

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Dmitri Šišmintsev

**Dupuytren kontraktuuri higinäärmete valguekspressiooni profiili
iseloomustamine**

Magistritöö

30 EAP

Juhendajad: PhD, MD Viljar Jaks
PhD Kristina Mäemets-Allas

TARTU 2022

Dupuytren kontraktuuri higinäärmete valguekspressiooni profiili iseloomustamine

Käesoleva töö raames on uuritud Dupuytren'i kontraktuuri patsientidest eralduv higinäärmete proteoomi eesmärgiga iseloomustada higinäärmete rolli haiguse patogeneesis. Proteoomika analüüsist on järeldatud, et võrreldes kontrollproovidega Dupuytren'i kontraktuuri higinäärmetes on ülesreguleeritud mitmed TGF- β signaalraja positiivsed regulaatorid ning mõned efektorvalgud, mis soodustavad epiteliaal-mesenhümaalset transformatsiooni, rakkude migratsiooni ning transdiferentseerumist müofibroblastiks. Need leiud on kooskõlas järgneva IFA tulemustega, milles on fikseeritud müofibroblaste meenutavate rakkude esinemist Dupuytren'i kontraktuuri higinäärme lähiümbruses.

Käesoleva töö alusel saab järeldada, et higinäärmed on mõjutatud Dupuytren'i kontraktuuri poolt ning omakorda omavad potentsiaali mõjutama haiguse kulgu, olles müofibroblastide allikas.

Dupuytren'i kontraktuur, higinäärmed, proteoomika, müofibroblast
B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

The description of Dupuytren's contracture derived sweat glands' protein expression profile

In this work have been studied the proteome of sweat glands from Dupuytren's contracture patients with purpose to describe its role in pathogenesis of disease. In contrast to control probes proteome analysis revealed upregulation of multiple TGF- β positive modulators and some effector proteins that reinforce epithelial-mesenchymal transition, cell migration as well as transdifferentiation into myofibroblast in sweat glands from Dupuytren's contracture patients. Following IFA revealed myofibroblast-resembling cells in close proximity to the sweat glands in Dupuytren's contracture derived probes.

This work provides evidence to fact, that sweat glands are affected by Dupuytren's contracture thereto sweat glands have potential to affect progression of Dupuytren's contracture as spring of myofibroblasts.

Dupuytren's contracture, sweat glands, proteomics, myofibroblast
B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Dupuytreni kontraktuuri üldiseloostus	7
1.2. Dupuytreni kontraktuuri kliiniline pilt ja raviviisid	9
1.2.1 Dupuytreni kontraktuuri kliiniline pilt ja diagnostika	9
1.2.2. Dupuytreni kontraktuuri ravi	9
1.3. Dupuytreni kontraktuuri etioloogia	10
1.3.1. Dupuytreni kontraktuuri geneetiline alus	11
1.3.2. Dupuytreni kontraktuuri molekulaarne patogenees	12
1.4. Higinäärmete ehitus ja funktsioon.	13
2 EKSPERIMENTAALOSA	15
2.1 Töö eesmärgid	15
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Proovide allikas ja nende käitlemine	16
2.2.2 Higinäärmete eraldamine ja puhastamine	16
2.2.3 Proovide ettevalmistamine proteoomika analüüsiks	17
2.2.4 Proteoomika analüüs	18
2.2.5 Immunofluorestsentsanalüüs	18
2.3 Tulemused	19
2.3.1 Proovide puhtuse hindamine	19
2.3.2 Higinäärmete proteoom peegeldab Dupuytren'i kontraktuuri esinemist	20
2.3.3 DC muutused molekulaarsel tasemel	22
2.3.4 Dupuytren'i kontraktuuri higinäärmed müofibroblastide allikana	26
2.4 Arutelu	27
KOKKUVÕTE	30
RESÜMEE	31
TÄNUAVALDUSED	32
KIRJANDUSE LOETELU	33
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	40
LISAD	41
LIHTLITSENTS	47

KASUTATUD LÜHENDID

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

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

BSA – *Bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin

CCH – *Collagenase clostridium histolyticum, clostridium histolyticum* kollageenaas

CLIC4 – *Chloride intracellular channel 4*, rakusisene kloriidikanal 4

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

DC – *Dupuytren's contracture*, Dupuytreni kontraktuur

DES – *Desmin*, desmiin

DKK1 – *Dickkopf-related protein 1*, Dikkkopfiga seotud valk 1

ECM – *Extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks

EMT – *Epithelial–mesenchymal transition*, epiteliaal-mesenhümaalne transformatsioon

FABP5 – *Fatty acid-binding protein, epidermal*, rasvhappeid siduv epidermaalne valk

FHL2 – *Four and a half LIM-only protein 2*

GWAS – *genome-wide association study*, geneetiline assotsiatsiooniuring

HIF1- α – *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*, hüpoksia indutseeriv faktor 1 alfa

IFA – Imuunfluorestsentsanalüüs

IGF – *Insulin-like growth factor*, insuliini tüüpi kasvufaktor

MAFB – *Transcription factor MafB*, transkriptsiooni faktor MafB

MMP – *Matrix metalloproteinases*, maatriks-metalloproteinaasid

NGF – *Nerve growth factor*, närvikasvufaktor

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

PPAR γ – *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, peroksisoomaalne proliferatsioon-aktiveeritud retseptor gamma

ROS –

RSPO2 – *R-spondin 2*, R-spondiin

SFRP4 – *Secreted frizzled-related protein 4*

SMAD – *Mothers against decapentaplegic*

SNP – *Single nucleotide polymorphism*, üksiku nukleotiidi polümorfism

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

TIMP – *Metalloproteinase inhibitor*, metalloproteinaasi inhibiitor

VEGFR2 – *Vascular endothelial growth factor receptor 2*, vaskulaarse endoteeli kasvufaktori retseptor 2

VIM – *Vimentin*, vimentiin

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

WIF1 – *Wnt inhibitory factor 1*, Wnt inhibeeriv faktor 1

WNT – proto-onkogeen WNT

SISSEJUHATUS

Vanim teadaolev palmaarse fibromatoosi juhtum on dokumenteeritud 1614. aastal Felix Plateri poolt (Hutchison ja Rayan, 2011; Benson jt., 1998). Alles 19. sajandi alguses uuris Guillaume Dupuytren välja selle haiguse kroonilise fibroproliferatiivse loomuse, kirjeldas selle patoanatomilisi aspekte ning pakkus esimesena uue kirurgilise ravi. Seetõttu on palmaarne fibromatoos tänapäeval enam teatud Dupuytreni kontraktuuri (*Dupuytren's contracture* - DC) nime all (Hart ja Hooper, 2004).

DC esinemissagedus varieerub populatsiooniti, ulatudes 3-42%-ni. Kõrgeimad esinemissageduse näitajad on saadud Põhja-Euroopa maades (Hindocha jt., 2018). DC on seostatud mitmete keskkonnafaktorite ja haigustega. DC haigestumise risk on suurem diabeeti põdevate, alkoholi tarbivate, suitsetavate ja raske füüsilise tööga tegelevate inimeste hulgas (Alser jt., 2020).

Viimaste aastakümnete jooksul on hakatud põhjalikult uurima ka DC geneetilist tausta, et paremini aru saada haiguse pärilikust etioloogiast. Varase ning ennetava ravi puudumine on viimaste dekaadide jooksul ajendanud uurima DC molekulaarset etiopatogeneesi. (Ball jt., 2016).

