

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Mikk Tooming

**Potentsiaalne veresoontelähedane tüvirakunišš Dupuytreni
kontraktuuri koes**

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Viljar Jaks

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Dupuytreni kontraktuuri üldiseloomustus	6
1.1.1 Dupuytreni kontraktuuri staadiumid.....	6
1.2 DK kliiniline pilt ning peamised ravimeetodid.....	7
1.2.1 DK kliiniline pilt ja diagnostika	7
1.2.2 Mittekirurgiline ravi	9
1.2.3 Kirurgiline ravi	9
1.3 DK korral koe tasandil toimuvad muutused	11
1.4 Kasvufaktorid ja rakkude jagunemist reguleerivad signaalirajad DK patogeneesis..	14
1.5 Koespetsiifilised tüvirakud ning tüvirakuniši olemus ja ülesanded.....	15
1.6 Veresoontelähedased tüvirakunišid	16
2 EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjal ja meetodika	18
2.2.1 DK proovid	18
2.2.2 Immunofluorestsentsanalüüs	18
2.2.3 Kasutatud antikehad	19
2.3 Tulemused.....	20
2.3.1 DK koe veresoontes esineb CD90/CD105 positiivne aktiveeritud endoteel.....	20
2.3.2 Potentsiaalne tüvirakuniš DK veresoontes ja nende vahetus läheduses	23
2.4 ARUTELU	26
KOKKUVÕTE	28
SUMMARY	29
TÄNUAVALDUSED.....	30

KIRJANDUSE LOETELU.....	31
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	37
LIHTLITSENTS.....	38

KASUTATUD LÜHENDID

α -SMA – *alpha smooth muscle actin*, silelihase aktiin

bFGF – *Basic fibroblast growth factor*, aluseline fibroblasti kasvufaktor

CTGF – *Connective tissue growth factor*, sidekoe kasvufaktor

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*, 4',6-diamidino-2-fenüülindool

DK – Dupuytreni kontraktuur

ECM – *Extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks/rakuvaheaine

FITC – *Fluorescein isothiocyanate*, fluorestseiin-isototsüanaat

IGF-II – *Insulin-like growth factor*, insuliini tüüpi kasvufaktorit II

KM – konfokaalmikroskoop

PDGF – *Platelet-derived growth factor*, vereliistakute kasvufaktor

TGF- β – *Transforming growth factor beta*, transformeeruv kasvufaktor beeta

TNF – *Tumor necrosis factor*, tuumor nekroosifaktor

vWF – *Von Willebrand's factor*, Von Willebrandi faktor

SISSEJUHATUS

Dupuytreni kontraktuur (DK) on ülemaailmselt levinud krooniline progresseeruv haigus, mida iseloomustab käe palmarfatsia sidekoestumisest tulenev paksenemine, mis põhjustab sõrmede püsivat kõverdumist ehk kontraktuuri. Haiguse olemasolu tehakse kindlaks kliinilise pildi alusel. DK leevendamiseks on mitmed kirurgilised ja mittekirurgilised meetodid, kuid haiguse tekkepõhjus on teadmata, mistõttu ei osata seda ka ennetada. DK põhjustab raskusi igapäevaelu toimetustega ning see on üks haiguse uurimise oluline aspekt.

DK korral toimub kontrollimatu müofibroblastide proliferatsioon, kuhjumine ning kollageeni produktsioon. Müofibroblastid on rakud, mis võivad diferentseeruda silelihasrakkudest, fibroblastidest ja mesenhümaalsetest tüvirakkudest. Müofibroblastide ebanormaalse vohamise tõttu kujunevad haiguse algstaadiumis sõlmed, mis DK süvenedes progresseeruvad üle käe sidekirme kuni sõrmedeni ning moodustuvad väädid, mis koosnevad tüüp I kollageeni asemel tunduvalt paksemast tüüp III kollageenist. Väädid põhjustavadki palmarfatsia ja sõrmede pöördumatut kontraktsiooni.

Käesolevas töös keskendutakse mesenhümaalsete tüvirakkude olemasolu sedastamisele ning kontrollimatult proliferereeruvate rakkude asukoha määramisele DK koes, kasutades selleks immunofluorestsentsanalüüsi meetodit. Antud uurimustöö annab uusi teadmisi DK molekulaarsete mehhanismide kohta.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Dupuytreni kontraktuuri üldiseloostus

Dupuytreni kontraktuur ehk peopesa sidekirme fibromatoos on pihukilekõõluse paksenemisega kaasnev ühe või mitme sõrme kontraktuur. Enamasti on haaratud neljas ja viies sõrm, harvemini kolmas sõrm, erandlikel juhtudel ka põial või nimetissõrm. Aastate jooksul süveneb sõrmede sirutuspuudulikkus, mis võib lõpuks viia sõrmede konksu tõmbumiseni ehk kontraktuurini (Peetsalu, 2007). Peamiselt vaevab haigus mehi, naistel esineb haigus harvemini. Alates 90ndast eluaastast esineb aga DK haigeid võrdselt nii naiste kui meeste hulgas (Anthony jt., 2008). DK riskifaktoriteks on alkoholi kuritarvitamine, diabeet, epilepsia, pärilikkus, raske füüsiline töö, suitsetamine, südame- ja veresoonkonna haigused ning trauma (Descatha, 2012; Hindocha jt., 2006; Rayan, 2007). Inimesel, kellel esineb DK, on sarnane oodatav keskmine eluiga haigust mittepõdeva inimesega (Millesi, 2012).

DK esmakirjeldaja oli Felix Platter 1614. aastal (Elliot, 1999). Laiemalt sai DK tuntuks tänu Baron Guillaume Dupuytrenile, kes kirjeldas esimesena haiguse kirurgilist korrektsiooni (Dupuytren, 1834; Elliot, 1999). Uurimuste kohaselt pärineb haigus keldi ja germaani hõimkonnast, kes juba sajandeid tagasi migreerusid Põhja-Euroopasse. Inimeste väljaränne on põhjustanud haiguse levikut ka Põhja-Ameerikasse ja Austraaliasse (O’Gorman jt., 2010). Huvitavaks teeb DK puhul asjaolu, et haigus on vähe levinud aafriklaste ning aasialaste seas (Mikkelsen, 1972).

1.1.1 Dupuytreni kontraktuuri staadiumid

DK kulgu saab jaotada prolifererumise, involutsiooni ja lõppstaadiumiks. Prolifererumise ehk vohamise staadiumis toimuvad muutused nii naha struktuuris kui elastsuses. Ebanormaalselt vohavatest müofibroblastidest areneb sõlm, mis on omavahel nahka ja käe palmarfatsiat siduv pehme koemass (Fitzgerald jt., 1999; Hindocha jt., 2009). Sõlmed on valutud, kuid nad võivad suurenedes tekitada ebamugavustunnet. Liigesekapsli põletiku tekkides võivad sõlmed muutuda valulikuks (Rayan, 2007).

Involutsiooni staadiumis hakkavad kaduvatest sõlmedest tekkima väädid. Väädi moodustumine võib toimuda ka sõlme kadumiseta (McFarlane, 1974). Väätide moodustumise algstaadiumis on raske täpselt vahet teha, kust algab või lõpeb väädi ning kust sõlm. Peamiseks haaratud rakutüübiks selles staadiumis on müofibroblastid.

Lõppstaadiumis algab sõlmede ning müofibroblastide kadumine. Jäävad alles väädid, mis sisaldavad peamiselt kollageeni ja vähesel määral ka müofibroblaste (Rayan, 2007). Väädid põhjustavad sõrmede kontraktuuri ning selle tõttu väheneb käe normaalne funktsioon. Peopesa sidekirmes on tüüp I kollageen asendunud tüüp III kollageeniga, mis on tunduvalt paksem ja vähem elastsem. DK lõppfaasi kontraktuur on pöördumatu (Fitzgerald jt., 1999; Hindocha jt., 2009).

1.2 DK kliiniline pilt ning peamised ravimeetodid

1.2.1 DK kliiniline pilt ja diagnostika

DK on varajases staadiumis raskesti diagnoositav haigus, kuna nahas ning nahaaluses koes toimuvad muutused ei pruugi kohe tähendada antud haigust. Esmastele vähemärgatavatele muutustele nahas järgneb nodulite ehk sõlmede moodustumine ning aja möödudes tekkinud sõlmede degenererumine. Sõlmede degenerumisele järgneb omakorda väätide moodustumine, mis toob kaasa pöördumatu sõrmede ja palmarfastsia kõverdumise. DK mõjul naha elastsus väheneb ning selle seotus nahaaluse fastsiaga muutub. Haiguse arenedes tekkinud sidekoelised kiud tõmbavad nahka sissepoole, nahk muutub kortsuliseks ning peopesa tekivad vaod. Nimetatud muutused on DK varajasteks sümptomiteks. Tavaliselt eelneb palmarfastsia kontraktuur sõrmede kõverdumisele, kuid haigus võib alguse saada ning püsima jääda vaid sõrmede piirkonda peopesa haaramata (Fitzgerald jt., 1999; Hindocha jt., 2009).

Väljakujunenud DK on võimalik väga lihtsalt kindlaks teha Huestoni lauapinna testi abil. Testi tegemiseks asetab patsient oma käe lauapinnale. Tulemus on negatiivne, kui käsi on lauapinnaga samas tasapinnas ning positiivne, kui käsi on võimatu täiesti sirgelt laua tasapinnale asetada ning laua ja peopesa vahele jääb pastapliiatsi suurune vahe (Hueston, 1982).



Joonis 1. Dupuytreni kontraktuur. Dupuytreni kontraktuur (A) vasaku käe väiksel ning nimeta sõrmel ja (B) parema käe nimeta sõrmel.

DK põhjuslikku ravi ei ole ning haigust pole võimalik ennetada. Peale kirurgilist ravi võib haigus retsiveeruda kas samas kohas või alguse saada ka uuest kohast. Retsiveerumise risk on suurem indiviididel, kelle suguvõsas on inimesi, kes põevad sarnaseid haigusi nagu DK (näiteks Peyronie tõbi, tallasidekirme fibromatoos, sõrmenuki-mõhnuspaksendid) ning kes on alla viiekümne eluaasta vanad (Abe jt., 2004).

1.2.2 Mittekirurgiline ravi

DK ravi peamiseks eesmärgiks on normaalse käe funktsiooni ning sõrmede liikuvuse taastamine kas kirurgiliste või mittekirurgiliste ravivõtetega. Seejuures on kirurgiline ravi osutunud mittekirurgilistest ravimeetoditest efektiivsemaks (van Rijssen ja Werker, 2009). Peamisteks mittekirurgilisteks ravimeetoditeks on käeharjutused, füsioteraapilised protseduurid, lahased ning kiiritus- ja kollagenaasravi (Birks, 2010).

