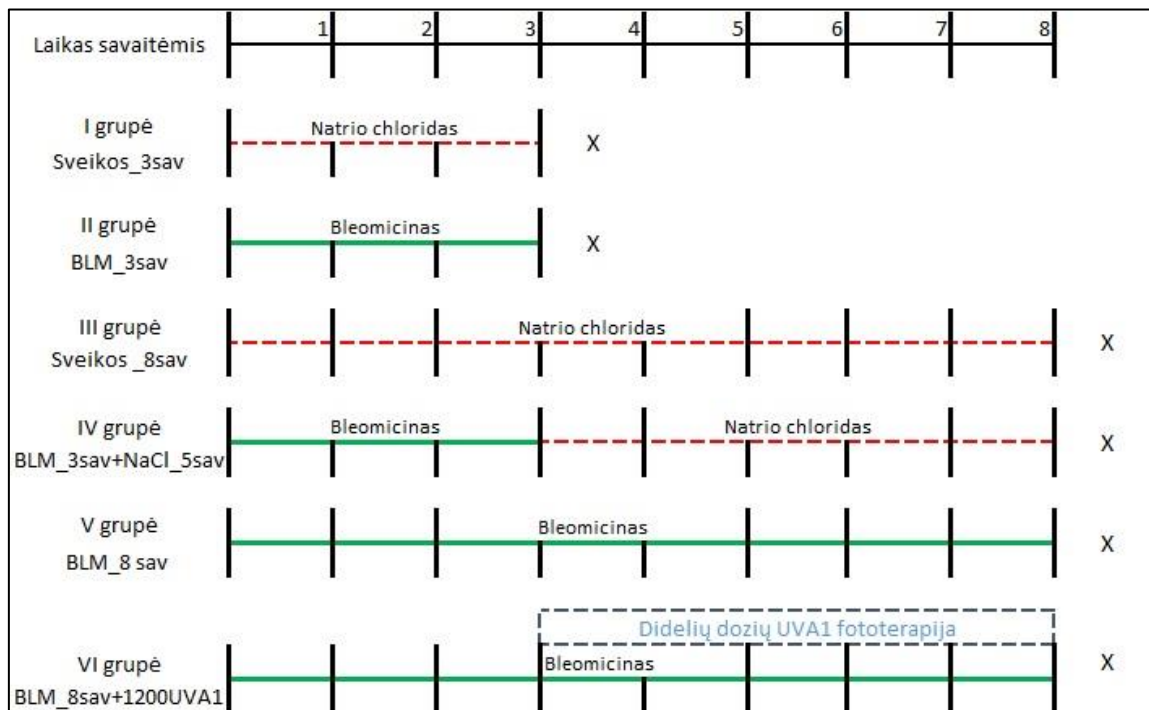
3.4.2. Fototerapijos kurso schema bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės pelių modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį

DBA/2 linijos pelės suskirstytos į 6 grupes (po 7 gyvūnus kiekvienoje):

- I grupė (Sveikos_3sav) – trijų savaičių sveikų pelių kontrolinė grupė;
- II grupė (BLM_3sav) – trijų savaičių pelių, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, grupė, kai bleomicinas buvo skirtas tris savaites;
- III grupė (Sveikos_8sav) – aštuonių savaičių sveikų pelių kontrolinė grupė;

- IV grupė (BLM_3sav+NaCl_5sav) – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, kai BLM buvo leidžiamas tris savaites, paskui kitas penkias savaites – natrio chlorido tirpalas;
- V grupė (BLM_8 sav) – aštuonių savaičių pelių, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, grupė, kai bleomicinas buvo skirtas aštuonias savaites;
- VI grupė (BLM_8sav+1200UVA1) – pelės su BLM sukelta sisteminė sklerozė, kurios paskutines penkias eksperimento savaites buvo gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², siaurajuostės UVA1 dozėmis, kartu veikiant BLM visas aštuonias savaites.

Siekiant įvertinti fototerapijos poveikį susiformavusiai ir besiformuojančiai fibrozei, VI grupės pelėms visas aštuonias eksperimento savaites leistas BLM ir paskutines penkias savaites kartu su BLM injekcijomis taikytas gydymas sumine 1 200 J/cm² UVA1 spinduliuotės doze (fototerapijos kursas – 3 kartai per savaitę, vienos procedūros metu skirta 80 J/cm² UVA1 dozė). Tai reiškia, kad UVA1 pradėjo veikti, kai odos fibrozė jau buvo atsiradusi per pirmas tris BLM leidimo savaites. Siekiant įvertinti susiformavusios fibrozės lygį, II grupės eksperimentinėms pelėms 3 savaites leistas BLM, pasibaigus jo injekcijoms, gyvūnai numarinti ir, paėmus odos mėginių, iširtas jos storis. Remtasi prielaida, kad šių gyvūnų odoje vyravo tokio pat lygio fibrozė kaip ir VI grupės pelių odoje po 3 savaičių BLM injekcijų, prieš pradėdant 5 savaičių trukmės gydymo procedūras UVA1 spinduliuote. IV grupės eksperimentinėms pelėms 3 savaites leistas BLM, o likusias 5 savaites – fiziologinis tirpalas. Jų oda vertinta dėl galimos spontaninės fibrozės regresijos ir odos fibrozės pokyčių iki fototerapijos. V grupės eksperimentinėms pelėms BLM buvo leistas 8 savaites, siekiant įvertinti fibrozės progresavimo lygį. I ir III grupių pelėms po oda leistas NaCl tirpalas, – šios, sveikų gyvūnų grupės, buvo kontrolinės. I ir II grupės gyvūnai buvo numarinti po 3 savaičių, o III, IV, V ir VI grupių – po 8 savaičių. Schema pateikiama 12 pav.



12 pav. Fototerapijos kurso schema

3.5. Tyrimų schema

3.5.1. Biopsinės medžiagos paruošimas mikroskopijai

BLM sukeltos eksperimentinės pelių fibrozės modeliuose oda mėginiams imama iš pažymėto nugaros srityje ploto, į kurį buvo leidžiamas BLM tirpalas. Biopsinė medžiaga buvo fiksuojama 10 % buferiniame formalino tirpale ir paskui įlieta į parafiną. Paruošti parafininiai 2–4 μm storio pjūviai naudoti histologinei ir imunohistocheminei analizei.

3.5.2. Tyrimai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje

- Histologinė odos storio analizė.
- Histologinė putliųjų ląstelių infiltracijos analizė.
- Imunohistocheminė aktyvios kaspazės-3 raiškos analizė (apoptozės įvertinimas).

- Imunohistocheminė p53 ir Ki-67 baltymų raiškos analizė (karcinogenezės rizikos įvertinimas).

3.5.3. Tyrimai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį

- Histologinė odos storio analizė.
- Kolageną skaidančių fermentų (MMP-1 ir MMP-3) imunohistocheminė analizė.
- Kolageno I ir III tipų sancaupų imunohistocheminė analizė.

Kadangi modeliuose buvo atlikti skirtingi histologiniai ir imunohistocheminiai tyrimai, aprašoma bendroji tyrimų atlikimo ir vertinimo metodika.

3.6. Histologinė analizė

3.6.1. Histologinė odos storio analizė

Parafininiai pjūvių mėginiai odos storiui įvertinti buvo nudažyti hematoksilinu ir eozinu (H&E) bendram morfologiniam vaizdui nustatyti, naudojant standartinį protokolą. Pirmiausia šie pjūviai deparafinizuoti ksilolu bei 100 %, 96 % ir 70 % etanoliu. Deparafinizuoti mėginiai buvo plauti ir 10 minučių dažyti hematoksilinu. Nudažius hematoksilino dažais, pjūviai buvo melsvinami 0,1 % amonio vandeniui. Nuplovus pjūviai vieną minutę dažyti eozinu. Dar kartą nuplovus vandeniui, pjūviai dehidruoti 70 %, 96 % ir 100 % etanoliui, o prieš padengiant juos dengiamuoju stikliuku, skaidrinti ksilolu. Mėginiai nufotografuoti „Olympus BX51“ (*Olympus Corporation, Inc.*, Tokijas, Japonija) mikroskopu su „Nikon DXM“ 1 200 kamera (*Nikon Instruments, Inc.*, Niujorkas, JAV) esant 20 x didinimui. Deros storis išmatuotas vertinant maksimalų atstumą tarp epidermio-dermos jungties ir dermos-poodžio riebalinio sluoksnio keturiuose kiekvieno mėginio laukuose. Kiekybinė odos storio analizė atlikta naudojant programinę įrangą „NIS ELEMENTS software v.BR 2.30“ (*Nikon instruments*, Olandija). Rezultatuose pateikti matavimų vidurkis ir standartinis nuokrypis, išreikšti µm.

3.6.2. Histologinė putliųjų ląstelių infiltracijos analizė

Kad išryškėtų putliosios ląstelės, pjūviai buvo nudažyti toluidino mėlio dažu pagal standartinį protokolą. Deparafinizuoti mėginiai buvo plauti ir 3 minutes dažyti toluidino mėliu. Nuplovus distiliuotu vandeniu, pjūviai nusausinti filtriniu popieriumi ir dehidruoti 96 % etanoliu. Dar kartą nusausinus, pjūviai skaidrinti ksilolu ir padengti dengiamaisiais stikleliais. Putliąsias ląsteles toluidino mėlis nudažo metachromatiškai violetine spalva ir foną – ortochromatiškai mėlyna spalva. Mėginiai nufotografuoti „Nikon „Eclipse TE2000“ (*Nikon*, Tokijas, Japonija) mikroskopu su „Nikon DS-Fi2“ kamera (*Nikon*, Tokijas, Japonija) esant 20 x didinimui. Kiekybinė putliųjų ląstelių analizė atlikta naudojant programinę įrangą „NIS ELEMENTS software v.BR 2.30“ (*Nikon instruments*, Olandija). Keturiuose kiekvieno mėginio laukuose buvo suskaičiuotos toluidino mėliu išryškintos putliosios ląstelės, apskaičiuotas vidurkis. Ląstelių infiltracija išreikšta kaip putliųjų ląstelių skaičiaus vidurkis mikroskopo vaizdo lauke (esant 200 x didinimui).

3.7. Aktyvios kaspazės-3, p53, Ki-67, MMP-1, MMP-3, kolageno I ir III tipo imunohistocheminė analizė

3.7.1. Imunohistocheminio dažymo atlikimo metodika

Imunohistocheminis dažymas su pirminiais antikūnais prieš aktyvią kaspazę-3, p53, Ki-67 baltymus, MMP-1, MMP-3 fermentus ir I bei III tipo kolagenus atliktas pagal gamintojo nuorodas, naudojant En-Vision vizualizacijos rinkinį (DAKO, Glostrupas, Danija). Pirminių antikūnų specifikacijos, skiedimai, teigiamos kontrolės mėginiai pateikiami 10 lentelėje.

10 lentelė. Pirminiai antikūnai, skirti imunohistocheminei analizei

Pirminis antikūnas	Gamintojas (katalogo numeris)	Skiedimas	Teigiamos kontrolės audinys
Pirminis antikūnas prieš aktyvią kaspazę-3 (triušio polikloninis antikūnas)	<i>Abcam</i> Kembridžas, Jungtinė Karalystė (ab44976)	1:500	Žmogaus tonzilė
Pirminis antikūnas prieš Ki-67 baltymą (pelės antikūnas prieš žmogaus Ki-67 antigeną) [Antikūno klonas – Sp6]	<i>Spring Bioscience</i> , Pleasantonas, JAV (M3064)	1:200	Žmogaus tonzilė
Pirminis antikūnas prieš p53 baltymą (triušio polikloninis antikūnas)	<i>Abcam</i> Kembridžas, Jungtinė Karalystė (ab31333)	1:200	Žmogaus krūtis adenokarcinoma
Pirminis antikūnas prieš matrikso metaloproteinazę-1 (anti-MMP1, triušio polikloninis antikūnas)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Ilinojus, JAV (PA5-27210)	1:600	Žmogaus krūtis adenokarcinoma
Pirminis antikūnas prieš matrikso metaloproteinazę-3 (anti-MMP3, triušio monokloninis antikūnas)	<i>Abcam</i> , Kembridžas, Jungtinė Karalystė (ab52915)	1:100	Žmogaus skrandžio adenokarcinoma
Pirminis antikūnas prieš I tipo kolageną (triušio polikloninis antikūnas)	<i>Abcam</i> Kembridžas, Jungtinė Karalystė (ab34710)	1:300	Žmogaus seilių liauka
Pirminis antikūnas prieš III tipo kolageną (triušio polikloninis antikūnas)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Ilinojus, JAV (PA1-85323)	1:400	Pelės placenta

Pirmiausia odos pjūviai deparafinizuoti ksilolu bei 100 %, 96 % ir 80 % etanoliu. Antigenams atkurti deparafinizuoti pjūviai 20 minučių buvo apdorojami citrato buferyje (pH 6,0) mikrobangų krosnelėje (*HISTOS REM®*, *Milestone Medical*, Mičiganas, JAV) 98° C temperatūroje, paskui aušinami iki kambario temperatūros ir nuplaunami fosfato buferiu (*Phosphate buffered saline – PBS*). Endogeninės peroksidazės aktyvumas blokuotas preparatus inkubuojant 30 minučių 3 %

vandenilio peroksido tirpale (DAKO REAL En-Vision Kit peroksidazės blokatorius). Nuplauti distiliuotu vandeniu pjūviai buvo panardinti į šviežio buferio voneleį ir inkubuoti praskiestais pirminiais antikūnais tamsioje drėgnoje kameroje 4° C temperatūroje per naktį. Vėliau pjūviai nuplauti PBS ir 30 minučių kambario temperatūroje inkubuoti antrinių (peroksidaze žymėtų) antikūnų tirpale. Nuplovus PBS, pjūviai buvo veikiami DAB (3,3-diaminobenzidino tetrahydrochloridas) substrato-chromogeno tirpale (DAKO En-Vision Kit) 5 minutes. Naudojant DAB substrato chromogeną, gaunamas rudai auksinės spalvos galutinis reakcijos produktas vietoj tikslinio antigeno. Atsargiai nuplauti distiliuotu vandeniu pjūviai buvo nudažyti Mayer hematoksilinu, nuskaidrinti ir padengti dengiamaisiais stikleliais, naudojant ilgalaikio saugojimo dengiamąją terpę. Imunohistocheminės reakcijos atliktos kartu su teigiamomis audinio kontrolėmis pagal protokolą, o neigiamai reagento kontrolei įvertinti vietoj tiriamo antikūno buvo pasirinktas atitinkamas kiekis PBS.

3.7.2. Imunohistocheminio dažymo mėginių vertinimo metodika

Imunohistocheminio dažymo mėginiai nufotografuoti „Nikon „Eclipse TE2000“ (Nikon, Tokijas, Japonija) mikroskopu su „Nikon DS-Fi2“ kamera (Nikon, Tokijas, Japonija). Aktyvios kaspazės-3, Ki-67 mėginiai nufotografuoti esant 40 x didinimui, p53 baltymo – esant 10 x didinimui, MMP-1, MMP-3, kolageno I ir III tipų – esant 40 x didinimui.

Kiekybinė p53 ir Ki-67 baltymų raiškos analizė atlikta naudojant atviro kodo programinę įrangą (*ImageJ® Fiji software, National Institutes of Health – NIH, Merilendas, JAV*), naudojant *Immunoratio* įskiepi (Copyright©; 2010–2011; versija 1.0c, Biomedicinos technologijų institutas, Tampėrės universitetas, Suomija), kuris yra laisvai prieinamas interneto svetainėje <http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>. Ki-67 raiška vertinta odos epidermio sluoksnyje, p53 baltymo raiška – visuose odos sluoksniuose. Pagal spalvos

atskyrimo metodiką, nustčius spalvinius slenksčius, apskaičiuotas santykis tarp teigiamai nusidažusių ląstelių branduolių (rudi pikseliai, DAB dažas) ir visų esančių ląstelių branduolių (mėlyni pikseliai, hematoksilino dažas). Matavimai atlikti kiekvieno mėginio keturiuose vaizduose ir rezultatas pateiktas kaip matavimų vidurkis, išreikštas procentais (%).

Kiekybinė aktyvios kaspazės-3, MMP-1, MMP-3, I ir III tipų kolageno raiškų analizė atlikta naudojant atviro kodo programinę įrangą (*ImageJ® Fiji software, National Institutes of Health – NIH, Merilendas, JAV*) [194]. Rudai nusidažiusi citoplazma vertinama kaip aktyvios kaspazės-3, MMP-1, MMP-3, I ir III tipų kolageno teigiama imunohistocheminė reakcija. Optinis vaizdas kompiuterinėje programoje buvo apdorotas pagal spalvos (hematoksilino ir DAB-diaminobenzidino) atskyrimo metodiką [195]. Pasirinkus teigiamos imunohistocheminės reakcijos spalvinį slenkstį, buvo įvertinta aktyvios kaspazės-3, MMP-1, MMP-3, I ir III tipų kolageno raiškų procentinė dalis visame optinio vaizdo lauko plote (pikselių, atitinkančių teigiamą reakciją / bendras pikselių skaičius). Matavimai atlikti kiekvieno mėginio keturiuose vaizduose ir kaip rezultatas pateiktas matavimų vidurkis, išreikštas procentais (%).

3.8. Statistika

Rezultatų statistinė analizė buvo atlikta naudojant SPSS v. 16.0 programą.

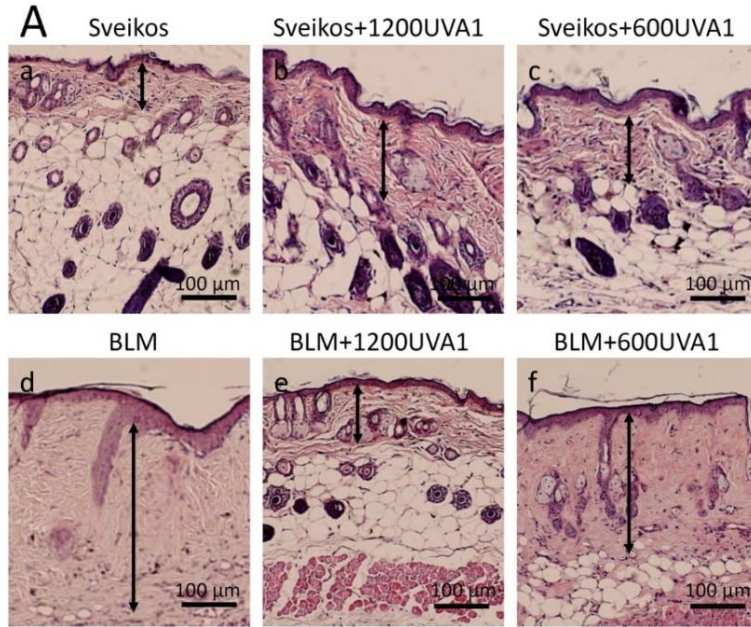
Duomenys išreikšti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis (SD). Tolydiesiems kintamiesiems (odos storis, putliųjų ląstelių infiltracija, kaspazės-3, p53 baltymo, Ki-67 baltymo, MMP-1, MMP-3, I ir III tipų kolageno raiškos) palyginti naudotas Mano ir Vitnio (angl. *Mann-Whitney U*) testas. Duomenys laikyti statistiškai reikšmingais, kai $P \leq 0,05$.