DC mõjust majandusele ei ole palju teada. Põhjuseks on kõige tõenäolisemalt ennustamatu haiguse kulg ning haiguse esinemissageduse lai varieeruvus populatsiooniti. Ühe Suurbritannias läbi viidud hinnangu kohaselt, kus DC haigestumus on ülemaailmsest märkimisväärselt väiksem, ületavad ainuüksi haiguse raviga seotud kulud 41 miljonit naelsterlingit aastas (Gerber jt., 2011). Lisaks otsesele majanduslikule kahjule alandab DC märkimisväärselt seda haigust põdeva inimese elukvaliteeti ja töövõimekust (Wilburn jt., 2013). Seetõttu saab väita, et tegu on laialt levinud ja kuluka haigusega, mille aktuaalsus suureneb seoses keskmise eluea pikenemisega ja teiste riskifaktorite levimisega (Bebbington ja Furniss, 2015).

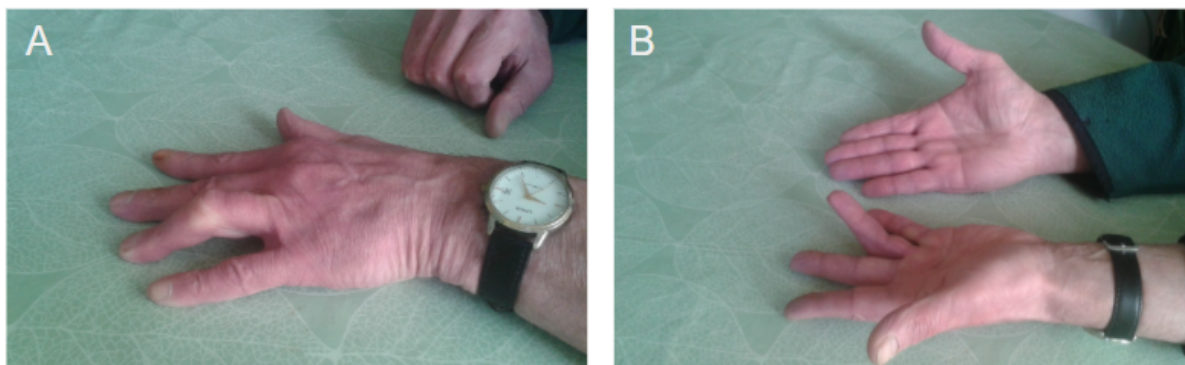
DC patogeneesi on varasemalt uuritud Viljar Jaksi uurimisgrupis. Leiti, et DC patsientide peopesa nahas olevates higinäärmetes leidub kasvufaktoreid, mis võivad toetada DC progresseerumist (Viil jt., 2015). Käesoleva töö eesmärgiks on edasi uurida higinäärmete rolli DC patogeneesis: proovitakse tuvastada spetsiifilisi biomarkereid, mida produtseeritakse DC põdevate patsientide higinäärmetes ning proovitakse seletada nende rolli haiguse kujunemisel.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Dupuytreni kontraktuuri üldiseloostus

DC-d võib kahtlustada, kui peopesas, tüüpiliselt palmaarsest fastsiast või sõrmede fleksorite kõõlustest, sopistub välja kõva sidekoeline sõlmeke, mis on tihti nahaga tihedamini seotud kui teised peopesa sidekoelised struktuurid. See tihe seos sõlmeke ja naha vahel viib lokaalsele naha välimuse muutumisele: tekivad uued nahavoldid. Tihti osutuvad esimesteks haiguse sümptomiteks just peopesa naha muutused, kuigi diagnostiliseks muutuseks jäävad siiski palpeeritavad sõlmekesed peopesas (Shaw Jr jt., 2007; Layton jt., 2019). Kontraktuuri tekke tõenäosus on suurim 4. ja 5. sõrme ning väikseim pöidla ja nimetissõrme puhul. Seejuures kontraktuur võib areneda samal käel mitmel sõrmel (Mikkelsen, 1976).

Haiguse edasiarenguga tekivad harilikult uued sõlmekesed ja need ühinevad sidekoeliseks väädik. Tüüpilisel juhul levivad sõlmekesed ja vääd distaalselt palmaarsest fastsiast sõrmede fastsiale. Kaugelearenenud haiguse puhul on sellist väädi mõnikord nimetatud selle omapärase väljanägemise tõttu pseudokõõluseks. Afekteeritud sõrme liikuvus ning kogu käe funktsionaalsus on märkimisväärselt piiratud areneva kontraktuuriga inimesel (Joonis 1).



Joonis 1. Dupuytren'i kontraktuur. Vaade käeselja (A) ja peopesa (B) poolt. Kontraktuur on arenenud vasaku käe nimeta sõrmel; kontraktuuri tõttu ei saa inimene sirutada afekteeritud käel sõrme selliselt nagu see on võimalik tervel käel (B). Pildid on tehtud ja kaasatud töösse eelnevalt diagnoositud DC põdeva loalt.

Sõlmeke areng põhineb müofibroblastide lokaalsel proliferatsioonil ja migratsioonil. Müofibroblastid on α -silelihaste aktiini (α -SMA) ning tüüp I ja tüüp III kollageeni ekspresseerivad kontraktsioonivõimelised sidekoe rakud. Esmakordselt on selliseid

rakke kirjeldatud granulatsioonikoos (Gabbiani ja Majne, 1971), aga nende päritolu ei ole lõpuni selge ka tänapäevaks (Bruijn jt., 2020). Müofibroblastidel on oluline roll haava paranemises ja nende kontrollimatu aktiivsus on põhjuseks mitmete fibroproliferatiivsete haiguste tekkimisele, nagu näiteks neeru (Yuan jt., 2019), maksa (Aydin ja Akçalı, 2018) ja kopsufibroos (Archontogeorgis jt., 2012). Samuti osalevad nad kasvajate mikrokeskkonna loomises (Sekhon jt., 2016). Müofibroblastid tekivad teiste rakkude transdiferentseerumise teel lokaalsete signaalmolekulide toimel (Agha jt., 2017). Mõned tunnustatud eellasrakud on fibroblastid, adipotsüüdid, peritsüüdid, silelihasrakud, müoepiteliaalsed rakud, makrofaagid ning endoteeli rakud (Cacho jt., 1991; Kurata jt., 2014). Tüvirakud, nagu näiteks mesenhümaalsed tüvirakud haiguskollet ümbritsevast rasvkoest ning nahast, on samuti võimelised diferentseeruma müofibroblastideks. Need rakud asuvad DC vääti ümbritsevas nahas ning rasvkoos ja tõenäoliselt põhjustavad haiguse taastekke pärast operatiivset ravi. (Iqbal jt., 2011; Tan jt., 2018)

Lokaalsete signaalide tulemusena hakkavad müofibroblastid aktiivselt paljunema ja sisenevad ümbritsevasse struktuuridesse, kaasa arvatud kõõlusse ja nahka. Nii tekib rakurohke sõlmeke, mis koosneb tüüp I ja tüüp III kollageeni produtseerivatest ja kontraktsioonivõimelistest müofibroblastidest, mis viivad kõõluse kontraktuuri ja väädi tekkimiseni. Sõlmekesed levivad mööda proksimaal-distaalset telge peopesas, moonutades keeruka peopesa ja sõrmede struktuuri kõõluste ning ligamentide liitumise ja kontraheerumise teel. (Gabbiani ja Majno, 1972; Benson jt., 1998)

1989. aastal jagasid Rombouts ja kolleegid DC haiguskulu kolmeks staadiumiks vastavalt DC kolde histopatoloogilistele muutustele, et ennustada kontraktuuri taastekke riski pärast operatsiooni (Rombouts jt., 1989). Esimese staadiumi kolle on rakkuderohke, mitootiliselt aktiivne ning fibrillaarsete valkude vaene sõlmeke. Seejuures esimese staadiumi sõlmeke on hästi vaskulariseeritud. Teise staadiumi sõlmekeses enam mitoosi ei leidu, see-eest on juba näha rakkudevaeseid fibrootilisi piirkondi, sealjuures müofibroblastid paiknevad mööda pingejoont (Luck, 1959). Kolmanda staadiumi puhul on rakke väga vähe või need puuduvad üldse, tüüp I ja tüüp III kollageeni kiud on organiseeritud laiadesse kimpudesse ja moodustavad väädi.