R. Finney oli esimene, kes kirjeldas 1955. aastal kiiritusravi mõju DK-le (Finney, 1955). Kiiritusravi on kõige suurema mõjuga haiguse algstaadiumis, kus kiiritamine pidurdab haiguse kulgu (Keilholz jt., 1996). Kiiritusravi kahjulikkus sõltub kiiritusdoosist. Peamisteks kõrvalnähtudeks on naha kuivus, punetus ning on võimalik isegi nahavähi teke (Falter jt., 1991).

Viimasel ajal on publitseeritud palju teadusartikleid kollagenaasi kasutamisest DK raviks. Antud juhul kasutatakse bakterist *Clostridium histolyticum* eraldatud kollagenaasi, mida süstitakse kollageenivääti (Badalamente ja Hurst, 2000; Badalamente ja Hurst, 2007; Hurst jt., 2009). Kollagenaas ei tee vahet haigel ja normaalsel koel ning seetõttu degradeeritakse nii haiges koes esinevat paksu tüüp III kollageeni kui ka tüüp I kollageeni. Närvikude koosneb tüüp II, XVI ja XXVIII kollageenidest, mida ravis kasutatav ensüüm ei mõjuta (Hart, 2012). Olenemata kollagenaasravi edukusest, on see uudne ravimeetod ning seetõttu pole veel laialt levinud.

DK paksenenud fastsia lõhustamiseks on kasutatud ka mitmeid teisi aineid, kuid nõrga raviefekti tõttu on nende kasutamisest loobutud. Nendeks aineteks olid näiteks pepsiin, trüpsiin, hüalüronidaas ning tiosiinamiin (van Rijssen ja Werker, 2009). Lisaks on leitud, et rasvkoest ja luuüdist pärinevad mesenhümaalsed tüvirakud eritavad mitmeid lahustuvaid aineid, mis inhibeerivad DK müofibroblastide prolifererumist. Selliste lahustuvate ainete kasutamine avaks uued võimalused mittekirurgiliseks DK raviks (Verhoekx jt., 2013).

1.2.3 Kirurgiline ravi

Kirurgilise ravi peamine eesmärk on taastada käe normaalne funktsioon. Põhilisteks kirurgilisteks ravimeetoditeks on fastsiotoomia ja erinevad fastsiektoomia alaliigid nagu radikaalne-, segmentaalne-, dermo-, nahakaudse nõela fastsiektoomia ning lisaks McCashi avatud peopesa tehnika (Bayat ja McGrouther, 2006).

Juba 1778. aastal pakkus Richard Whitfield palmaarfastsia fastsiotoomiat DK ravimiseks (Osterman jt., 2012). Fastsiotoomia põhimõte seisneb moodustunud kollageenivääride läbilõikamises, haiguslikku kude ei eemaldata (Shaw jt., 2007).

Kõige levinumaks operatsiooniks DK ravis on fastsiektoomia. Fastsiektoomia puhul eraldatakse haiguslik kude, üritades mitte kahjustada närve ning haigusest puutumata jäänud fastsiat. Operatsioon tuleks läbi viia enne, kui sõrme kontraktsioon on alla 60-ne kraadi või siis, kui esinevad valulikumad sõlmed. Fastsiektoomia puuduseks on pikk taastumisaeg, kuni kuus nädalat (van Rijssen ja Werker, 2009). Antud meetod on laialt levinud, kuna retsidiveerumise tõenäosus kolme aasta möödudes on 8,7% (van Rijssen jt., 2012).

1950ndatel oli populaarseks operatsioonimeetodiks radikaalne fastsiektoomia, kuid mitmete komplikatsioonide tõttu seda enam ei teostata. Radikaalse fastsiektoomia puhul eemaldatakse kogu haiguslik kontrakteerunud palmaarfastsia ning ka kude, mis ei ole otseselt patoloogilise koega seotud. Selle meetodi puhul säilitatakse vaid nahk (Chick ja Lister, 1991; Shaw jt., 2007).

Segmentaalne fastsiektoomia on fastsiektoomia alaliik, kus eemaldatakse ühe sentimeetri suurused haigestunud palmaarfastsia segmendid. Tihti eemaldatakse ka kõige prominentsem sõlm. Pärast operatsiooni pole sõrmed jäigad ning suured komplikatsioonid hoitakse ära, kuna pole vajadust ulatuslikke sisselõikeid teha. Antud meetodi rakendamine vähendab taastumisaega, kuid haiguse retsidiveerumise tõenäosus jääb samaks (Moermans, 1996).

Dermofastsiektoomia puhul eemaldatakse kogu haiguslik kude ning ka seda kattev nahk. Opereeritud kohale siirdatakse uus nahk. Antud meetodit kasutatakse haiguse retsidiivide korral. Dermofastsiektoomia rakendamisel on retsidiveerumise tõenäosus pärast 58 kuud 8.4% (Armstrong jt., 2000; Shaw jt., 2007). Lisaks tavalistele komplikatsioonidele kaasnevad antud operatsiooniga ka naha siirdamisega seotud riskid, nagu naha äratõukereaktsioon (van Rijssen ja Werker, 2009).

Nahakaudse nõela fastsiektoomia meetodi puhul läbistatakse kohaliku tuimestuse järel nõeltega nahk ning lõigatakse või läbistatakse haiguslikud väädid. Protseduur on laialt kasutatav, kuna taastumisaeg on lühike, ning meetod on minimaalselt invasiivne. Antud meetodi puudusteks on suur retsidiveerumise tõenäosus - 65% 32 kuu jooksul (van Rijssen jt., 2012). Tihti on peale nahakaudse nõela fastsiektoomia rakendamist siiski vaja kasutada ka mõnda eelnevalt nimetatud operatiivsetest meetoditest (van Rijssen ja Werker, 2006; van Rijssen jt., 2006).

McCashi avatud peopesa tehnika puhul tehakse pikilõiked pihukilekõõlusesse ning haav jäetakse pikemaks ajaks avatuks. Antud operatsiooni puhul on taastumine teistest kirurgilistest meetoditest pikaajalisem. Samuti on McCashi avatud peopesa tehnika puhul suur komplikatsioonide oht ja seetõttu kasutatakse antud meetodit vähe (McCash, 1964).

Kõikide meetodite puhul on levinumateks operatsioonijärgseteks komplikatsioonideks närvide ja veresoonte kahjustused, hematoomid, põletik ning käe tundlikkuse vähenemine. Seetõttu peab operatsioonijärgselt alustama füsioteraapiaga, et taastada käe lihasjäudlus ning ära hoida liigeste jäikuse teke. Füsioteraapia on vajalik, et taastada käe normaalse funktsioon ja ära hoida operatsioonijärgsed komplikatsioonid. Sellegipoolest võib olenemata raviviisi valikust ning selle edukusest DK retsidiveeruda (Peetsalu, 2007).

1.3 DK korral koe tasandil toimuvad muutused

On tõestatud, et müofibroblastid on peamiseks haaratud rakutüübiks DK-s ja nad vastutavad väärtide ning kontraktuuri tekke eest, olles peamiseks kollageeni allikaks DK koes (Hinz ja Gabbiani, 2012; Tomasek jt., 2002). Müofibroblastidele on iseloomulikud nii fibroblastide kui ka silelihasrakkude omadused (Gabbiani ja Majno, 1972; Shih ja Bayat, 2010). Müofibroblastid võivad pärineda fibroblastidest, silelihasrakkudest, peritsüütidest ja mesenhümaalsetest tüvirakkudest (Gabbiani ja Majno, 1972). DK sõlmed ja väädid sisaldavad suuremal hulgal α -silelihas aktiini (α -SMA, ingl *alpha smooth muscle actin*), mis on iseloomulik just müofibroblastidele (Iqbal jt., 2012).

Müofibroblastid ekspresseerivad normaalses koes tüüp I kollageeni, mis on ekstratsellulaarse maatriksi (ECM, ingl *Extracellular matrix*) peamine komponent (Hinz, 2007). Haava paranemise protsessis hakkavad müofibroblastid tootma tüüp III kollageeni (Gabbiani jt., 1976). Arvatakse, et DK korral toimub ebatüüpiline ja ülemäärane haava paranemise protsess, mis on vahendatud ECM-i ning müofibroblastidest toodetud kollageensete kiudude interaktsioonide poolt (Hart, 2012). DK sisaldab tüüp I kollageenikihi asemel tüüp III kollageenikihti (Murrell, 1991). Tüüp III kollageen on tunduvalt paksem kui tüüp I kollageen (Hanyu jt., 1984; Melling jt., 2000; Melling jt., 1999). Arvatakse, et DK peamiseks mehhanismiks võib olla müofibroblastide lõplik diferentseerumine ja apoptoos, millega kaasneb kollageen III rikka ECM-i moodustumine (Desmouliere jt., 1997; Wilutzky jt., 1998). Ka DK koe rakkude apoptoosimehhanismides on leitud muutusi (Wilutzky jt., 1998). Apoptoosi esilekutsujateks on siin geenid ced-3 ja c-Myc, transformeeruv kasvufaktor beeta (TGF- β , ingl *Transforming growth factor beta*), tuumor nekroosifaktor (TNF, ingl *Tumor*

necrosis factor) ning vereliistakute kasvufaktor (PDGF, ingl Platelet-derived growth factor) (Desmoulière jt., 1995).

Selleks, et mõista DK olemust, on oluline teada jagunevate müofibroblastide allikat. Müofibroblastid moodustuvad mesenhümaalsetest tüvirakkudest pärinevatest fibroblastidest. Et teada saada, kas mesenhümaalsed tüvirakud esinevad DK koes, uurisid Hindocha S. jt. tüvirakkude esinemist DK sõlmedes, väätidest, sõlmede ümber paiknevas rasvkoes ning sõlmi katvas nahas. Kontrollrühmaks valiti karpaalkanali sündroomiga patsiendid ning võrreldi saadud tulemusi omavahel. Antud katsetega uuriti, kas ka teised palmaarfastsia osad, nagu sõlmi kattev nahk ning sõlmede ümber paiknev rasvkude, võiksid olla potentsiaalseteks rakkude ebanormaalse prolifererumise asukohtadeks. Katsete tulemusena selgus, et võrreldes normaalse koega sisaldab DK kude enam CD13, CD29 ja CD166 positiivseid rakke. CD13 ja CD29 on rasvkoes leiduvate mesenhümaalsete tüvirakkude markerid. DK haigete inimeste sõlmi ümbritsevas rasvkoes esinev kõrgenenud tüvirakumarkerite ekspresioonitase võib viidata ebanormaalsele rasvkoe esinemisele DK koes ning see võib seletada, miks on DK nii suure retsidiveeruvusega haigus (Hindocha jt., 2011). Sõlmi katvast nahast ja sõlmi ümbritsevast rasvkoest pärinevad mesenhümaalsed tüvirakud võivad diferentseeruda DK korral müofibroblastideks, mis prolifereruvad ja lõppkokkuvõttes põhjustavad kontraktsiooni.

