

## MOLEKULINIO IR LĄSTELINIO IMUNITETO TYRIMAI BIOLOGINIUIOSE MODELIUIOSE IN VITRO IR IN VIVO

**1. Programos vykdytojas** - Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras (toliau – IMC).

Norminiai etatai skirti programai – 9.

**2. Programos tikslas** - gauti naujų mokslo tyrimais pagrįstų žinių reikalingų inovatyvios medicinos technologijų bei biotechnologijų plėtrai.

Tyrimų principas - kompleksiskumas, apimantis molekulinis ir ląstelinius imuniteto tyrimus biomodeliuose *in vitro* ir *in vivo*, laboratorinių gyvūnų ir alternatyvių tyrimo metodų taikymas žmogaus ligų modeliavimui, naujų biologiškai aktyvių medžiagų bei ląstelių biologinio poveikio tyrimams, antikūnų kūrimas ir taikymas bioanalitinių test-metodų kūrimui ir tobulinimui. Pagrindinės tyrimų kryptys - autoimuninių, alerginių, onkologinių ligų ląstelių ir molekulinis imuniteto mechanizmų tyrimai; biologiškai aktyvių medžiagų, imunomoduliatorių tyrimai ląstelių kultūrose ir biomodeliuose *in vivo*; nanotechnologinių metodų taikymas biomediciniuose tyrimuose.

### **3. Programos uždaviniai:**

3.1. Tirti imuninės sistemos ląstelių (dendritinių ląstelių, natūralių kilerių, natūralių kilerinių T limfocitų, citotoksinių T limfocitų, mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių, citokinų) funkcionavimo mechanizmus biologiniuose modeliuose, tikslu surasti diagnostikai vertingus biožymenis, bei giliau pažinti patologinius procesus.

Panaudojant *in vivo* optinio vaizdinimo metodus, biologiniuose modeliuose bus tiriami veiksniai nuo kurių priklauso efektorinių T limfocitų proliferacija ir migracija į pakenkimo židinių. Bus atliktas pelių T limfocitų donorų ląstelių, kokybės įvertinimo ir kultivavimo/stimuliacijos metodikos paruošimas.

Bus atliekamas adaptacinės imunoterapijos metodologijos paruošimas, imuninės sistemos parametrų tyrimas eksperimentinės terapijos laike. Optimalių imuniteto parametrų stebėsenai parinkimas ir vertinimas, kuriamos adaptacinės T ląstelių terapijos technologijos biomodeliuose.

Bus tiriami T reguliacinių limfocitų subpopuliacijų kiekybiniai skirtumai biomodeliuose normoje ir adaptacinės imunoterapijos metu pažeidimo židinyje ir periferiniame kraujyje. Bus įvertintas Treg funkcinis aktyvumas/gebėjimas slopinti CD8<sup>+</sup> T limfocitų IFN $\gamma$  sekreciją. Imuninės sistemos ląstelių kiekybinės charakteristikos bus tiriamos naudojant TissueGnostics skaitmeninės mikroskopijos platformą ir TissueFAXS programinę įrangą. Imuninės sistemos ląstelių funkcinės charakteristikos bus tiriamos naudojant ELISPOT metodiką.

3.2. Su G baltymais asocijuotų receptorių ir jų ligandų (melatonino) funkcijų įtakos imuninės sistemos ląstelėms (tęstiniai tyrimai), bei humoralinio ir ląstelinio imuniteto virusinių (parvovirus B19 bei Candida mielių) infekcijų atvejais tyrimai.

Mokslo literatūroje aprašyta labai daug G-baltymais asocijuotų receptorių, kurių funkcijos dar nėra galutinai iširtos. Daugumos tokių receptorių detali ekspresija bei funkcijos imuninės sistemos ląstelėse yra nežinomos. Todėl vienas iš uždavinių yra tyrinėti su G baltymais asocijuotų receptorių ir jų ligandų funkcijas imuninės sistemos ląstelėse. Vienas iš tokių ligandų yra melatoninas. Melatoninas sintetinamas tamsiu paros metu, o šviesa jo sintezę inhibuoja). Melatoninas reguliuoja cirkadinius ritmus ląstelių ciklą, ląstelių proliferaciją, apoptozę, citoskeleto reorganizaciją, pasižymi antioksidantiniu, imunomoduliaciniu poveikiu. Jau nustatyta, kad melatonino sintezės sutrikimai yra susiję su vėžiniais susirgimais bei autoimuninėmis ligomis (Carrillo-Vico, Guerrero et al. 2005). Melatoninas veikia ląsteles per 3 tipų receptorius: membraninius MT1 ir MT2, citozolinį MT3/Q2 ir branduolinius receptorius ROR $\alpha$ , ROR $\beta$ , ROR $\gamma$  (Hardeland, Cardinali et al. 2011). Tačiau apie tai, kurie receptoriai už kurias melatonino funkcijas yra atsakingi moduluojant imuninį atsaką yra tyrimų stadijoje. Bus tiriamas melatonino įtaka granuliocitų migracijai į infekcijos vietas, melatonino receptorių raiška,

o taip pat jo poveikis fagocitinių ląstelių deguonies ir azoto laisvų radikalų produkcijai bei fagocitozei. Bus atliekami alerginio kontaktinio dermatito imunologinių mechanizmų tyrimai bei potencialių molekulinų ir ląstelinų biožymenų paieška.

3.3. Gamtinių imunomoduliatorių (pagrindiniai beta gliukanų) tyrimai *in vivo* ir *in vitro* modelinėse sistemose, tikslu sudaryti optimalią biologiškai/farmakologiškai veiksmingą beta gliukanų „vaisto“ kompoziciją.

Bus toliau vykdoma gamtinių biologiškai aktyvių junginių paieška ir panaudojimo galimybių imunomoduliacijai laboratorinių gyvūnų modeliuose tyrimas, atliekama fotometrinių imunoglobulinų charakteristika, tiriamas augalinių preparatų moduliacinis poveikis uždegimui bei imuniniam atsakui ir oksidaciniam stresui, tiriamas polisacharidų (skirtingo molekulinio svorio beta-gliukanų) poveikis pelių makrofagams ir dendritinėms ląstelėms *in vitro* ir *in vivo*. Tam tikslui įgyvendinti bus naudojami eksperimentiniai-biologiniai modeliai, atliekamas jų gausinimas standartizavimas

3.4. Imuninių biologinių jutiklių, skirtų antigeno ir antikūno sąveikos registravimui, ir fermentinių biologinių jutiklių, skirtų realiuose mėginiuose esančių analizių nustatymui (pvz.: gliukozės) kūrimas bei tobulinimas.

Didelis dėmesys bus skiriamas kryptingo antikūnų imobilizavimo paviršiuje technologijoms, taip siekiant padidinti imuninio jutiklio jautrį. Taip pat bus siekiama sukurti jautresius ir patogius vartotojui gliukozės jutiklius, panaudojant skirtingai modifikuotus paviršius, imobilizuotus redoks tarpininkus bei įvairius fermentų imobilizavimo metodus (tęstiniai tyrimai).

#### **4. Metodologinis tyrimų pagrindimas:**

Liuceferazę ekspresuojantys limfocitai bus aktyvinami *in vitro* ir *in vivo*. Panaudojant magnetines mikrogranules, bus išskiriamos atskiros limfocitų subpopuliacijos, kurios bus suleidžiamos imunodeficitinėms RAG<sup>-/-</sup> pelėms su autoimuniniais ar navikiniais pažeidimais.

Planuojamuose tyrimuose numatoma gauti daugiau žinių apie imuninės sistemos ląstelių subtipų dalyvavimą ligų patogenezėje. Imuninės sistemos ląstelių migracijos ir proliferacijos *in vivo* tyrimuose bus naudojamos Rag2 pelės. Rag2 pelėse yra mutotas rekombinaciją aktyvuojantis genas 2 (Rag2). Šiose pelėse negali vykti V(D)J persitvarkymas, todėl nesubręsta nei T, nei B limfocitai. Rag2 pelės bus naudojamos kaip imuninės sistemos ląstelių recipientai tirti šių ląstelių funkcinėms savybėms. Imuninės sistemos ląstelių migracija ir proliferacija *in vivo* bus tirama naudojant bioluminescentinio vaizdinimo metodus. Ląstelių ir organų vaizdinimas *in vivo*, naudojant IVIS vaizdinimo sistema.

Su G baltymais asocijuotų receptorių tyrimams bus naudojami eksperimentiniai gyvūnai (BALB/c pelės, Lewis žiurkės). Bus naudoti molekulinės biologijos, ląstelinų kultūrų bei imunologiniai metodai. Prietaisai: boksas, CO2 inkubatorius, tēmės-citometrai, ląstelių sorteris, DNR ir baltymų elektroforezės aparatai, PCR įranga, multiskanas ir pan.

Alerginio kontaktinio dermatito diagnostikai skirtų žymenų paieškai bus tiriami citokinai bei metabolitai ligonių ir sveikų žmonių kraujo serume. Taip pat bus naudojami eksperimentiniai gyvūnų modeliai.