DC haiguse kulg ja erinevate staadiumite kestus püsib suuresti ennustamatuna: mõnedel patsientidel võib asümptomaatiline sõlmeke püsida stabiilsena mitmeid aastaid enne, kui see hakkab kiiresti arenema püsivaks kontraktuuriks, mis takistab

käe normaalset funktsioneerimist. Ennustamatu haiguse kulg on pannud aluse hüpoteesile, et käe trauma on sümptomaatilist DC provotseeriv faktor (Elliot ja Ragoowansi, 2005), mida kinnitavad hiljuti ilmunud sellekohased uurimustööd (Alser jt., 2020; Samulenas jt., 2020).

1.2. Dupuytreni kontraktuuri kliiniline pilt ja raviviisid

1.2.1 Dupuytreni kontraktuuri kliiniline pilt ja diagnostika

Dupuytren'i kontraktuuri peamiseks diagnostiliseks tunnuseks on valutud palpeeritavad sõlmekesed ja väädid peopesas (Vandecasteele ja Degreeef, 2020). Haiguse progresseerumisel muutub kõõlustega ühinenud väädi lühemaks, tekitades sõrmede kontraktuuri. Enne väädi teket DC diagnoosi on lihtne vahele jätta kuna varasemates staadiumites sümptomeid praktiliselt pole (Dolmans jt., 2012).

Kaugele arenenud haiguse korral võib fibroos areneda mõlemal käel ning võib samaaegselt tekkida ka plantaarses aponeuroosis. Taolist haigusvormi nimetatakse ka Ledderhose haiguseks ja selle levimuse hinnang DC patsientide seas varieerub 4-30% (Mohede jt., 2020).

Kui kontraktuur juba esineb siis saab seda lihtsalt ja efektiivselt diagnoosida Huestoni lauapinna testi abil. Patsient paneb käed lauapinnale ja tulemus loetakse positiivseks, kui peopesa ja laua vahele jääb umbes pliiatsi suurune vahe. Positiivse testi puhul on näidustatud operatiivne ravi. Vastupidisel juhul võib operatsioon kaasa tuua hoopis agressiivsema haiguse kulu (Hueston, 1982). Kuigi Huestoni lauapinna test on kiire ja lihtne, praktikas operatiivse ravi vajaduse hindamiseks kasutatakse alternatiivina Tubiana ja täiendatud Tubiana kriteeriumid, mis võtavad täpsemalt arvesse sümptomite väljakujunemise astet ja riskifaktorite mõju (Hindocha jt., 2008). DC esmase preventsiiooni meetodid puuduvad ja haiguse edukaks raviks on oluline selle varane ja täpne diagnostika. Kasvajad, kõõluste põletik, tenosünoviit ning ulnaarne neuropaatia on mõned näited peopesa võimalikest haigustest, mis võivad sarnaneda oma sümptomaatikalt DC-le (Walthall jt., 2021).

1.2.2. Dupuytreni kontraktuuri ravi

Häid võimalusi esimese ja teise DC staadiumil raviks veel pole. Mõnede patsientide puhul on haigusest haaratud sõrme fikseerimine või sõrmi tugevdav treening osutunud sümptome vähendavaks. Sõlmekesisised kortikosteroidide süstid ning

radioteraapia on näidanud vaid mõõdukat efekti. Arvatakse, et mõlema meetodi efektiivsuse aluseks on müofibroblastide paljunemise või põletikuliste protsesside pärssimine. Samas uuritakse DC konservatiivseid ravivõimalusi aktiivselt. (Ball jt., 2016; Walthall jt., 2021)

Juhul, kui metakarpofalangaalliigese kontraktuur jõuab 30 kraadini (positiivne lauapinna test) või proksimaalse interfalangaalse liigese kontraktuur ületab 15-20 kraadi, on operatiivne ravi näidustatud (Hovius ja Zhou., 2018). Kirurgilise ravi tehnikaid on mitu. Mõni on minimaalselt invasiivne, nagu näiteks nõela fastsektomia tehnika. Traditsiooniline McCash'i avatud peopesa tehnika on seevastu väga invasiivne, pika taastusperioodi ning kõrgema tüsistuste riskiga raviviis. Tüüpilised kirurgilise ravi kõrvaltoimed on närvide ja veresoonte kahjustus, koe nekroos, isheemia ja infektsioonid (Walthall jt., 2021).

Kuigi invasiivseid meetodeid on hakatud vähem kasutama, ei ole need kaotanud aktuaalsust (Zoubos jt., 2014). Arvatakse, et invasiivsetel tehnikatel on kõrgem raviefektiivsus ning madalam väädi taastekke risk (Lesiak jt., 2017). Kuid on ka alternatiivsed hinnangud mis näitavad kirurgiliste tehnikate efektiivsuse hindamise keerukust ja subjektiivsust (Rodrigues jt., 2015; Wong jt., 2021).

Bakteriaalse kollagenaasi (CCH ingl k *collagenase clostridium histolyticum*) süstimise tehnika kuulub minimaalselt invasiivsete DC raviviiside hulka. CCH lahust süstitakse DC väädi sisse ja järgnevalt sirutatakse sõrm mehhaaniliselt. CCH meetodika puhul on DC taastekke risk kõrgem võrreldes fastsiektomiaga ja kollagenaasi süstimise kõrvaltoimete risk võib osutada isegi suuremaks kui mõnedel kirurgilistel ravitehnikatel (Krefter jt., 2017). Siiski peetakse CCH-d perspektiivseks DC ja teiste fibrooside ravil (Sanjuan-Cerveró jt., 2018; Sanjuan-Cerveró, 2020; Cooper jt., 2020).

1.3. Dupuytreni kontraktuuri etioloogia

DC etiopatogenees ei ole veel lõplikult selge kuid on olemas konsensus, et DC on multifaktoriaalne haigus. Mitmetest meta-analüüsides on teada erinevaid geneetilisi, keskkonna ja elustiili faktoreid mis soodustavad DC teket (Alser jt., 2020; Geoghegan jt., 2021).

Üheks kõige tihedamini DC-ga seostatud haiguseks on halvasti ravitud diabeet. See on kooskõlas varasema teooriaga DC vaskulaarsest etiopatogeneesist ning sellega, et suitsetamine on samuti seotud DC tekke ja vasospasmiga (An jt., 1988).

Meeste seas on DC esinemissagedus mitu korda suurem võrreldes naistega ning kõigi inimeste jaoks haigestumusrisk suureneb vanusega. Erinevatel andmetel tõuseb risk DC-sse haigestuda märgatavalt alates 40 kuni 60 eluaastast kuid haigus võib manifesteeruda ka varem. Harva diagnoositakse haigust ka lapseas (Marsh ja Kelly, 2008). Teine tugev riskifaktor on vibratsioon. DC esinemissagedus on kõrgem vibreerivaid tööriistu kasutavate operaatorite seas (Mathieu jt., 2020).