Mesenhümaalsed tüvirakud on võimelised diferentseeruma palmaarfastsia, rasvkoe ja dermise rakkudeks (Azzarone jt., 1983). Rahvusvahelise rakuteraapia ühingu poolt on kinnitatud, et mesenhümaalsed tüvirakud ekspresseerivad markereid CD73, CD90 ja CD105 ning samas ei ekspresseeri CD14, CD34 ja CD45 markereid. Lisaks eelpool mainitud tunnustele on nad kultiveeritavad ja võimelised *in vitro* tingimustes diferentseeruma adipotsüütideks, kondroblastideks ning osteoblastideks (Dominici jt., 2006).

Mõni aasta tagasi leidsid Iqbal S. jt. (2012) DK sõlmi katvast nahast ja sõlmi ümbritsevast rasvkoest mesenhümaalsete tüvirakkude tunnustega CD34 negatiivseid ja CD73, CD90 ja CD105 positiivseid rakke, ning tänu sellele võib väita, et DK struktuure ümbritsev kude sisaldab mesenhümaalseid tüvirakke (Iqbal jt., 2012). Lisaks eelnevalt mainitud Hindocha S. jt katsetele leiti, et varastel hematopoeetilistel tüvirakkudel ekspresseerub pinnamarker CD34, mille positiivseid rakke oli võrdselt kõikides uuritud DK kudedes. CD34 suurem ekspresseeritus viitab suurenenud veresoonte hulga DK koes (Hindocha jt., 2011). Mesenhümaalsete tüvirakkude paiknemine veresoonte vahetus läheduses võimaldab neil kiirelt levida vigastatud kohta (Meirelles Lda jt., 2009).

Lisaks esines DK koes kõrgenenud CD90 ja CD166 pinnamarkerite ekspressioon (Hindocha jt., 2011). CD90 on hematopoeetiline marker, mida on leitud fibroblastidest ning mesenhümaalsetest tüvirakkudest. Peale selle on CD90 ka apoptoosi ja nekroosi marker (Campioni jt., 2009; Hindocha jt., 2011; Rege ja Hagood, 2006). Tema kõrgenenud ekspressioonitase DK koes võib viidata rakuliste muutustele ja nekroosile. Apoptoosi ning CD90 positiivset signaali andvate rakkude omavahelist seost pole veel uuritud. CD166 on angiogeneesi marker ning tema ekspressioon DK koes viitab intensiivistunud angiogeneesile, seda toetab ka CD34 ekspressiooni tõus DK koes (Hindocha jt., 2011).

Nendest andmetest tulenevalt võib järeldada, et mesenhümaalsed tüvirakud on eeldatavaks müofibroblastide allikaks DK koes, kuid see vajab edasist uurimist (Berndt jt., 1994; McCann jt., 1993; Verjee jt., 2010). Niinimetatud DK tüvirakkude identifitseerimine ning kirjeldamine aitab paremini aru saada DK tekkemehhanismidest ning võib anda edasisi juhtnööre haiguse ravi efektiivsemaks muutmisel.

ECM on struktuurne element, mis pakub müofibroblastidele stabiilset toetavat keskkonda (Discher jt., 2009; Frantz jt., 2010; Hynes, 2012; Macri jt., 2007; Ozbek jt., 2010; Schultz ja Wysocki, 2009). Lisaks toetavale funktsioonile on ECM komponentidel kasvufaktorite ja teiste bioaktiivsete faktorite sisalduse tõttu ka regulatiivne ülesanne (Klingberg jt., 2013). Fibroblastide poolt asustatud kollageeniplaadil on *in vitro* tingimustes näidatud, et kollageenaasi madala taseme puhul ei toimu kollagenolüüsi ja seega on soodustatud kollageeni süntees ning ladustamine. Müofibroblastide poolt toodetud kollageenikimpude tõttu on fibrootilised haiguskolded rigiidsed (Robson, 2003).

DK üheks tunnuseks on ECM-i ebakorrapärane paiknemine (Alfonso-Rodriguez jt., 2014). DK korral on näidatud muutusi ECM-i struktuursetes valkudes nagu tüüp I kollageenis, tüüp III kollageenis, tenastiin-C-s ja mitmetes laminiinides (Berndt jt., 1994). TGF- β stimuleerib põhiliste ECM-i komponentide fibronektiini ja tüüp I kollageeni ekspressioonitaseme tõusu. DK tekkiv jäik ECM põhjustab tugevamat müofibroblastide kontraktsiooni ning suurendab ECM-i produktsiooni, mis muudab selle järjest jäigemaks (Krause jt., 2011).

1.4 Kasvufaktorid ja rakkude jagunemist reguleerivad signaalirajad DK patogeneesis

ECM omab lisaks rakke toetavale funktsioonile ka kasvufaktoreid hoiustavat funktsiooni. Peamised kasvufaktorid ja signaalirajad, mida peetakse oluliseks DK arengus, on transformeeruv kasvufaktor beeta (TGF- β , ingl *Transforming growth factor beta*), aluseline fibroblasti kasvufaktor (bFGF, ingl *Basic fibroblast growth factor*), sidekoe kasvufaktor (CTGF, ingl *Connective tissue growth factor*), insuliini tüüpi kasvufaktor II (IGF-II, ingl *Insulin-like growth factor 2*), MAP kinaasirada ja AKT signaalirada. DK rakkude proteoomika ja transkriptoomi analüüsid on näidanud, et TGF- β , MAP kinaasi ja AKT signaalirajad mängivad olulist rolli rakkude proliferatsioonis ja fibroosis (Kraljevic Pavelic jt., 2009; Rehman jt., 2011).

TGF- β on peamine tsütokiin, mis normaalses koes vastutab koe regeneratsiooni eest, kuid osaleb ka patoloogilise koe fibroosiprotsessis (O'Kane ja Ferguson, 1997). TGF- β indutseerib haiguslikes palmaarfastsia rakkudes kollageeni tootmist (Badalamente ja Hurst, 1999; Hurst ja Badalamente, 1999; Lee jt., 1999). DK korral on TGF- β ekspressioonitase suurenenud ja aktiivsus on seotud mitogeense aktiveeritud valguga ERK1/2 MAP kinaasi rajaga. Samuti seostatakse suurenenud TGF- β ekspressiooni α -SMA, CTGF-i, fibronektiini ja kollageenide suurenenud sünteesiga (Krause jt., 2011). TGF- β vahendab fibroblastide diferentseerumist müofibroblastideks, mille tagajärjel suureneb ECM komponentide tootmine (Kraljevic Pavelic jt., 2009). Kui inhibeerida DK fibroblastides spetsiifiliste inhibiitorite abil TGF- β ja ERK1/2 MAP signaalirada, siis toimub ka rakkude proliferatsiooni blokeerimine. Uurimustest selgub, et MAP kinaasi raja inhibiitorite kasutamisel väheneb ka fibroblastide kontraktilsus. Seetõttu on TGF- β ja ERK1/2 MAP kinaasi signaalsioonirajad uuteks DK ravi sihtmärkideks. Lisaks võivad eelpool nimetatud radade inhibiitorid ära hoida ka DK retsidiive (Krause jt., 2011)

DK patogenees on seotud ka AKT signaalirajaga, mida indutseerivad peamiselt kasvufaktorid (Kraljevic Pavelic jt., 2009). Meie töögrupp leidis, et AKT valguga fosforüleerimine toimub väikestes veresoontes ning proliferuivad rakud paiknevad nende vahetus läheduses. Seejuures olid põhilisteks proliferuivateks rakkudeks müofibroblastid väikeste veresoonte välises seinas. Lisaks leidsime, et DK kude sisaldas suurenenud hulgal CTGF, bFGF ja IGF-2. IGF-2 esines vaid DK koes, kuid CTGF ekspresseerus ka DK koe läheduses asuvates higinäärmete aatsinustes (Viil jt., 2015).

bFGF on varem leitud müofibroblastidest, mis ümbritsevad veresooni. Lisaks on bFGF leitud ka prolifereeruvatest endoteelirakkudest, mis asuvad valdavalt väikestes ja sulgunud veresoontes ning higinäärmetes, mis DK puhul ise ka bFGF-i sünteesivad (Gonzalez jt., 1992).

1.5 Koespetsiifilised tüvirakud ning tüvirakuniši olemus ja ülesanded

Tüvirakud on prolifereerumisvõimelised diferentseerumata rakud, mida leidub erinevates hulkraksete organismide kudedes. Tüvirakk on võimeline arenema kindla funktsiooniga rakuks või jagunema mitoosi teel uueks diferentseerumata tüvirakuks (Calabrese jt., 2007). Tüvirakkude arv organismis on vahendatud signaalide abil (Scadden, 2006). Tüvirakud eelistavad paikneda hulganiisti koos ning diferentseerudes moodustavad nad kudesid, mis on kõrgemate eluvormide aluseks. Tüvirakkude diferentseerumise suuna kujunemisel omavad suurt tähtsust rakud ise, tekkimise asukoht, maatriksi glükoproteiinid, rakkude- ja molekulidevahelised kontaktid ning rakkudevahelised interaktsioonid. Täiskasvanud rakud ja rakkudevahelised ühendused ning erinevad sekreteeritavad faktorid säilitavad tüvirakke puhkeolekus (Calabrese jt., 2007).