Programos vykdymui bus taikomi šiuolaikiški tyrimų metodai bei priemonės: genetiniai (PGR), klinikiniai, hematologiniai, biocheminiai, imunologiniai metodai: imunofermentinis metodas (ELISA, ELISPOT), imunoelektroforezė, imunodifuzija, patomorfologiniai, histologiniai metodai; audinių kultūros, šviesinė ir fluorescencinė mikroskopija, spektrofotometrija; stereomikroskopija; T ir B limfocitų funkcinio aktyvumo tyrimai; NK ir NKT limfocitų funkcinio aktyvumo tyrimai; Mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių bei supresorinių receptorių tyrimai; dendritiniu ląsteliu brandinimo ir aktyvinimo tyrimai; dendritiniu ląsteliu imunogeninių ir tolerogeninių savybių tyrimai; monokloninių ir polikloninių antikūnų kūrimas; srautinė citometrija; Western blotingas; ląstelių kultūros.

Elektrodo paviršiaus modifikavimas skirtingais metodais, giminingos sąveikos (imuniniai biologiniai jutikliai) ar analizės buvimo biologiniuose mėginiuose (pvz. serume) (fermentiniai biologiniai jutikliai) registravimas optiniais bei elektrocheminiais metodais. Darbe bus naudojamas UV-vis spektrofotometras, elektrocheminė aparatūra bei paviršiaus plazmonų rezonanso įrenginys. Bus tiriami tiesioginiai ir netiesioginiai analizės nustatymo metodai, siekiant sukurti kuo jautresnę analizinę sistemą, skirtą analizių nustatymui biologiniuose mėginiuose.

## 5. Tyrimų etapai ir jų charakteristika; detalus įgyvendinimo planas

Imuninės sistemos ląstelių (dendritinių ląstelių, natūralių kilerių, natūralių kilerinių T limfocitų, citotoksinių T limfocitų, mieloidinės kilmės supresorinių ląstelių ir kt.) diferenciacijos ir funkcinių savybių tyrimai biologiniuose modeliuose. I-as etapas 2017 - 2018 metais.

Ataptyvinės imunoterapijos metodologijos paruošimas, imuninės sistemos parametrų tyrimas eksperimentinės terapijos laike. Optimalių imuniteto parametrų stebėsenai parinkimas ir vertinimas II-etapas 2019 - 2021 metais.

T reguliaciniais limfocitais (Treg) vadinami CD4+ ir CD8+ T limfocitai, kurie slopina kitų imuninės sistemos ląstelių (T ląstelių pagalbininkų, citotoksinių T limfocitų, B limfocitų, NK ląstelių, dendritinių ląstelių, makrofagų) funkcijas, išskirdami citokinus (pvz., IL-10, TGFβ) ar tiesioginio kontakto metu. Imuninį atsaką slopinančiu poveikiu pasižymintiems (imunosupresiniams) limfocitams būdinga tam tikrų nespecifinių žymenų raiška, iš kurių paminėtini CD25 (IL-2 receptoriaus  $\alpha$  grandinė), FoxP3. *forkhead helix box P3*), GITR (angl. *glucocorticoid – induced tumor necrosis factor receptor*), CD103 ( $\alpha 4\beta 7$  integrinas), CTLA-4 (angl. *cytotoxic T lymphocyte late antigen*) ir kt. Įvairių tyrimų rezultatai rodo, kad imunosupresiniu poveikiu pasižymintys Treg limfocitai atlieka itin svarbų vaidmenį autoimuninių, imunodeficitinių bei alerginių ligų patogenezėje, taip pat dalyvauja reguliuojant alotransplantato atmetimo reakcijas bei slopinant priešnavikinį imuninį atsaką (Arosa FA. 2002, André S. et al. 2009, Focosi D. et al. 2010).

Ankstesnių metų tyrimų rezultatai (Juršėnaitė J. et al. 2015; Sudzius G. et al. 2015) parodė, kad imuniteto žymenų vertinimas imunoterapijos bei patologijų atvejais duoda naudingą mokslinę ir praktinę informaciją biomedicinos mokslui.

Su G baltymais asocijuotų receptorių ir jų ligandų (melatonino) funkcijų tyrimas imuninės sistemos ląstelėse: 2017-2021 metais.

Be plačiai žinomų G-baltymais asocijuotų citokinų receptorių, paskutiniaisiais metais yra aprašyti receptoriai, kurie aktyvuojasi fosfolipidais, lipidais, nukleotidais, neuropeptidais, mažos molekulinės masės augalinės kilmės molekulėmis ar net pakitusiu pH. Kai kurių receptorių ligandai visiškai nežinomi. Daugumos tokių receptorių funkcijos ir detali ekspresija imuninės sistemos ląstelėse yra mažai žinoma ar visiškai nežinoma. Vienas tokių ligandų yra melatoninas.

Melatonino vaidmuo imuninei sistemai IMC tiriamas jau keletą metų. Nustatyta, kad melatoninas, veikdamas per MT2 receptorių, moduliuoja antikūnų produkciją ir, kad melatonino koncentracija kraujo serume imunizacijos metu yra labai svarbi antikūnų susidarymui (Cernysiov, Gerasimcik et al. 2010), bei imuninės sistemos ląstelių migracijai į uždegimo vietą (Cernysiov, Mauricas et al. 2011). Buvo iširta melatonino receptorių raišką užkrūčio liaukos, kaulų čiulpų ląstelėse, B bei T limfocituose ir nustatyta, kad melatonino receptorių raiška priklauso nuo cirkadinio laiko, o kai kurių (pvz., MT1 ir MT2) receptorių raiška priklauso nuo melatonino koncentracijos serume. (Cernysiov, Bozaite et al. 2014, Cernysiov, Bozaite et al. 2014). Buvo nustatyta, kad melatoninas inhibuoja granulocitų migraciją, veikdamas per MT2 ir MT3 receptorius (Mauricas, Girkontaite, 2015). Atlikti pirminiai alerginio kontaktinio dermatito biožymenų tyrimai (Zinkevičienė A. et al. 2015, 2016 m.).

Esminiai darbų etapai:

I-as etapas (2017-2019 metai). Alerginio kontaktinio dermatito molekulinį ir ląstelinį biožymenų tyrimas. Melatonino įtakos imuninės sistemos ląstelių adhezijai, migracijai, citokinų produkcijos imuninio atsako laike tyrimas.

II-as etapas (2019-2021 metai). Melatonino įtakos onkologinių ar autoimuninių ligų patogenezėi tyrimas. Melatonino ir jo receptorių raiškos imuninėse ląstelėse senėjimo laike tyrimai. Naujų ir esamų laikmečiu svarbių biomolekulių funkcijų imuninei sistemai tyrimai.

Gamtinių imunomoduliatorių tyrimai in vivo ir in vitro modelinėse sistemose. Eksperimentiniai-jūrų kiaulytės, triušiai išauginti mūsų centre. Biologiniai modeliai ir jų standartizavimas.

Laboratorinių gyvūnų, kaip modelio, naudojimas glaudžiai susijęs su biologijos, medicinos, veterinarijos mokslų raida. Šių mokslo sričių moksliniuose tyrimuose naudojami: linijinės pelės BALB/c, CBA, DBA/2, CC57W, C57Bl/6J inbridinių linijų, Wistar, Lewis populiacijos žiurkės, Eksperimentų kokybė su jais priklauso nuo gyvūnų genotipo ir fenotipo, todėl nuolat atliekami genetiniai, klinikiniai, hematologiniai, imunologiniai, biocheminiai gyvūnų tyrimai. Reciprokinės izotransplantacijos metodu ir PGR metodais vertinamas inbridinių gyvūnų genotipas,

skaičiuojami inbrydingo koeficientai, vedama linijų geneologija. I ir II etapai (2017-2021 metai). Biomodelių panaudojimas *in vitro* ir *in vivo* modelinėse sistemose: Biologiškai aktyvių medžiagų, imunomoduliatorių tyrimai *in vivo* modelinėse sistemose; Ląstelių kultūrų panaudojimas biologiškai aktyvių medžiagų tyrimams (alternatyvių tyrimo metodų taikymas) - imunomoduliacinėmis savybėmis pasižyminčių medžiagų tyrimai ląstelių kultūrose; ląstelių kultūrų panaudojimas ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir žūties mechanizmų tyrimams.

Biologinių jutiklių skirtų antigeno ir antikūno sąveikos registravimui kūrimas bei tobulinimas, atliekant kryptingą antikūnų imobilizavimą paviršiuje. Modifikuojant elektrodą fermentiniam biologiniam jutikliui, didelis dėmesys skiriamas tinkamų red-oks tarpininkų parinkimui bei fermento imobilizavimui. Geriausi biologiniai jutikliai bus ištirti biologiniuose mėginiuose).

I-as etapas (2017-2020 metai). Imuninių ir fermentinių biologinių jutiklių kūrimas.

II-as etapas (2020-2021 metai). Imuninių ir fermentinių biologinių jutiklių tyrimas biologiniuose mėginiuose.