4. REZULTATAI

4.1. Tyrimų rezultatai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje

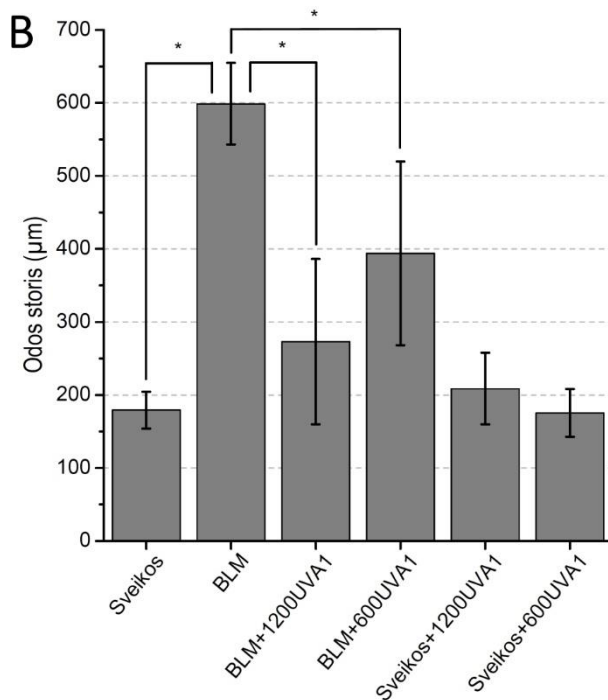
4.1.1. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis odos storiui

Atlikus odos histologinę analizę nustatyta, kad sveikų kontrolinės grupės (I) pelių odos storis – $179,34 \pm 25,30 \mu\text{m}$. Po BLM injekcijų odos storis statistiškai reikšmingai ($P < 0,05$) padidėjo iki $598,95 \pm 55,74 \mu\text{m}$. Taigi, kontrolinėje grupėje (II) skleroderma buvo sėkmingai sukelta. Mikroskopiškai vertinant H&E nudažytus šios grupės mėginius, buvo matomi kompaktiškų kolageno skaidulų susikaupimas dermoje, kraujagyslių sienelės edema, uždegiminių ląstelių infiltracija, odos priedų tankio sumažėjimas bei odos storio padidėjimas (13 A pav.).



13 A pav. Odos storio pokyčiai. Paveiksle pateiktos kiekvienos grupės reprezentatyvios nuotraukos; H&E dažymas; x 20 didinimas; rodyklė – atstumas tarp epidermio-dermos jungties ir dermos-poodžio riebalinio sluoksnio. a) sveikos ir d) pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; b) sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; c) sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; e) BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; f) BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis

Po didelių ir vidutinių UVA1 dozių fototerapijos pelių, kurioms buvo sukelta eksperimentinė skleroderma (III ir IV grupių), odos storis sumažėjo atitinkamai iki $272,94 \pm 113,20 \mu\text{m}$ ir $393,95 \pm 125,87 \mu\text{m}$, palyginti su kontroline BLM (II) grupe ($P < 0,05$). Sveikų gyvūnų, gavusių dideles ir vidutines UVA1 spinduliuotės dozes, odos storis nesiskyrė ($P > 0,05$) nuo I grupės pelių, kurios nebuvo švitintos (atitinkamai V gr. – $208,71 \pm 48,99 \mu\text{m}$; VI gr. – $175,51 \pm 32,83 \mu\text{m}$ ir I gr. – $179,34 \pm 25,30 \mu\text{m}$) (13 B pav.).



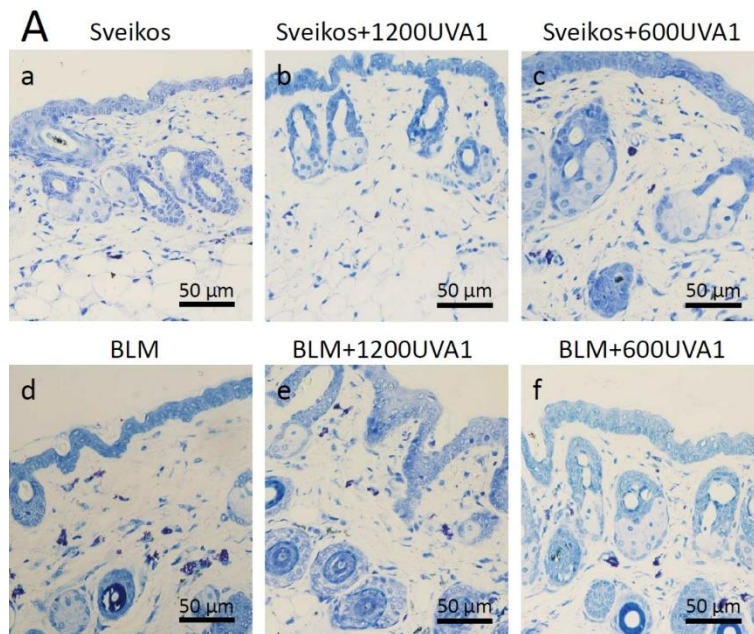
13 B pav. Eksperimento grupių gyvūnų odos storio pokyčiai. Kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip odos storio (μm) vidurkiai \pm standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis. BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sveikos pelės ir pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis. * – skirtumai statistškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

Iš histologinės analizės matyti, kad skleroderminės odos storis sumažėjo 54 % pelių, kurioms buvo skirtas 1 200 J/cm², ir 34 % – kurioms buvo atliktas 600 J/cm² UVA1 dozių fototerapijos kursas, palyginti su negydyta kontroline pelių grupe.

4.1.2. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis putliųjų ląstelių infiltracijai

Toluidino mėlio dažas išryškino putliąsias ląsteles, kurios buvo nusidažiusios violetine / tamsiai purpurine spalva. Putliųjų ląstelių infiltracija atspindi šių ląstelių skaičių mikroskopo vaizdo lauke. Pelių, kurioms BLM sukelta skleroderma, odoje

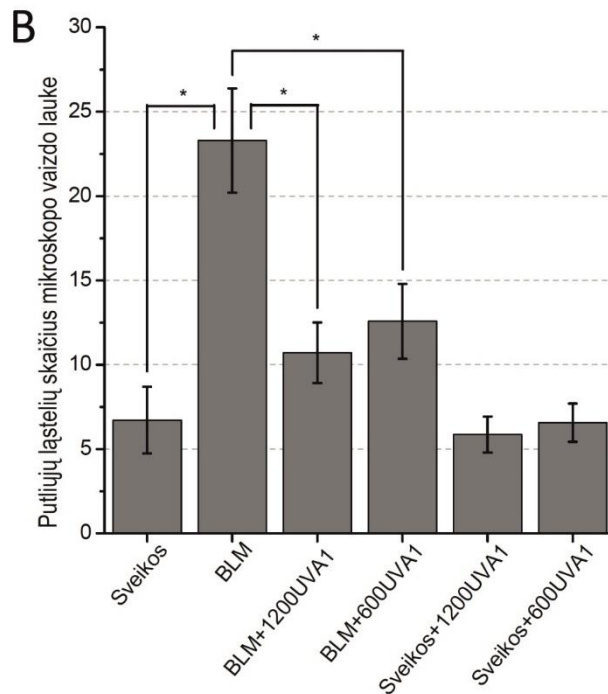
putliųjų ląstelių infiltracija buvo padidėjusi, palyginti su sveikų pelių grupe (atitinkamai $23,29 \pm 3,09$ ir $6,71 \pm 1,98$; $P < 0,05$). Tai rodo, kad BLM injekcijos reišmingai padidino uždegiminių ląstelių skaičius. Putliųjų ląstelių infiltracija ir jų degranuliacija buvo matomos apie kraujagysles ir prakaito liaukų latakus (14 A pav.).



14 A pav. Putliųjų ląstelių infiltracija. Paveiksle pateiktos kiekvienos grupės reprezentatyvios nuotraukos; toluidino mėlio dažymas; x 20 didinimas. a) sveikos ir d) pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; b) sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; c) sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; e) BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; f) BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis

Pelių, kurioms BLM sukelta skleroderma ir kurioms taikyta UVA1 fototerapija didelėmis ir vidutinėmis dozėmis, grupėse (III ir IV) putliųjų ląstelių kiekis sumažėjo iki atitinkamai $10,71 \pm 1,80$ ir $12,57 \pm 2,23$, palyginti su kontroline BLM grupe (II). Putliųjų ląstelių infiltracija tarp sveikų ir sveikų pelių, gavusių UVA1

spinduliuotę didelėmis ir vidutinėmis dozėmis, grupių (atitinkamai I gr. – $6,71 \pm 1,98$; V ir VI gr. – $5,86 \pm 1,07$ ir $6,57 \pm 1,13$.) nesiskyrė (14 B pav.).

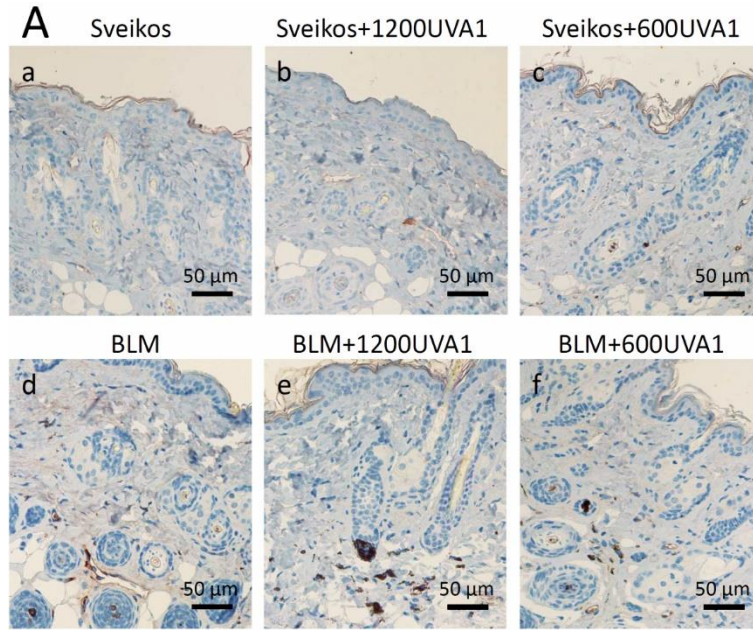


14 Bpav. Putliųjų ląstelių infiltracija. Kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip putliųjų ląstelių skaičiaus vidurkiai \pm standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių ląstelių skaičiaus vidurkis mikroskopo vaizdo lauke (didinimas $\times 200$). BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sveikos pelės ir pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$, UVA1 dozėmis; BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, $600\ \text{J}/\text{cm}^2$, UVA1 dozėmis; sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$, UVA1 dozėmis; sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, $600\ \text{J}/\text{cm}^2$, UVA1 dozėmis. * – skirtumai statistškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

Iš atliktos histologinės analizės matyti, kad siaurajuostė UVA1 didelėmis ir vidutinėmis dozėmis sumažino putliųjų ląstelių infiltraciją skleroderminėje, bet ne sveikoje pelių odoje.

4.1.3. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis apoptozei

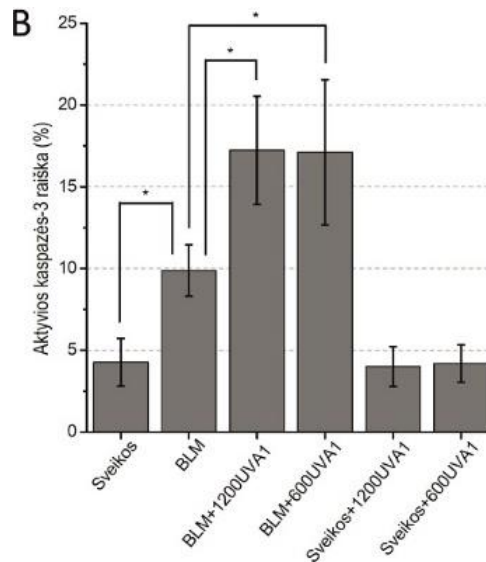
Apoptozės proceso reguliavimo sutrikimas – viena iš sisteminės sklerozės patogenezės grandžių. Apoptozėje dalyvauja fermentai, priklausantys peptidazių šeimai. Kaspazės – tai peptidazės, kurių aktyviajame centre yra aminorūgštis cisteinas ir kurios skelia asparto rūgšties karboksilinės grupės sudaromą peptidinį ryšį (angl. *Caspase-cysteinic aspartate specific peptidase*) [154, 155]. Kaspazė-3 yra pagrindinė ir dominuojanti vykdomoji peptidazė, kuri gali būti aktyvinama tiek išoriniu, tiek vidiniu apoptozės reguliavimo būdu [157, 158]. Siekiant įvertinti siaurajuostės UVA1 poveikį ląstelių žūčiai (apoptozei), buvo atliktas imunohistocheminis dažymas su pirminiais antikūnais prieš aktyvią kaspazę-3. Rudai nusidažiusi citoplazma dermos sluoksniuose vertinta kaip teigiama imunohistocheminė aktyvios kaspazės-3 reakcija (15 A pav.).



15 A pav. Aktyvios kaspazės-3 imunohistocheminė analizė; pateiktos kiekvienos grupės reprezentatyvios nuotraukos; didinimas x 20; BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; a) sveikos pelės ir d) pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; b) sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; c) sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; e) BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; f) BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis

Gauti rezultatai parodė, kad sveikų pelių dermos sluoksnyje aktyvios kaspazės-3 raiška buvo $4,26 \pm 1,45$ %. Sveikų pelių, švitintų didelėmis ar vidutinėmis UVA1 spinduliuotės dozėmis, aktyvios kaspazės-3 ekspresija odoje išliko panaši – atitinkamai $3,99 \pm 1,21$ % ir $4,17 \pm 1,18$ % (V ir VI grupės). BLM sukeltame sisteminės sklerozės modelyje (II grupė) aktyvios kaspazės-3 raiška odoje padidėjo iki $9,87 \pm 1,57$ % ir statistiškai reikšmingai skyrėsi ($P < 0,05$) nuo sveikų gyvūnų (I) grupės. Po UVA1 fototerapijos kurso, sukaupus 1 200 J/cm² ir 600 J/cm² spinduliuotės dozes, pelių su SS dermoje nustatyta gerokai padidėjusi ($P < 0,05$) aktyvios kaspazės-3 raiška (atitinkamai $17,24 \pm 3,30$ % ir $17,10 \pm 4,43$ %), palyginti

su kontroline ($9,87 \pm 1,57$ %) BLM (II) grupe. Imunohistocheminės analizės rezultatai apibendrinti 15 B pav.



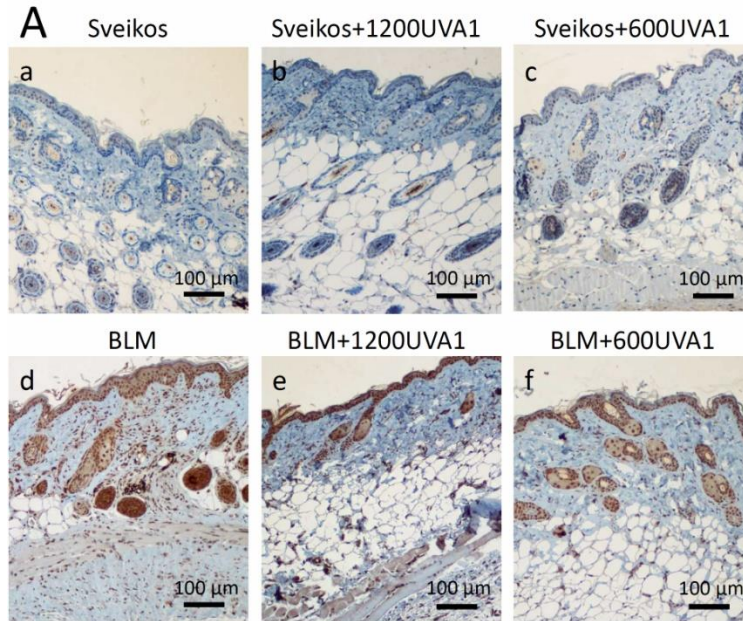
15 B pav. Aktyvios kaspazės-3 raiška eksperimento grupėse; kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip aktyvios kaspazės-3 raiškos (%) vidurkiai \pm standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių aktyvios kaspazės-3 raiškos vidurkis (didinimas $\times 20$). BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sveikos pelės ir pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

Ivertinus atliktos imunohistocheminės analizės duomenis su pirminiais antikūnais prieš aktyvią kaspazę-3 galima teigti, kad didelių ir vidutinių dozių siaurajuostė UVA1 fototerapija padidėjusią aktyvios kaspazės-3 raišką sukėlė skleroderminėje pelių odoje, o sveikoje – ne. Tad siaurajuostė UVA1 spinduliuotė sukėlė apoptozę gyvūnų, kuriems bleomicinu sukelta fibrozė, odoje.

4.1.4. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių ir vidutinių dozių poveikis karcinogenezei

4.1.4.1. p53 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai

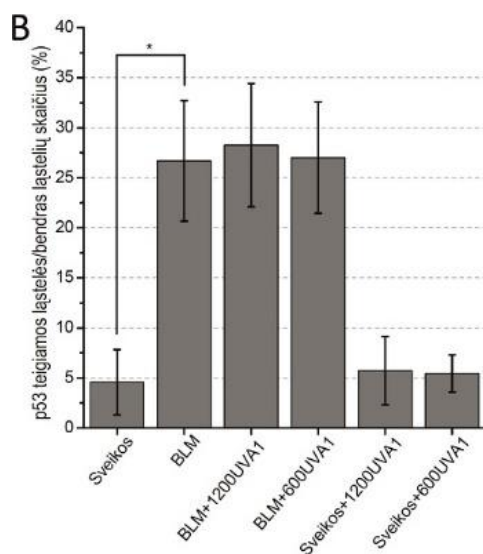
TP53, arba naviko supresoriaus, geno mutacija sukelia p53 baltymo struktūros pasikeitimą ir lemia padidėjusį jo kiekį ląstelės branduolyje [196]. Padidėjusi p53 baltymo raiška yra susijusi su sutrikusiais ląstelės proliferacijos ir apoptozės reguliavimo mechanizmais bei padidėjusia vėžinio proceso rizika [196]. Siekiant įvertinti karcinogenezės riziką, darbe atlikta imunohistocheminė analizė naudojant pirminį antikūną prieš p53 baltymą. Rudai nusidažęs ląstelės branduolys buvo vertinamas kaip teigiama imunohistocheminė reakcija. Procentinis p53 baltymą turinčių ląstelių kiekis buvo apskaičiuotas naudojantis atviro kodo programa, kaip aprašyta metodų skylyje (16 A pav.).