Lisaks on selle haiguse tekkes suur roll pärilikkusel. Ühes Taanis läbi viidud kaksikute uuringus leiti, et 80%-l juhtudest oli sama DC haigus ka teistel perekonnaliikmetel, mis asetab geneetilise eelsoodumuse kõige olulisemaks etioloogiliseks faktoriks (Larsen jt., 2014). Sarnased uuringud väiksemate valimitega erinevatest geograafilistest piirkondadest on jõudnud põhimõtteliselt sama järelduseni, kuid haiguse penetrantsus on neis uuringuis mõnevõrra madalam (Hindocha jt., 2006; Capstick jt., 2012; Williams jt., 2015).

1.3.1. Dupuytren kontraktuuri geneetiline alus

Kuigi DC-d on uuritud pikka aega, on selle geneetilised riskifaktorid avastatud alles viimaste aastakümnete jooksul tänu molekulaargeneetika edusammudele. Dolmans kolleegidega publitseeris esimesena GWAS uuringu, mis seostas 9 ühenukleotiidset polümorfismi (ingl k *single nucleotide polymorphism*, SNP) DC esinemisega ning tõi esile põhjusliku seose Wnt-signaalraja ja DC etiopatogeneesi vahel (Dolmans jt., 2011). Leitud SNP-de seos DC'ga sai kinnituse järgmise GWAS uuringu raames, mis lisaks juba uuritud polümorfismidele avastas DC seose mitmete teiste geenivariantidega. Nende seas olid nii Wnt-signaalraja modulaatorid, kui ka teiste bioloogiliste protsesside komponendid (Becker jt., 2016). Koos kolmanda, kõige mahukama, DC geneetilisi põhjuseid kirjeldava GWAS uuringuga (Ng jt., 2017) on selle haigusega seotud lookuste arv jõudnud peaaegu neljakümneni. Mitmete Wnt-signaalraja komponentide (näiteks WNT7b, SFRP4, RSPO2) ning teiste geenide polümorfismide seost fibroproliferatiivsete haigustega on leitud ka teistes uuringutes (Dam jt., 2016; Samulénas jt., 2021).

Mitmed geenivariandid, mis pole seotud Wnt signaalirajaga on samuti seotud DC tekkega. Üks huvipakkuv kandidaat, millele on pöördud tähelepanu Dolmans ja kolleegide uuringus, on proto-onkogeen *MAFB*. MAFB valk leiti olevad kõrgelt ekspresseeritud DC väädi rakkudes immunohistokeemilise uuringu käigus (Lee jt., 2006). Kuna MAFB on võimeline vallandama fibroblastist diferentseerumist

müofibroblastiks *in vitro* (Eychene jt., 2008), võib see olla oluline ka DC sõlmekese arengu ehk *in vivo* fibroblastide aktiveerumise kontekstis.

Teine detailsemalt uuritud *MMP14* geeni riskialleel *rs1042704* kodeerib väiksema kollagenolüütilise aktiivsusega MMP14 ensüümi. MMP/TIMP valkude suhe on oluline koe remodelleerimise protsessis. Nende ensüümide tasakaal on rikutud fibrootilises koes üldiselt ning iseäranis DC kolletes. Vähenenud MMP14 ensüümi aktiivsus võib suurendada fibroosi tekke tõenäosust ning kontraktuuri tekke riski (Itoh jt., 2021).

1.3.2. Dupuytreni kontraktuuri molekulaarne patogenees

DC on seostatud häiretega WNT, FGF, TGF- β , PDGF, IGF ja NGF signaalradade töös (Sayadi jt., 2019, O’Gorman jt., 2010; Park jt., 2019). Kuigi DC detailine patogenees on senini veel teadmata, on mõned olulised faktorid siiski leitud. Vastuseks lokaalsetele signaalidele, nagu näiteks põletiku vahendavad tsütokiinid traumeeritud käes või suitsetamisest tingitud lokaalne hüpoksia, intensiivistub müofibroblastide diferentseerumine fibroblastidest. Müofibroblastide aktiivsus ja paljunemine on mitme signaaliraja poolt reguleeritud negatiivse tagasiside kaudu ja nende proliferatsioon suureneb liigselt kui see tagasiside kaob. Üheks selliseks häirunud tagasiside mehhanismiks DC puhul on endoteelist pärit bFGF tootmise inhibeerimine ja negatiivse tagasiside kadumise tõttu tekib rakkuderohke ja hästi vaskulariseeritud DC sõlmeke. (Gonzalez jt., 1992). Kuna DC koldes on leitud kõrge HIF1- α ja VEGFR2 ekspressioon arvatakse, et DC koldes valitseb hüpoksia. Hüpoksia korral tekivad ROS (ingl k *reactive oxygen species*) omakorda soodustavad müofibroblastide proliferatsiooni (Shimura jt., 2020; Holzer jt., 2013).

Haiguse progresseerumisel muutuvad nii haiguskolde morfoloogia, kui ka aktiveeritud signaaliradade muster. Nagu eespool kirjeldatud, on WNT-signaaliraja düsregulatsioon on üks võtmeprotsessidest, mis juhib DC patogeneesi. Kuigi päris paljude selle signaaliraja komponentide ekspressioon muutub, ei ole määrava toimega võtmeregulaatorit eristada suudetud. Üheks võimaluseks oleksid negatiivsed WNT-signaaliraja regulaatorid, nagu DKK1, SFRP1 ja WIF1, mis on DC sõlmekeses tugevalt allareguleeritud. Selle põhjuseks on pakutud TGF- signaaliraja suurenenud aktiivsust (van Beuge jt., 2015).

TGF- on fibroosi soodustav signaalmolekul, mis on tugevalt ülesreguleeritud kõikides DC staadiumites sõlmekese koes (Shih ja Bayat, 2010). WNT ja TGF-

vastastikune võimendav toime põhjustab fibroblastide diferentseerumist müofibroblastideks. PPAR γ on mõlema signaalraja negatiivne regulaator, mille vähenemine võib samuti viia fibroosi progressioonile (Vallée jt., 2017).

TGF- ekspressiooni inhibiitorite manustamine, nagu näiteks glükokortikosteroidid, inhibeerib fibroosi ja müofibroblastide teket (Wang jt., 2018) ja seetõttu on glükokortikosteroidide süstimist sõlmekeste sisse kasutatud DC konservatiivse raviviisina.

Kuigi mainitud signaaliradade interaktsiooni ei ole selgelt kirjeldatud DC koes, viitavad mõnede uuringute tulemused kaudselt sellise koosmõju esinemisele (O’Gorman jt., 2006). Üheks näiteks on ekstratsellulaarse maatriksi (ECM) valk tenastiin C (TNC), mis on võimeline inhibeerima DKK1 ekspressiooni kasvajates, soodustades sel teel angiogeneesi, kasvaja progressiooni ja fibroblastide aktiveerumist (Saupe jt., 2013; Fujita jt., 2019). DC sõlmekestes on tenastiin C samuti ülesreguleeritud (Shih jt., 2009) ning tõenäoliselt seda toodavad just müofibroblastid (Berndt jt., 1994).

Alternatiivne Wnt signaali võimendamise mehhanism, mis võiks aset leida ka DC patogeneesis, on tüüp I kollageenist tingitud DKK1 inhibeerimine, mida on demonstreeritud *in vitro* kasvajarakkudes (Barbolina jt., 2013).

Lisaks sellele viib allareguleeritud DKK1 ekspressiooni taastamine fibroosi taandumisele, mida on demonstreeritud süsteemse skleroosi patsiendi rakkudes *in vitro* ning indutseeritud fibroosiga hiirtes (Dees jt., 2013).