#### **6. Numatomi rezultatai:**

6.1. Remiantis tyrimų duomenimis sieksime įvertinti citotoksinių, dendritinių ir supresorinių reguliacinių ląstelių kiekybinius skirtumus bei jų imuninį atsaką slopinančias savybes (supresorinius receptorius) patologijų atvejais, lyginant su sveikais individualais.

6.2. Ištirtas melatonino (ir galimai kitų ligandų) vaidmuo moduluojant imuninį atsaką.

6.3. Tikimasi surasti alerginio kontaktinio dermatito diagnostikai vertingą žymenį.

6.4. Pateikiami standartizuoti biomodeliai eksperimentams *in vivo*.

6.5. Ištirti nauji preparatai (sudaryti beta gliukanų pagrindu bendradarbiaujant su UAB „Biocentras“) išaiškintos jų imunomoduliacinės, priešartritinės, priešvėžinės savybės.

6.6. Sukurti imuninių ir fermentinių biologinių jutiklių modeliai. Įvertintas jų tinkamumas analizei biologiniuose mėginiuose. Ištirtas biologinių jutiklių jautris, nustatymo bei aptikimo ribos, stabilumas ir galimybė panaudoti daugkartiniams matavimams.

6.7. Planuojame gautus rezultatus publikuoti ISI Web of Science sąrašo žurnaluose su citavimo indeksu po 3-4 straipsnius metuose.

6.8. Plėtojamos biologijos krypties doktorantūros studijos, numatoma 4-6 doktorantai. Planuojama, kad šios programos rezultatų pagrindu bus apginta iki 4 mokslo daktaro disertacijų.

#### **7. Rezultatų sklaidos priemonės:**

Pranešimai bei dalyvavimas tarptautinėse mokslinėse konferencijose (ne mažiau kaip po 3 pranešimus kasmet). Programos vykdytojai aktyviai dalyvaus Lietuvos imunologų draugijos veikloje, viešindami savo veiklos rezultatus draugijos organizuojamuose renginiuose. Rezultatų sklaidos veikla apims ir kitas įprastas priemones: mokslo populiarinimo straipsnius populiarioje spaudoje, prisakymus žiniasklaidai ir pan.

#### **8. Preliminarus programos lėšų paskirstymas (tūkst. Eur)**

Eil. Nr.	Išlaidų pavadinimas	2017 metais	2018 metais	2019 metais	2020 metais	2021 metais	Visai programai (suma)
1.	Programai skirti norminiai etatai, lėšos	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	9 etatai 86,3	431,5
2.	Kitos lėšos planuojamos programai vykdyti (iš kitų, institutui skirtų valstybės biudžeto bazinio finansavimo lėšų)	284,7	284,7	284,7	284,7	284,7	1 423,5
	Iš viso	371	371	371	371	371	1 855

#### **9. Programos trukmė 2017 - 2021 metai**

**10. Programos vadovas:** dr. Mykolas Mauricas, Imunologijos skyriaus vedėjas, vyriausiasis mokslo darbuotojas, Tel.: (8 5) 2469248; E. paštas: [mykolas.mauricas@imcentras.lt](mailto:mykolas.mauricas@imcentras.lt)

**NAUJOS KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ IR REKOMBINANTINIŲ MOLEKULIŲ  
TECHNOLOGIJOS AUDINIŲ INŽINERIJAI IR REGENERACINEI MEDICINAI**

**1. Programos vykdytojas** - Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras (toliau – IMC).

Norminiai etatai skirti programai – 10.

**2. Programos tikslas** - vykdyti fundamentinius ir taikomojus mokslinius tyrimus siekiant kurti ir tobulinti naujas inovatyvias kamieninių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių, rekombinantinių molekulių gamybos, audinių inžinerijos ir regeneracinės medicinos technologijas.

**3. Programos uždaviniai:**

3.1. Siekdami programos tikslo kamieninių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių, bei audinių inžinerijos ir regeneracinės medicinos tyrimų kryptyje iškelėme šiuos uždavinius:

3.1.1. Vykdyti fundamentinius pliuripotentiškumo ir diferenciacijos molekulinį mechanizmų tyrimus šiam tikslui panaudojant žmogaus (neembrioninės kilmės) ir gyvūnų kamienines ląsteles.

3.1.2. Tirti endogeninius audinių reparacijos mechanizmus panaudojant kamieninių ląstelių produkuojamus veiksnius.

3.1.3. Kurti naujos kartos terapijos technologijas panaudojant kamieninių ląstelių produkuojamus veiksnius.

3.1.4. Tirti kamieninių ląstelių ir jų mikroaplinkos (kitų tipų ląstelių ir tarpląstelinio užpildo) sąveikos mechanizmus panaudojant naujos kartos audinių inžinerijos metodus (230 tūkst Eur).

3.1.5. Tirti natūralių ir sintetinių karkasų panaudojimo galimybes audinių rekonstrukcijai įvairių patologinių būklių metu.

3.1.6. Vykdyti skirtingo diferenciacijos laipsnio pelių kamieninių ląstelių funkcijos tyrimus in vivo.

3.2. Kita programos darbo kryptis susijusi su rekombinantinių terapinės paskirties baltymų technologijų kūrimu. Keliamas tikslas sukurti pažangias sulietų baltymų valymo technologijas ir panaudoti jas terapiškai svarbių naujų baltymų gamybai ir išgryninimui. Siekiant numatyto tikslo šioje tyrimų kryptyje keliami uždaviniai:

3.2.1. Atrinkti bakterinius kamienus, kurie garantuoja maksimalų naujai sukurtų rekombinantinių SUMO DNR konstruktų stabilumą ir pagaminti, charakterizuoti bakterinių kamienų bankus bei užtikrinti jų ilgalaikį išlaikymą. Eksperimentiškai patikrinti SUMO technologijos pagrindu gaminamų baltymų raišką, tirpumą ir stabilumą.

3.2.2. Klonuoti SUMO proteazės geną ir atlikti analogiškus bakterinių kamienų tyrimus, užtikrinant SUMO proteazės geno stabilumą ir bakterinio banko sukūrimą bei charakterizavimą.

3.2.3. Pagaminti bakterijose SUMO proteazę ir ją išgryninti, naudojant chromatografijos metodus. Sukurti metodus SUMO proteazės kiekiui ir aktyvumui nustatyti ir panaudoti juos charakterizuojant rekombinantinę SUMO proteazę (UV VIS, fluorescencija, elektroforezė ir fermentinio aktyvumo įvertinimas).

3.2.4. Panaudoti SUMO proteazę sulietų su SUMO baltymų kirpimui ir išvalymui.

**4. Metodologinis tyrimų pagrindimas:**

4.1. Kamieniškumu pasižyminčių ląstelių išskyrimas iš suaugusio organizmo audinių (pvz., žmogaus placentos, žmogaus periferinio kraujo, įvairių pelės organų) vadovaujantis jau aprašytomis metodikomis ir jas modifikuojant.

4.2. Saugaus ir efektyvaus ląstelių auginimo ir dauginimo *ex vivo* tyrimai: auginimo terpių priedų, aplinkos atmosferos sudėties, paviršiaus dangos ir auginimo aplinkos formos įtakos stebėjimas.

4.3. Paviršiaus ir viduląstelinio kamieniškumo ir/arba specializacijos žymenų paieška tėkmės citometrijos, genų raiškos ir baltymų profilio tyrimų pagalba; mikroskopiniai gyvų ir fiksuotų

kultūrų tyrimai; funkciniai mėginiai *in vitro* (migracijos, kontraktiškumo, impulso perdavimo, barjerinio sluoksnio sudarymo, vamzdinių struktūrų formavimo ir kt. mėginiai).

4.4. Kelių tipų ląstelių auginimas kartu mišinyje, atskirais sluoksniais viename inde, ant nanostruktūriškai skirtingų paviršių tame pačiame inde, trimačiuose karkasuose ir/ar ant sintetinių matricių ir t.t. Auginimo modelio įtakos ląstelių morfologijai ir funkcijai tyrimas. Audinių fragmentų formavimas. Specifinių audinių modelių kūrimas, vaskuliarizavimo problemų sprendimai, audinių modelių pritaikymas ir sertifikavimas toksikologinėms, farmakologinėms ir kitoms studijoms (pvz., plaučių modelio pritaikymas oro taršos tyrimams, kremzlės modelio pritaikymas farmacinių preparatų išbandymams ir t.t).

4.5. Baltymų chemija – gryninimo procesų kūrimas, išgrynintų baltymų formulavimo paieška ilgalaikiam saugojimui, baltymų stabilizacija.

4.6. Analizės metodų kūrimas baltymo kokybės kontrolei kuriamo proceso stadijose.

4.7. Išgrynintų baltymų biologinės funkcijos analizės metodai (sąveika su specifiniais antikūnais).

4.8. Metodai, pagrįsti antigeno – antikūno sąveika. Jie tinka baltymų kiekybiniam nustatymui tiek mišiniuose, tiek išgrynintuose pavyzdžiuose. Imunofermenčių metodų (ELISA, imunoblotas) ir biomolekulių sąveikos tyrimo sistemų (Biacore, Octet systems) taikymas. SUMO proteazei specifinius antikūnus produkuojančios hibridomos bus gautos suliejus imunizuotų BALB/c pelių blužnies ir mielomines SP2/0 linijos ląsteles. Paviršiaus plazmoninio rezonanso metodu atliekama epitopinė analizė. Kuriamas imunofermenčių analizės (IFA) sistema SUMO proteazės kiekybiniam nustatymui.