Tüvirakke määratletakse asukoha järgi ning nende kogumikud moodustavad keskkonna, mida nimetatakse tüvirakunišiks (Scadden, 2006). Inimesel on kirjeldatud embrüonaalseid ja täiskasvanud tüvirakke, millest viimastel on ilma tüvirakunišita piiratud jagunemisvõime. Sellised rakud on näiteks hematopoeetilised tüvirakud, mis tagavad kogu vere- ja immuunsüsteemi regeneratsiooni. Ilma kindla anatoomilise asukoha ning tüvirakunišita ei oma tüvirakud kindlat funktsiooni. Tüvirakuniš tagab tüvirakkude püsijäämise ja edasise saatuse, mõjutades nende funktsiooni ning vastutades nende stabiilse arvu eest organismis (Putnam, 2014). Ilma tüvirakunišita rakkude arv organismis väheneks või toimuks hoopis nende ebanormaalne vohamine. Tüvirakuniš moodustab koe füsioloogilise põhiüksuse aluse. Need on spetsiifilised kohad, mis reguleerivad kudede arengut, toimetulekut ning taastamist. Tüvirakuniši ja tüvirakkude vastastikune mõju moodustab dünaamilise süsteemi, mis on vajalik kudede püsimiseks. Tüvirakuniši moodustavateks faktoriteks on lahustunud ja lahustumata ained, ECM ning teiste rakkude poolt avaldatavad mõjutused. Tüvirakunišist oleneb tüvirakkude diferentseerumise tase ning selle kaudu vastutab ta koe homöostaasi eest (Scadden, 2006). Tüvirakunišid paiknevad enamasti veresoonte vahetus läheduses (Putnam, 2014). Paiknemine väikestes veresoontes, või nende vahetus läheduses, võimaldab tüvirakkudel kergesti saada erinevaid signaale üle organismi (Scadden, 2006). Tüvirakuniši ümberkorraldamine ja organiseerimine on oluline ning pidev. Kui vajaminevate signaalide

ekspresseerumises toimuksid häired, viiks see rakkude ebanormaalsele paigutumisele. Häire tüvirakunišis võib tekitada erinevaid patoloogiaid nii tüvirakkudele kui ka teistele sihtmärkidele ning isegi põhjustada kasvaja arengu (Scadden, 2006).

1.6 Veresoontelähedased tüvirakunišid

Varem on näidatud, et ajukasvajate tüvirakud paiknevad peamiselt väikeste kapillaaride läheduses. Ajukasvajate korral on veresoontelähedased tüvirakunišid ebanormaalsed ning nad mõjutavad otseselt kasvajakke tüvirakke ning ka kasvaja arengut. Ajukasvaja veresoontevõrgustik tagab sobiva tüvirakuniši keskkonna ja tingimused, mis võimaldavad vähitüvirakkude püsimise multipotentsel kujul. Lisaks sellele võib tüvirakunišis pakkuda ka kaitsvat rolli väliste tegurite eest, nagu keemia- ja kiiritusravi, tänu millele on kasvajakud võimelised retsidi veeruma. On läbi viidud katseid angiogeneesi ja veresoonte hulga vähendamiseks, mille tulemusena on peetunud ka kasvaja areng (Calabrese jt., 2007). Sellest võib järeldada, et väikesed veresooned käituvad tüvirakunišina ka kasvajakke ajukoes (Calabrese jt., 2007; Paul jt., 2012).

Meie töögrupp võttis aluseks nimetatud info uurimaks proliferereeruvate rakkude paiknemist DK koes ning leidis, et ka meie uuritavad proliferereeruvad rakud asusid enamasti väikestes veresoontes või nende vahetus läheduses (Viil jt., 2015).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

1. Uurida, kas DK koes esineb mesenhümaalseid tüvirakke, mis on kolmikpositiivsed markeritele CD73, CD90 ja CD105;
2. Leida ja kirjeldada DK koes prolifereeruvate rakkude täpset asukohta, mis võiks olla aluseks haiguse tekkele ja selle progresseerumisele.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 DK proovid

DK haigetelt võeti koeproovid avatud radikaalse fastsiektoomia abil, eemaldades kogu haiguslik kontakteerunud palmaarfastsia. Sõlmed eraldati DK väätidest ning sisestati Tissue-Tek O.C.T. segusse (Sakura Finetek, USA). Sisestatud proovid külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati - 80°C juures. Koeproovide võtmine ja edasine töötlemine on kooskõlastatud Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomiteega (loa nr 221/M-34).

2.2.2 Immunofluorestsentsanalüüs

Külmutatud proovidest lõigati 10 µm paksused koelõigud ja asetati alusklaasile (Starfrost, KnittelGlass, Saksamaa). Lõike fikseeriti 4%-lises paraformaldehüüdis 10 minutit, seejärel pesti 1x PBS lahusega 2x2 minutit. Permeabiliseerimine toimus 0,1% Triton X-100 lahusega 10 minuti jooksul, millele järgnes pesu 1x PBS lahusega 2x2 minutit. Järgnevalt blokeeriti lõike 4% kitse seerumit sisaldavas PBS lahuses tund aega. Peale blokeerimist inkubeeriti koelõike primaarsete antikehadega tund aega ning pesti 1x PBS lahusega 3x5 minutit. Sellele järgnes 45-minutiline inkubatsioon fluorokroomiga märgistatud sekundaarsete antikehadega (1:1000, Thermo Fisher Scientific) ning pesu 1x PBS lahusega 3x5 minutit. Inkubatsioonil CD105-FITC (fluorestseiin-isotiotsüanaat) konjugaadiga märgistati proovid primaarsete ning seejärel sekundaarsete antikehadega nagu vastavalt eespool esitatud kirjeldusele ning seejärel blokeeriti proovid tund aega 4% küüliku seerumit sisaldavas PBS lahuses, mis sisaldas mittespetsiifilisi hiire immunoglobuliine (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Edaspidi inkubeeriti proovid CD105-FITC konjugaadiga ühe tunni jooksul ning pesti lõike 1x PBS lahusega 3x5 minutit. Seejärel toimus inkubeerimine küülikus toodetud FITCi vastase Alexa Fluor 488-konjugeeritud sekundaarse antikehaga 45 minutit (1:500, Thermo Fisher Scientific), millele järgnes pesemine 1x PBS lahusega 3x5 minutit. Rakutuomad tehti nähtavaks DAPI lahusega (1µg/ml, Sigma), millele järgnes pesemine 1x PBS lahusega 2 minutit. Proovid sulundati sulundusvedelikuga (Dako, Taani). Kõik ülaltoodud immunofluorestsentsprotseduurid toimusid toatemperatuuril.

Konfokaalmikroskoobi (KM) analüüsi jaoks fikseeriti 60 µm paksused koelõigud 4% paraformaldehüüdis 12 minutit. Sellele järgnes pesu 1x PBS lahusega 3x5 minutit ning blokeerimine koos permeabiliseerimisega tund aega 4% kitse seerumit sisaldavas PBS lahuses, kuhu oli lisatud 0,5% Triton X-100 lahust. Järgnevalt inkubeeriti proove üleöö 4°C juures primaarsete antikehadega, kuhu oli lisatud 0,5% Triton X-100. Pesu viidi läbi 3x40

minutiliste intervallidega 1x PBS lahuses. Inkubeerimine sekundaarsete antikehade lahusega (1:500, Thermo Fisher Scientific), mis sisaldas lisaks 0,5% Triton X-100 lahusele ka DAPI lahust (1µg/ml, Sigma), kestis tund aega. Proovid sulundati sulundusvedelikuga (Dako).

Katsetes kasutatud antikehad on välja toodud Tabelis 1. Pildid tehti Olympus BX61 ja Olympus IX81 CellR fluorestsentsmikroskoopidega ning Olympus FV1000 konfokaalmikroskoobiga. Pilte töödeldi Hokawo software v2.1-ga (Hamamatsu Photonics) ning Imarise 7.6.1 programmiga (Bitplane AG).

2.2.3 Kasutatud antikehad

Tabel 1. Töös kasutatud antikehad

Primaarsed antikehad	Peremeesloom, kloon/kataloogi nr	Allikas	Lahjendus
CD73	Hiir, kloon AA60-E3-3, MABD122	Millipore	1:50
CD90 (Thy-1)	Hiir, kloon F15-42-1, CBL415	Millipore	1:50
CD105-FITC	Hiir, kloon MEM-229, ab53318	Abcam	1:100
Desmiin	Hiir, kloon D33, M0760	Dako	1:50
Ki67	Küülik, kloon EPR3611, ab92353	Abcam	1:200
Ki67	Rott, kloon SolA15, 14-5698	eBioscience	1:100
Silelihase aktiin (SMA)	Hiir, kloon α sm-1, NCL-SMA	Novocastra, Leica	1:25
Silelihase aktiin (SMA)	Küülik, kloon EPR5368, 5264-1	Epitomics	1:2000
von Willebrandi Faktor	Küülik, A0082	Dako	1:1000
Hiire IgG	Hiir, sc-3879	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Küüliku IgG	Küülik, ab27478	Abcam	1:200

Sekundaarsed antikehad	Peremeesloom, kataloogi nr	Allikas	Lahjendus
Kitses toodetud roti vastane Alexa 488 konjugeeritud antikeha	Kits, A-11006	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Küülikus toodetud FITC vastane Alexa 488 konjugeeritud antikeha	Küülik, A-11090	Thermo Fisher Scientific	1:500
Kitses toodetud hiire vastane Alexa 555 konjugeeritud antikeha	Kits, A-21424	Thermo Fisher Scientific	1:1000 KM – 1:500
Kitses toodetud küüliku vastane Alexa 555 konjugeeritud antikeha	Kits, A-21429	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Kitses toodetud küüliku vastane Alexa Fluor 647 konjugeeritud antikeha	Kits, A-21245	Thermo Fisher Scientific	1:1000 KM – 1:500