Eelnevalt välja toodud faktide alusel saab väita, et Wnt signaaliraja aktivatsioon võib olla tingitud mitmete teiste signaaliradade ja üksikute valkude ekspressiooni düsregulatsiooni tõttu, mis viib fibroosi tekkele ja progressioonile. Selle protsessi nüansside väljauurimine on esimene samm potentsiaalsete raviviiside väljatöötamisel.

1.4. Higinäärmete ehitus ja funktsioon.

Inimesel on kahte tüüpi higinäärmeid. Apokriinset tüüpi higinäärmed lokaliseeruvad eeskätt rinnanäärme areoolides, kaenlaalustes ning anogenitaalses piirkonnas. Ekriinset tüüpi higinäärmed paiknevad mujal naha pinnal. Nende tihedus varieerub sõltuvalt piirkonnast ning on maksimaalne peopesadel ja jalataldadel, kus need on ainukesed nahaderivaadid. Ekriinsete higinäärmete sekreet eritatakse otse naha

pinnale ning nende peamine funktsioon on termoregulatsioon. Lisaks sellele kaitsevad higinäärmete sekreedi komponendid nahka patogeenide eest. Ehituselt on ekriinne higinääre lihtne tubulaarne nääre, mille juha koosneb helikaalsest akrosüringiumist, mis läbib epidermist, ning sirgest ja keerdunud osast, mis paiknevad pärisnahas. Juha ühendab naha pinda ja sekreeti produtseerivat glomerulaarset osa, mis paikneb pärisnaha ja naha aluskoe piiri lähedal. (Hodge jt., 2018)

Higinäärme glomerulaarne osa koosneb valendikku moodustavatest sekretoorsetest rakkudest, mis on kogu ulatuses ümbritsetud kontraktsioonivõimeliste müoepiteliaalsete rakkudega, mis soodustavad sekreedi väljutamist. Juha koosneb ühekihilisest epiteelist (Saga, 2002). Näärmete aktiivsus on reguleeritud atsetüülkoliinergiliste sümpaatiliste närvikiudude kaudu. Need soodustavad vastuseks kõrgele kehatemperatuurile müoepiteliaalsete rakkude kontraktsiooni ja higi produktsiooni (Sato jt., 1979). Emotsionaalne stress vallandab samuti higistamise suurenenud noradrenaliini signaalsiooni kaudu (Hodge jt., 2021).

Higinäärmeid on kaua uuritud nende arvatava osaluse tõttu haava paranemise protsessis. Pikka aega on teada higinäärmetest pärit rakkude võime liikuda haava piirkonda, kus need aitavad kaasa epidermise moodustamisele (Lobitz jt., 1956). Esimesed higinäärme multipotentsed tüvirakud isoleeriti üsna hiljuti (Petschnik jt., 2010). Hiljem näidati eksperimentaalselt higinäärmete komponentide võimet regenereeruda (Lu ja Fuchs, 2014) ning toota erinevaid naha komponente nagu epidermis, karvafolliikulid ja veresooni *in vivo* (Leung jt., 2013; Danner jt., 2012). Tänapäevaks on ekriinsetest higinäärmetest isoleeritud α -SMA-positiivsed multipotentsed mesenhümaalsed tüvirakud ning on näidatud nende paiknemine inimese ekriinse higinäärme glomerulaarse osa müoepiteliaalsete rakkude kihis (Ma jt., 2018).

Kuigi higinäärmete roll fibroproliferatiivsete haiguste etiopatogeneesis on tänaseni ebaselge, on teada nende võime olla müofibroblastide allikaks ning on kirjeldatud nende roll naha fibroproliferatiivse haiguse tekkeprotsessis (Takahashi jt., 2013). Seetõttu on higinäärmed huvipakkuvad uurimisobjektid ka DC kontekstis.

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistr töö eesmärgid on:

1. Tuvastada Dupuytreni kontraktuuri proovidest saadud higinäärmetes erinevalt ekspresseeritud valke;
2. Seletada higinäärmetes erinevalt ekspresseeritud valkude potentsiaalset rolli Dupuytren'i kontraktuuri etiopatogeneesis.

Püstitatud eesmärkide saavutamiseks teostati Dupuytren'i kontraktuuri patsientide ning kontrollgrupi inimeste kudetest isoleeritud higinäärmete proteoomi analüüs. Proteoomika tulemuste kinnitamiseks ja täiendamiseks kasutati immunofluorestsentsanalüüsi.

2.2 Materjal ja meetoodika

2.2.1 Proovide allikas ja nende käitlemine

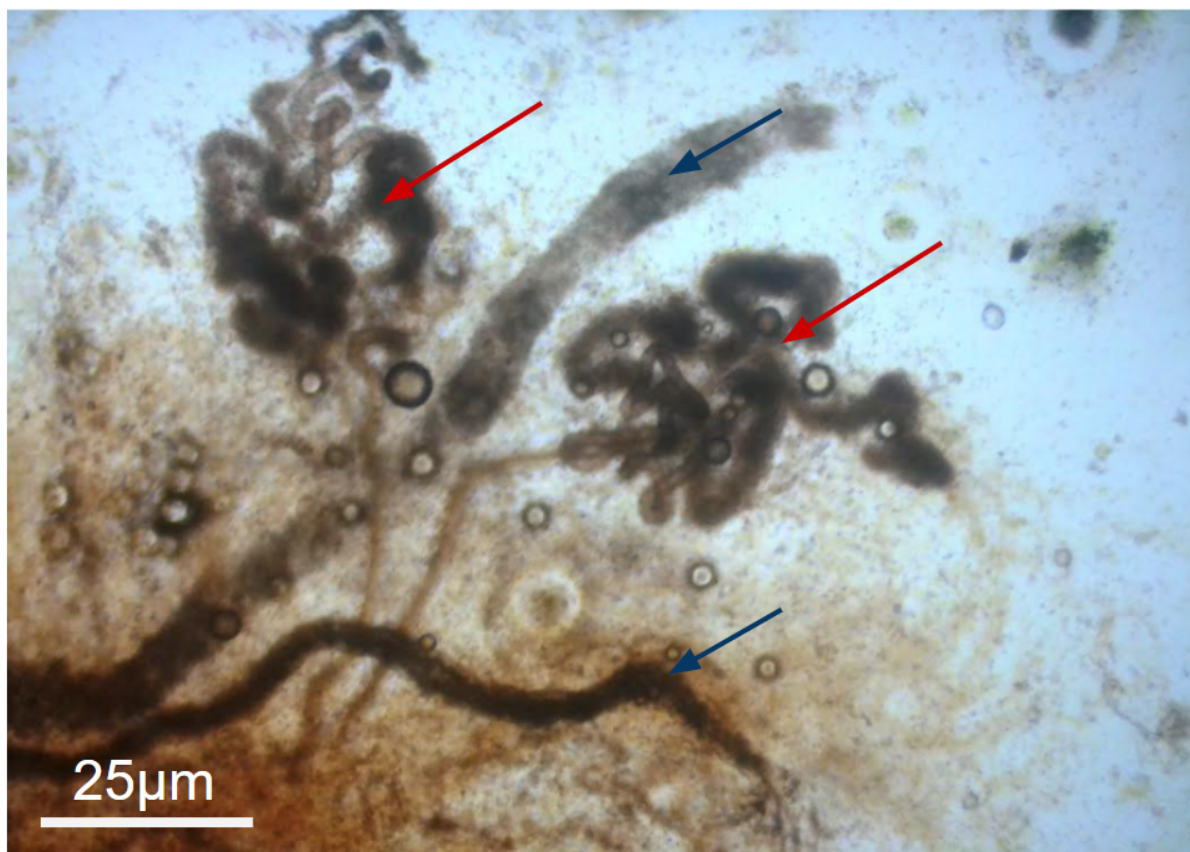
DC koetükid eraldati radikaalse fastsiotoomia operatsiooni käigus. Tervete patsientide proovid on saadud karpaalkanali operatsioonist üle jäävast koetükist. Koetükid transporditi ja säilitati operatsiooni järgselt jääl ja töödeldi higinäärmete eraldamiseks samal päeval. Piisavalt suured proovid poolitati: ühest osas eraldati higinäärmed (vt allpool), teine osa säilitati imuunfluorestsentsanalüüsiks (IFA). Proteoomika analüüsil kasutati kolme DC patsienti nahaproovist eraldatud higinäärmeid. Kontrollmaterjaliks olid kolme patsiendi karpaalkanali operatsioonil saadud naha lõigust eraldatud higinäärmed. IFA jaoks ühe karpaalkanali ja kahe fastsiotoomia operatsioonist saadud koetükid sisestati TissueTek O.C.T. keskkonda (Sakura Finetek, USA) ja proovid külmutati vedelas lämmastikus. Analüüsimiseni hoiti proove -80°C juures. Koeproovide võtmiseks ja edasiseks töötlemiseks oli saadud Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee kooskõlastus (nr 335/T-1).