Institute veikia modernios ląstelių kultivavimo ir tyrimų laboratorijos aprūpintos šiuolaikine įranga (tėkmės citometrai su ląstelių sorteriu FACSAria II ir FACSAria III, Beckton Dickinson, tėkmės citometras Cyflow Space, Partec; bioreaktorius Biolevitator, Hamilton; Konfokalinės mikroskopijos sistema Leica SP8; realaus laiko PGR sistemos Stratagene Mx 3005P ir Biorad CFX 96; baltymų izofokusavimo sistema Protean IEF cell, Biorad; mikroplokštelių skaitytuvai Asys UVM340 ir Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems, *in vivo* vaizdinimo sistema IVIS200, Perkin Elmer IVIS200, ir kt.).

## **5. Tyrimų etapai ir jų charakteristika; detalus įgyvendinimo planas**

5.1. Kamieninių ląstelių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių tyrimo ir technologijų kūrimo etapai:

5.1.1. pilotinės studijos numatytomis gydymo/diagnostikos strategijų kūrimo kryptimis (2017-2021 metai): pilotiniai ląstelės biologijos (imortalizuotų, pirminių ir kitų tipų ląstelių) eksperimentai, biosuderinamumo eksperimentai (išbandant naujas matricas ir substratus), naujų ląstelių linijų išskyrimas ir charakterizavimas, biotetikos leidimų paraiškų teikimas, bendradarbiavimo grupių sudarymas (su klinikų gydytojais, klinikinės laboratorijos personalu, užsienio kolegomis ir pan.), atsižvelgiant į pilotinių eksperimentų rezultatus.

5.1.2. Pliuripotentiųjų ląstelių *ex vivo* saugaus ir efektyvaus gausinimo metodologijų vystymas (2017-2019 metai):

5.1.2.1. auginimo terpių serumo ir atskirų auginimo faktorių parinkimas ir išbandymas;

5.1.2.2. aplinkos atmosferos deguonies ir kitų dujų kiekio/santykio parinkimas ir išbandymas;

5.1.2.3. auginimo indų paviršių padengimo tarpląstelinio matriksu baltymais, jų mišiniais, sintetinėmis medžiagomis, padengimo biologiškai aktyviomis molekulėmis nanodimensijoje tyrimai;

5.1.2.4. trimatės auginimo aplinkos formos (trimačiuose ar dvimačiuose modeliuose, bioreaktoriuose) kūrimas ir tobulinimas;

5.1.2.5. keičiamų kultivavimo sąlygų įtakos ląstelių gyvybingumui, diferencijacijai, morfologinėms ir funkcinėms charakteristikoms tyrimai.

5.2. Eksperimentinis darbas numatytomis gydymo/diagnostikos strategijų kūrimo kryptimis (2018-2021 metai):

5.2.1. *In vitro* neuroregeneracinio modelio sukūrimas ir išbandymas: neuroregeneracinių danties pulpos kilmės kamieninių ląstelių sekretuojamų veiksnių tyrimai;

5.2.2. kremzlės, kremzlės/kaulo bei sinovijos audinio regeneracijos tyrimai *in vitro*, veikiant kamieninių ląstelių produktais bei pačiomis ląstelėmis;

5.2.3. kraujagyslės fragmentų konstravimas pasitelkiant hidrogelio matricas ir paviršių mikro- ar makro-strūktūravimą, kraujagyslių endotelio, lygiųjų raumenų sluoksniu, fibroblastų auginimas *in vitro* ir gautų kraujagyslių mimetikų paruošimas klinikiniam panaudojimui;

5.2.4. pelės kamieninių ląstelių išskyrimo, auginimo ir gausinimo *in vitro* eksperimentai – fundamentinėms žinioms apie embrioninių kamieninių ląstelių potencialumą gauti, pluripotentinių ląstelių palyginimui su multipotentinėmis, totipotentinių ląstelių išgavimo iš pluripotentinių embrioninių kamieninių ląstelių galimiems mechanizms atrasti;

5.2.5. priešūždegiminio ir imunomoduliacinio mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikio tyrimai uždegimo, oksidacinio streso ir autoimuninių procesų modeliuose (plaučių LOPL, odos uždegimų ir kituose, vystomuose IMCe) *in vitro* ir *in vivo* (pelių ir žiurkių organizmuose). Būtina atrinkti kamieninių ląstelių produktų pristatymo į audinius formas: egzosomas, auginimo terpė, substrato praturtinimas ar ląstelių suspensija; palyginti skirtingų poveikius, atrinkti ir validuoti geriausias.

5.3. Audinių modelių *in vitro* tyrimams kūrimas ir išbandymas (2017-2021 metai) partnerystė su fizikų ir chemikų atstovais, klinikos medikais: karkasų, biologiškai aktyvių medžiagų sintezės ir įterpimo bei pirminių ląstelių gavimo klausimai – ląstelių išskyrimas iš klinikinės medžiagos: post-mortem audinių, operacinės medžiagos, donotų audinių likučių (pagal turimus Bioetikos leidimus); trimačių karkasų atranka (iš gatavų produktų), naujų kūrimas, gamyba ir panaudojimas (su partneriais):

5.3.1. odos, kraujagyslės, kremzlės, plaučių audinio modelinių sistemų sukūrimas ir charakterizavimas morfologiškai, imunohistochemiškai ir funkciškai. Tai apima tinkamų ląstelių linijų ar pirminių ląstelių atranką, kultivavimą, atkuriant natyvią aplinką, paruošimą mikroskopijai, imunohistochemijai, funkciniam tyrimams. Pvz., odos epitelio ląstelių auginimas ant pasirinktų kandidatinių substratų, veikimas diferenciacijos terpė (jos sudėties atranka), kultivavimas oro-skysčio paviršiuje bei gauto multislukšninio epidermio audinio charakterizavimas aukščiau paminėtais metodais. Panašiais etapais kuriami ir kiti modeliai;

5.3.2. sėkmingų modelių validavimas, išbandymai realiomis sąlygomis, komercializavimas.

5.4. Rekombinantinių baltymų gamybos technologijų kūrimas:

5.4.1. Klonavimas (sukurti SUMO baltymo pagrindu paremtą genų suliejimo DNR lygmenyje technologiją, atrinkti bakterinius kamienus, kurie garantuoja maksimalų naujai sukurtų rekombinantinių SUMO DNR konstruktų stabilumą ir pagaminti, charakterizuoti bakterinių kamienų bankus bei užtikrinti jų ilgalaikį išlaikymą, klonuoti SUMO proteazės geną ir atlikti analogiškus bakterinių kamienų tyrimus.) (2017-2018 metai);

5.4.2. SUMO proteazės gryninimas (pagaminti bakterijose SUMO proteazę ir ją išgryninti, naudojant chromatografijos metodus. SUMO proteazė turi būti charakterizuota pagal savo aktyvumą, optimizuojamos fermentinės reakcijos sąlygos) (2018-2019 metai);

5.4.3. Metodologijos sukūrimas (parengti metodologiją sulietų su SUMO baltymų kirpimui ir išvalymui, panaudojant SUMO proteazę.) (2020 metai).

## **6. Numatomi rezultatai:**

6.1. Planuojame gautus rezultatus publikuoti ISI Web of Science sąrašo žurnaluose su IF, po 3 straipsnius kasmet. Taip pat bus rengiamos publikacijos kituose recenzuojamuose moksliniuose žurnaluose.

6.2. Pasiūlyta keletą gydymo/diagnostikos strategijų lėtinėms neinfekcinėms ir panašioms būklėms (kartu su gydymo įstaigų partneriais).

6.3. Sukurta metodologija rekombinantinių baltymų gryninimui, paremta sulietų baltymų (fusion proteins) technologija, panaudojant SUMO (small ubiquitin-like modifier) baltymu

proteazę.

6.4. Naujai sukurtų technologijų pagrindu bus rengiamos ir registruojamos patentinės paraiškos.

### 7. Rezultatų sklaidos priemonės:

Rezultatų sklaida mokslinei ir plačiajai visuomenei yra neatskiriama mokslinės veiklos dalis. Ypatingai tai aktualu kamieninių ląstelių tyrimų ir taikymo srityje, kadangi tai labai aktyvaus visuomenės dalyvavimo, donorystės, palaikymo iš įvairių bendruomenių (pvz., tam tikrų ligų pacientų), religinių grupių, politikų reikalaujanti medicinos ir mokslo šaka. Rezultatų sklaidos veikla apims jau įprastas priemones: mokslo populiarinimo straipsnius populiarioje spaudoje, pasisakymus žiniasklaidai, dalyvavimą Tyrėjų naktyje ir pan. Tikslinga būtų panaudoti ir kitus kitus metodus: patrauklios, kamieninių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių tyrimus reprezentuojančios interneto platformos sukūrimas, diskusijų ir pokalbių įvairiose interneto medijose inicijavimas, interaktyvių stendų muziejuose ir parodose įrengimas ir t.t.