KM - konfokaalmikroskoop, FITC - fluorestseini-isotiotsüanaat

2.3 Tulemused

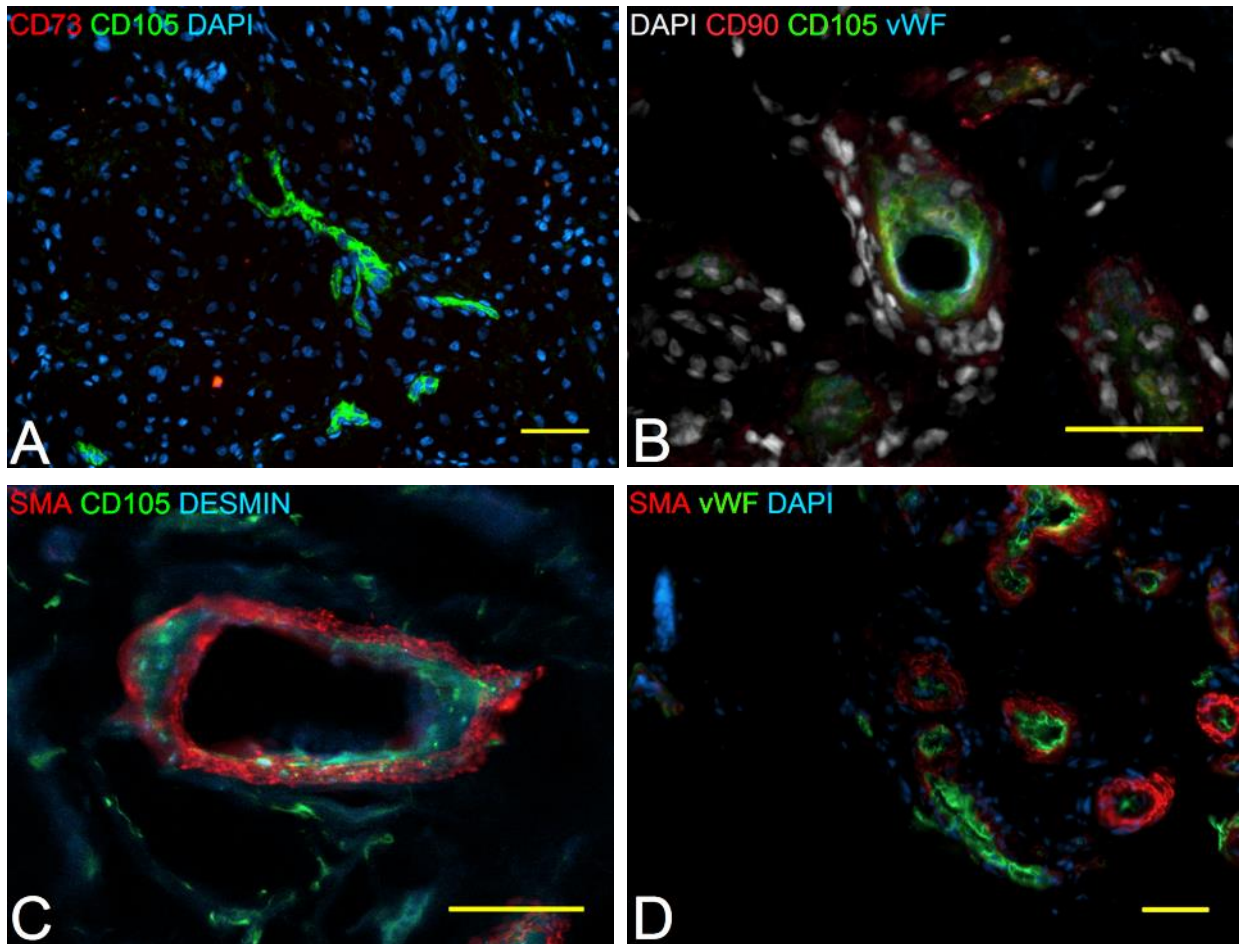
2.3.1 DK koe veresoontes esineb CD90/CD105 positiivne aktiveeritud endoteel

Mesenhümaalseid tüvirakke iseloomustab CD73, CD90, CD105 ekspressioon (Dominici jt., 2006; Putnam, 2014). Mesenhümaalseid tüvirakke on isoleeritud DK kontraktuuri lähedal asuvast koest, kuid mitte otse DK koest (Hindocha jt., 2011; Iqbal jt., 2012). Et kindlaks teha, kas DK sisaldab mesenhümaalseid tüvirakke, mis ekspresseeriks kõiki mesenhümaalse tüviraku markereid CD73, CD90 ja CD105, värvisime DK kudet vastavate spetsiifiliste antikehadega. Antud katse tulemusena leidsime, et DK koes ekspresseeruvad mesenhümaalsetest tüvirakumarkeritest vaid CD90 ja CD105, kuid mitte CD73 (Joonis 2, A ja B). Seega immunofluorestsentsanalüüs tõestas, et DK kude ei sisalda mesenhümaalseid tüvirakke, mis oleksid positiivsed kõigi kolme markeri suhtes.

On näidatud, et DK kude sisaldab võrreldes mittehaigusliku koega suurenenud hulgal veresooni (Rehman jt., 2011). Et teada saada, kas DK koe veresoonte endoteel sisaldab vastavat aktiveeritud endoteeli fenotüüpi, värvisime DK kudet antikehadega CD90, CD105 ning veresoonte endoteelimerkiga von Willebrandi faktor (vWF, ingl *Von Willebrand's factor*), kuna lisaks CD90 ja CD105 ekspressioonile mesenhümaalsetes tüvirakkudes, märgistavad nad ka aktiveeritud endoteeli, ekspresseerudes arenevates veresoontes, regenereeruvates ning kasvujalikes kudedes. Samuti tähistavad nad kasvufaktorite ja tsütokiinide poolt aktiveeritud endoteeli rakke (Nassiri jt., 2011; Schubert jt., 2011). Katse tulemusena selgus, et DK kude sisaldab CD90/CD105 aktiveeritud endoteeli fenotüüpi ning CD90 ja CD105 asusid vWF-positiivset signaali andvate veresoonte endoteeli rakkudes (Joonis 2, B). Enamasti ulatus CD90 positiivne osa CD105 positiivsest osast välja.

Silelihase aktiin (SMA) on ekspresseeritud müofibroblastides (Hinz ja Gabbiani, 2012), mis ümbritsevad veresoontes endoteeli rakke ning desmiini ekspresseeruvad peritsüüdid (Nehls jt., 1992) ümbritsevad omakorda müofibroblaste. Et kinnitada CD105 ekspressiooni vaid veresoonte endoteeli rakkudes värvisime DK kudet CD105 ja SMA antikehadega ning CD105 ja desmiini antikehadega. Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena ei esinenud CD105 ja SMA positiivseid ega CD105 ja desmiini positiivseid rakke ning seega järeldasime, et CD105 ekspresseerub ainult endoteeli rakkudel (Joonis 2, C).

Kokkuvõtvalt selgus, et DK koes leidub CD90 ja CD105 ekspresseerivaid rakke vaid endoteelis, mis viitab põletikule ja aktiveeritud kasvufaktorite signaaliradade olemasolule. CD73 positiivseid rakke ei leitud. Antud tulemustest selgub, et DK kude ei sisalda mesenhümaalseid tüvirakke.



Joonis 2. Aktiveeritud endoteeliga veresooni sisaldavas DK koes ei esine mesenhümaalseid tüvirakke. (A) värviti DK kudet antikehadega, mis märgistavad CD73 (punane) ja CD105 (roheline). DAPI märgistab rakutuumasid (sinine). Katse tulemusena selgus, et DK koes ei esinenud CD73 ja CD105 kaksik-positiivseid rakke. (B) värviti DK kudet antikehadega, mis märgistavad CD90 (punane), CD105 (roheline) ja vWF (sinine). DAPI märgistab rakutuumasid (hall). Leiti, et DK kude sisaldab CD90/CD105/vWF positiivseid endoteeli rakke. (C) värviti DK kudet antikehadega, mis märgistavad SMA (punane), CD105 (roheline) ja desmiini (sinine). Katse tulemusena selgus, et DK koes ei esinenud CD105/SMA ega CD105/desmiin topeltpositiivseid rakke. (D) värviti DK kudet antikehadega, mis tunnevad ära SMA (punane) ja vWF (roheline). DAPI märgistab rakutuumasid (sinine). Selgus, et DK koes esinevad SMA positiivsed moodustised on veresooned. Pildid on tehtud Olympus BX61 ja IX81 fluorestsentsmikroskoopidega. Piltide mõõtkava 50 μm .

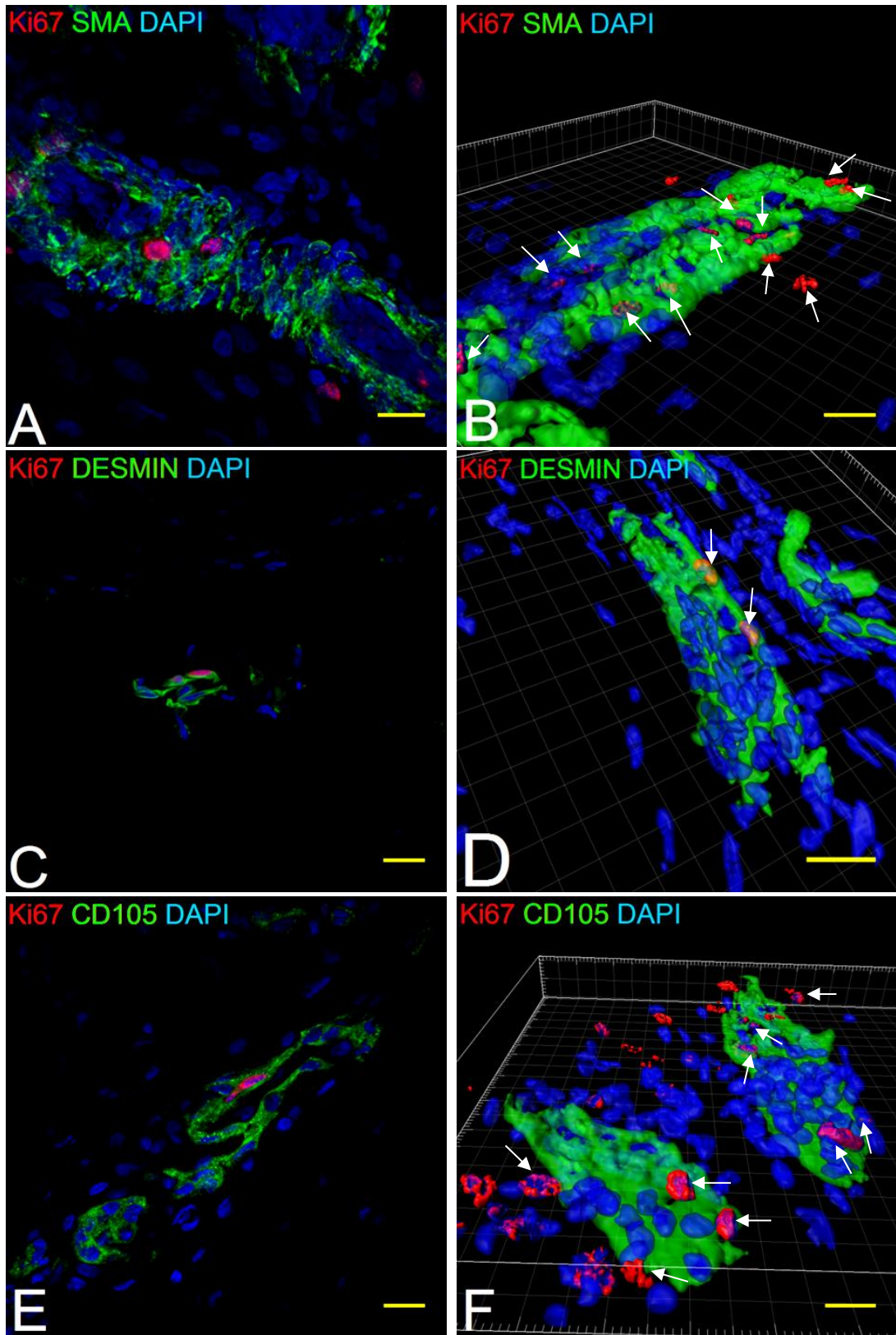
2.3.2 Potentsiaalne tüvirakunišš DK veresoontes ja nende vahetus läheduses