2.2.2 Higinäärmete eraldamine ja puhastamine

Selleks, et saada muust koest puhastatud higinäärmete preparaate, kasutati Gao ja kolleegide poolt koostatud higinäärmete eemaldamise protokoll (Gao jt., 2014).

DC või karpaalkanali operatsiooni käigus eraldatud koetükke töödeldi steriilses keskkonnas, kus esmalt eemaldata analüüsiks mittevajalik fibroosne kude. Analüüsimiseks sobiv materjal tükeldati skalpelliga umbes 1 kuni 3 millimeetrilise läbimõõduga fragmentideks ning pesti steriilse PBS lahusega. Tükeldatud koefragmente inkubeeriti üleöö 37°C / 5% CO_2 inkubaatoris 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penitsiliini, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomütsiini, 5% BSA ja 0,1% kollageenaas I sisaldavas lahuses.

Pärast inkubatsiooni koguti valgusmikroskoobi all pipeti abil üksikud higinäärmed tuubi (Joonis 2). Kuna veresoonte fragmendid, nagu näiteks veenulid, arterioolid ning neid šunteerivad glomus kehad (ingl k *glomus body*) võivad valgusmikroskoobiga vaadates olla väga sarnased higinäärmete tubulaarsete ja glomerulaarsete komponentidega, siis proteoomika analüüsiks kasutati vaid fragmenteerumata higinäärmed.



Joonis 2. Eraldamiseks sobivad terved higinäärmed (märgitud punaste nooltega) ning mõned veresoonte fragmendid (märgitud siniste nooltega). Pilt on tehtud 20x suurendusel Nikon Eclipse TS100 valgusmikroskoobiga.

Tuubidesse kogutud higinäärmeid tsentriguugiti 3 minutit 20°C ja 800 rpm juures ja eraldati supernatant. Seejärel higinäärmeid inkubeeriti 0,1% trüpsiini lahuses 15 minutit. Trüpsiiniga töötlemise eesmärgiks oli võimalikult hästi puhastada higinäärmeid ektoopilistest ekstratsellulaarse matriksi komponentidest ja muudest valgulistest kontaminantidest. Pärast seda tsentrifugeeriti proove 5 minutit 4°C ja 600 rpm juures, proovidest eraldati supernatant ning materjali terviklikkust kontrolliti valgusmikroskoobiga. Proove säilitati kuni edasise kasutamiseni -80°C juures.

2.2.3 Proovide ettevalmistamine proteoomika analüüsiks

Eraldatud higinäärmed suspendeeriti jää peal 300 µL lüüsi puhvris (0.3M Tris-HCl pH 8.0, 0.1M DTT, 0.5% PEG 20,000, 4% SDS) ning tõsteti homogeniseerimistuubi, mis sisaldas 1,4 mm suuruseid kerakesi (Bertin Corp). Proov homogeniseeriti kasutades 6000 rpm × 1 min × 3 korda 4°C juures. Selleks, et vähendada proovimaterjali kadu ja eemaldada homogeniseerimise käigus tekkinud vaht, külmutati proove üleöö

-80°C juures. Lüüsitud ja homogeniseeritud higinäärmete proovid saadeti analüüsimiseks Tartu Ülikooli Proteoomika Tuumiklaborisse.

2.2.4 Proteoomika analüüs

Proteoomika analüüsi jaoks inkubeeriti proove trüpsiini lahuses suhtes 50:1 (kaalu järgi, valgud : ensüüm) 4 tunni jooksul. Edasi lahjendati valkude-trüpsiini segu 5x 0,1M ammooniumi bikarbonaadi lahusega ning inkubeeriti üleöö toatemperatuuril. Peptiide sisaldav proov süstiti Ultimate 3000 RSLCnano süsteemi (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), mis oli varustatud C18 vedelikkromatograafia (LC) kassetiga tagasiloputus-konfiguratsioonis. Peptiidid lahutati 200 nL/min 5-40% B puhvri gradiendis. Elueeritud peptiidid pihustati Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) tandem mass-spektromeetrisse (MS), kasutades 2.5 kV nano-elektrospreid. Aanalüüsiti ainult laenguga +2 kuni +5 fraktsioone.

Saadud torandmed analüüsiti MaxQuant 1.4.0.8 tarkvara paketi abil kasutades UniProt (www.uniprot.org) inimese valkude andmebaasi. Edasises analüüsis kasutati valke, mille False Discovery Rate (FDR) väärtuseks oli $\leq 1\%$.

Proteoomi andmeid analüüsiti Perseus (www.perseus-framework.org) tarkvarapaketi abil. Kvantitatiivne proteoomi analüüs viidi läbi NSAF (*normalized spectral abundance factor*) meetodi abil (Zybailov jt., 2006).

2.2.5 Immunofluorestsentsanalüüs

Varem külmutatud koeproovid lõigati krüomikrotoomiga (Leica, Saksamaa) 20 µm paksusega lõikudeks ning asetati katseklaasile (Starfrost, KnittelGlass, Saksamaa). Koelõike hoiustati -80°C juures kuni IFA analüüsini.

IFA analüüsiks proovid fikseeriti 4% paraformaldehüüdi lahuses 10 minutit. Seejärel pesti proove 3 korda 2 minuti jooksul 1xPBS lahusega. Järgmises etapis permeabiliseeriti lõike 0,2% Triton X-100 lahusega 10 minuti jooksul. Järgnes pesu 1xPBS lahusega 3 korda 2 minutit. Lõike blokeeriti 1 tund 1xPBS-s lahustatud 4% veise seerumi albumiiniga. Valkude märgistamine primaarsete antikehadega (Tabel 1) toimus 4°C juures üle öö. Sellele järgnes 3 korda 5 minutit pesu 1xPBS lahusega ning inkubatsioon sekundaarsete antikehade (Tabel 2) 1:1000 lahuses toatemperatuuril üks tund. Peale seda pesti lõike 3 korda 5 minutit 1xPBS lahusega. Tuumade visualiseerimiseks inkubeeriti lõike 3 minutit DAPI lahuses (1µg/ml;

Sigma). Pärast 5-minutilist pesu 1xPBS lahuses sulundati lõigud fluorestsentssulundusvedeliku (Dako; Taani).