Pristatysime programos rezultatus tarptautinėse konferencijose (parengti ir pristatyti ne mažiau kaip 3 pranešimai kasmet).

Vykdam programą bus surengta keletą nedidelių konferencijų (ne mažiau 3-jų) tarp potencialių partnerių Lietuvoje, vėliau įtraukiant ir viso Baltijos regiono ir Europos mokslininkus, kurių patirtis reikalinga.

### 8. Preliminarus programos lėšų paskirstymas (tūkst. Eur)

Eil. Nr.	Išlaidų pavadinimas	2017 metais	2018 metais	2019 metais	2020 metais	2021 metais	Visai programai (suma)
1.	Programai skirti norminiai etatai, lėšos	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	479,45
2.	Kitos lėšos planuojamos programai vykdyti (iš kitų, institutui skirtų valstybės biudžeto bazinio finansavimo lėšų)	316,11	316,11	316,11	316,11	316,11	1 580,55
	Iš viso	412	412	412	412	412	2 060

### 9. Programos trukmė. 2017 - 2021 metai

### 10. Programos vadovas:

dr. Augustas Pivoriūnas, VMTI Inovatyvios medicinos centro direktoriaus pavaduotojas mokslo reikalams, Kamieninių ląstelių biologijos skyriaus vedėjas, 85 2628413, [a.pivoriunas@imcentras.lt](mailto:a.pivoriunas@imcentras.lt)



## PATVIRTINTA

Lietuvos Respublikos švietimo ir mokslo  
ministro 2017 m. balandžio 24 d.  
įsakymu Nr. V-273

### SVEIKATINIMO, INOVATYVIŲ DIAGNOSTIKOS IR GYDYMO METODŲ TAIKYMO IR LIGŲ PREVENCIJOS TYRIMAI

**1. Programos vykdytojas** - Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras (toliau – IMC).

Norminiai etatai skirti programai - 8,69.

#### **2. Programos tikslai:**

2.1. Įrodymais pagrįstas diagnostikos ir gydymo metodų bei gamtinių kurortinių veiksnių taikymo sergant kaulų raumenų sistemos ligomis įvertinimas, apibendrinant sergančiųjų kaulų raumenų sistemos ligomis stebėsenos duomenis sukurtose, susistemintose ir valdomose klinikinių duomenų bazėse.

2.2. Inovatyvių neinvazinių diagnostikos ir šiuolaikiškų gydymo metodų bei gamtinių kurortinių veiksnių sergantiesiems kaulų raumenų sistemos ligomis paieška ir pagrindimas.

#### **3. Programos uždaviniai:**

3.1. Uždaviniai, skirti programos pirmajam tikslui pasiekti:

3.1.1. Sergančiųjų kaulų raumenų sistemos ligomis stebėseną, toliau tęsiant sukurtą reumatoidinio artrito ir kitų reumatinių ligų (sistemines raudonosios vilkligės, sisteminės sklerozės, vaskulitų ir kitų) duomenų bazių papildymą ir atnaujinimą, palaikant ankstyvo artrito duomenų bazę, ištiriant sergančiųjų pirminiu ir antriniu Sjogreno sindromu naujų atvejų dažnumą bei įvertinant jų riziką susirgti limfoproliferacinėmis ligomis.

3.1.2. Analizuoti bei apibendrinti biologinės terapijos, skirtos reumatoidinio artrito, psoriazinio artrito ir ankilozinio spondilito gydymo efektyvumo, saugumo bei šalutinio poveikio ilgalaikės stebėsenos duomenis, vertinant indikacijas, pacientų atranką, vaistų skyrimo trukmę ir būdą, susiejant ir palyginant gautą informaciją su vėžinių, infekcinių ligų ir populiacijos mirčių registrais bei kai kuriomis kitomis duomenų bazėmis.

3.2. Įgyvendinant antrąjį programos tikslą bus sprendžiami šie uždaviniai:

3.2.1. Įvairaus diametro arterijų funkcijos bei struktūros pažeidimų įvertinimas, sergant sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis ir unifikuotų kraujagyslių ištyrimo metodikų sukūrimas, algoritmo tiriant sergančiuosius reumatinėmis ligomis bei siekiant išaiškinti ankstyvą aterosklerozę sukūrimas.

3.2.2. Atrinkti uždegiminiams sąnario audiniams selektyviausius fotosensibilizatorius ar sintezuotas nanodaleles, kurios sugerdamos šviesą ir išspinduliuodamos šilumą, sunaikins uždegiminę sinoviją. Iširti uždegiminio židinio gydomojo poveikio šviesa galimybes.

3.2.3. Agresyvių sinovijos fibroblastų diagnostinių raiškų paieškos *in vitro*, sąsajų su artrito eiga tyrimai.

3.2.4. Iširti ir apibendrinti eksperimentiniuose gyvūnų sklerodermos modeliuose šviesos gydomąjį poveikį bei nustatyti galimus pašalinius reiškinius, įvertinti šviesos dozavimo ypatumus.

3.2.5. Atlikti pilotinę studiją pacientams, sergantiems sisteminėmis sklerozėmis (gauta Institute sukurtos šviesos šaltinio - modelio akreditacija klinikiniam tyrimui). Įvertinti šviesos šaltinio saugumo ir eksploatacines savybes bei sukurti šviesos panaudojimo metodiką.

3.2.6. Iširti ir apibendrinti gamtinių kurortinių veiksnių įtakos struktūrinių kelių sąnarių pokyčių progresavimui, klinikinių ir funkcinių rodiklių dinamikai osteoartrito atvejais.

Šie uždaviniai bus sprendžiami bendradarbiaujant su kitais Instituto padaliniais, t. y. Imunologijos, Regeneracinės medicinos ir Biomodelių skyriais.

#### **4. Metodologinis tyrimų pagrindimas:**

Kaulų raumenų sistemos ligos pagal Lietuvos sveikatos statistiką užima pirmą vietą pastovaus neįgalumo struktūroje. Sąnarių ligos sudaro pusę visų lėtinių ligų 65 metų ir vyresnių

žmonių grupėje. Jos sukelia ilgalaikius, dažnai nepakeliamus skausmus ir fizinę negalią. Dėl šių ligų nukenčia gyvenimo kokybė, jos yra nelengva našta visuomenei, sveikatos apsaugos tarnyboms, jų biudžetui, kitiems ekonomikos rodikliams. Kai kurios autoimuninės ligos (reumatoidinis artritas, sisteminė sklerozė, sisteminė raudonoji vilkligė, sisteminiai vaskulitai) ženkliai (15-20 metų) sutrumpina gyvenimo trukmę. Todėl įrodymais pagrįsti tyrimai bei jų rezultatų analizė sąlygoja sergamumo, neįgalumo, mirtingumo nuo kaulų raumenų ligų mažėjimą. Institutas toliau vykdo neįgalumo prevencijai skirtus projektus, vykdo klinikinius projektus, siekiančius mažinti mirtingumą ir mirštamumą dėl kaulų raumenų ligų bei fundamentaliuosius tyrimus, susijusius su naujų patogenetinių mechanizmų išaiškinimu ir bandymu juos paveikti.

Duomenų apie sergančiuosius reumatinėmis ligomis sistemingas kaupimas ir vertinimas pradėtas 1995 m. nuo Vilniaus m. sergančiųjų apklausos duomenų analizės. Reumatoidinis artritas, būdamas lėtai progresuojanti sąnarių liga, sukelia ne tik ženklius sveikatos pokyčius, bet ir neigiamas socialines pasekmes. Naštos visuomenei ir individui dydį galima įvertinti tik atlikus sergančiųjų apklausą, kurioje atsispindėtų sveikatos medicininiai ir socialiniai aspektai. Todėl 1995 m. tuometiniame Vilniaus Universiteto Eksperimentinės ir klinikinės medicinos institute kartu su Vilniaus universiteto Reumatologijos klinika buvo įsteigtas Vilniaus reumatoidiniu artritu sergančiųjų registras t.y. sudaromas sąrašas pacientų, į kurį įtraukiami visi sergantieji šia sunkia sąnarių liga. Tais pačiais metais pradėtos kurti retų reumatinių ligų duomenų bazės, skirtos sisteminės raudonosios vilkligės, vaskulitų nuolatinėi stebėsenai. 2007 m. pradėtas ankstyvo artrito registras, leidžiantis prognozuoti greitai sukeliančios negalią ligos eigą ir užkirsti jai kelią. 2000 m. pradėtas biologinės terapijos registras, kuriame yra visų pacientų, gydomų biologiniais vaistais, ligos eigos rodikliai. Šis registras leidžia stebėti sergančiųjų ligos eigą, vaisto efektyvumą, atlikti pašalinių reiškinių stebėseną ir užkirsti kelią gydymo sukeliams komplikacijoms.