On teada, et müofibroblastid ning nende ebaloomulikult aktiivne prolifererumine iseloomustab DK kudet ja eriti aktiivset haiguse kulgu (Rehman jt., 2011). Et lähemalt uurida, kus DK koes antud prolifereruvad rakud täpsemalt asuvad, värvisime DK kudet antikehadega, mis tunnevad ära müofibroblastide markerit silelihase aktiini (SMA) ning raku proliferatiivsuse markerit Ki67. Värvimise tulemusel selgus, et DK kude sisaldab suurenenud hulgal Ki67 positiivset signaali andvaid prolifereruvaid rakke, mis asusid SMA-d ekspresseerivate struktuuride sees või nende vahetus läheduses (Joonis 3, A ja B). Et kindlaks teha, kas SMA positiivset signaali andvad struktuurid on veresoone, värvisime DK kudet SMA ning endoteelimerki vWF-iga (Joonis 2, D). Antud katsega tõestati, et prolifereruvad müofibroblastid asusid väikeste veresoonte lihaskihis või nende vahetus läheduses.

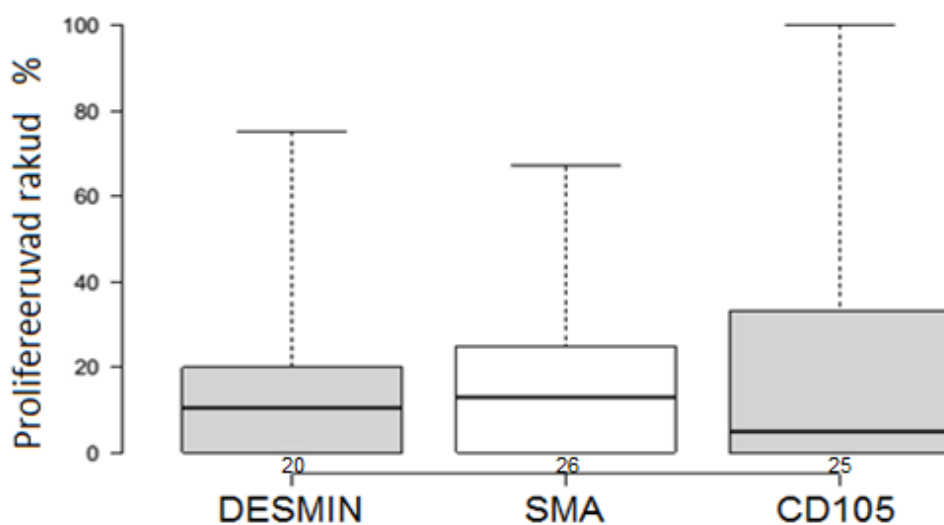
Teiste veresoone seina komponentide proliferatsiooni aktiivsuse teada saamiseks värvisime DK kudet antikehadega, mis seonduvad Ki67, peritsüüdi markeri desmiiniga, ning CD105-ga. Immunofluorestsentsanalüüs näitas, et DK koes esineb nii prolifereruvaid peritsüüte (Joonis 3, C ja D) kui ka prolifereruvaid CD105 positiivseid aktiveeritud endoteeli rakke (Joonis 3, E ja F). Ühtlasi leidsid prolifereruvaid rakke ka väikeste veresoonte vahetus läheduses.

Kvantitatiivse analüüsi tulemusel selgus, et desmiin positiivsete prolifereruvate rakkude keskvaartus oli 10,5%, SMA positiivsete prolifereruvate rakkude keskvaartus oli 13% ning CD105 prolifereruvate rakkude keskvaartus oli 5%. Antud tulemustest võib järeldada, et proliferatsioon toimub kogu veresoone ulatuses, mis viitab sellele, et DK koes veresoone kasvavad (Joonis 4).

Jagunevate rakkude asukoha uurimisel selgus, et prolifereruvad rakud asuvad veresoontes ja nende vahetus läheduses. Viimasena mainitud tulemus viitab võimalusele, et veresoone ja nende ümbrus võivad olla potentsiaalseks tüvirakunišiks Dupuytreni kontraktuuris.



Joonis 3. Prolifereeruvate rakkude paiknemine DK koes. DK kudet värviti antikehadega, mis tunnevad ära Ki67 (punane), SMA, desmiini ja CD105 (kõik rohelised, vaata pildilegendi). DAPI märgistab rakutuumasid (sinine). Katse tulemusena selgus, et DK koes olevates veresoontes või nende vahetus läheduses esineb SMA, desmiin ja CD105 positiivseid prolifereeruvaid rakke. (B) on nooltega näidatud SMA positiivsed prolifereeruvad müofibroblastid. (D) on nooltega näidatud desmiin positiivsed prolifereeruvad peritsüüdid. (F) on nooltega näidatud CD105 positiivsed prolifereeruvad endoteeli rakud. Pildid on tehtud Olympus FV1000 konfokaalmikroskoobiga. Piltide mõõtkava 20 µm.



Joonis 4. Prolifereeruvate rakkude jaotus DK koe veresoone seinas. Desmiin antikehaga värvitud piltidel oli desmiin positiivsete rakkude koguhulk 144, neist desmiin positiivse signaaliga prolifereeruvaid rakke 18 ning kokku oli prolifereeruvaid rakke 44. SMA antikehaga värvitud piltidel oli SMA positiivsete rakkude koguhulk oli 242, neist SMA positiivse signaaliga prolifereeruvaid rakke 26 ning kokku oli prolifereeruvaid rakke 55. CD105 antikehaga värvitud piltidel oli CD105 positiivsete rakkude koguhulk 265, neist CD105 positiivse signaaliga prolifereeruvaid rakke oli 30 ning kokku oli prolifereeruvaid rakke 72. Numbrid tulpade all väljendavad analüüsitud piltide arvu.

2.4 ARUTELU

Kuna Dupuytreni kontraktuur (DK) on väga laialdaselt levinud, pakuvad selle haiguse tekkepõhjused ja tekkemehhanism teadlastele suurt huvi. DK leevendamiseks on küll mitmeid kirurgilisi ja mittekirurgilisi ravimeetodeid, kuid vaatamata sellele ei osata DK-d ennetada ning põhjuslik ravi haiguse vastu puudub.

Viimastel aastatel on avaldatud järjest uusi andmeid Dupuytreni kontraktuuri molekulaarsete aluste kohta, ometi on teadmised antud haiguse rakuliste ning molekulaarsete mehhanismide kohta siiski veel puudulikud.

DK kulgemisel toimub kontrollimatu müofibroblastide proliferatsioon ja kuhjumine ning tüüp III kollageeni tootmine. Nimetatud sündmused viivad edaspidise püsiva kontraktsiooni tekkeni (Rehman jt., 2011). Rahvusvaheline rakuteraapia ühing on kinnitanud, et mesenhümaalsed tüvirakud ekspresseerivad CD73, CD90 ja CD105 markereid. Iqbal jt. (2012) on näidanud mesenhümaalsete tüvirakkude paiknemist DK lähedalasuvates kudedes nagu sõlmi ümbritsev rasvkude ning sõlmi kattev nahk, kuid pole siiani teada, kas DK kude sisaldab mesenhümaalseid tüvirakke. Sellest lähtuvalt oli käesoleva uurimustöö üheks eesmärgiks uurida, kas DK koes esineb CD73/CD90/CD105 positiivseid mesenhümaalseid tüvirakke. Immunofluorestsentsanalüüsi tulemusena selgus, et DK koes ekspresseeruvad mesenhümaalsete tüvirakkude markerid CD90 ja CD105, kuid mitte CD73. Nendest tulemustest järeldasime, et DK koes ei esine mesenhümaalseid tüvirakke. Seetõttu võib oletada, et just DK ümbritsevatest kudedest pärinevad mesenhümaalsed tüvirakud annavad aluse müofibroblastidele, mis põhjustavad DK-le omast pöördumatut kontraktuuri.

On näidatud, et CD90 ja CD105 ekspresseeruvad arenevates veresoontes, regenereeruvates ning kasvavalikes kudedes, lisaks sellele märgistavad nad kasvufaktorite ja tsütokiinide poolt aktiveeritud endoteeli rakke (Nassiri jt., 2011; Schubert jt., 2011). Rehman jt. (2011) näitasid, et DK kude sisaldab suuremal hulgal veresooni võrreldes mitthaigusliku koega. Eeltoodud markerite suurenenud ekspresseerumise osakaal DK koes püstitas küsimuse, kas DK koes asuv veresoonte endoteel sisaldab vastavat aktiveeritud endoteeli fenotüüpi. CD90, CD105 ja veresoonte endoteeli markeri vWF-iga koosvärvimisel selgus, et DK koes asuvates veresoontes esineb antud aktiveeritud endoteeli fenotüüp, mis viitab DK koes asetleidvatele põletikulistele protsessidele ning aktiveeritud kasvufaktorite signaaliradadele.

Antud uurimustöö teiseks eesmärgiks oli leida ja kirjeldada täpne prolifer eeruvate rakkude asukoht, mis seletaks haiguse tekkemehhanismi ja edasist progresseerumist. Immunofluoresentsanalüüsil värviti DK kudet raku proliferatiivsuse markeriga Ki67 ning müofibroblastide markeriga SMA. Katsete tulemustest selgus, et kontrollimatult prolifer eeruvad müofibroblastid paiknesid SMA struktuurides vWF positiivsete endoteelirakkude ümber ja veresoonte ümbruses.