16 A pav. p53 baltymo imunohistocheminė analizė; pateiktos kiekvienos grupės reprezentatyvios nuotraukos; rudai nusidažęs ląstelės branduolys vertintas kaip teigiama imunohistocheminė reakcija; didinimas x 10; BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; a) sveikos pelės ir d) pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; b) sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; c) sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; e) BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; f) BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis

Pelių, kurioms BLM buvo sukelta skleroderma, grupėje (II gr.) nustatyta smarkiai padidėjusi p53 baltymo ekspresija, palyginti su kontroline (I gr.) sveikų pelių grupe (atitinkamai $26,69 \pm 6,03$ % ir $4,57 \pm 3,26$ %; $P < 0,05$). Pelių, kurioms sukelta skleroderma, grupėse po siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelėmis ir vidutinėmis dozėmis p53 teigiamų ląstelių kiekis odoje buvo atitinkamai $28,25 \pm 6,16$ % ir $27,02 \pm 5,57$ %. Taigi, sukauptus 1 200 J/cm² ir 600 J/cm² UVA1 spinduliuotės dozes, šio baltymo raiška (III ir IV gr.) buvo panaši kaip ir negydytų pelių, kurioms buvo sukelta skleroderma, grupėje (II gr.). Sveikų pelių, gavusių dideles ir vidutines UVA1 spinduliuotės dozes (V ir VI gr.), p53 raiška odoje buvo atitinkamai $5,73 \pm$

3,40 % ir $5,43 \pm 1,86$ %, o tai reikšmingai nesiskyrė nuo sveikų gyvūnų kontrolinės grupės (I gr.; $4,57 \pm 3,26$ %). Taigi, 365 \pm 5 nm UVA1 fototerapija didelėmis ir vidutinėmis spinduliuotės dozėmis nesukelia padidėjusios p53 raiškos nei sveikoje, nei skleroderminėje odoje. Imunohistocheminės analizės rezultatai apibendrinti paveiksle 16 B pav.

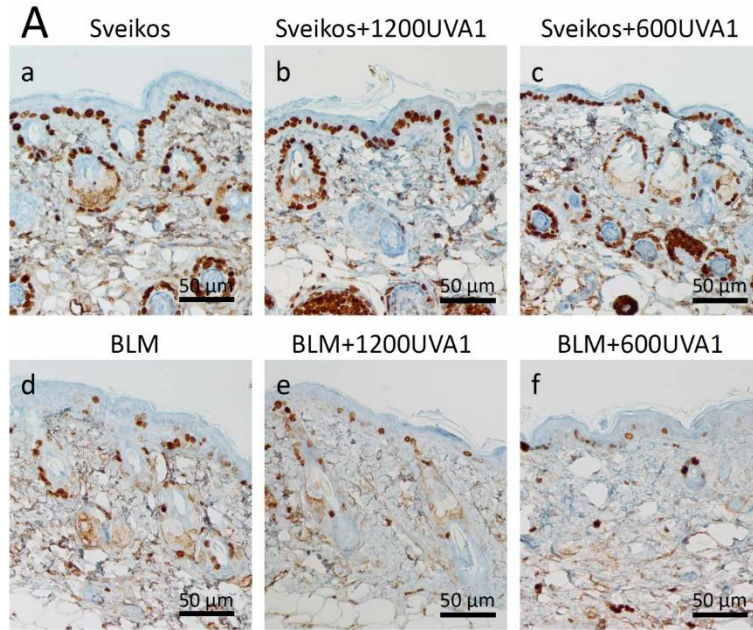


16 B pav. p53 baltymo raiška eksperimento grupėse; apskaičiuotas santykis tarp teigiamai nusidažiusių ląstelių branduolių ir visų esančių ląstelių branduolių. Matavimai atlikti kiekvieno mėginio keturiuose vaizduose ir rezultatas pateiktas kaip matavimų vidurkis, išreikštas procentais (%) \pm standartinis nuokrypis (I). BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sveikos pelės ir pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

Iš atliktos imunohistocheminės analizės matyti, kad didelių ir vidutinių dozių siaurajuostė UVA1 nesukelia reikšmingai padidėjusios p53 raiškos nei sveikoje, nei pelių, kurioms bleomicinu sukelta skleroderma, odoje, palyginti su nešvitintomis gyvūnų grupėmis. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos karcinogenezės rizika yra minimali.

4.1.4.2. Ki-67 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai

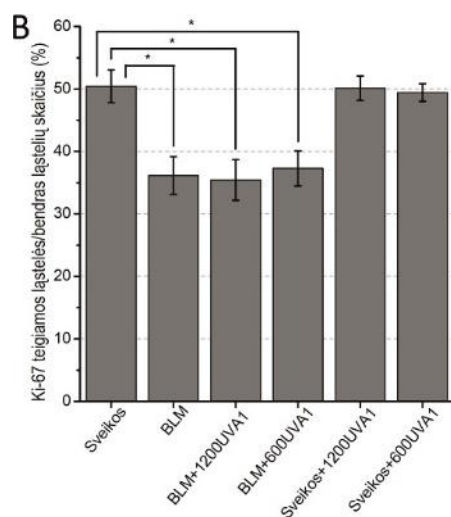
Ki-67 antigenas – tai didelės molekulinės masės baltymas ir ląstelių proliferacijos žymuo. Padidėjusi Ki-67 raiška yra susijusi su pakitusia ląstelių diferenciacija ir ryškia proliferacija, o tai lemia vėžinio proceso atsiradimą [197, 198]. Siekdami įvertinti UVA1 spinduliuotės karcinogenezės riziką, atlikome ir Ki-67 imunohistocheminę analizę. Keratinocitų branduoliai, nusidažę ruda spalva, vertinti kaip teigiama Ki-67 imunohistocheminė reakcija. Procentinis Ki-67 baltymą turinčių branduolių kiekis įvertintas naudojantis atviro kodo programa (17 A pav.).



17 A pav. Ki-67 baltymo imunohistocheminė analizė; pateiktos kiekvienos grupės reprezentatyvios nuotraukos; rudai nusidažęs branduolys epidermio sluoksnyje vertintas kaip teigiama imunohistocheminė reakcija; didinimas x 20; BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; a) sveikos pelės ir d) pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; b) sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; c) sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; e) BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; f) BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis

Nustatyta, kad sveikų pelių (I gr.) epidermio sluoksnyje $50,43 \pm 2,64$ % keratinocitų branduolių turėjo Ki-67 baltymo raišką. Po BLM injekcijų (II gr.) Ki-67 raiška viršutiniame odos sluoksnyje sumažėjo iki $36,14 \pm 3,02$ % ($P < 0,05$). Tai rodo, kad BLM sumažino keratinocitų proliferaciją. Pelių, kurioms buvo sukelta skleroderma, gydytų didelėmis ir vidutinėmis UVA1 spinduliuotės dozėmis, grupėse (III ir IV gr.) Ki-67 baltymo raiška išliko panaši (atitinkamai $35,43 \pm 3,26$ % ir $37,29 \pm 2,81$ %), palyginti su kontroline eksperimentinės sklerodermos grupe (II gr.; $36,14 \pm 3,02$ %). Sveikų pelių, gydytų suminėmis 1 200 J/cm² ir 600 J/cm² spinduliuotės dozėmis

(V ir VI gr.), baltymo Ki-67 raiška epidermyje (atitinkamai $50,14 \pm 1,95 \%$ ir $49,43 \pm 1,40 \%$) nesiskyrė nuo sveikų gyvūnų grupės (I gr. – $50,43 \pm 2,64\%$). Taigi, UVA1 fototerapija didelėmis ir vidutinėmis dozėmis nesukelia padidėjusios Ki-67 baltymo raiškos nei sveikoje, nei skleroderminėje odoje. Imunohistocheminės analizės rezultatai apibendrinti 17 B pav.



17 B pav. Ki-67 baltymo raiška eksperimento grupėse; apskaičiuotas santykis tarp teigiamai nusidažiusių ląstelių branduolių ir visų esančių ląstelių branduolių (didinimas x 20). Matavimai atlikti kiekvieno mėginio keturiuose vaizduose ir rezultatas pateiktas matavimų vidurkiu, išreikštu procentais (%) ± standartinis nuokrypis (I). BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sveikos pelės ir pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė – kontrolinės grupės; BLM+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; BLM+600UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+1200UVA1 – sveikos pelės, gydytos didelėmis, 1 200 J/cm², UVA1 dozėmis; sveikos+600UVA1 – sveikos pelės, gydytos vidutinėmis, 600 J/cm², UVA1 dozėmis. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai P ≤ 0,05

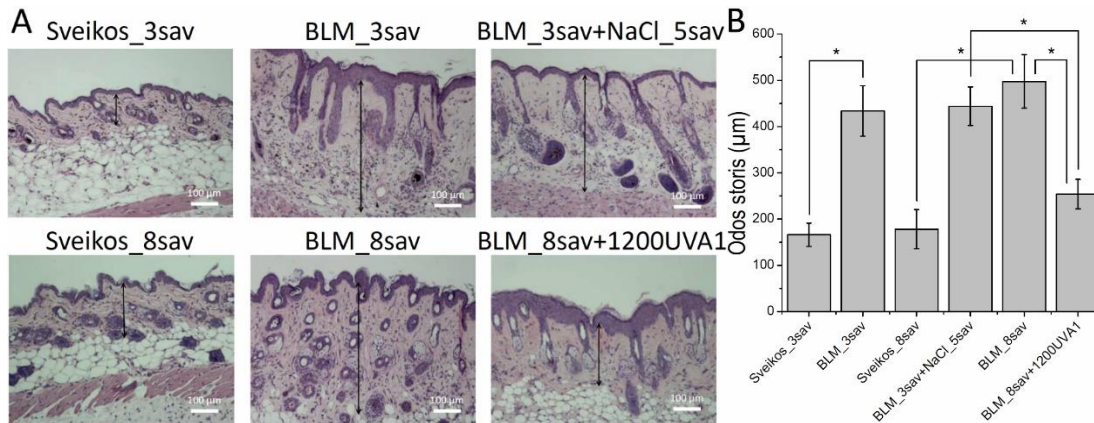
Iš atliktos imunohistocheminės analizės matyti, kad didelių ir vidutinių dozių siaurajuostė UVA1 nesukelia reikšmingai padidėjusios Ki-67 raiškos nei sveikoje, nei pelių, kurioms bleomicinu sukelta skleroderma, odoje, palyginti su nešvitintomis gyvūnų grupėmis. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos karcinogenezės rizika yra minimali.

4.2. Tyrimų rezultatai bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį

4.2.1. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių dozių poveikis odos storiui

Siekiant įvertinti UVA1 spinduliuotės poveikį susiformavusiai fibrozei, pelėms, kurioms BLM sukelta skleroderma, fototerapija pradėta toliau tęsiant BLM injekcijas (VI gr.). Pirmiausia buvo palygintas odos storis tarp kontrolinių sveikų pelių grupių (I ir III gr.) ir pelių, kurioms BLM injekcijomis sukelta skleroderma, grupių (II ir V gr.). Praėjus 3 ir 8 savaitėms po BLM injekcijų, odos storis statistiškai reikšmingai padidėjo iki $433,69 \pm 54,37 \mu\text{m}$ (II gr.) ir $497,43 \pm 57,83 \mu\text{m}$ (V gr.), palyginti su odos storiu pelių, kurioms 3 ir 8 savaites skirtas NaCl tirpalas (kontrolinės grupės: I gr. – $166,04 \pm 25,29 \mu\text{m}$; III gr. – $178,18 \pm 42,35 \mu\text{m}$; $P = 0,002$). Praėjus trimis savaitėmis po BLM ir 5 savaitėmis po NaCl tirpalo injekcijų, IV grupės pelėms nenustatyta spontaninės fibrozės regresija, nes jų odos storis nesiskyrė nuo II grupės pelių odos storio (atitinkamai $443,87 \pm 41,77 \mu\text{m}$ ir $433,69 \pm 54,38 \mu\text{m}$). Pelių, kurioms 8 savaites buvo skirtos BLM injekcijos, o paskutines 5 eksperimento savaites gydymas sumine $1\ 200 \text{ J/cm}^2$ UVA1 spinduliuotės doze (VI gr.), odos storis statistiškai reikšmingai sumažėjo, palyginti su V grupės pelėmis, kurioms 8 savaites buvo skirtos tik BLM injekcijos (atitinkamai $253,96 \pm 31,83 \mu\text{m}$ ir $497,43 \pm 57,83 \mu\text{m}$, $P = 0,002$). Be to, UVA1 fototerapija didelėmis dozėmis ryškiau sumažino odos storį, nei aptikti jos fibroziniai pokyčiai, buvę po trijų savaičių bleomicino skyrimo iki gydymo pradžios (atitinkamai VI gr. – $253,96$

$\pm 31,83 \mu\text{m}$ ir II gr. – $433,69 \pm 54,38 \mu\text{m}$, IV gr – $443,87 \pm 41,77 \mu\text{m}$; $P = 0,002$). Taigi suminė $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$ UVA1 spinduliuotės dozė ne tik sustabdo fibrozės progresavimą, bet ir sukelia jau buvusių fibrozinių pokyčių regresiją. Rezultatai apibendrinti 18 pav.



18 pav. A dalis: eksperimento grupių gyvūnų odos storio pokyčiai. Paveiksle pateiktos kiekvienos grupės reprezentatyvios nuotraukos; H&E dažymas; x 20 didinimas; rodyklė – atstumas tarp epidermio-dermos jungties ir dermos-poodžio riebalinio sluoksnio. B dalis: kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip odos storio (μm) vidurkiai \pm standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių odos storio vidurkis. BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sav – savaitė; NaCl – natrio chlorido tirpalas; sveikos_3sav ir sveikos_8 sav – trijų ir aštuonių savaičių sveikų pelių kontrolinės grupės; BLM_3sav ir BLM_8 sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms bleomicinas buvo skirtas 3 arba 8 savaites – kontrolinės grupės; BLM_3sav+NaCl_5sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms BLM buvo leidžiamas 3 savaites, paskui kitas penkias savaites – natrio chlorido tirpalas; BLM_8sav+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurios paskutines penkias eksperimento savaites buvo gydytos didelėmis siaurajuostės UVA1 dozėmis kartu veikiant BLM visas aštuonias savaites. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

Iš atliktos histologinės analizės matyti, kad pelių, kurios buvo gydytos didelių dozių UVA1 fototerapija paskutines penkias eksperimento savaites ir kartu veiktos bleomicinu visas aštuonias savaites, odos storis sumažėjo 49 % ir 43 %, palyginti su odos storio pelių, veiktų tik bleomicinu atitinkamai aštuonias ir tris savaites.

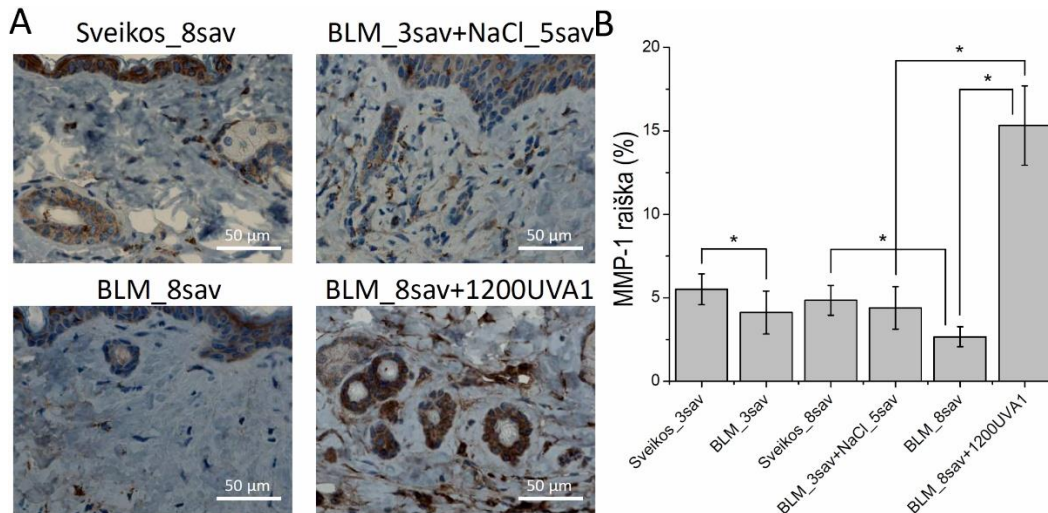
Suminė 1 200 J/cm² UVA1 spinduliuotės dozė ne tik sustabdo fibrozės progresavimą, bet ir sukelia jau buvusių fibrozinių pokyčių regresiją.

Siekiant įvertinti 365 ± 5 nm UVA1 spinduliuotės poveikį kolageno metabolizmui jau susiformavusios fibrozės modelyje, atlikta imunohistocheminė analizė su pirminiais antikūnais prieš I ir III tipo kolagenus bei juos skaidančius fermentus MMP-1 ir MMP-3.

4.2.2. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių dozių poveikis MMP-1 ir MMP-3 raiškoms

4.2.2.1. MMP-1 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai

Praėjus 3 ir 8 savaitėms po BLM injekcijų, skleroderminėje pelių odoje nustatyta sumažėjusi MMP-1 raiška (II gr. – 4,11 ± 1,28 %; V gr. – 2,66 ± 0,59 %), palyginti su sveikų pelių grupėmis (I gr. – 5,50 ± 0,91 %; III gr. – 4,84 ± 0,88 %; P < 0,05 ir P = 0,002, atitinkamai). MMP-1 fermento raiška po gydymo didelėmis 365 ± 5 nm UVA1 spinduliuotės dozėmis kartu skiriant BLM injekcijas 8 savaites, buvo reikšmingai didesnė (VI gr. – 15,31 ± 2,37 %), palyginti su pelių, gavusių BLM injekcijas tik 3 savaites arba visas 8 savaites, grupėmis (atitinkamai IV gr. – 4,40 ± 1,26 %; V gr. – 2,66 ± 0,59 %; P = 0,002). Imunohistocheminės analizės vaizdai ir rezultatai apibendrinti 19 pav.