2007 m. sukurta Lietuvos reumatinių ligų biologinės terapijos duomenų bazė, kurioje yra kaupiami pacientų, sergančių reumatoidiniu artritu, psoriaziniu artritu, ankiloziniu spondilitu, juveniliniu artritu ir gydomų biologiniais vaistais, ligos aktyvumo, gydymo efektyvumo, imunogeniško rodikliai, duomenys apie pasireiškusius nepageidaujamus reiškinius, analizuojami latentinės tuberkuliozės, nustatytos prieš paskiriant biologinius vaistus diagnostikos ir sekimo klausimai. Šis registras leidžia ilgą laiką stebėti sergančiųjų ligos eigą, pašalinius reiškinius ir užkirsti kelią sukeliams gydymo komplikacijoms, vertinant pagal indikacijas, vaistų skyrimo trukmę ir būdą, susiejant ir palyginant gautą informaciją su vėžinių, infekcinių ligų ir populiacijos mirčių registrais bei kai kuriomis kitomis duomenų bazėmis. Taigi, biologinės terapijos duomenų bazė yra viena iš ypatingai svarbių priemonių neįgalumo prevencijai, ligos eigos, komplikacijų, pasekmių ir vaistų efektyvumo vertinimui.

Planuojama įsigyti įrenginius su integruota paciento savęs ir gydytojo vertinimo programine įranga, skirta nuolatiniam paciento savijautos ir funkcijų vertinimui. Šių įrenginių pagalba pacientai bei gydantys gydytojai duomenis įves tiesiogiai į elektroninę duomenų bazę. Jau egzistuojančios duomenų bazės duomenys bus harmonizuoti su naujaisiais duomenimis, taip pat bus koreguojami surenkami duomenys.

2011 m. pradėta pradėta kurti Vilniaus miesto sergančiųjų Sjogreno sindromu duomenų bazė perauga į visos Lietuvos sergančiųjų Sjogreno sindromu duomenų bazę. Šių duomenų bazė yra svarbi ne tik sveikatos būklės stebėsenai, bet ir ankstyvai limfomos bei kitų limfoproliferacinių procesų atsiradimo diagnostikai.

Tuo būdu, kaulų raumenų ligų klinikinių duomenų bazė, biologinės terapijos ir Sjogreno sindromo registras yra svarbios priemonės neįgalumo prevencijai, ligos eigos, komplikacijų, pasekmių ir vaistų efektyvumo vertinimui, naujų ligos žymenų paieškai. (Pvz. United Kingdom Primary Sjögren's Syndrome Registry—a united effort to tackle an orphan rheumatic disease). Surinkus ilgalaikio paciento klinikinės būklės stebėjimo duomenis, numatoma gilintis į autoimuninių artritų ir sisteminių jungiamojo audinio ligų etiopatogenetinius ir ligos išsivystymo bei progresavimo veiksnių mechanizmus.

Osteoartritas (OA) – dažniausia vyresnio amžiaus žmonių sąnarių liga, kurios paplitimas,

visuomenei senstant, neabejotinai didės. Dabartinis OA medikamentinis gydymas ribojamas gretutinių ligų ir labai dažnai nėra pakankamai efektyvus, o išeičių stadijose taikomas chirurginis gydymas ženkliai didina sveikatos priežiūros teikėjų sąnaudas. 2016 m. Tarptautinės osteoartrito tyrimų draugijos (OARSI) pasauliniame kongrese pabrėžta, kad tik 19% sergančiųjų OA patenkinti gydymu, daugiau nei pusė ligonių pageidautų pamėginti kitą gydymą iki pasiryžimo pilnai artroplastikai, kuriai nesijaučia pasiruošę 91% pacientų. Visuomenės senėjimas, nepakankamas fizinis aktyvumas ir jo pasekmės užprogramuoja į ateitį OA - dažniausios sąnarių ligos - tolimesnį plitimą. Tai ne tik biomedicinė, bet ir svarbi socioekonominė problema. Heterogeninė OA kilmė, farmakologinių priemonių jo vystymuisi stabdyti neefektyvumas skatina nemedikamentinio pobūdžio priemonių, kurių sudedamoji dalis galėtų būti kurortiniai veiksniai, tyrimus. Todėl gamtinių kurortinių veiksnių taikymas yra perspektyvi kryptis, ne tik siekiant individualizuoti sergančiųjų OA stebėseną ir gydymą, bet ir reikšminga atskleidžiant kurortinių veiksnių veikimo mechanizmus. Tai aktualu savo taikomuoju aspektu ir OA gydymui, ir gydymo metodikų kurortinėse įstaigose pagrindimui ir atnaujinimui.

Natūralių nemedikamentinių veiksnių ankstyvas taikymas turėtų būti individualizuotas ir sudaryti šiuolaikinio OA kompleksinio gydymo pagrindą, tačiau tokios koncepcijos įgyvendinimui trūksta patikimų mokslinių studijų. Iki šiol šių veiksnių efektyvumo įrodymai apsiriboja skausmo ir funkcijos pokyčių trumpalaikiais stebėjimais, neatsižvelgiant į sąnarių struktūrinių pokyčių ir juos atspindinčių žymenų dinamiką. Tai ypač pasakytina apie kurortinius gamtinius veiksnis, kurių empiriniai efektyvumo įrodymai reumatinių ligų atvejais žinomi labai seniai, bet veikimo mechanizmai išlieka neaiškūs. 2015 ir 2016 m. metaanalizės [S.Tenti ir kt., 2015; R. Forestier ir kt., 2016 ], skirtos kurortinių veiksnių poveikio kelio OA atvejais, apibendrina, kad kurortologinis gydymas 3-9 mėnesiams mažina skausmą ir gerina funkciją. Lietuvoje mokslinių darbų apie gamtinių kurortinių veiksnių veikimo mechanizmus degeneracinių sąnarių ligų atvejais neatliekama kelis dešimtmečius, nors toks poreikis iš kurortinių paslaugų teikėjų vis labiau jaučiamas.

Kaulų raumenų sistemos ligos (reumatoidinis artritas, sisteminė raudonoji vilkligė, sisteminė sklerozė ir k. t. ) – sisteminės jungiamojo audinio ligos, pažeidžiančios daugelį organų, tame tarpe ir arterijas. Su jomis siejamas ankstyvos aterosklerozės vystymasis ir padidintas mirtingumas dėl kardiovaskulinių ligų. Ankstyvą pacientų, sergančių reumatinėmis ligomis neįgalumą ar mirtį lemia ne tik pati liga, bet ir su ja susiję kardiovaskuliniai įvykiai, kuriuos skatina ankstyva aterosklerozė. Šių pacientų gyvenimo trukmė gerokai pailgėjo per paskutiniuosius 20 metų, nes turimos gydymo priemonės pakankamai gerai kontroliuoja ligos aktyvumą, tačiau išaugo tikimybė šiems pacientams susirgti kitomis lėtinėmis ligomis, kurios jiems atsiranda anksčiau ir dažniau, nei likusioje populiacijos dalyje.

Sergantieji reumatoidiniu artritu du – tris kartus dažniau serga miokardo infarktu lyginant su bendra populiacija, jiems dažniau registruojama nebyli išemija ir staigios mirtys. Sisteminės raudonosios vilkligės metu krūtinės angina nustatoma 6-10 proc. sergančiųjų, nors bendroje populiacijoje pagal amžių atitinkančioje SRV pacientus – 1.6 proc. Mažiausiai žinoma apie sisteminę sklerozę sergančiųjų riziką išsivystyti gyvybei pavojingoms kardiovaskulinėms būklėms.

Siekiant įgyvendinti programos antrąją tikslą keliamas uždavinys - sumažinti mirtingumą nuo širdies kraujagyslių susirgimų. Tolimesni mūsų darbai neatsitiktinai siejami su koncepcija „Surask, kovok ir stebėk“ („*Find, Fight and Follow*“), kurios esmė - šiandieninė ankstyva diagnostika, gydymas ir gydymo kontrolė. Arterijų vidinio sluoksnio (endotelio) disfunkcija bei arterijų standumo pokyčiai – vieni iš ankstyviausių pakitimų aterosklerozės vystymėsi ir turi reikšmingas sąsajas su būsimais kardiovaskuliniais įvykiais. Ankstyvas šių pokyčių nustatymas leistų užkirsti kelią kardiovaskulinėms komplikacijoms, sergant sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis. Pastaraisiais metais atsirado inovatyvūs neinvaziniai endotelio funkcijos (ultragarsu įvertinant žasto arterijos tėkmės sąlygotą dilataciją) ir arterijų standumo tyrimo (aplanacinė tonometrija) metodai. Jų pagalba tapo įmanoma labai ankstyvose arterinės hipertenzijos ir aterosklerozės stadijose nustatyti kraujagyslių pažeidimą, nagrinėti įvairaus