Lisaks müofibroblastidele uuriti ka teiste veresoone ümber paiknevate rakutüüpide proliferatsiooni aktiivsuseid. Selgus, et tõepoolest esineb DK koes ka prolifer eeruvaid peritsüüte ning prolifer eeruvaid aktiveeritud veresoonte endoteeli rakke, mis näitab, et DK-s toimub aktiivne veresoonte moodustumine ja kasv. Samuti võis täheldada jagunevaid rakke veresoonte lähedalt ümbritsevast koest. Antud tulemused rõhutavad DK koe veresoonte ja nende ümbruse olulisust erinevatele rakkudele. Võib oletada, et suurenenud veresoonte hulk DK koes aitab kaasa parema hapniku, toitainete ning kasvufaktorite kättesaadavuse, mis omakorda soodustab rakkude proliferatsiooni.

Kuigi antud töö raames ei suudetud DK koe siseseid mesenhümaalseid tüvirakke tuvastada, on suurenenud veresoonte arvuga olemas vajalikud tingimused tüvirakuniši eksisteerimiseks. Võib oletada, et DK kude sisaldab veel meile teadmata omadustega tüvirakke, mis võivad olla haiguse aluseks.

Saadud informatsioon DK koes esinevate prolifer eeruvate rakkude asukoha kohta avas uue suuna haiguse molekulaarsete mehhanismide uurimisel. Edaspidi tasuks uurida DK koes asuvate erinevate rakupopulatsioonide nagu endoteelirakkude, peritsüütide ning silelihasrakkude tüvirakuomadusi *ex vivo*. Lisaks sellele andis käesolev uurimustöö suuna erinevate kasvufaktorite mõju uurimiseks DK koest pärinevate rakkude kasvule, kasutades erinevaid spetsiifilisi inhibiitoreid nagu AKT, CTGF, bFGF.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kas DK koes esineb mesenhümaalseid tüvirakke ning leida ja kirjeldada täpne prolifereruvate rakkude asukoht, mis seletaks haiguse tekkepõhjust ja edasist kulgu.

Uurimise käigus tehti kindlaks, et DK kude ei sisalda CD73, CD90 ja CD105 markerite suhtes positiivseid mesenhümaalseid tüvirakke.

Ometi leidsime, et DK koes toimub valdav rakkude prolifererumine, mis on iseloomulik just tüvirakkudele. Katsete tulemusena selgus, et prolifereruvad rakud asuvad veresoontes ja nende vahetus läheduses. Kvantitatiivne analüüs näitas, et DK koes toimub rakkude prolifererumine kogu veresoone ulatuses. Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et DK koes on veresooned pidevas kasvufaasis. Meie arvame, et väikesed veresooned ja nende ümbrus pakuvad rakkudele püsivat ja toetavat keskkonda, kus nad on võimelised ebakorrapäraselt prolifereruma.

Käesoleva uurimustöö põhjal võib oletada, et veresooned ja nende vahetu lähedus on potentsiaalseks tüvirakunišiks Dupuytreni kontraktuuris. Seetõttu omavad tüvirakkude ja nende kasvu pärssivate inhibiitorite uuringud suurt potentsiaali haiguse tekkepõhjuste väljaselgitamisel ja ravimisel.

Blood vessels form putative stem cell niches in Dupuytren's contracture.

Mikk Tooming

SUMMARY

The aim of this study was to determine if Dupuytren's contracture (DC) tissue confined mesenchymal stem cells (MSC). In our search for such cells we were not able to identify any CD73/CD90/CD105 triple-positive MSC-like cells in the DC tissue suggesting that putative DC stem cells do not necessarily bear a consensus MSC phenotype. Nonetheless, we found that endothelial cells in the blood vessels of DC nodules were double-positive for the MSC markers CD105 and CD90. CD105 is expressed in the endothelium of immature blood vessels and in blood vessels found in malignant tumors indicating the presence of activated growth factor signaling in the vascular and perivascular structures of the DC tissue. CD90 is expressed in the activated endothelial cells e.g. in the case of inflammatory response.

In concordance with the presence of activated CD105/CD90-positive endothelial cells we found an increased number of proliferative Ki67-positive cells in the DC nodules, which were located predominantly in the immediate vicinity and within the CD105-positive blood vessels. Moreover, we found proliferative SMA positive myofibroblasts, Desmin positive pericytes and CD105 positive endothelial cells within and the immediate vicinity of DC blood vessels. The quantitative analysis of the immunofluorescence images showed that blood vessels in DC tissue are in an activated growth state.

According to this research, blood vessels might be considered as a stem cell niche in Dupuytren's contracture. The *ex vivo* properties of fibroblasts, endothelial cells and pericytes need to be further investigated.

TÄNUAVALDUSED

Avaldan suurt tänu oma juhendajale, Viljar Jaksile huvitava lõputöö teema eest ning Janeli Viilile kannatliku suhtumise ja suure abivalmiduse eest.

Siiras tänu tervele laborikollektiivile, kellela poleks lõputöö valmimine nii töökalt ja innukalt möödunud.

Lisaks väärivad sooja tänusõna ka mu kursusekaaslased, kellela poleks need kolm aastat nii toredalt möödunud ning mu ema, kes on minu jaoks alati olemas olnud.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abe, Y., Rokkaku, T., Ofuchi, S., Tokunaga, S., Takahashi, K. ja Moriya, H. (2004). An objective method to evaluate the risk of recurrence and extension of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br.* 29: 427-30.
- Alfonso-Rodriguez, C. A., Garzon, I., Garrido-Gomez, J., Oliveira, A. C., Martin-Piedra, M. A., Scionti, G., Carriel, V., Hernandez-Cortes, P., Campos, A. ja Alaminos, M. (2014). Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in dupuytren's disease. *PLoS One.* 9: e112457.
- Anthony, S. G., Lozano-Calderon, S. A., Simmons, B. P. ja Jupiter, J. B. (2008). Gender ratio of Dupuytren's disease in the modern U.S. population. *Hand (N Y).* 3: 87-90.
- Armstrong, J. R., Hurren, J. S. ja Logan, A. M. (2000). Dermofasciectomy in the management of Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br.* 82: 90-4.
- Azzarone, B., Faily-Crepin, C., Day-garosjean, L., Chaponnier, C. ja Gabbiani, G. (1983). Abnormal behavior of cultured fibroblasts from nodule and nonaffected aponeurosis of Dupuytren's disease. *Journal of Cellular Physiology.* 117: 353-361.
- Badalamente, M. A. ja Hurst, L. C. (1999). The biochemistry of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 15: 35-42, v-vi.
- Badalamente, M. A. ja Hurst, L. C. (2000). Enzyme injection as nonsurgical treatment of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.* 25: 629-36.
- Badalamente, M. A. ja Hurst, L. C. (2007). Efficacy and safety of injectable mixed collagenase subtypes in the treatment of Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Am.* 32: 767-74.
- Bayat, A. ja McGrouther, D. A. (2006). Management of Dupuytren's disease--clear advice for an elusive condition. *Ann R Coll Surg Engl.* 88: 3-8.
- Berndt, A., Kosmehl, H., Katenkamp, D. ja Tauchmann, V. (1994). Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's disease is associated with a fibronectin, laminin, collagen type IV and tenascin extracellular matrix. *Pathobiology.* 62: 55-8.
- Birks, M. (2010). Dupuytren's disease. *Surgery (Oxford).* 28: 85-88.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A. ja Gilbertson, R. J. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 11: 69-82.
- Campioni, D., Rizzo, R., Stignani, M., Melchiorri, L., Ferrari, L., Moretti, S., Russo, A., Bagnara, G. P., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Cuneo, A., Baricordi, O. R. ja

- Lanza, F. (2009). A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs. *Cytometry B Clin Cytom.* 76: 225-30.
- Chick, L. R. ja Lister, G. D. (1991). Surgical alternatives in Dupuytren's contracture. *Hand Clin.* 7: 715-9; discussion 721-2.
- Descatha, A. (2012) Dupuytren's Disease and Occupation, in: C. Eaton, M. H. Seegenschmiedt, A. Bayat, G. Gabbiani, P. Werker and W. Wach, Dupuytren's Disease and Related Hyperproliferative Disorders, Springer Berlin Heidelberg. pp. 45-49.
- Desmouliere, A., Badid, C., Bochaton-Piallat, M. L. ja Gabbiani, G. (1997). Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol.* 29: 19-30.
- Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I. ja Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American Journal of Pathology.* 146: 56-66.
- Discher, D. E., Mooney, D. J. ja Zandstra, P. W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 324: 1673-7.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. ja Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8: 315-7.
- Dupuytren, B. G. (1834). Permanent retraction of the fingers, produced by an affection of the palmar fascia. *Lancet.* II: 222-5.
- Elliot, D. (1999). The early history of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 15: 1-19, v.
- Falter, E., Herndl, E. ja Muhlbauer, W. (1991). Dupuytren's contracture. When operate? Conservative preliminary treatment? *Fortschr Med.* 109: 223-6.
- Finney, R. (1955). Dupuytren's contracture. *Br J Radiol.* 28: 610-4.
- Fitzgerald, A. M., Kirkpatrick, J. J. ja Naylor, I. L. (1999). Dupuytren's disease. The way forward? *J Hand Surg Br.* 24: 395-9.
- Frantz, C., Stewart, K. M. ja Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 123: 4195-200.
- Gabbiani, G. ja Majno, G. (1972). Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol.* 66: 131-46.