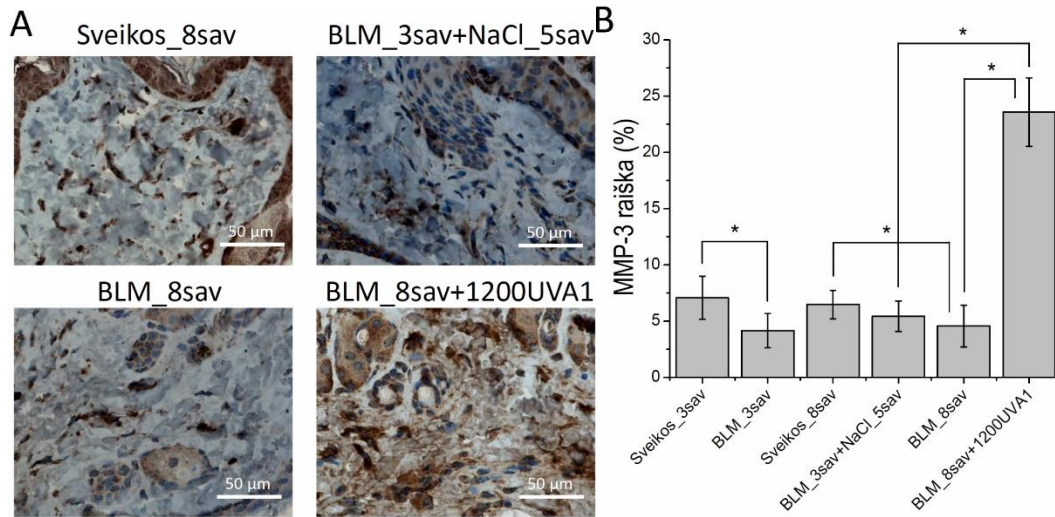


19 pav. A dalis: MMP-1 imunohistocheminė analizė; paveiksle pateiktos gydomosios ir kontrolinių pelių grupių reprezentatyvios nuotraukos; rudai nusidažiusi citoplazma vertinama kaip teigiama imunohistocheminė reakcija; didinimas x 40; B dalis: kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip MMP-1 raiškos (%) vidurkis \pm standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių MMP-1 raiškos vidurkis. BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sav – savaitė; NaCl – natrio chlorido tirpalas; sveikos_3sav ir sveikos_8 sav – trijų ir aštuonių savaičių sveikų pelių kontrolinės grupės; BLM_3sav ir BLM_8 sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms bleomicinas buvo skirtas 3 arba 8 savaites – kontrolinės grupės; BLM_3sav+NaCl_5sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė, ir kurioms BLM buvo leidžiamas 3 savaites, paskui kitas penkias savaites – natrio chlorido tirpalas; BLM_8sav+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurios paskutines penkias eksperimento savaites buvo gydytos didelėmis siaurajuostės UVA1 dozėmis kartu veikiant BLM visas aštuonias savaites. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

4.2.2.2. MMP-3 imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai

Pelių, kurioms BLM sukelta skleroderma, odoje nustatyta sumažėjusi MMP-3 raiška (II gr. – $4,15 \pm 1,52$ %; V gr. – $4,55 \pm 1,85$ %) praėjus 3 ir 8 savaitėms po BLM injekcijų, palyginti su sveikų pelių grupėmis (I gr. – $7,08 \pm 1,92$ %; III gr. – $6,47 \pm 1,27$ %; abiem atvejais $P < 0,05$). Statistiškai reikšmingai didesnė MMP-3 fermento raiška ($23,58 \pm 3,04$ %) buvo nustatyta po gydymo sumine 1200 J/cm^2 UVA1 spinduliuotės doze nepaisant pailginto BLM skyrimo (VI gr.), palyginti su

pelių, gavusių BLM injekcijas tik 3 savaites arba visas 8 savaites, grupėmis (IV gr. – $5,42 \pm 1,34$ %; V gr. – $4,55 \pm 1,85$ %; $P = 0,002$). Imunohistocheminės analizės vaizdai ir rezultatai apibendrinti 20 pav.



20 pav. A dalis: MMP-3 imunohistocheminė analizė; paveiksle pateiktos gydomosios ir kontrolinių pelių grupių reprezentatyvios nuotraukos; rudai nusidažiusi citoplazma vertinama kaip teigiama imunohistocheminė reakcija; didinimas $\times 40$; B dalis: kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip MMP-3 raiškos (%) vidurkiai \pm standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių MMP-3 raiškos vidurkis. BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sav – savaitė; NaCl – natrio chlorido tirpalas; sveikos_3sav ir sveikos_8 sav – trijų ir aštuonių savaičių sveikų pelių kontrolinės grupės; BLM_3sav ir BLM_8 sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms bleomicinas buvo skirtas 3 arba 8 savaites – kontrolinės grupės; BLM_3sav+NaCl_5sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms BLM buvo leidžiamas 3 savaites, paskui kitas penkias savaites – natrio chlorido tirpalas; BLM_8sav+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurios paskutines penkias eksperimento savaites buvo gydytos didelėmis siaurajuostės UVA1 dozėmis kartu veikiant BLM visas aštuonias savaites. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

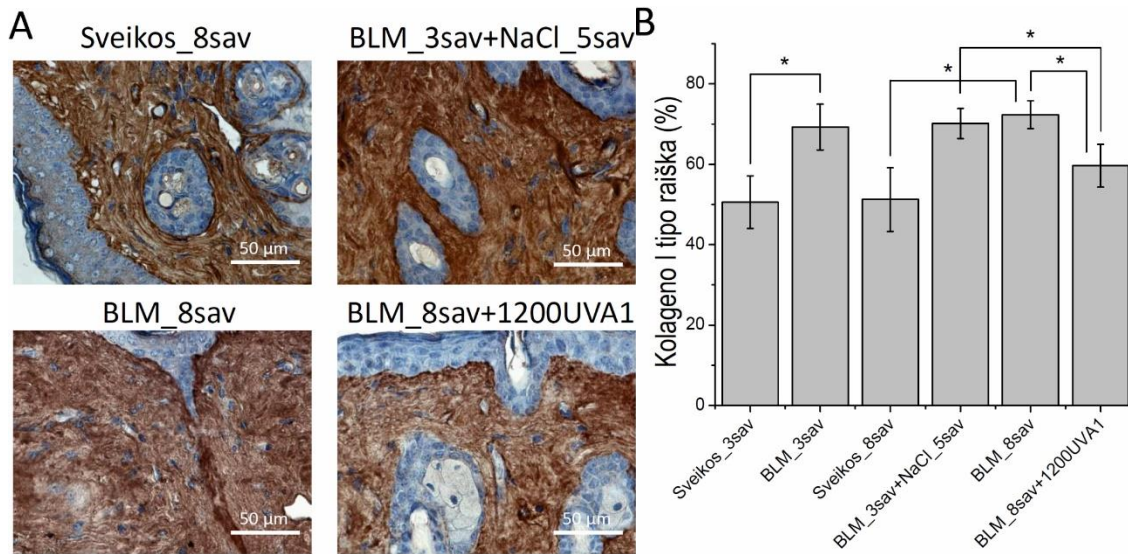
Ivertinus imunohistocheminės analizės su pirminiais antikūnais prieš MMP-1 ir MMP-3 duomenis matyti, kad pelių, gydytų didelėmis UVA1 fototerapijos dozėmis (suminė $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$) paskutines penkias eksperimento savaites ir kartu tęsiant bleomicino injekcijas viso eksperimento metu, MMP-1 kiekis odoje padidėjo 5,8

karto, o MMP-3 kiekis – 5,2 karto, palyginti su pelėmis, veiktomis tik bleomicinu visas aštuonias savaites.

4.2.3. Siaurajuostės UVA1 fototerapijos didelių dozių poveikis kolageno I ir III tipų raiškoms

4.2.3.1. I tipo kolageno imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai

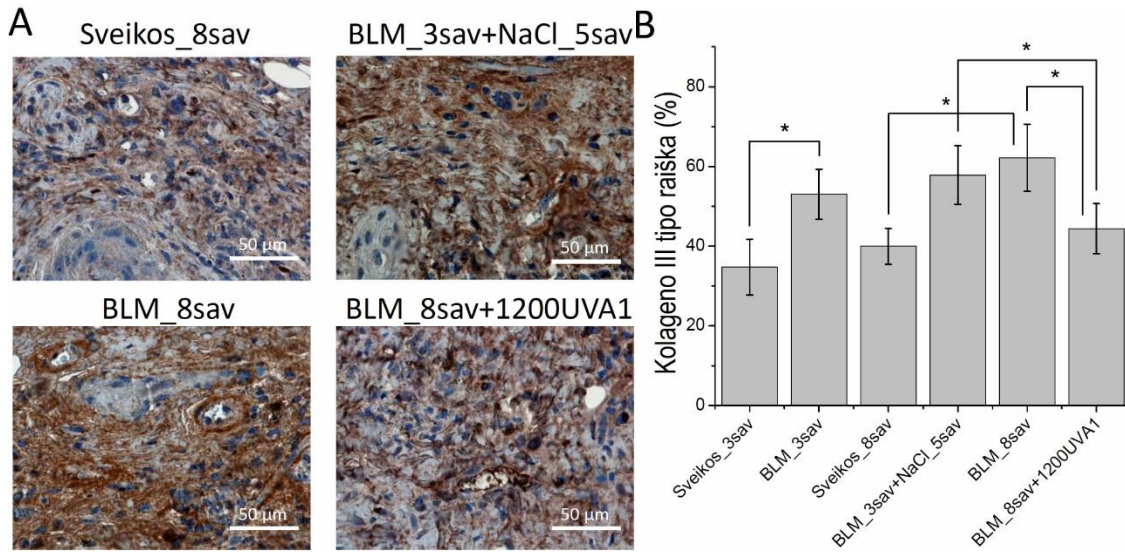
Pelėms, kurioms BLM sukelta skleroderma, odoje nustatytas statistiškai reikšmingai padidėjęs ($P < 0,05$) I tipo kolageno kiekis (II gr. – $69,26 \pm 5,68\%$, V gr. – $72,33 \pm 3,48\%$), palyginti su sveikų pelių grupėmis (I gr. – $50,57 \pm 6,51\%$; III gr. – $51,24 \pm 7,91\%$). VI grupės pelių odoje, nepaisant pailgintos BLM skyrimo trukmės, po gydymo didelėmis UVA1 dozėmis aptiktas statistiškai reikšmingai mažesnis I tipo kolageno kiekis ($59,65 \pm 5,33\%$), palyginti su kontrolinėmis negydytų pelių grupėmis, kurioms BLM buvo skirtas 3 arba visas 8 savaites (atitinkamai IV gr. – $70,12 \pm 3,74\%$ ir V gr. – $72,33 \pm 3,48\%$; $P = 0,002$). Imunohistocheminės analizės vaizdai ir rezultatai apibendrinti 21 pav.



21 pav. A dalis: kolageno I tipo imunohistocheminė analizė; paveiksle pateiktos gydomosios ir kontrolinių pelių grupių reprezentatyvios nuotraukos; rudai nusidažiusi citoplazma vertinama kaip teigiama imunohistocheminė reakcija; didinimas x 40; B dalis: kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip kolageno I tipo raiškos (%) vidurkiai ± standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių kolageno I tipo raiškos vidurkis; BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sav – savaitė; NaCl – natrio chlorido tirpalas; sveikos_3sav ir sveikos_8 sav – trijų ir aštuonių savaičių sveikų pelių kontrolinės grupės; BLM_3sav ir BLM_8 sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms bleomicinas buvo skirtas 3 arba 8 savaites – kontrolinės grupės; BLM_3sav+NaCl_5sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms BLM buvo leidžiamas 3 savaites, paskui kitas penkias savaites – natrio chlorido tirpalas; BLM_8sav+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurios paskutines penkias eksperimento savaites buvo gydytos didelėmis siaurajuostės UVA1 dozėmis kartu veikiant BLM visas aštuonias savaites. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

4.2.3.2. III tipo kolageno imunohistocheminės raiškos analizės rezultatai

Atlikus III tipo kolageno imunohistocheminį dažymą, gauti rezultatai buvo panašūs kaip ir I tipo kolageno. Praėjus 3 ir 8 savaitėms po BLM injekcijų, skleroderminėje pelių odoje nustatytas padidėjęs III tipo kolageno kiekis (II gr. – $53,03 \pm 6,28$ % ir V gr. – $62,15 \pm 8,37$ %), palyginti su kontrolinėmis sveikų pelių grupėmis (I gr. – $34,71$ % $\pm 6,98$ %; III gr. – $39,95 \pm 4,47$ %; $P = 0,003$ ir $P = 0,002$). VI grupės pelių, kurioms buvo skirta suminė $1\ 200\ \text{J/cm}^2$ UVA1 spinduliuotės dozė tęsiant BLM injekcijas viso eksperimento metu, odoje nustatytas reikšmingai sumažėjęs III tipo kolageno kiekis (VI gr. – $44,41 \pm 6,27$ %), palyginti su pelių, kurioms netaikyta fototerapija, grupėmis (IV gr. $57,85 \pm 7,37$ %; ir V gr. – $62,15 \pm 8,37$ %; $P < 0,05$). Imunohistocheminės analizės vaizdai ir rezultatai apibendrinti 22 pav.



22 pav. A dalis: kolageno III tipo imunohistocheminė analizė; paveiksle pateiktos gydomosios ir kontrolinių pelių grupių reprezentatyvios nuotraukos; rudai nusidažiusi citoplazma vertinama kaip teigiama imunohistocheminė reakcija; didinimas x 40; B dalis: kiekvienos gyvūnų grupės duomenys pateikiami kaip kolageno III tipo raiškos (%) vidurkiaai ± standartinis nuokrypis (I). Vertinti kiekvieno mėginio 4 pjūviai, skaičiuotas mėginio visų pjūvių kolageno III tipo raiškos vidurkis. BLM – bleomicinas; UVA1 – ultravioletinė A1 spinduliuotė; sav – savaitė; NaCl – natrio chlorido tirpalas; sveikos_3sav ir sveikos_8 sav – trijų ir aštuonių savaičių sveikų pelių kontrolinės grupės; BLM_3sav ir BLM_8 sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms bleomicinas buvo skirtas 3 arba 8 savaites – kontrolinės grupės; BLM_3sav+NaCl_5sav – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurioms BLM buvo leidžiamas 3 savaites, paskui kitas penkias savaites – natrio chlorido tirpalas; BLM_8sav+1200UVA1 – pelės, kurioms BLM sukelta sisteminė sklerozė ir kurios paskutines penkias eksperimento savaites buvo gydytos didelėmis siaurajuostės UVA1 dozėmis kartu veikiant BLM visas aštuonias savaites. * – skirtumai statistiškai reikšmingi, kai $P \leq 0,05$

Ivertinus imunohistocheminės analizės su pirminiais antikūnais prieš I ir III tipų kolageną duomenis matyti, kad pelių, gydytų didelėmis UVA1 fototerapijos dozėmis (suminė $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$) paskutines penkias eksperimento savaites ir kartu tęsiant prailgintas bleomicino injekcijas, kolageno I tipo kiekis odoje sumažėjo 1,2, o kolageno III tipo kiekis – 1,4 karto, palyginti su pelėmis, veiktomis tik bleomicinu visas aštuonias savaites.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Tyrimų, atliktų bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės modelyje, rezultatų aptarimas

Atliktų tyrimų tikslas buvo įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės vidutinių ir didelių dozių poveikį odos fibrozei ir karcinogenezei bleomicinu sukeltame pelių sklerodermos modelyje. Odos storis, putliųjų ląstelių infiltracija, aktyvios kaspazės-3, p53 ir Ki-67 baltymų raiška buvo įvertinta atlikus histologinius ir imunohistocheminius tyrimus.

Aktyvūs SS fibroblastai, gaminantys daug kolageno, ypač I ir III tipų, fibronektino, dekorino ir kitų baltymų, lemia sutrikusią pusiausvyrą tarp tarpląstelinio užpildo komponentų produkcijos ir skaidymo [199]. Padidėjęs tarpląstelinio užpildo komponentų kaupimasis ir sumažėjęs fermentų, skaidančių kolageną, aktyvumas skatina fibrozės išsivystymą [82, 86]. Histopatologiškai odos fibrozė apibūdinama odos sustorėjimu, standžių kolageno skaidulų bei homogeninės medžiagos atsidėjimu sustorėjusioje odoje ir uždegiminių ląstelių infiltratų sankaupomis.

Mūsų atliktame tyrime pelių, kurios gavo sumines 1 200 J/cm² ir 600 J/cm² UVA1 fototerapijos dozes, odos storis sumažėjo atitinkamai 54 % ir 34 %, palyginti su kontrolinėmis nešvitintomis pelėmis. Ju su bendraautoriais [200] atliko tyrimą su BALB/c linijos pelėmis, siekdami įvertinti plačiajuostės UVA1 (340–400 nm) spinduliuotės mažų, vidutinių ir didelių dozių poveikį odos storiui naudojant bleomicinu sukeltą gyvūnų sklerodermos modelį. Suminės 600 J/cm², 1 800 J/cm² ir 3 000 J/cm² UVA1 spinduliuotės dozės odos storį sumažino atitinkamai 4 %, 13 % ir 36 %, palyginti su nešvitintų gyvūnų odos storiu. Taigi, mūsų atliktame tyrime siaurajuostė 365 ± 5 nm UVA1 net 5 kartus veiksmingiau sumažina skleroderminės odos storį, palyginti su plataus spektro UVA1 spinduliuote.

Uždegiminių ląstelių apoptozės sukėlimas yra viena iš pagrindinių UVA1 fototerapijos veikimo mechanizmo grandžių [132]. SS būdinguose uždegiminiuose

infiltratuose nustatomas padidėjęs T ir B ląstelių, makrofagų ir putliųjų ląstelių kiekis [201, 202]. Šiame darbe, kaip ir kitose studijose, nustatytas reikšmingai padidėjęs putliųjų ląstelių kiekis pelių, kurioms buvo sukelta skleroderma, odoje [72]. Tačiau šių ląstelių vaidmuo SS patogenezėje nėra aiškus. Putliosios ląstelės dalyvauja imuninės sistemos reguliavimo procese, kuris sergant SS yra sutrikęs [203]. Šios ląstelės išskiria biologiškai aktyvias medžiagas, uždegimą skatinančius citokinus ir chemokinus bei augimo faktorius [204]. Vazoaktyvūs mediatoriai, tokie kaip histaminas ir serotoninas, didina kraujagyslių pralaidumą ir taip sukelia intersticinę audinių edemą, kuri yra nustatoma ankstyvojoje SS stadijoje [204]. Be to, serotoninas tiesiogiai dalyvauja ir fibrozės procese [57]. Putliųjų ląstelių granulose yra daug polisacharadidų, iš kurių svarbiausias yra heparinas. Heparinas stimuliuoja profibrozinius faktorius – fibroblastų augimo faktorių ir transformuojantį augimo faktorių beta (TGF- β), kurie dalyvauja fibrogenezės procese [205]. Be to, TGF- β pritraukia putliąsias ląsteles ir susidaro ydingas ratas, palaikantis tiek uždegiminius, tiek fibrozinus pokyčius [206]. Šiame tyrime siaurajuostė UVA1 spinduliuotė reikšmingai sumažino putliųjų ląstelių kiekį ir jų degranuliaciją pelių, kurioms buvo sukelta skleroderma, odoje. Tai įrodo, kad UVA1 fototerapija tiesiogiai veikia vieną iš galimų patogenetinių SS grandžių. Skirtingai nei skleroderminėje, sveikų pelių odoje putliųjų ląstelių kiekis po UVA1 fototerapijos nesumažėjo. Šis fenomenas gali būti susijęs su sveikų ląstelių atsparumu UVA1 sukeliamai apoptozei. Mikita su bendraautoriais [207] atliktuose *in vivo* tyrimuose įvertino UVA1 spinduliuotės poveikį MRL/lpr linijos pelėms, kurioms būdingas spontaniškas sisteminei raudonajai vilkligei būdingų pokyčių išsivystymas. Buvo įrodyta, kad UVA1 sukelia tik patogenetinių, bet ne sveikų putliųjų ląstelių apoptozę [207]. Be to, šį fenomeną patvirtina ir *in vitro* atliktas tyrimas, kurio metu buvo nustatyta, kad UV spinduliuotė sukelia proliferuojančių putliųjų ląstelių apoptozę, tačiau neturi įtakos normalioms putliosios ląstelėms [208].