diametro arterijų funkcijos bei struktūros pažeidimo aspektus ir jų reikšmę klinikiams sprendimams. Ultragarsiniai tyrimo metodai ir įvairūs jų taikymo variantai (miego arterijų, žasto arterijų ir kitose srityje) leidžia anksti nustatyti pakitimus iki atsirandant klinikiams požymiams. Arterijų standumo nustatymas aplanacinės tonometrijos būdu, ultragarsinis miego arterijų funkcijos bei struktūros įvertinimas, endotelio funkcijos vertinimas lazerinės doplerografijos būdu – šie tyrimai jau anksčiau taikyti tiriant sisteminę jungiamojo audinio ligas. Tačiau išilginio bendrosios miego arterijos judėjimo nustatymas ultragarsiniu metodu – tai naujas tyrimo metodas, kuris dar nebuvo taikytas tiriant reumatinėmis ligomis sergančius pacientus. Pastarojo tyrimo tikslas yra palyginti išilginį bendrosios miego arterijos judėjimą, išmatuotą ultragarsiniu greičio vektorių vaizdinimo metodu pacientams sergantiems SRV, RA, SS ir nustatyti, ar egzistuoja išilginio bendrosios miego arterijos judėjimo skirtumai tarp pacientų patyrusių kardiovaskulinį įvykį ir nepatyrusių kardiovaskulinio įvykio. Šis vertinimas leistų daryti prielaidą, kad išilginis bendrosios miego arterijos judėjimas galėtų būti potencialus ŠKL rizikos stratifikacijos veiksnys, sergantiems SRV, RA, SS. Kol kas negalima tvirtai pasakyti koks ultragarsinis metodas yra svarbesnis atskiros autoimuninės ligos metu. Unifikuotos kraujagyslių ištyrimo metodikos, kuri leistų sudaryti algoritmą ir juo vadovautis, tiriant sergančiuosius reumatinėmis ligomis, bei siekiant išaiškinti ankstyvą aterosklerozę sukūrimas padėtų išspręsti antrąjį programos uždavinį.

Pastaraisiais metais naujosios šviesos technologijos ir nanotechnologijos atsidūrė mokslinių tyrimų sraigalyje. Tyrimai atsiskleidė platų šių krypčių taikomąjį potencialą, kuriant naujus metodus aktualių diagnostinės ir gydomosios medicinos problemų sprendimui.

Todėl labai svarbi šviesos technologijų ir nanotechnologijų selektyvaus taikymo galimybių paieška persistuojančio reumatoidinio artrito sukeltam sinovitiui diagnozuoti ir gydyti. Panaudojus fluorescencinės spektroskopijos metodą ir sudarius sąnario audinių fluorescencijos duomenų bazę gali būti gautos teorinės prielaidos švitinimo ir nesensibilizuotos fluorescencijos detekcijos sistemų sukūrimui. Eksperimentiniai efektyvių fotosensibilizatorių ar nanodalelių poveikių tyrimai uždegiminiams sąnario audiniams leistų atrinkti selektyviausius fotosensibilizatorius ar sintezuotas nanodaleles, kurios sugerdamos šviesą ir išspinduliuodamos šilumą, sunaikins uždegiminę sinoviją. Toliau bus vykdomas uždavinys: diagnostikos ir gydymo tikslais nuolat ieškoma naujų dalelių ar medžiagų, besikaupiančių uždegiminėje reumatoidinėje membranoje, kuriai būdinga aktyvi kraujotaka, metabolinis aktyvumas, nekontroliuojama sinoviocitų proliferacija. Sprendžiant šį uždavinį bus atliekami Eksperimentiniai efektyvių fotosensibilizatorių ar nanodalelių poveikių uždegiminiams sąnario audiniams tyrimai, kurie leistų atrinkti selektyviausius fotosensibilizatorius ar sintezuotas nanodaleles, kurios sugerdamos šviesą ir išspinduliuodamos šilumą, sunaikins uždegiminę sinoviją. Paraleliai bus analizuojama uždegiminio židinio gydymo poveikio šviesa galimybės. Taip pat atliekamos Agresyvių sinovijos fibroblastų diagnostinių raiškų paieškos *in vitro*, koreliacija su artrito eiga tyrimai.

Įgyvendinant antrąjį programos tikslą bus tęsiami darbai eksperimentiniuose gyvūnų sklerodermos modeliuose, siekiant įrodyti šviesos gydomąjį poveikį bei nustatyti galimus pašalinius reiškinius, bus įvertinti šviesos dozavimo ypatumai.

Ankstesniais metais vykdant šią programą sukurtas šviesos diodų, kurie skleidžia siaurajuostes ultravioletinę A1 bei infraraudonąją šviesas, modelis.

Yra gauta šio sukurto šviesos šaltinio - modelio akreditacija klinikiams tyrimams, bus atliekama pilotinė studija su pacientais, sergančiais sisteminė skleroze. Pagrindiniai ligos požymiai – odos sukietėjimas, trofinės opos bei kraujagyslių pakenkimas. Tyrimo duomenys leis aprašyti šviesos šaltinio saugumą ir eksplotacines savybes bei sukurti šviesos panaudojimo metodiką.

Neinvazinis arterijų standumo tyrimas buvo atliekamas remiantis Wilkinson I.B. (Wilkinson I.B., Cockcroft J.R., Webb D.J. Pulse wave analysis and arterial stiffness. J Cardiovasc Pharmacol 1998;32:S33 - S37) ir O'Rourke M.F. (O'Rourke M.F., Gallagher D.E Pulse wave analysis. J Hypertens Suppl 1966; 14: 147 – 157.) aprašyta metodika ir naudojant Sphygmocor (Sphygmocor (v.7.01) AtCor Medical Pty. Ltd) aparatą. Ultragarsinis endotelio funkcijos

tyrimas žasto arterijoje sukeltos hiperemijos metu buvo atliekamas remiantis Celermajer D.S (Celermajer D.S., Sorensen K.E., Gooch V.M. et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111 – 1115) aprašyta metodika ir tarptautinėmis nuorodomis (Corretti M., Anderson T.J., Benjamin E.J. et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 2000;39:257 – 265. Žasto arterijos skersmeniui matuoti naudotas didelio tikslumo ultragarsinis prietaisas Logiq 7 (General Electric, Solingen, Germany) su 12 MHz dažnio elektroniniu linijiniu davikliu, išilginio bendrosios miego arterijos judėjimo nustatymas ultragarsiniu metodu, naudojant greičio vektorių vaizdinimo programinę įrangą (Siemens syngo US Workstation, Siemens Medical Solutions, Inc. ir Research Arena 2; TomTec imaging systems GmbH), skirtą miokardo išilginio judėjimo ir deformacijos analizei; endotelio funkcijos vertinimas lazerinės doplerografijos būdu PeriFlux System 5000 aparatu.

Kokybiniai ir kiekybiniai plaštakų pirštų nagų guolio kapiliarų pokyčiai, būdingi pirminiam ir antriniam Reino sindromui bus nustatomi šaltos šviesos kapiliaroskopu VideoCap 200.

Klinikinis pacientų artrito dinamikos vertinimas bus atliekamas pagal standartizuotas anketas: vizualinės analogijos skalę (VAS), skaudamų ir ištusių sąnarių skaičių, ligos aktyvumo indeksą DAS 28 (*angl. disease activity score*). Bus atliekamas uždegiminių plaštakų ir kelių sąnarių tyrimas rentgenologiškai ir sonoskopiškai, nustatant sinovito išreikštumą, erozijų skaičių ir įvertinant šių sąnarių fotoaktyvuojamų sričių fluorescencijos signalus. Fluorescencijai matuoti bus naudojama *Ocean Optics S2000-FL (Ocean Optics Inc., USA)* šviesolaidinis fluorimetras, kuriame įmontuota CCD liniuotė registruoja spektrą 360-1000 nm spektriniame intervale. Prietaiso jautrumas 86 fotonai/intensyvumo vnt. Fluorimetras prijungtas prie kompiuterio, spektrų registravimui naudota "Ocean Optics" programa OOIBase32™ Siemens Acuson Antares aparatu, linijiniu davikliu, kurio dažnio diapazonas 7-11,43 MHz bei galios dopleriu bus tiriami plaštakų, riešų, MKF, PIF, kelio sąnariai, vertinami didžiausi artritiniai pakitimai - skystis, sinovitas, paviršių erozijos.

Sinovijos ir kremzlės audinių bandiniai bus paimti iš sergančiųjų reumatoidiniu artritu (RA) ir osteoartritu (OA) chirurginės intervencijos metu pašalintos nereikalingos medžiagos. RA ligonių diagnozė nustatyta remiantis ARA (Amerikos reumatologų asociacijos) kriterijais reumatoidiniam artritui, OA diagnozė – remiantis ARA kriterijais oseoartritui.

Sinovijos fibroblastų ląstelių (SF) kultūros, išskirtos iš uždegiminės sinovijos membranos, bus auginamos pagal standartizuotas metodikas. Bus pasirinktas kolagenu sukeltas artritas kaip patofiziologiškai ir histologiškai RA atitinkantis modelis.

Sergančių kaulų raumenų ligomis bei gydymo efektyvumo ir jo šalutinio poveikio stebėsenos sistema bus parengta sukuriant objektyvių ir subjektyvių sergamumo rodiklių duomenų bazę, panaudojant longitudinalinį tyrimo metodą ir išskiriant reikšmingus stebėjimo parametrus. Tyrimo imtis bus formuojama atsitiktiniu metodu EpiInfo pagalba panaudojant atitinkamus pacientų įtraukimo ir atmetimo kriterijus. Objektyvūs sergamumo duomenys bus gaunami iš ligos istorijų ir ambulatorinių kortelių, subjektyvūs – pacientų apklausos būdu. Tuo tikslu bus sudaromi klausimynai, įvertinamas jų validumas, atliekami pilotiniai tyrimai. Duomenys bus apdorojami ir hipotezės tikrinamos daugiabinės matematinės statistikos metodais.