IFA meetodil värvitud nahalõike vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga Olympus IX81 CellR. Pildid jäädvustati Hamamatsu Orca ER (Hamamatsu Photonics) kaameraga, kasutades 10x, 40x või 100x suurendusega objektive. Mikroskoopia tulemusena saadud pilte töödeldi Hokawo 2.1 pilditöötlusprogrammiga (Hamamatsu Photonics).

Tabel 1. Immunofluorestsentsanalüüsil kasutatud primaarsed antikehad

Antikeha	Peremeesloom	Kasutatud lahjendus	Antikeha tootja; Katalooginumber
α -Silelihaste aktiin (α -SMA)	Hiir, mAk	1:250	Leica microsystems, DE; NCL-SMA
Desmiin (DES)	Kits, pAk	1:200	R&D SYSTEMS; AF3844
Vimentiin (VIM)	Küülik, pAk	1:200	Abcam; ab92547

Tabel 2. Immunofluorestsentsanalüüsil kasutatud sekundaarsed antikehad

Antikeha	Peremeesloom	Kasutatud lahjendus	Antikeha tootja ja katalooginumber
Eelis valmistatud hiire vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647	Eesel	1:1000	Life technologies, US; A-31571
Eelis valmistatud kitse vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	Eesel	1:1000	Life technologies, US; A11055
Eelis valmistatud kitse vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 594	Eesel	1:1000	Life technologies, US; A11055

2.3 Tulemused

2.3.1 Proovide puhtuse hindamine

Koe efektiivne isoleerimine ja puhastamine on väga oluline adekvaatseks proteoomi analüüsiks. Proteoomika analüüsist saadud andmed näitasid, et DC spetsiifilise tüüp

I ja tüüp III kollageeni sisaldus DC higinäärmete proovides ei olnud kontrollproovide higinäärmetega võrreldes kõrgem. Selle põhjal võib järeldada, et higinäärmete proovid ei olnud kontamineerunud sõlmekese koega ehk leitud matritsellulaarsed ja ekstratsellulaarse maatriksi struktuursed valgud kuuluvad just higinäärmetesse ja nendega tihedas kontaktis paiknevatesse struktuuridesse. Seetõttu on higinäärmete isoleerimine olnud adekvaatne.

2.3.2 Higinäärmete proteoom peegeldab Dupuytren'i kontraktuuri esinemist

Kokku detekteeriti proteoomika analüüsil andmed 4221 valgu kohta. Võrreldes normaalsete higinäärmetega leiti Perseus tarkvaraga analüüsi tulemusena DC kontraktuuri higinäärmetes 140 erinevalt ekspresseeritud valku. Nendest 36 olid allareguleeritud ning 104 ülesreguleeritud. Saadud andmeid analüüsiti järgnevalt Enrichr tarkvara abil kasutades erinevaid andmebaase, et leida statistiliselt olulisi seoseid higinäärmete proteoomi ja bioloogiliste protsesside vahel. Eeldatavasti on selle lähenemise puudus higinäärmeid puudutava informatsiooni suhteline alaesindatus kasutatud andmebaaside hulgas, kuna higinäärmetega seotud patoloogiad ei ole sage põhjus arstiabi otsimiseks. Siiski eeldasime, et konventsionaalne proteoomika andmete analüüs annab ülevaate üldisemate protsesside kohta, mis toimuvad DC higinäärmetes.

DisGeNet andmebaasi järgi on DC proovides erinevalt ekspresseeritud valgud assotsieeritud mitmete kõõluse ja liigeste, kaasa arvatud luupekse, küünarliigese ja randme kontraktuuridega (COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL12A1, FBN1, LMNA, CAV1, FHL1, AMBP, HSPG2), sidekoe haigustega (TNXB, FBN1, LOX), fibromatoosiga (PDGFRB, CAV1, FN1, VIM) ja vähenenud naha elastsusega (LMNA, PHGDH, FBN1). Kuigi DC nende seisundite seas ei esine, oli siiski välja toodud proksimaalse falangidevahelise liigese kontraktuur (COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL12A1, FBN1) ning fibromatoos. Need patoloogiad on osa DC patogeneesist. Seejuures DC-s erinevalt ekspresseeritud TTR, VWF, COL4A1 ja APOB valgud seostusid spetsifitseerimata kapillaaride haigusega. Lisaks sellele oli DC higinäärmete proovides ülesreguleeritud aktiivsema higi sekretsiooniga seostuvad valgud DKC1, CAV1, COL6A1, COL6A2, COL6A3 (Joonis 3).

Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
Contracture	0.000002602	0.0001454	8.62	110.87
Flexion contractures of joints	0.000004946	0.0002381	9.42	115.04
Flexion contracture	0.000005225	0.0002481	9.34	113.63
Contracture of joint	0.000006475	0.0002992	9.06	108.22
contracture of elbow	0.00002103	0.0007592	17.07	183.83
Flexion contracture - elbow	0.00003121	0.001020	15.61	161.98
Flexion contracture of the knee	0.0001564	0.003170	16.66	145.99
Ankle contracture	0.0001758	0.003386	33.43	289.04
Flexion contracture of proximal interphalangeal joint	0.001020	0.01286	7.04	48.46
Contracture of joint of hand	0.002744	0.02349	11.73	69.20
Pulmonary Fibrosis	0.00005342	0.001493	4.34	42.69
Renal fibrosis	0.00009015	0.002200	6.14	57.22
Fibrosis, Liver	0.0001212	0.002636	3.72	33.54
Cystic Fibrosis	0.0002807	0.004864	3.40	27.78
Myelofibrosis	0.004998	0.03431	6.18	32.77
Dermatofibrosarcoma	0.005474	0.03600	20.54	106.99
Fibrosis	0.006778	0.04188	4.45	22.21
Primary Myelofibrosis	0.009179	0.05095	4.12	19.32
Idiopathic Pulmonary Fibrosis	0.01745	0.07797	2.76	11.16
Fibromatosis	0.004190	0.03068	23.97	131.24
Disease of capillaries	0.00004768	0.001377	23.34	232.21

Joonis 3. DisGeNet andmebaasi abil Enrichr tarkvara kaudu saadud erinevalt ekspresseeritud geenide kogumi assotsiatsioon asjakohaste haigusseisunditega. Tabelis on toodud DC higinäärmete proovides tekivad valgu ekspressiooni muutused, mis on seotud kontraktuuride, fibroosi, fibromatoosi ja defineerimata kapillaaride haigusega.

Selleks, et detailsemalt uurida isoleeritud higinäärmetes toimuvaid bioloogilisi protsesse, kasutati GO Biological process 2021 andmebaasi (Joonis 4). Üle 20 DC proovides erinevalt ekspresseeritud valgu oli seotud ECM remodelleerimise ja organisatsiooniga. Lisaks sellele oli suurenenud ka retseptor-vahendatud endotsütoosi, endosoomide küpsemise ning epiteliaalsete ja silelihasrakkude migratsiooniga seotud valkude ekspressioon. Need leiud on kooskõlas teoriaga, et higinäärmetes olevad müofibroblastid on võimelised panustama fibroproliferatiivsete haiguste patogeneesi (Takahashi jt., 2013).