Fibrozės ir patogenetinių uždegiminių ląstelių infiltracijos mažinimas gali būti susijęs su UVA1 sąlygota apoptoze. Siekiant įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės apoptozinį veikimo mechanizmą, buvo atlikta aktyvios kaspazės-3 raiškos imunohistocheminė analizė. Šiame moksliniame darbe nustatyta padidėjusi aktyvios kaspazės-3 raiška dermoje po BLM injekcijų, o tai rodo patogenezinį ir uždegiminį BLM veikimo mechanizmą sukeliant fibrozinį procesą. Yamamoto su bendraautoriais [157] tyrė apoptozės procesus BLM sukeltame sklerodermos modelyje C3H/HeJ linijos pelėms. Apoptozinių ląstelių kiekis vertintas galinės deoksinukleotidiltransferazės deoksiuridintrifosfato liekanos žymėjimo ir DNR elektroforezės gelyje metodais. Po BLM injekcijų nustatytas padidėjęs kaspazės-3 aktyvumas ir mRNR raiška. Apoptozinės ląstelės ir padidėjęs Fas / Fas ligando kiekis nustatytas keratinocituose ir mononuklearuose, bet ne fibroblastuose ir endotelio ląstelėse. Skiriant neutralizuojantį antikūną prieš Fas ligandą kartu su BLM injekcijomis, nustatytas sumažėjęs odos fibrozės išsivystymo laipsnis kartu su silpnesniu kaspazės-3 aktyvumu ir nedideliu apoptozės laipsniu. Tad Fas / Fas ligando apoptozės kelias yra svarbus sisteminės sklerozės patogenezėje [157]. Įrodyta, kad sklerodermos fibroblastai yra atsparūs nuo Fas ligando priklausomai apoptozei [209-211]. Kitų autorių tyrimais nustatyta, kad sklerodermos fibroblastams būdinga padidėjusi Bcl-2 ir sumažėjusi Bax baltymų raiška, o tai lemia sumažėjusį apoptozinį aktyvumą [209, 212]. Manoma, kad transformuojantis augimo faktorius beta gali būti pagrindinis veiksnys, sukeliantis sisteminei sklerozei būdingas fibroblastų populiacijas, atsparias ląstelių žūčiai [213].

Kadangi fibroblastų atsparumas apoptozei priklauso ne tik nuo Fas / Fas ligando grandies, bet ir nuo vidiniame apoptozės kelyje dalyvaujančių Bax ir Bcl baltymų, efektyvi fototerapija turėtų veikti abu ląstelių žūties kelius [132]. Plačiajuostės UVA1 veikimo mechanizmas sukeliant apoptozę buvo tirtas polimorfonuklearų kultūroje (iš sveiko žmogaus kraujo mėginio) [214]. Siekiant įvertinti apoptozės vidinio kelio aktyvaciją, buvo tirti antikūnai prieš citochromą c ir aktyvią kaspazę-

9, o išorinio kelio aktyvaciją – antikūnai prieš aktyvią kaspazę-8 ir Bid baltymą. Apoptuojančių ląstelių kiekis įvertintas tėkmės citometrijos būdu. Skyrus 30 J/cm², 50 J/cm² ir 80 J/cm² UVA1 (340–440 nm) spinduliuotės dozes, bendras apoptuojančių ląstelių kiekis padidėjo atitinkamai 1,8, 2,7 ir 4,5 karto. Tad plačiajuostė UVA1 sukelia apoptozę tiek vidiniu, tiek išoriniu apoptozės aktyvacijos keliu [132, 214]. Galima daryti prielaidą, kad siaurajuostės UVA1 spinduliuotės poveikis apoptozės aktyvacijos procese būtų panašus. Be abejo, siekiant patvirtinti šią hipotezę, tikslinga iširti specifinius baltymus, tokius kaip citochromas c, aktyvi kaspazė-9, aktyvi kaspazė-8, Bid ir kitus, dalyvaujančius aktyvinant apoptozę vidiniu ir išoriniu keliu, nes aktyvios kaspazės-3 raiška gali būti sukelta veikiant per abi grandis.

Šiame tyrime, skyrus dideles ir vidutines UVA1 fototerapijos dozes, aktyvios kaspazės-3 raiška suplonėjusioje skleroderminėje odoje padidėjo dvigubai. Tyrimais nustatyta, kad SS sergančių pacientų T ląstelės yra ne tokios jautrios apoptozės procesui ir jose yra sumažėjusi aktyvios kaspazės-3 raiška [215]. Siekdami įvertinti UVA1 poveikį T ląstelių apoptozei, Yamauchi su bendrautoriais atliko tyrimą *in vitro* su sveikomis CD4⁺ ir T limfomos ląstelėmis [216]. Pašvitinus ląsteles 20 J/cm² UVA1 paaikėjo, kad ląstelių jautrumas apoptozei priklauso nuo aktyvios kaspazės-3 raiškos. Didesnis šio fermento kiekis ląstelių aplinkoje (būdingas patogeninėms ląstelėms) lemia geresnį apoptozinį atsaką į UVA1 spinduliuotę. Mūsų atliktame tyrime aktyvios kaspazės-3 raiška galbūt taip pat padidina čia esančių T ląstelių jautrumą UVA1 sąlygotai apoptozei, todėl mažėja uždegiminė infiltracija ir gaunamas antifibrozinis fototerapijos efektas. Okazaki su bendrautoriais [217] nustatė, kad pacientų, sergančių SS, serume yra padidėjusi autoantikūnų prieš aktyvią kaspazę-3 koncentracija. Šių antikūnų kiekis buvo tiesiogiai susijęs su kraujagyslių pažeidimu, ilgesne ligos trukme, padidėjusiais uždegiminiais rodikliais ir išreikšta plaučių fibroze. Manoma, kad antikūnai prieš kaspazę-3 yra susiję su sutrikusiu apoptozės reguliavimo procesu ir sumažėjusiu

kaspazės-3 fermento aktyvumu [217]. Taigi siaurajuostė UVA1 spinduliuotė, sukianti padidėjusią aktyvios kaspazės-3 raišką, reguliuoja SS būdingą pakitusį apoptozės procesą.

Siekiant nustatyti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės įtaką karcinogenezei, Ki-67 ir p53 baltymų raiška buvo įvertinta tiek sveikų pelių, tiek tų, kurioms buvo sukelta skleroderma, grupėse. Didelės molekulinės masės baltymas Ki-67 yra ląstelių proliferacijos žymuo. Padidėjusi šio baltymo raiška yra susijusi su pakitusia ląstelių diferenciacija, o tai lemia vėžinių procesų išsivystymo galimybę [198]. Negydytoms pelėms, kurioms buvo sukelta skleroderma, nustatytas sumažėjęs Ki-67 kiekis, o tai atspindi bleomicino antiproliferacinį veikimo mechanizmą [218]. Skyrus UVA1 fototerapiją didelėmis ir vidutinėmis dozėmis sveikų pelių ir pelių, kurioms buvo skleroderma, grupėms, padidėjusi Ki-67 raiška epidermyje neaptikta. Anksčiau atliktų studijų rezultatai yra priešaringi. Edstrom su bendraautoriais [219] parodė, kad plačiajuostė UVA1(340–400 nm; suminė dozė – 240 J/cm²) sukėlė padidėjusią Ki-67 raišką sveikų žmonių epidermio ląstelėse. Tačiau Gambichler su kolegomis [220] nustatė, kad trys minimalios eriteminės plačiajuostės UVA1 spinduliuotės dozės neturėjo įtakos Ki-67 ekspresijai sveikų savanorių odoje. Mūsų rezultatai svarbūs tuo, kad terapinės 600 J/cm² ir 1 200 J/cm² siaurajuostės UVA1 fototerapijos dozės neaktyvino Ki-67 baltymo raiškos sveikų pelių ir pelių, kurioms buvo skleroderma, epidermyje. Be proliferacijos žymens Ki-67, karcinogenezės išsivystymui turi įtakos ir p53 baltymas. Normaliose ląstelėse p53 kiekis yra minimalus, tačiau esant piktybinėms ligoms, įskaitant ir epitelinius odos vėžio atvejus, šio baltymo raiška yra pakitusi ir padidėjusi net 50–90 % [197]. Ultravioletinė spinduliuotė yra vienas iš pagrindinių veiksnių, sukeliančių p53 mutacijas. Nustatyta, kad p53 raiška sveikų žmonių odoje, kai jie tam tikrą laiką pabūna saulėje, padidėja [221]. Šiame tyrime po bleomicino injekcijų pelių odoje aptikta aiškiai teigiama p53 imunohistocheminė reakcija. Yamamoto su bendraautoriais [222] patvirtino, kad bleomicinu sukeltame gyvūnų sklerodermos

modelyje vyrauja apoptoziniai procesai. Taigi, padidėjusi p53 raiška odoje gali turėti įtakos uždegiminiams, fibroziniais ir imunomoduliaciniams pokyčiams [223]. Suminės 1 200 J/cm² ir 600 J/cm² siaurajuostės UVA1 spinduliuotės dozės nesukėlė statistiškai reikšmingos p53 raiškos sveikų pelių ir tų, kurioms buvo skleroderma, grupėse. Remiantis kitų autorių duomenimis, plačiajuostė UVA1 (330–460 nm) sukelia p53 ekspresiją žmogaus epidermio keratinocituose [224, 225]. Burren su bendraautoriais [224] parodė, kad 0,5, 1 ir 2 minimalios eriteminės UVA1 spinduliuotės dozės tiesiogiai veikia nuo dozės priklausomą p53 raišką epidermyje. Kitoje studijoje, atliktoje su sveikais savanoriais, buvo nustatyta padidėjusi šio baltymo raiška po apšvitinimo suminėmis 200 J/cm² plačiajuostės UVA1 dozėmis [225]. Tokie rezultatų skirtumai gali būti paaiškinami skirtingu spinduliuotės spektru. Minėtose studijose buvo naudojamas platus UVA1 spinduliuotės spektras, apimantis tiek regimąją šviesą, tiek UVA2 sritį. Elektromagnetinių bangų spektre esančios trumpesnės bangos turi daugiau energijos nei ilgos bangos. Skverbimosi į audinius gylis priklauso nuo odoje esančių šviesą sugeriančių chromoforų ir fluoroforų [128]. Epidermyje yra gausu trumpesnės bangos ilgio UV sugeriančių molekulių. Taigi daugiau energijos turinčios trumpos UV bangos gali sukelti apoptozę reguliuojančių baltymų, tokių kaip p53, raišką, ypač viršutiniuose odos sluoksniuose [130]. Atlikti tyrimai su gyvūnais taip pat patvirtino mažesnę UVA1 karcinogeninį poveikį nei UVB. Apšvitinus UVA1 ar UVB (280–315 nm) spinduliuotėmis beplaukes peles, nustatyta, kad UVA1 (tyrime naudotas šviesos spektras patenka ir į UVA2 sritį, bangos ilgis 315–400 nm) turi silpnesnį poveikį ląstelės ciklo S fazei (deoksiribonukleorūgštis – DNR replikacijai) ir p53 baltymo raiškai nei UVB radiacija [226]. Skirtingas UV spinduliuotės bangos ilgis lemia specifinį biologinį poveikį ląstelėms. UVB tiesiogiai sukelia DNR pažaidas, taip formuojasi pirimidino dimerai, o tai lemia įvairias mutacijas [190]. Nustatyta, kad ir UVA1 gali skatinti pirimidinų dimerų susidarymą, tačiau 10 000 kartų mažiau nei UVB ir 100 kartų mažiau nei UVA2 spinduliuotės [191]. Apšvitinus UVB (280–320 nm) ir

UVA1 (320–400 nm) spinduliuotėmis genetiškai modifikuotas peles (HGF/SF, angl. *Hepatocyte growth factor/scatter factor*), kurioms UV spinduliais gali būti sukelta melanoma (tiek biologiniu, tiek genetiniu aspektais panaši į žmogaus), buvo nustatyta, kad melanomos išsivystymui turi įtakos tik UVB spinduliuotė, o UVA1 spinduliuotė tokios įtakos neturi [227]. Khodaeiani su bendraautoriais [197] tyrė piktybines odos ligas ir nustatė aiškiai teigiamas p53 ir Ki-67 baltymų raiškas imunohistocheminėse reakcijose, o tai rodo šių veiksnių įtaką odos karcinogenezei. Šiame tyrime 365 ± 5 nm UVA1 fototerapija didelėmis ir vidutinėmis dozėmis nesukėlė nei p53, nei Ki-67 baltymų raiškos sveikoje ar pelių, kurioms sukelta skleroderma, odoje. Be abejo, norint visiškai atmesti UVA1 sukeltą karcinogenę, imunohistocheminės reakcijos rezultatus patvirtinti būtų tikslinga atlikti genų ekspresijos analizę.

5.2. Tyrimų, atliktų bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį, rezultatų aptarimas

Pacientams, sergantiems sisteminė skleroze, būdingi įsisenėję fibroziniai pokyčiai su besitęsiančiu patogenetiniu mechanizmu. Tad veiksmingas antifibrozinis gydymas turėtų ne tik skatinti kolageno degradaciją, bet ir sustabdyti tolesnę tarpląstelinio užpildo kaupimąsi. Darbo tikslas šiame etape buvo įvertinti siaurajuostės UVA1 didelių dozių poveikį susiformavusiai fibrozei, naudojant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės sklerodermos modelį, kai patogenetinis faktorius skiriamas visą eksperimento laikotarpį. Atlikus histologinius ir imunohistocheminius tyrimus prieš fototerapijos kursą ir po jo, buvo įvertintas odos storis, MMP-1, MMP-3, I ir III tipų kolageno kiekiai.

Tiriamosios grupės pelėms aštuonias savaites buvo leistas bleomicinas ir paskutines penkias eksperimento savaites kartu taikytas gydymas suminėmis 1 200 J/cm² UVA1 spinduliuotės dozėmis. Po fototerapijos kurso, kartu veikiant ir patogenetiniam faktoriui, odos storis sumažėjo 49 % ir 43 %, palyginti su grupėmis

pelių, kurioms aštuonias ir tris savaites leistas tik bleomicinas. Be to, po gydymo didelėmis UVA1 dozėmis odos storis buvo mažesnis, palyginti su prieš fototerapiją buvusiais fibrozinais pokyčiais. Taigi, 365 ± 5 nm UVA1 ne tik sustabdo fibrozės progresavimą, bet ir sukelia jau buvusių fibrozinių pokyčių regresiją. Anksčiau atliktuose tyrimuose, naudojant gyvūnų modelius, kuriuose tirtas plačiajuostės UVA1 poveikis fibrozei, nebuvo taikomas bleomicinu sukeltas susiformavusios fibrozės modelis. Šis modelis buvo pasirinktas remiantis ankstesniais darbais, kuriuose autoriai [228] tyrė imatinibo mezilato poveikį susiformavusiai fibrozei bleomicinu sukeltame sklerodermos modelyje. Imatinibo mezilatas – tirozinkinazės inhibitorius, blokuojantis SS patogenezėje dalyvaujančių svarbiausių citokinių (TGF-β ir PDGF) profibrozines funkcijas [229]. Imatinibo mezilatas (150 mg/kg/d) buvo leidžiamas į pilvaplėvės ertmę tris savaites DBA/2 linijos pelėms, kartu tęsiant bleomicino injekcijas visą eksperimento laikotarpį. Nustatyta, kad pelių, paskutines tris eksperimento savaites veiktų bleomicinu ir gydytų imatinibo mezilatu, oda buvo 27 % plonesnė nei pelių, veiktų tik bleomicinu. Tad neinvazinė siaurajuostė UVA1 fototerapija labiau sumažina odos storį susiformavusios fibrozės sklerodermos modelyje nei sisteminis gydymas tirozinkinazės inhibitoriumi (atitinkamai 49 % ir 27 %), palyginti su negydytų pelių, kurioms sukelta skleroderma, grupėmis.

Viena iš hipotezių, paaiškinančių efektyvų UVA1 fototerapijos antifibrozinį poveikį, yra susijusi su hemooksidaze-1. Nustatyta, kad, paveikus UVA1 spinduliuote, dermos fibroblastuose padidėja fermento hemooksidazės-1 kiekis [230]. Hemooksidazė-1 apsaugo ląsteles nuo neigiamo oksidacinio streso poveikio, taip pat mažina uždegiminių citokinių koncentraciją ir padidina matrikso metaloproteinazių raišką odoje [231]. Tad manoma, kad fermentas hemooksidazė-1 ir MMP-1, mažinant odos fibrozę, veikia sinergiškai [232]. Ilgesnio bangos ilgio UVA1 sukelia stipresnę hemooksidazės-1 raišką, palyginti su trumpesnio bangos ilgio UVA1 [232]. Tad daroma prielaida, kad, selektyviai naudojant UVA1 spinduliuotės 365 nm bangos ilgį, antifibrozinis efektas dėl hemooksidazės-1

indukcijos yra ryškesnis nei skiriant plataus spektro UVA1. Tad siaurajuostė UVA1 fototerapija didelėmis dozėmis galėtų būti efektyvi neinvazinė gydymo priemonė, kurios veikimo mechanizmas pasireiškia ne tik fibrozės progresavimo sustabdymu, bet ir fibrozinių pokyčių regresija.

Veiksmingas antifibrozinis gydymas turėtų būti sutelktas į fibroblastų aktyvumo mažinimą ir susikaupusio tarpląstelinio užpildo komponentų skaidymą. Fibroblastai, esantys dermos sluoksnyje, gali būti vieni iš UVA1 fototerapijos taikinių. SS būdingas tarpląstelinio matrikso komponentų kaupimasis priklauso nuo fibroblastų padidėjusios kolageno I ir III tipų gamybos ir sumažėjusios MMP-1 ir MMP-3 raiškos. Be daugelio kitų substratų, MMP-1 (kolagenazė-1) skaido I ir III tipo kolagenų fibriles, o MMP-3 (stromelizinas-1) – III tipo kolageną [83, 84]. Taigi, MMPs sumažėjęs kiekis ir aktyvumas tiesiogiai dalyvauja SS patogenezėje. Mūsų tyrime po 8 savaičių bleomicino injekcijų pelių, kurioms buvo skleroderma, odoje MMP-1 kiekis sumažėjo 1,8 karto, o MMP-3 – 1,4 karto, palyginti su sveikų pelių grupe. Kaip nustatyta anksčiau atliktuose ląstelių kultūros tyrimuose, SS fibroblastams būdingas sumažėjęs MMP-3 ir MMP-1 aktyvumas, palyginti su sveikų žmonių ląstelėmis [233, 234]. Prieš du dešimtmečius atliktais *in vitro* tyrimais įrodyta, kad UVA1 sukelia MMPs aktyvumą žmogaus fibroblastų kultūroje [235, 236]. Be to, MMPs kiekis buvo padidėjęs po fototerapijos taikant gydymą plačiajuoste UVA1 spinduliuote pacientams, sergantiems lokalia ar sisteminė skleroze [166, 179, 181]. Taigi mūsų darbe odos storio sumažėjimas gali būti nulemtas UVA1 poveikio į kolageną skaidančias proteazes. Sukaupus suminę 1 200 J/cm² siaurajuostės UVA1 dozę, gyvūnų su skleroderma grupėje MMP-1 kiekis odoje padidėjo 5,8 karto, o MMP-3 – 5,2 karto, palyginti su kontroline negydytų pelių, kurioms buvo sukelta skleroderma, grupe. Po fototerapijos kurso kartu tęsiant prailgintą bleomicino injekcijas, kolageno I tipo kiekis sumažėjo 1,2, o kolageno III tipo – 1,4 karto, palyginti su negydytų kontrolinių pelių grupe. Labiau sumažėjęs III tipo kolageno kiekis gali būti susijęs su padidėjusiomis jį

skaidančių MMP-1 ir MMP-3 raiškomis [83]. Po 365 ± 5 nm UVA1 fototerapijos didelėmis dozėmis, tęsiant patogenetinio faktoriaus – bleomicino veikimą, pelių su sklerodema odoje nustatytas mažesnis kolageno kiekis nei prieš gydymo kursą buvusios kolageno sankaupos skleroderminėje odoje.