##### **5. Tyrimų etapai ir jų charakteristika; detalus įgyvendinimo planas**

Pirmojo ir antrojo tikslo uždaviniams vykdyti :

2017 metais – Įvairaus diametro kraujagyslių funkcijos bei struktūros pažeidimų įvertinimas, sergant sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis. Sąnario audinių fluorescencijos duomenų bazės, pagrįstos fluorescencinės diagnostikos metodo taikymu endogeniniais fluoroforais sensibilizuotame uždegiminiame sąnaryje *in vivo* sergant reumatoidiniu artritu sudarymas. Sergančiųjų kaulų raumenų sistemos ligomis stebėseną, ankstyvo artrito, gamtinių kurtinių veiksnių efektyvumo tyrimas, biologinės terapijos registro bazės tęstinis pildymas, Sjogreno ligos bazės tęstinis pildymas, stebėseną.

2018 metais – Įvairaus diametro arterijų funkcijos bei struktūros pažeidimų įvertinimas, sergant

sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis, ligos eigos stebėseną dinamikoje. Sąnario audinių fluorescencijos duomenų bazės, pagrįstos fluorescencinės diagnostikos metodo taikymu endogeniniais fluoroforais sensibilizuotame uždegiminiame sąnaryje *in vivo* sergant reumatoidiniu artritu sudarymas. Klinikinių ligos raiškos ir fizikinių spektrinių duomenų sugretinimas. Švitinimo sistemos modeliavimas. Sergančiųjų kaulų raumenų sistemos ligomis stebėseną, gamtinių kurotinių veiksnių efektyvumo tyrimas, biologinio registro bazės tęstinis pildymas, Sjogreno ligos bazės tęstinis pildymas, stebėseną. Lietuvos bendros internetinės bazės sudarymo parengiamieji darbai.

2019 metais – Įvairaus diametro arterijų funkcijos bei struktūros pažeidimų įvertinimas, sergant sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis, inovatyvių savalaikių diagnostikos ir gydymo taktikos metodikų parinkimas. Eksperimentinis efektyvių fotosensibilizatorių ar nanodalelių poveikių uždegiminio sąnario audiniams vizualizuoti ir gydyti šviesos poveikyje atrinkimas. Sergančiųjų kaulų raumenų sistemos ligomis stebėseną, gamtinių kurotinių veiksnių efektyvumo tyrimas, biologinio registro bazės tęstinis pildymas, Sjogreno ligos bazės tęstinis pildymas, stebėseną. Lietuvos bendros internetinės bazės valdymas.

2020 metais – Širdies ligų prevencijos ir gydymo taktikos modeliavimas: inovatyvių savalaikių diagnostikos ir gydymo taktikos metodikų parinkimas sisteminių jungiamojo audinio ligų metu, rezultatų apibendrinimas. Eksperimentinis efektyvių fotosensibilizatorių ar nanodalelių poveikių uždegiminio sąnario audiniams vizualizuoti ir gydyti šviesos poveikyje atrinkimas, rezultatų analizė. Sergančiųjų kaulų raumenų sistemos ligomis stebėseną, gamtinių kurotinių veiksnių efektyvumo tyrimas biologinio registro bazės tęstinis pildymas, Sjogreno ligos bazės tęstinis pildymas, stebėseną. Lietuvos bendros internetinės bazės sudarymas, valdymas, rezultatų sisteminimas.

2021 metais – Širdies ligų prevencijos ir gydymo taktikos modeliavimas: inovatyvių savalaikių diagnostikos ir gydymo taktikos metodikų parinkimas sisteminių jungiamojo audinio ligų metu, metodinės rekomendacijos. Unifikuotos kraujagyslių ištyrimo metodikos, tiriant sergančiuosius reumatinėmis ligomis, bei siekiant išaiškinti ankstyvą aterosklerozę, sukūrimas. Švitinimo sistemos modeliavimas ir efektyvių fotosensibilizatorių ar nanodalelių poveikių uždegiminio sąnario audiniams vizualizuoti bei gydyti apibendrinimas. Sergančiųjų kaulų raumenų sistemos ligomis stebėsenos apibendrinimas, gamtinių kurotinių veiksnių efektyvumo įvertinimas biologinio registro bazės apibendrinimas, Sjogreno ligos stebėsenos apibendrinimas.

## **6. Numatomi rezultatai:**

6.1. Kaulų raumenų ligų klinikinių duomenų bazės, biologinės terapijos registras yra svarbios priemonės išaiškinant šių ligų poveikio gyventojams riziką ir gaunant naujų mokslo žinių, reikalingų sergamumui, ligotumui, mirtingumui ir neįgalumui mažinti.

6.2. Panaudojus inovatyvius neinvazinius tyrimo metodus bus ištirti ankstyvos aterosklerozės pasireiškimo ypatumai sergant sisteminėmis skleroze ir kitomis sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis ir įvertintas jų ryšys su tradiciniais ir netradiciniais kardiovaskulinės rizikos veiksniais. Ankstyvas endotelio disfunkcijos bei arterijų standumo pokyčių nustatymas leis užkirsti kelią labai rimtom kardiovaskulinėms komplikacijoms, sergant sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis. Vertinant duomenis, kad Lietuvoje mirtingumas nuo širdies ir kraujagyslių ligų sudaro apie 54 proc. ir yra vienas didžiausių Europoje, manome, kad šis reumatinių ligonių širdies ir kraujagyslių funkcinių - struktūrinių pokyčių tyrimas leis nustatyti veiksnius, sąlygojančius kardiovaskulinių įvykių išsivystymą ir sudarys galimybę ieškoti priemonių jų prevencijai.

6.3. Apibendrinus šių tyrimų rezultatus bus parengtos 2 metodinės rekomendacijos „Širdies ligų inovatyvi savalaikė diagnostika ir gydymas sergantiesiems sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis“, „Unifikuota kraujagyslių tyrimo metodika, tiriant sergančiuosius reumatinėmis ligomis“ ir parengta bei apginta 1 mokslų daktaro disertacija.

6.4. Sudarius sąnario audinių fluorescencijos duomenų bazę bus gautos teorinės prielaidos švitinimo sistemos sukūrimui. Bus sukurta nesensibilizuotos fluorescencijos detekcijos sistema. Bus atrinkti efektyvūs fotosensibilizatorių ar nanodalelių poveikiai uždegiminio sąnario audiniams vizualizuoti ir gydyti sensibilizacijos poveikyje. Bus atrinkti selektyviausias

fotosensibilizatorius ar sintezuotų nanodalelių lokalus poveikis šviesa uždegiminei sinovijai sunaikinti. Gauta Institute sukurto šviesos šaltinio - modelio akreditacija klinikiniam tyrimui, bus atliekama pilotinė studija su pacientais, sergančiais sisteminė skleroze. Pagal tyrimų duomenis bus parengtos šviesos panaudojimo metodinės rekomendacijos ir parengta bei apginta 1 mokslų daktaro disertacija.

6.5. Įgyvendinant šios programos tikslus planuojama publikuoti ne mažiau 2 straipsnių kasmet leidiniuose, referuojamuose ir turinčiuose citavimo indeksą mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje „ISI Web of Science“.

#### **7. Rezultatų sklaidos priemonės:**

Gauti atliktų tyrimų rezultatai bus viešinami, skaitant pranešimus nacionalinėse ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose (nemažiau kaip 2-jose kasmet). Be to, tyrimo rezultatai bus viešinami populiarioje spaudoje, visuomenės sveikatos ir kitų specialistų vartojamoje informacinėje erdvėje, kasmetinėje mokslinėje-praktinėje konferencijoje „Reumatologijos seminarai“.

#### **8. Preliminarus programos lėšų paskirstymas (tūkst. Eur)**

Eil. Nr.	Išlaidų pavadinimas	2017 metais	2018 metais	2019 metais	2020 metais	2021 metais	Visai programai (suma)
1.	Programai skirti norminiai etatai, lėšos	8,66	8,66	8,66	8,66	8,66	
		83,04	83,04	83,04	83,04	83,04	415,2
2.	Kitos lėšos planuojamos programai vykdyti (iš kitų, institutui skirtų valstybės biudžeto bazinio finansavimo lėšų)	231,96	231,96	231,96	231,96	231,96	1 159,8
	Iš viso	315	315	315	315	315	1575

#### **9. Programos trukmė. 2017 - 2021 metai.**

#### **10. Programos vadovas:**

prof., habil. dr. Aleksandras Laucevičius, VMTI Inovatyvios medicinos centro Inovatyvių medicinos technologijų ir kurortologijos skyriaus vedėjas, 85 2365010, [cardio@cardio.lt](mailto:cardio@cardio.lt)