- Gabbiani, G., Le Lous, M., Bailey, A. J., Bazin, S. ja Delaunay, A. (1976). Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 21: 133-45.
- Gonzalez, A. M., Buscaglia, M., Fox, R., Isacchi, A., Sarmientos, P., Farris, J., Ong, M., Martineau, D., Lappi, D. A. ja Baird, A. (1992). Basic fibroblast growth factor in Dupuytren's contracture. *The American Journal of Pathology.* 141: 661-671.
- Hanyu, T., Tajima, T., Takagi, T., Sasaki, S., Fujimoto, D., Isemura, M. ja Yosizawa, Z. (1984). Biochemical studies on the collagen of the palmar aponeurosis affected with Dupuytren's disease. *Tohoku J Exp Med.* 142: 437-43.
- Hart, S. (2012) A Primer of Collagen Biology: Synthesis, Degradation, Subtypes, and Role in Dupuytren's Disease, in: C. Eaton, M. H. Seegenschmiedt, A. Bayat, G. Gabbiani, P. Werker and W. Wach, Dupuytren's Disease and Related Hyperproliferative Disorders, Springer Berlin Heidelberg. pp. 131-142.
- Hindocha, S., McGrouther, D. A. ja Bayat, A. (2009). Epidemiological evaluation of Dupuytren's disease incidence and prevalence rates in relation to etiology. *Hand (N Y).* 4: 256-69.
- Hindocha, S., John, S., Stanley, J. K., Watson, S. J. ja Bayat, A. (2006). The heritability of Dupuytren's disease: familial aggregation and its clinical significance. *J Hand Surg Am.* 31: 204-10.
- Hindocha, S., Iqbal, S. A., Farhatullah, S., Paus, R. ja Bayat, A. (2011). Characterization of stem cells in Dupuytren's disease. *Br J Surg.* 98: 308-15.
- Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 127: 526-37.
- Hinz, B. ja Gabbiani, G. (2012) The Role of the Myofibroblast in Dupuytren's Disease: Fundamental Aspects of Contraction and Therapeutic Perspectives, in: C. Eaton, M. H. Seegenschmiedt, A. Bayat, G. Gabbiani, P. Werker and W. Wach, Dupuytren's Disease and Related Hyperproliferative Disorders, Springer Berlin Heidelberg. pp. 53-60.
- Hueston, J. T. (1982). The table top test. *Hand.* 14: 100-3.
- Hurst, L. C. ja Badalamente, M. A. (1999). Nonoperative treatment of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 15: 97-107, vii.
- Hurst, L. C., Badalamente, M. A., Hentz, V. R., Hotchkiss, R. N., Kaplan, F. T., Meals, R. A., Smith, T. M. ja Rodzvilla, J. (2009). Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N Engl J Med.* 361: 968-79.

- Hynes, R. O. (2012). The evolution of metazoan extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*. 196: 671-679.
- Iqbal, S. A., Manning, C., Syed, F., Kolluru, V., Hayton, M., Watson, S. ja Bayat, A. (2012). Identification of mesenchymal stem cells in perinodular fat and skin in Dupuytren's disease: a potential source of myofibroblasts with implications for pathogenesis and therapy. *Stem Cells Dev*. 21: 609-22.
- Keilholz, L., Seegenschmiedt, M. H. ja Sauer, R. (1996). Radiotherapy for prevention of disease progression in early-stage Dupuytren's contracture: Initial and long-term results. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. 36: 891-897.
- Klingberg, F., Hinz, B. ja White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*. 229: 298-309.
- Kraljevic Pavelic, S., Sedic, M., Hock, K., Vucinic, S., Jurisic, D., Gehrig, P., Scott, M., Schlapbach, R., Cacev, T., Kapitanovic, S. ja Pavelic, K. (2009). An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren's disease. *J Pathol*. 217: 524-33.
- Krause, C., Kloen, P. ja ten Dijke, P. (2011). Elevated transforming growth factor β and mitogen-activated protein kinase pathways mediate fibrotic traits of Dupuytren's disease fibroblasts. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 4: 14-14.
- Lee, T. Y., Chin, G. S., Kim, W. J., Chau, D., Gittes, G. K. ja Longaker, M. T. (1999). Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg*. 43: 179-84.
- Macri, L., Silverstein, D. ja Clark, R. A. (2007). Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 59: 1366-81.
- McCann, B. G., Logan, A., Belcher, H., Warn, A. ja Warn, R. M. (1993). The presence of myofibroblasts in the dermis of patients with Dupuytren's contracture. A possible source for recurrence. *J Hand Surg Br*. 18: 656-61.
- McCash, C. R. (1964). The open palm technique in Dupuytren's contracture. *Br J Plast Surg*. 17: 271-80.
- McFarlane, R. M. (1974). Patterns of the diseased fascia in the fingers in Dupuytren's contracture. Displacement of the neurovascular bundle. *Plast Reconstr Surg*. 54: 31-44.
- Meirelles Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D. T. ja Caplan, A. I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 20: 419-27.

- Melling, M., Karimian-Teherani, D., Mostler, S., Behnam, M., Sobal, G. ja Menzel, E. J. (2000). Changes of biochemical and biomechanical properties in Dupuytren disease. *Arch Pathol Lab Med.* 124: 1275-81.
- Melling, M., Reihnsner, R., Pfeiler, W., Schnallinger, M., Karimian-Teherani, D., Behnam, M., Mostler, S. ja Menzel, E. J. (1999). Comparison of palmar aponeuroses from individuals with diabetes mellitus and Dupuytren's contracture. *Anat Rec.* 255: 401-6.
- Mikkelsen, O. A. (1972). The prevalence of Dupuytren's disease in Norway. A study in a representative population sample of the municipality of Haugesund. *Acta Chir Scand.* 138: 695-700.
- Millesi, H. (2012) Basic Thoughts on Dupuytren's Contracture, in: C. Eaton, M. H. Seegenschmiedt, A. Bayat, G. Gabbiani, P. Werker and W. Wach, Dupuytren's Disease and Related Hyperproliferative Disorders, Springer Berlin Heidelberg. pp. 21-26.
- Moermans, J. P. (1996). Long-term results after segmental aponeurectomy for Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br.* 21: 797-800.
- Murrell, G. A. (1991). The role of the fibroblast in Dupuytren's contracture. *Hand Clin.* 7: 669-80; discussion 681.
- Nassiri, F., Cusimano, M. D., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Fazio, A., Yousef, G. M., Syro, L. V., Kovacs, K. ja Lloyd, R. V. (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 31: 2283-90.
- Nehls, V., Denzer, K. ja Drenckhahn, D. (1992). Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* 270: 469-74.
- O'Kane, S. ja Ferguson, M. W. (1997). Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 29: 63-78.
- O'Gorman, D. B., Vi, L. ja Gan, B. S. (2010). Molecular mechanisms and treatment strategies for Dupuytren's disease. *Ther Clin Risk Manag.* 6: 383-90.
- Osterman, A. L., Murray, P. ja Pianta, T. (2012) Cline's Contracture: Dupuytren Was a Thief – A History of Surgery for Dupuytren's Contracture, in: C. Eaton, M. H. Seegenschmiedt, A. Bayat, G. Gabbiani, P. Werker and W. Wach, Dupuytren's Disease and Related Hyperproliferative Disorders, Springer Berlin Heidelberg. pp. 195-205.
- Ozbek, S., Balasubramanian, P. G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R. P. ja Adams, J. C. (2010). The evolution of extracellular matrix. *Mol Biol Cell.* 21: 4300-5.

- Paul, G., Özen, I., Christophersen, N. S., Reinbothe, T., Bengzon, J., Visse, E., Jansson, K., Dannaeus, K., Henriques-Oliveira, C., Roybon, L., Anisimov, S. V., Renström, E., Svensson, M., Haegerstrand, A. ja Brundin, P. (2012). The Adult Human Brain Harbors Multipotent Perivascular Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 7: e35577.
- Peetsalu, A. 2007. Dupuytreni kontraktuur, p. 638. Kirurgia. Medicina, Tallinn.
- Putnam, A. J. (2014). The instructive role of the vasculature in stem cell niches. *Biomaterials Science*. 2: 1562-1573.
- Rayan, G. M. (2007). Dupuytren's disease: anatomy, pathology, presentation, and treatment. *Instr Course Lect*. 56: 101-11.
- Rege, T. A. ja Hagood, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 20: 1045-54.
- Rehman, S., Goodacre, R., Day, P. J., Bayat, A. ja Westerhoff, H. V. (2011). Dupuytren's: a systems biology disease. *Arthritis Res Ther*. 13: 238.
- Robson, M. C. (2003). Proliferative scarring. *Surg Clin North Am*. 83: 557-69.
- Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 441: 1075-9.
- Schubert, K., Polte, T., Bonisch, U., Schader, S., Holtappels, R., Hildebrandt, G., Lehmann, J., Simon, J. C., Anderegg, U. ja Saalbach, A. (2011). Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur J Immunol*. 41: 645-56.
- Schultz, G. S. ja Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*. 17: 153-62.
- Shaw, R. B., Jr., Chong, A. K., Zhang, A., Hentz, V. R. ja Chang, J. (2007). Dupuytren's disease: history, diagnosis, and treatment. *Plast Reconstr Surg*. 120: 44e-54e.
- Shih, B. ja Bayat, A. (2010). Scientific understanding and clinical management of Dupuytren disease. *Nat Rev Rheumatol*. 6: 715-26.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. ja Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3: 349-63.
- van Rijssen, A., ter Linden, H. ja Werker, P. N. (2012) Three-Year Results of First-Ever Randomized Clinical Trial on Treatment in Dupuytren's Disease: Percutaneous Needle Fasciotomy Versus Limited Fasciectomy, in: C. Eaton, M. H. Seegenschmiedt, A. Bayat, G. Gabbiani, P. Werker and W. Wach, Dupuytren's Disease and Related Hyperproliferative Disorders, Springer Berlin Heidelberg. pp. 281-288.
- van Rijssen, A. L. ja Werker, P. M. (2006). Percutaneous needle fasciotomy in dupuytren's disease. *J Hand Surg Br*. 31: 498-501.

- van Rijssen, A. L. ja Werker, P. M. (2009). Treatment of Dupuytren's contracture; an overview of options. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 153: A129.
- van Rijssen, A. L., Gerbrandy, F. S., Ter Linden, H., Klip, H. ja Werker, P. M. (2006). A comparison of the direct outcomes of percutaneous needle fasciotomy and limited fasciectomy for Dupuytren's disease: a 6-week follow-up study. *J Hand Surg Am.* 31: 717-25.
- Verhoekx, J. S., Mudera, V., Walbeehm, E. T. ja Hovius, S. E. (2013). Adipose-derived stem cells inhibit the contractile myofibroblast in Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg.* 132: 1139-48.
- Verjee, L. S., Midwood, K., Davidson, D., Eastwood, M. ja Nanchahal, J. (2010). Post-transcriptional regulation of alpha-smooth muscle actin determines the contractile phenotype of Dupuytren's nodular cells. *J Cell Physiol.* 224: 681-90.
- Viil, J., Maasalu, K., Mäemets-Allas, K., Tamming, L., Lõhmussaar, K., Tooming, M., Ingerpuu, S., Märtson, A. ja Jaks, V. (2015). Laminin-rich blood vessels display activated growth factor signaling and act as the proliferation centers in Dupuytren's contracture. Manuscript.
- Wilutzky, B., Berndt, A., Katenkamp, D. ja Koshmehl, H. (1998). Programmed cell death in nodular palmar fibromatosis (Morbus Dupuytren). *Histol Histopathol.* 13: 67-72.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://boxplot.tyerslab.com/>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mikk Tooming (24.02.1993)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Potentsiaalne veresoontelähedane tüvirakunišš Dupuytreni kontraktuuri koes,

Mille juhendaja on Viljar Jaks,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **05.25.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015