Padidėjęs kolageną skaidančių fermentų aktyvumas arba susilpnėjusi kolageno sintezė *de novo* lemia kolageno kiekio sumažėjimą po fototerapijos. Mempel su bendraautoriais [148] nustatė, kad suminė 750 J/cm^2 plačiajuostės (350–400 nm) UVA1 spinduliuotės dozė sumažino I ir III tipo kolageno kiekį (atitinkamai 1,33 ir 1,08 karto) pacientų, sergančių atopiniu dermatitu, odoje. Tačiau po plataus spektro UVA1 fototerapijos MMP-1 aktyvumas nepadidėjo. Taigi, remiantis šio mokslinio darbo rezultatais, galima daryti išvadą, kad siaurajuostė UVA1 fototerapija sumažina kolageno sankaupas ne tik aktyvindama proteazes, bet ir veikdama kolageno sintezę *de novo*. Svarbu paminėti, kad siaurajuostė UVA1 sumažino III tipo kolageno kiekį efektyviau nei plataus spektro UVA1 fototerapija (atitinkamai 1,4 ir 1,08 karto) [148].

6. REZULTATŲ APIBENDRINIMAS

Šie tyrimai buvo atlikti tikintis netolimoje ateityje siaurajuostę UVA1 pritaikyti sisteminė skleroze sergantiems pacientams gydyti. Siekiant įvertinti, ar šis gydymo metodas yra veiksmingas ir saugus, šiame moksliniame darbe buvo tirtas siaurajuostės UVA1 (365 ± 5 nm) spinduliuotės poveikis naudojant bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės ir bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį, gyvūnų modelius. Atlikus histologinius ir imunohistocheminius tyrimus, buvo įvertintas siaurajuostės UVA1 poveikis odos storiui, putliųjų ląstelių infiltracijai, aktyvios kaspazės-3, p53 ir Ki-67 baltymų raiškai, kolageno I ir III tipo kiekiui bei juos skaidančių fermentų MMP-1 ir MMP-3 raiškoms.

Pirmame tyrimo etape DBA/2 linijos pelėms buvo sukelta sisteminė sklerozė, skiriant poodines bleomicino injekcijas. Paskui gyvūnams buvo skirtas penkių savaičių siaurajuostės UVA1 fototerapijos kursas, kurio metu sukauptos didelės (suminė dozė – 1 200 J/cm²) arba vidutinės (suminė dozė – 600 J/cm²) spinduliuotės dozės. Nustatyta, kad didelių ir vidutinių dozių UVA1 fototerapijos kursas reikšmingai sumažina skleroderminės odos storį ir antifibrozinis efektas yra tiesiogiai priklausomas nuo dozės. Histologinės analizės rezultatai parodė, kad 365 ± 5 nm UVA1 neturi įtakos sveikos odos storiui ir struktūrai.

Siekiant įvertinti fototerapijos veikimo mechanizmo grandis, buvo tirtas UVA1 poveikis uždegiminių ląstelių infiltracijai. Yra žinoma, kad putliosios ląstelės dalyvauja sisteminės sklerozės patogenezėje ir yra vienos iš fibrogenezę skatinančių faktorių [237]. Po didelių ir vidutinių UVA1 fototerapijos dozių buvo stebėtas sumažėjęs putliųjų ląstelių sankaupų kiekis skleroderminėje pelių odoje. Tad 365 ± 5 nm UVA1 sukėlė patogenetinių uždegiminių ląstelių apoptozę, tai patvirtina ir padidėjęs aktyvios kaspazės-3 raiškos kiekis po fototerapijos kurso pelių, kurioms buvo sukelta skleroderma, odoje. Svarbu paminėti, kad siaurajuostė UVA1 spinduliuotė neturėjo įtakos sveikų pelių odos ląstelių kiekiui ir jų žūčiai. Skleroderminiai fibroblastai, esantys giliuosiuose odos sluoksniuose, yra atsparūs apoptozei, dėl to išlieka aktyvūs ir toliau gausiai gamina tarpląstelinio matrikso komponentus [209]. Aktyvios kaspazės-3 raiškos nustatymas giliuosiuose odos sluoksniuose yra čia vykstančios apoptozės žymuo [154]. Tai leidžia daryti prielaidą, kad suplonėjęs odos storis gali būti susijęs su sumažėjusiu putliųjų ląstelių, fibroblastų skaičiumi ar pačių ląstelių aktyvumu dėl siaurajuostės UVA1 sąlygotos apoptozės. Tačiau šių tyrimų duomenimis, dermos sluoksnyje tam tikros rūšies ląstelių apoptozė po UVA1 fototerapijos negali būti paaiškinta, todėl reikia tolesnių tyrimų *in vitro*, pavyzdžiui, naudojant skleroderminius fibroblastus.

Siekiant nustatyti, ar siaurajuostė UVA1 fototerapija nesukelia padidėjusios piktybinių navikų rizikos, buvo įvertinta karcinogenezę skatinančių p53 ir Ki-67

baltymų raiška sveikoje ir skleroderminėje gyvūnų odoje. Imunohistocheminės analizės duomenys parodė, kad didelių ir vidutinių dozių 365 ± 5 nm UVA1 fototerapija nesukėlė reikšmingai padidėjusios p53 ir Ki-67 baltymų raiškos nei sveikų, nei pelių su skleroderma odoje. Be abejo, norint visiškai atmesti UVA1 sąlygojamą karcinogenezę, imunohistocheminės reakcijos rezultatams patvirtinti būtų tikslinga atlikti genų ekspresijos analizę [197].

Kadangi pacientams, sergantiems sisteminė skleroze, būdingi įsisenėję fibroziniai pokyčiai ir besitęsiantis fibrozę skatinantis patogenetinis mechanizmas, veiksmingas antifibrozinis gydymas turėtų ne tik skatinti kolageno degradaciją, bet ir sustabdyti tolesnį tarpląstelinio užpildo kaupimąsi. Tad antrame mokslinio darbo etape buvo atlikti tyrimai, siekiant įvertinti siaurajuostės UVA1 didelių dozių poveikį susiformavusiai fibrozei, naudojant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės modelį. Histologinės analizės duomenys parodė, kad po didelių dozių 365 ± 5 nm UVA1 fototerapijos, kartu skiriant bleomiciną visą eksperimento laikotarpį, pelių, kurioms sukelta skleroderma, oda suplonėjo net labiau nei prieš gydymą buvę fibroziniai pokyčiai.

Fibrozės patogenezėje svarbiausios proteazės yra MMP-1 (kolagenazė-1) ir MMP-3 (stromelizinas-1), kurių susilpnėjęs aktyvumas ir sumažėjęs kiekis lemia padidėjusį I ir III tipo kolageno kaupimąsi [83, 84]. Siekiant įvertinti siaurajuostės UVA1 poveikį kolageno metabolizmui, buvo atlikti tyrimai su pirminiais antikūnais prieš MMP-1, MMP-3, kolageno I ir III tipus. Nustatyta, kad pelių, veiktu bleomicinu aštuonias savaites ir paskutines penkias eksperimento savaites gydytų didelėmis siaurajuostės UVA1 spinduliuotės dozėmis, odoje buvo reikšmingai padidėjusios MMP-1 ir MMP-3 raiškos, palyginti su grupe pelių, gavusių tik bleomiciną visas aštuonias savaites. Gauti rezultatai taip pat patvirtino, kad suminės $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$ UVA1 fototerapijos dozės statistiškai reikšmingai sumažina kolageno I ir III tipo kiekius skleroderminėje odoje. Imunohistocheminės analizės duomenys

atspindi, kad tiek padidėjusi kolageną skaidančių fermentų raiška, tiek susilpnėjusi kolageno sintezė lemia kolageno sankaupų sumažėjimą po fototerapijos.

Šiame moksliniame darbe buvo patvirtinti ginamieji teiginiai, kad siaurajuostė 365 ± 5 nm UVA1 fototerapija sumažina skleroderminės odos storį, sustabdo fibrozės progresavimą ir sukelia fibrozinių pokyčių regresiją bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės gyvūnų modelyje, nesukeldama padidėjusios karcinogenezės rizikos.

7. IŠVADOS

1. Suminės $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$ ir $600\ \text{J}/\text{cm}^2$ siaurajuostės UVA1 spinduliuotės dozės statistiškai reikšmingai sumažina odos storį bleomicinu sukeltame susiformavusios fibrozės gyvūnų modelyje.
2. 365 ± 5 nm UVA1 fototerapija didelėmis ($1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$) ir vidutinėmis ($600\ \text{J}/\text{cm}^2$) dozėmis sumažina putliųjų ląstelių infiltraciją ir padidina aktyvios kaspazės-3 raišką skleroderminėje odoje, naudojant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės gyvūnų modelį.
3. Taikant 365 ± 5 nm UVA1 fototerapiją suminėmis $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$ ir $600\ \text{J}/\text{cm}^2$ dozėmis, neaptikta karcinogenezę lemiančių p53 ir Ki-67 baltymų raiškos gyvūnų, kuriems bleomicinu sukelta SS, odoje.
4. 365 ± 5 nm UVA1 fototerapija suminėmis $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$ dozėmis sumažina I ir III tipų kolageno sankaupas ir padidina matrikso metaloproteinazės-1 ir matrikso metaloproteinazės-3 raiškas gyvūnų odoje, naudojant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės modelį, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį.
5. Suminės $1\ 200\ \text{J}/\text{cm}^2$ siaurajuostės UVA1 fototerapijos dozės ne tik sustabdo fibrozės progresavimą, bet ir sukelia jau buvusių fibrozinių pokyčių regresiją bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės gyvūnų modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį.

8. MOKSLINIO DARBO TRŪKUMAI

Antifibrozinis preparatų ar prietaisų poveikis ikiklinikiniuose fibrozės modeliuose skirstomas į tris įrodymo lygius (lygiai nuo C iki A) [122]. Vaistai, kurie apibūdinami akivaizdžiu C įrodymo lygiu, pasižymi antifibrozinėmis savybėmis tik *in vitro* tyrimuose. Reikia pažymėti, kad teigiamas poveikis *in vitro* nebūtinai gali būti veiksmingas *in vivo*. Akivaizdus B įrodymo lygis – antifibrozinis efektas, kuris yra įvertinamas *in vivo*, naudojant gyvūnų SS modelius. Vaistai, priskiriami akivaizdžiam A įrodymo lygiui, turi būti ištirti, naudojant mažiausiai du gyvūnų modelius, atspindinčius skirtingus ligos ypatumus. Šiame moksliniame darbe buvo įrodytas siaurajuostės UVA1 fototerapijos efektyvumas bleomicinu sukeltame sisteminės sklerozės modelyje, kuriame fibrozės patogenezė būdinga ankstyvoms, nuo uždegimo priklausančioms, SS stadijoms. Šiame modelyje, nors ir nustatytas kraujagyslių sienelių sustorėjimas giliausiuose odos sluoksniuose, nėra tipiškos generalizuotos mikroangiopatijos, kuri prasideda sergantiems SS iki išsivystant fibrozei [116, 123]. Spontaniniame sklerodermos Tsk-1 modelyje vyrauja kraujagyslių pažeidimas, autoimuniniai pokyčiai ir fibrogenėzė, tačiau nėra uždegiminių infiltratų [238]. Taigi, siekiant įvertinti UVA1 fototerapijos efektyvumą nuo uždegimo nepriklausančioje, vėlyvoje SS stadijoje, tikslinga atlikti tyrimus su spontaniniais, natūraliai išsivystančiais sklerodermos gyvūnų modeliais, kuriuose vyrauja ir vaskulopatijos požymiai.

Be to, ilgalaikis UVA1 spinduliuotės poveikis nėra ištirtas. Šiame moksliniame darbe buvo įrodytas suminių 1 200 J/cm² siaurajuostės UVA1 spinduliuotės dozių antifibrozinis efektas, pasireiškiantis fibrozinių pokyčių regresija ir fibrozės prevencija. Taigi, didelių dozių UVA1 fototerapija būtų veiksminga pacientų, sergančių SS, gydymo galimybė. Siekiant sumažinti galimą pašalinių reakcijų riziką, būtų tikslinga įvertinti vidutinių arba mažų siaurajuostės UVA1 dozių poveikį naudojant bleomicinu sukeltą susiformavusios fibrozės gyvūnų modelį.

Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo įvertinti siaurajuostės UVA1 spinduliuotės poveikį fibrozės procesui bleomicinu sukeltame sisteminės sklerozės gyvūnų modelyje. Atliktais tyrimais buvo nustatytas šios fototerapijos antifibrozinis efektyvumas su minimalia karcinogenezės rizika. Tačiau, siekiant išaiškinti tikslų UVA1 veikimo mechanizmą skleroderminėje odoje, ateityje būtų tikslinga nustatyti šios spinduliuotės poveikį miofibroblastams, CD3⁺ T ląstelėms, CD20⁺ B ląstelėms, CD68⁺ makrofagams, TGF-β, kurie dalyvauja sisteminės sklerozės patogenezėje.

9. PRAKTIŅĖ NAUDA

Pasaulyje kasmet yra patvirtinami nauji veiksmingi autoimuninių ligų gydymo metodai ar medikamentai, tačiau SS gydymas kol kas yra neišspręstas uždavinys tiek klinicistams, tiek mokslininkams. Pacientų, sergančių SS, sisteminio ar lokalaus gydymo galimybės yra ribotos. Šio mokslinio darbo rezultatai parodė, kad 1 200 J/cm² ir 600 J/cm² siaurajuostės UVA1 spinduliuotės dozės statistiškai reikšmingai sumažina odos storį bleomicinu sukeltos susiformavusios fibrozės modelyje, nesukeliant padidėjusios karcinogenezę lemiančių baltymų raiškos. Be to, didelių dozių, 1 200 J/cm² siaurajuostė UVA1 fototerapija ne tik sustabdo fibrozės progresavimą, bet ir sukelia jau buvusių fibrozinių pokyčių regresiją susiformavusios fibrozės modelyje, kai bleomicinas skiriamas visą eksperimento laikotarpį. Tad ši fototerapijos rūšis gali būti viena iš neinvazinio gydymo galimybių odos fibrozei mažinti.

Netolimoje ateityje planuojama atlikti klinikinį sisteminė skleroze sergančių pacientų tyrimą, siekiant gydyti odos fibrozę taikant 365 ± 5 nm UVA1 spinduliuotę. Valstybinė akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnyba prie Sveikatos apsaugos ministerijos suteikė leidimą naudoti specialiosios paskirties medicinos prietaisą „IMC-Light“ klinikiniam tyrimui, vykstančiam Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose. Akreditacijos duomenys ir suteiktas leidimas (D2-11748 - (5.19) (Nr. S8-5)) yra įregistruoti Europos medicininių

prietaisų duomenų banke EUDAMED; klinikinio tyrimo identifikacijos Nr. (CIV-ID): CIV-15 - 10-013898.

Šio neinvazinio metodo pritaikymas kasdieninėje klinikinėje praktikoje būtų svarbus žingsnis sprendžiant sudėtingas SS gydymo problemas. O dėl savo gerų techninių parametrų ir saugumo siaurajuostės UVA1 spinduliuotės prietaisas gali pakeisti ir plataus UVA1 spektro prietaisus, skirtus atopiniam dermatitui, psoriazei ir kitoms odos ligoms gydyti.

10. LITERATŪRA

1. Chiffrot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 37(4): 223-35.
2. Steen VD, Oddis CV, Conte CG, Janoski J, Casterline GZ, Medsger TA, Jr. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum* 1997; 40(3): 441-5.
3. Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9(5): A311-8.
4. Guiducci S, Giacomelli R, Cerinic MM. Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun Rev* 2007; 6(8): 520-3.
5. Nihtyanova SI, Brough GM, Black CM, Denton CP. Clinical burden of digital vasculopathy in limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(1): 120-3.
6. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 557-67.
7. Blagojevic J, Matucci-Cerinic M. Systemic sclerosis: clinical manifestations. *Curr Rheumatol Rev* 2010; 6(4): 295-304.
8. Decuman S, Smith V, Verhaeghe ST, Van Hecke A, De Keyser F. Work participation in patients with systemic sclerosis: a systematic review. *Clin Exp Rheumatol* 2014; 32(6 Suppl 86): S-206-13.
9. Bernatsky S, Hudson M, Panopalis P, Clarke AE, Pope J, Leclercq S *et al.* The cost of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2009; 61(1): 119-23.
10. van den Hoogen FH, Boerbooms AM, Swaak AJ, Rasker JJ, van Lier HJ, van de Putte LB. Comparison of methotrexate with placebo in the treatment of systemic sclerosis: a 24 week randomized double-blind trial, followed by a 24 week observational trial. *Br J Rheumatol* 1996; 35(4): 364-72.
11. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, Goldin J, Roth MD, Furst DE *et al.* Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354(25): 2655-66.
12. Kerr AC, Ferguson J, Attili SK, Beattie PE, Coleman AJ, Dawe RS *et al.* Ultraviolet A1 phototherapy: a British Photodermatology Group workshop report. *Clin Exp Dermatol* 2012; 37(3): 219-26.
13. Gambichler T, Terras S, Kreuter A. Treatment regimens, protocols, dosage, and indications for UVA1 phototherapy: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2013; 31(4): 438-54.
14. Morita A, Werfel T, Stege H, Ahrens C, Karmann K, Grewe M *et al.* Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J Exp Med* 1997; 186(10): 1763-8.
15. Gruss C, Reed JA, Altmeyer P, McNutt NS, Kerscher M. Induction of interstitial collagenase (MMP-1) by UVA-1 phototherapy in morphea fibroblasts. *Lancet* 1997; 350(9087): 1295-6.
16. Grabbe J, Welker P, Humke S, Grewe M, Schopf E, Henz BM *et al.* High-dose ultraviolet A1 (UVA1), but not UVA/UVB therapy, decreases IgE-binding cells in

- lesional skin of patients with atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1996; 107(3): 419-22.
17. Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Breuksch S, Altmeyer P, Kreuter A. Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. *Br J Dermatol* 2007; 156(5): 951-6.
 18. de Rie MA, Enomoto DN, de Vries HJ, Bos JD. Evaluation of medium-dose UVA1 phototherapy in localized scleroderma with the cutometer and fast Fourier transform method. *Dermatology* 2003; 207(3): 298-301.
 19. Durand F, Staumont D, Bonneville A, Hachulla E, Hatron PY, Thomas P. Ultraviolet A1 phototherapy for treatment of acrosclerosis in systemic sclerosis: controlled study with half-side comparison analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23(6): 215-21.
 20. Kreuter A, Hyun J, Skrygan M, Sommer A, Bastian A, Altmeyer P *et al.* Ultraviolet A1-induced downregulation of human beta-defensins and interleukin-6 and interleukin-8 correlates with clinical improvement in localized scleroderma. *Br J Dermatol* 2006; 155(3): 600-7.
 21. Matthews YJ, Halliday GM, Phan TA, Damian DL. Wavelength dependency for UVA-induced suppression of recall immunity in humans. *J Dermatol Sci* 2010; 59(3): 192-7.
 22. Connolly KL, Griffith JL, McEvoy M, Lim HW. Ultraviolet A1 phototherapy beyond morphea: experience in 83 patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2015; 31(6): 289-95.
 23. Inada SA, Kamiyama S, Akasaki I, Torii K, Furuhashi T, Amano H *et al.* Development of an ultraviolet A1 light emitting diode-based device for phototherapy. *Open Dermatology Journal* 2012; 6(1): 13-24.
 24. Nistico SP, Saraceno R, Chiricozzi A, Giunta A, Di Stefani A, Zerbinati N. UVA-1 laser in the treatment of palmoplantar pustular psoriasis. *Photomed Laser Surg* 2013; 31(9): 434-8.
 25. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum* 2010; 62(10): 2831-44.
 26. Distler O, Cozzio A. Systemic sclerosis and localized scleroderma--current concepts and novel targets for therapy. *Semin Immunopathol* 2016; 38(1): 87-95.
 27. Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med* 1979; 149(6): 1326-35.
 28. Kahaleh MB. Raynaud's phenomenon and vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6(6): 621-7.
 29. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000; 27(1): 155-60.
 30. Maurer B, Busch N, Jungel A, Pileckyte M, Gay RE, Michel BA *et al.* Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation* 2009; 120(23): 2367-76.
 31. Guiducci S, Distler O, Distler JH, Matucci-Cerinic M. Mechanisms of vascular damage in SSc--implications for vascular treatment strategies. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 Suppl 5: v18-20.

32. Blann AD, Illingworth K, Jayson MI. Mechanisms of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *J Rheumatol* 1993; 20(8): 1325-30.
33. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol* 2005; 24(2): 111-6.
34. Bradfield PF, Nourshargh S, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(10): 2104-12.
35. Mathes AL, Christmann RB, Stifano G, Affandi AJ, Radstake TR, Farina GA *et al.* Global chemokine expression in systemic sclerosis (SSc): CCL19 expression correlates with vascular inflammation in SSc skin. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(10): 1864-72.
36. Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O, Meyringer R, Guiducci S, Landthaler M *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(11): 2665-78.
37. Galindo M, Santiago B, Rivero M, Rullas J, Alcami J, Pablos JL. Chemokine expression by systemic sclerosis fibroblasts: abnormal regulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6): 1382-6.
38. Ong VH, Evans LA, Shiwen X, Fisher IB, Rajkumar V, Abraham DJ *et al.* Monocyte chemoattractant protein 3 as a mediator of fibrosis: Overexpression in systemic sclerosis and the type 1 tight-skin mouse. *Arthritis Rheum* 2003; 48(7): 1979-91.
39. Kahaleh B. The microvascular endothelium in scleroderma. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 Suppl 5: v14-5.
40. Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R *et al.* Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med* 2000; 6(10): 1183-6.
41. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996; 98(3): 785-92.
42. Jufri NF, Mohamedali A, Avolio A, Baker MS. Mechanical stretch: physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells. *Vasc Cell* 2015; 7: 8.
43. Riccieri V, Spadaro A, Fuksa L, Firuzi O, Saso L, Valesini G. Specific oxidative stress parameters differently correlate with nailfold capillaroscopy changes and organ involvement in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2008; 27(2): 225-30.
44. Wang Y, Kahaleh B. Epigenetic repression of bone morphogenetic protein receptor II expression in scleroderma. *J Cell Mol Med* 2013; 17(10): 1291-9.
45. Gilbane AJ, Derrett-Smith E, Trinder SL, Good RB, Pearce A, Denton CP *et al.* Impaired bone morphogenetic protein receptor II signaling in a transforming growth factor-beta-dependent mouse model of pulmonary hypertension and in systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(6): 665-77.

46. Altorok N, Almeshal N, Wang Y, Kahaleh B. Epigenetics, the holy grail in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54(10): 1759-70.
47. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum* 1991; 34(8): 978-83.
48. Wigley FM. Vascular disease in scleroderma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009; 36(2-3): 150-75.
49. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9(4): 777-94.
50. Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J *et al.* Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 2004; 95(1): 109-16.
51. Davies CA, Jeziorska M, Freemont AJ, Herrick AL. The differential expression of VEGF, VEGFR-2, and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis. *Hum Pathol* 2006; 37(2): 190-7.
52. Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Impaired angiogenesis in systemic sclerosis: the emerging role of the antiangiogenic VEGF(165)b splice variant. *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21(7): 204-10.
53. Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. *Lancet* 2004; 364(9434): 603-10.
54. Zhu S, Evans S, Yan B, Povsic TJ, Tapson V, Goldschmidt-Clermont PJ *et al.* Transcriptional regulation of Bim by FOXO3a and Akt mediates scleroderma serum-induced apoptosis in endothelial progenitor cells. *Circulation* 2008; 118(21): 2156-65.
55. Nevskaya T, Bykovskaia S, Lyssuk E, Shakhov I, Zaprjagaeva M, Mach E *et al.* Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: relation to impaired angiogenesis and cardiovascular manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(3): 421-9.
56. Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W *et al.* Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(4): 1296-304.
57. Dees C, Akhmetshina A, Zerr P, Reich N, Palumbo K, Horn A *et al.* Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med* 2011; 208(5): 961-72.
58. Fuschiotti P. Current perspectives on the immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Immunotargets Ther* 2016; 5: 21-35.
59. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004; 50(6): 1721-33.
60. Avouac J, Furnrohr BG, Tomcik M, Palumbo K, Zerr P, Horn A *et al.* Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011; 63(3): 800-9.

61. Kuwana M, Medsger TA, Jr., Wright TM. T and B cell collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. *J Immunol* 1995; 155(5): 2703-14.
62. Kissin EY, Korn JH. Fibrosis in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29(2): 351-69.
63. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2010; 10(2): 65-73.
64. Chizzolini C. T cells, B cells, and polarized immune response in the pathogenesis of fibrosis and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20(6): 707-12.
65. Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine* 2011; 56(3): 544-9.
66. Slobodin G, Ahmad MS, Rosner I, Peri R, Rozenbaum M, Kessel A *et al.* Regulatory T cells (CD4(+)CD25(bright)FoxP3(+)) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. *Cell Immunol* 2010; 261(2): 77-80.
67. Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2013; 65(1): 236-46.
68. Ayano M, Tsukamoto H, Kohno K, Ueda N, Tanaka A, Mitoma H *et al.* Increased CD226 Expression on CD8+ T Cells Is Associated with Upregulated Cytokine Production and Endothelial Cell Injury in Patients with Systemic Sclerosis. *J Immunol* 2015; 195(3): 892-900.
69. Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(12): 679-85.
70. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15(6): 778-84.
71. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum* 2004; 50(6): 1918-27.
72. Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E *et al.* CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol* 2008; 172(6): 1650-63.
73. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35(1): 35-42.
74. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M *et al.* Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354(25): 2667-76.
75. Gunther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E *et al.* Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 2014; 16(2): R65.
76. Gruschwitz M, von den Driesch P, Kellner I, Hornstein OP, Sterry W. Expression of adhesion proteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions in the skin of

- patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27(2 Pt 1): 169-77.
77. Raja J, Denton CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 2015; 37(5): 543-57.
 78. Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010; 37(1): 11-25.
 79. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 509-37.
 80. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airo P, Cozzi F, Carreira PE *et al*. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(10): 1809-15.
 81. Komocsi A, Vorobcsuk A, Faludi R, Pinter T, Lenkey Z, Kolto G *et al*. The impact of cardiopulmonary manifestations on the mortality of SSc: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(6): 1027-36.
 82. Ho YY, Lagares D, Tager AM, Kapoor M. Fibrosis--a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(7): 390-402.
 83. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21491-4.
 84. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6(5): 199-213.
 85. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009; 360(19): 1989-2003.
 86. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2): 199-210.
 87. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell* 2003; 14(6): 2508-19.
 88. Jelaska A, Arakawa M, Broketa G, Korn JH. Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1996; 39(8): 1338-46.
 89. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005; 26(11): 587-95.
 90. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24(2-3): 111-9.
 91. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 2004; 35(2): 83-92.
 92. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 2): 217-24.
 93. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113(6): 685-700.
 94. Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 2006; 580(12): 2811-20.

95. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425(6958): 577-84.
96. Verrecchia F, Mauviel A, Farge D. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2006; 5(8): 563-9.
97. Sargent JL, Milano A, Bhattacharyya S, Varga J, Connolly MK, Chang HY *et al.* A TGFbeta-responsive gene signature is associated with a subset of diffuse scleroderma with increased disease severity. *J Invest Dermatol* 2010; 130(3): 694-705.
98. Wei J, Melichian D, Komura K, Hinchcliff M, Lam AP, Lafyatis R *et al.* Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipoatrophy: a novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum* 2011; 63(6): 1707-17.
99. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P *et al.* Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun* 2012; 3: 735.
100. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(22): 3056-62.
101. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; 4(8): 599-604.
102. Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 Suppl 5: v2-4.
103. Dees C, Tomcik M, Zerr P, Akhmetshina A, Horn A, Palumbo K *et al.* Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(7): 1304-10.
104. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-6.
105. Palumbo-Zerr K, Zerr P, Distler A, Fliehr J, Mancuso R, Huang J *et al.* Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor-beta signaling and fibrosis. *Nat Med* 2015; 21(2): 150-8.
106. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Wei J, Kim S, Barak Y, Mori Y *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *Faseb j* 2009; 23(9): 2968-77.
107. Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, Komura K, Wu M, Huang QQ *et al.* PPARgamma downregulation by TGFss in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis. *PLoS One* 2010; 5(11): e13778.
108. Beyer C, Huang J, Beer J, Zhang Y, Palumbo-Zerr K, Zerr P *et al.* Activation of liver X receptors inhibits experimental fibrosis by interfering with interleukin-6 release from macrophages. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(6): 1317-24.
109. Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2013; 80(1): 23-8.
110. Derrett-Smith EC, Denton CP, Sonnylal S. Animal models of scleroderma: lessons from transgenic and knockout mice. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21(6): 630-5.
111. Yamamoto T. Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol* 2010; 37(1): 26-41.

112. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H *et al.* Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112(4): 456-62.
113. Gentiletti J, McCloskey LJ, Artlett CM, Peters J, Jimenez SA, Christner PJ. Demonstration of autoimmunity in the tight skin-2 mouse: a model for scleroderma. *J Immunol* 2005; 175(4): 2418-26.
114. Christner PJ, Artlett CM, Conway RF, Jimenez SA. Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11): 2598-605.
115. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum* 2011; 63(11): 3575-85.
116. Yamamoto T, Katayama I. Vascular changes in bleomycin-induced scleroderma. *Int J Rheumatol* 2011; 2011:5.
117. Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Exp Dermatol* 2005; 14(2): 81-95.
118. Yamamoto T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res* 2006; 297(8): 333-44.
119. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000; 292(11): 535-41.
120. Ishikawa H, Takeda K, Okamoto A, Matsuo S, Isobe K. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol* 2009; 129(7): 1688-95.
121. Batteux F, Kavian N, Servettaz A. New insights on chemically induced animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23(6): 511-8.
122. Distler JH, Distler O. Criteria to select molecular targets for anti-fibrotic therapy. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 Suppl 5: v12-3.
123. Avouac J. Mouse model of experimental dermal fibrosis: the bleomycin-induced dermal fibrosis. *Methods Mol Biol* 2014; 1142: 91-8.
124. Kapoor M, McCann M, Liu S, Huh K, Denton CP, Abraham DJ *et al.* Loss of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mouse fibroblasts results in increased susceptibility to bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(9): 2822-9.
125. Diffey BL. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002; 18(2): 68-74.
126. Tewari A, Lahmann C, Sarkany R, Bergemann J, Young AR. Human erythema and matrix metalloproteinase-1 mRNA induction, in vivo, share an action spectrum which suggests common chromophores. *Photochem Photobiol Sci* 2012; 11(1): 216-23.
127. Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *Int J Mol Sci* 2013; 14(3): 6414-35.

128. Svobodova A, Vostalova J. Solar radiation induced skin damage: review of protective and preventive options. *Int J Radiat Biol* 2010; 86(12): 999-1030.
129. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4(26): 1-22.
130. Mahmoud BH, Hexsel CL, Hamzavi IH, Lim HW. Effects of visible light on the skin. *Photochem Photobiol* 2008; 84(2): 450-62.
131. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci* 2013; 12(1): 54-64.
132. Godar DE. UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol* 1999; 112(1): 3-12.
133. Ravanat JL, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 2001; 63(1-3): 88-102.
134. York NR, Jacobe HT. UVA1 phototherapy: a review of mechanism and therapeutic application. *Int J Dermatol* 2010; 49(6): 623-30.
135. Grewe M, Gyufko K, Krutmann J. Interleukin-10 production by cultured human keratinocytes: regulation by ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation. *J Invest Dermatol* 1995; 104(1): 3-6.
136. Grewe M, Gyufko K, Schopf E, Krutmann J. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* 1994; 343(8888): 25-6.
137. Seite S, Zucchi H, Moyal D, Tison S, Compan D, Christiaens F *et al.* Alterations in human epidermal Langerhans cells by ultraviolet radiation: quantitative and morphological study. *Br J Dermatol* 2003; 148(2): 291-9.
138. Dumay O, Karam A, Vian L, Moyal D, Hourseau C, Stoebner P *et al.* Ultraviolet A1 exposure of human skin results in Langerhans cell depletion and reduction of epidermal antigen-presenting cell function: partial protection by a broad-spectrum sunscreen. *Br J Dermatol* 2001; 144(6): 1161-8.
139. Dittmar HC, Weiss JM, Termeer CC, Denfeld RW, Wanner MB, Skov L *et al.* In vivo UVA-1 and UVB irradiation differentially perturbs the antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1999; 112(3): 322-5.
140. Rosen CF, Seki Y, Farinelli W, Stern RS, Fitzpatrick TB, Pathak MA *et al.* A comparison of the melanocyte response to narrow band UVA and UVB exposure in vivo. *J Invest Dermatol* 1987; 88(6): 774-9.
141. van Schanke A, Jongsma MJ, Bisschop R, van Venrooij GM, Rebel H, de Gruijl FR. Single UVB overexposure stimulates melanocyte proliferation in murine skin, in contrast to fractionated or UVA-1 exposure. *J Invest Dermatol* 2005; 124(1): 241-7.
142. Breuckmann F, von Kobyletzki G, Avermaete A, Radenhausen M, Hoxtermann S, Pieck C *et al.* Mechanisms of apoptosis: UVA1-induced immediate and UVB-induced delayed apoptosis in human T cells in vitro. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17(4): 418-29.
143. Godar DE, Miller SA, Thomas DP. Immediate and delayed apoptotic cell death mechanisms: UVA versus UVB and UVC radiation. *Cell Death Differ* 1994; 1(1): 59-66.

144. Plotz SG, Abeck D, Seitzer U, Hein R, Ring J. UVA1 for hypereosinophilic syndrome. *Acta Derm Venereol* 2000; 80(3): 221.
145. Gobello T, Mazzanti C, Sordi D, Annessi G, Abeni D, Chinni LM *et al.* Medium-versus high-dose ultraviolet A1 therapy for urticaria pigmentosa: a pilot study. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49(4): 679-84.
146. Stege H, Schopf E, Ruzicka T, Krutmann J. High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa. *Lancet* 1996; 347(8993): 64.
147. Brenneisen P, Briviba K, Wlaschek M, Wenk J, Scharffetter-Kochanek K. Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(3): 515-24.
148. Mempel M, Schmidt T, Boeck K, Brockow K, Stachowitz S, Fesq H *et al.* Changes in collagen I and collagen III metabolism in patients with generalized atopic eczema undergoing medium-dose ultraviolet A1 phototherapy. *Br J Dermatol* 2000; 142(3): 473-80.
149. Lowe NJ, Meyers DP, Wieder JM, Luftman D, Borget T, Lehman MD *et al.* Low doses of repetitive ultraviolet A induce morphologic changes in human skin. *J Invest Dermatol* 1995; 105(6): 739-43.
150. Polderman MC, le Cessie S, Huizinga TW, Pavel S. Efficacy of UVA-1 cold light as an adjuvant therapy for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(11): 1402-4.
151. Breuckmann F, Stuecker M, Altmeyer P, Kreuter A. Modulation of endothelial dysfunction and apoptosis: UVA1-mediated skin improvement in systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 2004; 296(5): 235-9.
152. Harbour R, Miller J. A new system for grading recommendations in evidence based guidelines. *Bmj* 2001; 323(7308): 334-6.
153. van der Heijde D, Aletaha D, Carmona L, Edwards CJ, Kvien TK, Kouloumas M *et al.* 2014 Update of the EULAR standardised operating procedures for EULAR-endorsed recommendations. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(1): 8-13.
154. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87(2): 171.
155. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 725-31.
156. Nadiri A, Wolinski MK, Saleh M. The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol* 2006; 177(7): 4239-45.
157. Yamamoto T, Nishioka K. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004; 122(1): 44-50.
158. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(10): 7320-6.
159. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86(1): 147-57.
160. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6(5): 513-9.

161. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1533-44.
162. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5): 405-13.
163. Skov L, Hansen H, Allen M, Villadsen L, Norval M, Barker JN *et al.* Contrasting effects of ultraviolet A1 and ultraviolet B exposure on the induction of tumour necrosis factor-alpha in human skin. *Br J Dermatol* 1998; 138(2): 216-20.
164. Krutmann J, Czech W, Diepgen T, Niedner R, Kapp A, Schopf E. High-dose UVA1 therapy in the treatment of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(2 Pt 1): 225-30.
165. Kerscher M, Dirschka T, Volkenandt M. Treatment of localised scleroderma by UVA1 phototherapy. *Lancet* 1995; 346(8983): 1166.
166. Stege H, Berneburg M, Humke S, Klammer M, Grewe M, Grether-Beck S *et al.* High-dose UVA1 radiation therapy for localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36(6 Pt 1): 938-44.
167. Kerscher M, Volkenandt M, Gruss C, Reuther T, von Kobyletzki G, Freitag M *et al.* Low-dose UVA phototherapy for treatment of localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38(1): 21-6.
168. Camacho NR, Sanchez JE, Martin RF, Gonzalez JR, Sanchez JL. Medium-dose UVA1 phototherapy in localized scleroderma and its effect in CD34-positive dendritic cells. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45(5): 697-9.
169. Kreuter A, Hyun J, Stucker M, Sommer A, Altmeyer P, Gambichler T. A randomized controlled study of low-dose UVA1, medium-dose UVA1, and narrowband UVB phototherapy in the treatment of localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(3): 440-7.
170. Sator PG, Radakovic S, Schulmeister K, Honigsmann H, Tanew A. Medium-dose is more effective than low-dose ultraviolet A1 phototherapy for localized scleroderma as shown by 20-MHz ultrasound assessment. *J Am Acad Dermatol* 2009; 60(5): 786-91.
171. Andres C, Kollmar A, Mempel M, Hein R, Ring J, Eberlein B. Successful ultraviolet A1 phototherapy in the treatment of localized scleroderma: a retrospective and prospective study. *Br J Dermatol* 2010; 162(2): 445-7.
172. Su O, Onsun N, Onay HK, Erdemoglu Y, Ozkaya DB, Cebeci F *et al.* Effectiveness of medium-dose ultraviolet A1 phototherapy in localized scleroderma. *Int J Dermatol* 2011; 50(8): 1006-13.
173. Tuchinda C, Kerr HA, Taylor CR, Jacobe H, Bergamo BM, Elmetts C *et al.* UVA1 phototherapy for cutaneous diseases: an experience of 92 cases in the United States. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2006; 22(5): 247-53.
174. Rombold S, Lobisch K, Katzer K, Graziotin TC, Ring J, Eberlein B. Efficacy of UVA1 phototherapy in 230 patients with various skin diseases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008; 24(1): 19-23.
175. Gruss CJ, Von Kobyletzki G, Behrens-Williams SC, Lininger J, Reuther T, Kerscher M *et al.* Effects of low dose ultraviolet A-1 phototherapy on morphea. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2001; 17(4): 149-55.

176. Jacobe HT, Cayce R, Nguyen J. UVA1 phototherapy is effective in darker skin: a review of 101 patients of Fitzpatrick skin types I-V. *Br J Dermatol* 2008; 159(3): 691-6.
177. El-Mofty M, Mostafa W, Esmat S, Youssef R, Bousseila M, Nagi N *et al.* Suggested mechanisms of action of UVA phototherapy in morphea: a molecular study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20(2): 93-100.
178. Pereira N, Santiago F, Oliveira H, Figueiredo A. Low-dose UVA(1) phototherapy for scleroderma: what benefit can we expect? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26(5): 619-26.
179. von Kobyletzki G, Uhle A, Pieck C, Hoffmann K, Altmeyer P. Acrosclerosis in patients with systemic sclerosis responds to low-dose UV-A1 phototherapy. *Arch Dermatol* 2000; 136(2): 275-6.
180. Morita A, Kobayashi K, Isomura I, Tsuji T, Krutmann J. Ultraviolet A1 (340-400 nm) phototherapy for scleroderma in systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43(4): 670-4.
181. Kreuter A, Breuckmann F, Uhle A, Brockmeyer N, Von Kobyletzki G, Freitag M *et al.* Low-dose UVA1 phototherapy in systemic sclerosis: effects on acrosclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50(5): 740-7.
182. Rose RF, Turner D, Goodfield MJ, Goulden V. Low-dose UVA1 phototherapy for proximal and acral scleroderma in systemic sclerosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009; 25(3): 153-5.
183. Tewari A, Garibaldinos T, Lai-Cheong J, Groves R, Sarkany R, Branislav Novakovic L. Successful treatment of microstomia with UVA1 phototherapy in systemic sclerosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2011; 27(2): 113-4.
184. Hassani J, Feldman SR. Phototherapy in Scleroderma. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2016; 6(4): 519-53.
185. Zandi S, Kalia S, Lui H. UVA1 phototherapy: a concise and practical review. *Skin Therapy Lett* 2012; 17(1): 1-4.
186. McGrath H, Jr. Ultraviolet A1 (340-400 nm) irradiation and systemic lupus erythematosus. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; 4(1): 79-84.
187. Wallenfang K, Stadler R. [Association between UVA1 and PUVA bath therapy and development of malignant melanoma]. *Hautarzt* 2001; 52(8): 705-7.
188. Calzavara-Pinton P, Monari P, Manganoni AM, Ungari M, Rossi MT, Gualdi G *et al.* Merkel cell carcinoma arising in immunosuppressed patients treated with high-dose ultraviolet A1 (320-400 nm) phototherapy: a report of two cases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2010; 26(5): 263-5.
189. Reich A, Medrek K. Effects of narrow band UVB (311 nm) irradiation on epidermal cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14(4): 8456-66.
190. Moura Valejo Coelho M, Matos TR, Apetato M. The dark side of the light: mechanisms of photocarcinogenesis. *Clin Dermatol* 2016; 34(5): 563-70.
191. Lisby S, Gniadecki R, Wulf HC. UV-induced DNA damage in human keratinocytes: quantitation and correlation with long-term survival. *Exp Dermatol* 2005; 14(5): 349-55.
192. Macve JC, Norval M. The effects of UV waveband and cis-urocanic acid on tumour outgrowth in mice. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1(12): 1006-11.

193. Inada SA, Amano H, Akasaki I, Morita A, Kobayashi K. Effect of UV irradiation on the apoptosis and necrosis of Jurkat cells using UV LEDs. *Proc SPIE* 2009;7231:1-6.
194. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 676-82.
195. Brianezi G, Grandi F, Bagatin E, Enokihara MM, Miot HA. Dermal type I collagen assessment by digital image analysis. *An Bras Dermatol* 2015; 90(5): 723-7.
196. Glebov OK, McKenzie KE, White CA, Sukumar S. Frequent p53 gene mutations and novel alleles in familial breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54(14): 3703-9.
197. Khodaeiani E, Fakhrjou A, Amirnia M, Babaei-Nezhad S, Taghvamanesh F, Razzagh-Karimi E *et al.* Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki67 expression in skin epithelial tumors. *Indian J Dermatol* 2013; 58(3): 181-7.
198. van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998; 51(10): 716-24.
199. Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2007; 9(2): 136-43.
200. Ju M, Chen K, Chang B, Gu H. UVA1 irradiation inhibits fibroblast proliferation and alleviates pathological changes of scleroderma in a mouse model. *Journal of Biomedical Research* 2012; 26(2): 135-42.
201. Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Settas L, Zafiriou E, Sakkas L. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(8): 1233-5.
202. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A *et al.* Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(21): 12319-24.
203. Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(6): 478-86.
204. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008; 9(11): 1215-23.
205. Gospodarowicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 1986; 128(3): 475-84.
206. Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR. Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 1994; 152(12): 5860-7.
207. Mikita N, Kanazawa N, Yoshimasu T, Ikeda T, Li HJ, Yamamoto Y *et al.* The protective effects of ultraviolet A1 irradiation on spontaneous lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice. *Clin Dev Immunol* 2009; 2009:9.
208. Guhl S, Hartmann K, Tapkenhinrichs S, Smorodchenko A, Grutzkau A, Henz BM *et al.* Ultraviolet irradiation induces apoptosis in human immature, but not in skin mast cells. *J Invest Dermatol* 2003; 121(4): 837-44.
209. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2001; 44(7): 1667-76.

210. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(10): 2230-9.
211. Yamamoto T, Yokozeiki H, Nishioka K. Fas- and FasL-deficient mice are resistant to the induction of bleomycin-induced scleroderma. *Arch Dermatol Res* 2007; 298(9): 465-8.
212. Kim JY, Kwok SK, Hur KH, Kim HJ, Kim NS, Yoo SA *et al.* Up-regulated macrophage migration inhibitory factor protects apoptosis of dermal fibroblasts in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2008; 152(2): 328-35.
213. Chabaud S, Moulin VJ. Apoptosis modulation as a promising target for treatment of systemic sclerosis. *Int J Rheumatol* 2011; 2011:13.
214. Tuchinda C, Lim HW, Strickland FM, Guzman EA, Wong HK. Comparison of broadband UVB, narrowband UVB, broadband UVA and UVA1 on activation of apoptotic pathways in human peripheral blood mononuclear cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23(1): 2-9.
215. Cipriani P, Fulminis A, Pingiotti E, Marrelli A, Liakouli V, Perricone R *et al.* Resistance to apoptosis in circulating alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006; 33(10): 2003-14.
216. Yamauchi R, Morita A, Yasuda Y, Grether-Beck S, Klotz LO, Tsuji T *et al.* Different susceptibility of malignant versus nonmalignant human T cells toward ultraviolet A-1 radiation-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* 2004; 122(2): 477-83.
217. Okazaki S, Ogawa F, Iwata Y, Hara T, Muroi E, Komura K *et al.* Autoantibody against caspase-3, an executioner of apoptosis, in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2010; 30(7): 871-8.
218. Maeda T, Yamamoto T, Imamura T, Tsuboi R. Impaired wound healing in bleomycin-induced murine scleroderma: a new model of wound retardation. *Arch Dermatol Res* 2016; 308(2): 87-94.
219. Edstrom DW, Porwit A, Ros AM. Effects on human skin of repetitive ultraviolet-A1 (UVA1) irradiation and visible light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2001; 17(2): 66-70.
220. Gambichler T, Rotterdam S, Tigges C, Altmeyer P, Bechara FG. Impact of ultraviolet radiation on the expression of marker proteins of gap and adhesion junctions in human epidermis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008; 24(6): 318-21.
221. Ansarin H, Daliri M, Soltani-Arabshahi R. Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol* 2006; 16(5): 543-7.
222. Yamamoto T, Nishioka K. Increased expression of p53 and p21 (Waf1/Cip1) in the lesional skin of bleomycin-induced scleroderma. *Arch Dermatol Res* 2005; 296(11): 509-13.
223. Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer* 2011; 2(4): 503-16.
224. Burren R, Scaletta C, Frenk E, Panizzon RG, Applegate LA. Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following

- UVA I, UVA I + II and solar simulating radiations. *Int J Cancer* 1998; 76(2): 201-6.
225. Seite S, Moyal D, Verdier MP, Hourseau C, Fourtanier A. Accumulated p53 protein and UVA protection level of sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16(1): 3-9.
226. de Laat A, Kroon ED, de Gruijl FR. Cell cycle effects and concomitant p53 expression in hairless murine skin after longwave UVA (365 nm) irradiation: a comparison with UVB irradiation. *Photochem Photobiol* 1997; 65(4): 730-5.
227. De Fabo EC, Noonan FP, Fears T, Merlino G. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res* 2004; 64(18): 6372-6.
228. Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Busch N, Zwerina J, Schett G *et al.* Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(1): 219-24.
229. Distler JH, Jungel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE *et al.* Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(1): 311-22.
230. Xiang Y, Liu G, Yang L, Zhong JL. UVA-induced protection of skin through the induction of heme oxygenase-1. *Biosci Trends* 2011; 5(6): 239-44.
231. Tyrrell RM, Reeve VE. Potential protection of skin by acute UVA irradiation--from cellular to animal models. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92(1): 86-91.
232. Nisar MF, Parsons KS, Bian CX, Zhong JL. UVA irradiation induced heme oxygenase-1: a novel phototherapy for morphea. *Photochem Photobiol* 2015; 91(1): 210-20.
233. Kirk TZ, Mark ME, Chua CC, Chua BH, Mayes MD. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 1995; 270(7): 3423-8.
234. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994; 103(3): 359-63.
235. Yin L, Yamauchi R, Tsuji T, Krutmann J, Morita A. The expression of matrix metalloproteinase-1 mRNA induced by ultraviolet A1 (340-400 nm) is phototherapy relevant to the glutathione (GSH) content in skin fibroblasts of systemic sclerosis. *J Dermatol* 2003; 30(3): 173-80.
236. Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K. UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 1993; 2(2): 92-7.
237. Hugel T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis. *Swiss Med Wkly* 2014; 144: w13999.
238. Dooley A, Low SY, Holmes A, Kidane AG, Abraham DJ, Black CM *et al.* Nitric oxide synthase expression and activity in the tight-skin mouse model of fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(3): 272-80.

11. PRIEDAI

1 priedas. Valstybinės akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnybos prie Sveikatos apsaugos ministerijos teikimas atlikti medicinos prietaiso klinikinius tyrimus



VALSTYBINĖ AKREDITAVIMO SVEIKATOS PRIEŽIŪROS VEIKLAI TARNYBA PRIE SVEIKATOS APSAUGOS MINISTERIJOS

Biudžetinė įstaiga, buveinė Jeruzalės g. 21, LT-08420 Vilnius, tel. (8 5) 261 5177, faks. (8 5) 212 7310,
el. paštas vaspvt@vaspvt.gov.lt, interneto svetainė www.vaspvt.gov.lt.
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 191352247

Valstybinis mokslinių tyrimų institutas	2015- <i>M-0A</i>	Nr. D2- <i>Kally</i> -(5.19.)
Inovatyvios medicinos centras	2015-08-17	pranešimą
Žygimantų g. 9,	(2015-08-19)	(Nr. S8-5)
LT-01102 Vilnius		

El. pastas imc@imcentras.lt

DĖL TEIKIMO ATLIKTI MEDICINOS PRIETAISO KLINIKINIUS TYRIMUS IŠDAVIMO

Valstybinė akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnyba prie Sveikatos apsaugos ministerijos (toliau – Akreditavimo tarnyba) įvertino įmonės *Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centro* 2015 m. rugpjūčio 19 d. pateiktą pranešimą apie medicinos prietaiso – *Šviesos šaltinio „IMC-Light“* - klinikinius tyrimus. Informuojame, kad vadovaujantis Akreditavimo tarnybos direktoriaus 2014 m. gruodžio 19 d. įsakymu Nr. T1-1913 „Dėl teikimų atlikti medicinos prietaisų klinikinius tyrimus išdavimo tvarkos aprašo patvirtinimo“ patvirtinto Teikimų atlikti medicinos prietaisų klinikinius tyrimus išdavimo tvarkos aprašo 14 punktu, įmonei *Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centrai* išduodamas Teikimas atlikti medicinos prietaiso klinikinius tyrimus Nr. S8-5-15. Taip pat pranešame, kad pranešimas apie vykdomus klinikinius tyrimus yra įregistruotas Europos medicinos prietaisų duomenų banke EUDAMED, klinikinio tyrimo identifikacinis numeris (CIV-ID): CIV-15-10-013898.

PRIDEDAMA. Teikimas atlikti medicinos prietaiso klinikinius tyrimus, 2015-10-30 Nr. S8-5-15, 1 lapas, 1 egz.

Direktorė

Nora Ribokiene

S. Dainiuvienė, tel. (8 5) 261 5177 el. paštas: saulc.dainiuviene@vaspvt.gov.lt
R. Talalajevskis, tel. (8 5) 261 5177 el. paštas: romanas.talalajevskis@vaspvt.gov.lt

1 priedas. Valstybinės akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnybos prie Sveikatos apsaugos ministerijos teikimas atlikti medicinos prietaiso klinikinius tyrimus (tęsinys)



VALSTYBINĖ AKREDITAVIMO SVEIKATOS PRIEŽIŪROS VEIKLAI TARNYBA
PRIE SVEIKATOS APSAUGOS MINISTERIJOS

Biudžetinė įstaiga, buveinė Jeruzalės g. 21, LT-08420 Vilnius, tel. (8 5) 261 5177, faks. (8 5) 212 7310,
el. paštas vaspvt@vaspvt.gov.lt, interneto svetainė www.vaspvt.gov.lt.
Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 191352247

TEIKIMAS
ATLIKTI MEDICINOS PRIETAISO KLINIKINIUS TYRIMUS

2015-10-30 Nr. S8-5-15

(Sudarymo data)

Vilnius

(Sudarymo vieta)

Gamintojo pavadinimas	Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras
Gamintojo adresas	Žygimantų g. 9, LT-01102 Vilnius
Medicinos prietaiso pavadinimas	Šviesos šaltinis
Tipas, modelis	IMC-Light
Pagrindinis tyrėjas	Dr. Rita Rugienė
Tyrimo atlikimo vieta	VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos, Santariškių g. 2, LT-08661, Vilnius
Tiriamų prietaisų skaičius	1
Tyrimo dalyvaujančių pacientų skaičius	90
Tyrimo pradžia ir numatoma trukmė	2016-01-02, numatoma trukmė 3 metai

Pastaba. Jei medicinos prietaise yra žmogaus kraujo produktų ir/ar vaistų, jų kokybė ir sauga nėra įvertinta.

Pranešimą dėl medicinos prietaisų klinikinių tyrimų atlikti pateikė:

Valstybinio mokslinių tyrimų instituto
Inovatyvios medicinos centras

(juridinio asmens pavadinimas)

Žygimantų g. 9, LT-01102 Vilnius

(juridinio asmens duomenys)

Direktorė

(įstaigos vadovo ar jo pareigas einančio asmens pareigos)



Nora Ribokienė

(vardas ir pavardė)

2 priedas. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą

Valstybinis mokslinių tyrimų institutas
Inovatyvios medicinos centras
GAUTA
2014 m. 07 mėn. 04 d.
Nr. 8-117
VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA
LEIDIMAS ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROCEDŪRŲ PROJEKTĄ

2014-08-01/Nr. G2-15
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2014-07-28 išvada Nr. 9 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“, l e i d ž i a m a

Valstybinio mokslinių tyrimų institutui Inovatyvios medicinos centrai

įsteigto kalifikacijos kėlimo (arba) mokymo uždavaniai leidimas atlikti bandymus su gyvūnais procedūrų projektą.

Molėtų pl. 29, LT-01102 Vilnius, 302877556,

adresas (arba) kodas (arba) juridinių asmenų registre

atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą

„UVA1 skirtingų šviesos dozių poveikio vertinimas bleomicinu sukeltame pelių eksperimentinės sisteminės sklerozės modelyje“;

(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto pavadinimas, vadovai, naudojami gyvūnai)

vadovė Gailutė Kirdaitė, naudojant 60 linijinių pelių,

Valstybinio mokslinių tyrimų institutui Inovatyvios medicinos centrai, Molėtų pl. 29, Vilnius.

(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto atlikimo vietos pavadinimas, adresas)

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą galioja iki 2015 m. gruodžio 31 d.

Direktorius

Jonas Milius

3 priedas. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA
LEIDIMAS ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROCEDŪRŲ PROJEKTĄ

2016-04-25 Nr. G2-42
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2016-04-21 išvada Nr. 4 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“,
l e i d i a m a

Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centrui,

(tikro subjekto (-ų), kuriam (-iems) išduotas leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą,

Molėtų pl. 29, Vilnius, 302877556,

adresas (-ai), kodas (-ai) Juridinių asmenų registre)

atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą

„UVA1 skirtingų šviesos dozių poveikio vertinimas bleomicinu sukeltame pelių eksperimentiniame sisteminės sklerozės modelyje“,

(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto pavadinimas, vadovas, naudojami gyvūnai)

projekto vadovė Rūta Bradūnaitė, naudojant 42 peles,

Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centre, Molėtų pl. 29, Vilnius.

(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto atlikimo vietos pavadinimas, adresas)

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą galioja iki 2017 m. gruodžio 31 d.

Direktoriaus pavaduotojas



Vidmantas Paulauskas