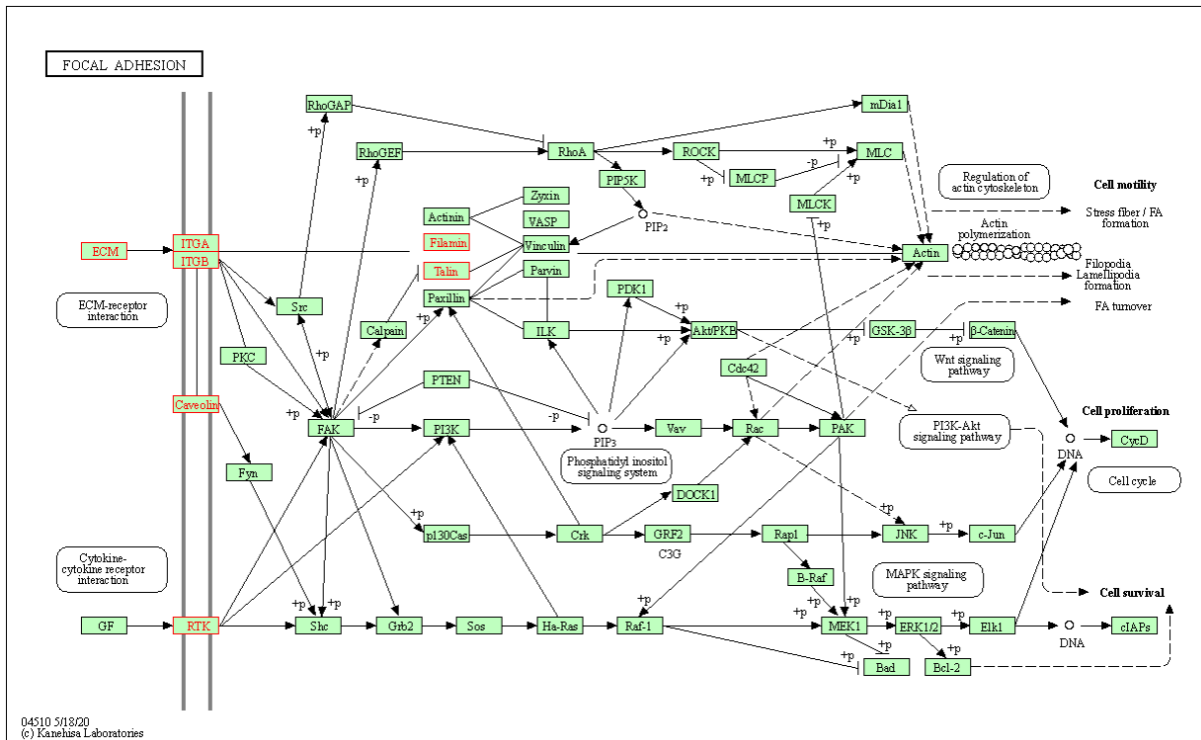
Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
regulation of smooth muscle cell migration (GO:0014910)	0.0003507	0.01858	25.56	203.34
positive regulation of cell migration (GO:0030335)	0.002901	0.04833	3.94	23.00
positive regulation of smooth muscle cell migration (GO:0014911)	0.006176	0.07300	19.17	97.54
regulation of cell migration (GO:0030334)	0.008103	0.08545	2.95	14.20
endothelial cell migration (GO:0043542)	0.03045	0.1684	7.76	27.11
epithelial cell migration (GO:0010631)	0.03339	0.1684	7.37	25.04
receptor-mediated endocytosis (GO:0006898)	5.226e-9	0.000001024	12.74	243.03
positive regulation of endocytosis (GO:0045807)	0.0003524	0.01858	13.25	105.32
extracellular matrix organization (GO:0030198)	2.892e-14	3.612e-11	11.65	363.33
extracellular matrix assembly (GO:0085029)	0.01214	0.1067	13.07	57.65
cell-matrix adhesion (GO:0007160)	0.03319	0.1684	4.46	15.19
positive regulation of cell-matrix adhesion (GO:0001954)	0.03800	0.1791	6.84	22.36

Joonis 4. GO Biological process 2021 andmebaasi abil Enrichr tarkvara kaudu saadud erinevalt ekspresseeritud geenide kogumi assotsiatsioon asjakohaste bioloogiliste protsessidega. Võrreldes kontrollproovide higinäärmetega on DC higinäärmetes kõrgem rakkude migratsiooni, endotsütoosi ning ECM remodelleerimise tase.

2.3.3 DC muutused molekulaarsel tasemel

Selleks, et analüüsida muutusi molekulaarsel tasemel ning seostada neid konkreetsete signaaliradade ja bioloogiliste protsessidega DC patogeneesis, kasutati KEGG 2021 Human andmebaasi.

Statistiliselt oluliseks muutuseks DC higinäärmete proovides, võrreldes kontrollproovidega on rakk-ECM adhesiooniga seotud valkude ning PI3K-Akt signaalrajasse kuuluva rakkupinna retseptori CD140 (ehk PDGFRB) ülesregulatsioon. 12 valku, mille hulgas on 5 tüüpi kollageene (COL4A1, COL4A2, COL6A1, COL6A1, COL6A3), rakk-ECM adhesiooni ning migratsiooni reguleerivad integriinid (ITGA5, ITGB5), vitronektiin (VTN), tenastiin (TNXB), fibronektiin (FN1), basaalmembraani valgud laminiin gamma (LAMC1) ja perlekaan (HSPG2), olid seotud rakkude suurema migratsiooni astmega (Joonis 5).



Joonis 5. KEGG 2021 Human signaaliradade andmebaasi alusel esile toodud fokaalse adhesiooni ning PI3K-Akt signaalirajad ja nende ülesreguleeritud komponendid (märgitud punasega). ECM – ekstratsellulaarne maatriks; ITG – integriin; RTK – retseptori türosiini kinaas.

Signaalmolekul TGF-β on kirjeldatud võtmeregulaatorina fibroosi, kaasa arvatud DC, sümptomite arengus. Kuigi käesolevas uurimuses ei ole DC higinäärmete proovides otseselt tuvastatud TGF-β signaalvalgu ülesregulatsiooni, on eelnevate uurimuste ja allpool kirjeldatud leiude alusel võimalik väita, et TGF-β signalisatsioon on mitmekesiselt moduleeritud DC koes ning ka higinäärmetes.

RhoC (ingl k *Ras homolog gene family, member C*) valk oli ülesreguleeritud DC higinäärmete proovides. Teadaolevalt RhoC ekspressioon positiivselt reguleeritud TGF-β signaalraja poolt ning on näidatud, et nende valkude koostime soodustab epiteliaal-mesenhümaalset transformatsiooni (EMT), migratsiooni (Nomikou jt., 2018) ning kopsu fibroblastide diferentseerumist müofibroblastideks *in vitro* (Ji jt., 2014).

DC higinäärmete proovides ülesreguleeritud TNS1 (ingl k *Tensin 1*) on samuti EMT ning rakkude migratsiooni soodustav valk, mis sodustab müofibroblastide diferentseerumist ning toetab nende migratsiooni, adhesiooni ning kollageeni tootmist. Selle ekspressioon on eeldatavalt kaudselt reguleeritud TGF-β poolt. TNS1 ekspressioon suureneb muuhulgas vastuseks ROCK-vahendatud signaalile, mis

omakorda sõltub Rho perekonna GTPaasidest, mis omakorda on reguleeritud muuhulgas TGF- β signalisatsiooni poolt. (Bernau jt., 2017; Wilson jt., 2022)

TGFBI (ingl k *TGF- β induced*) on fibroosi ning EMT-d soodustav sekretoorne valk, mille ekspressioon aktiveerub vastuseks TGF- β signaalile (Xu jt., 2021). Teistest valkudest on kõige suuremas astmes ülesreguleeritud TGFBI, mis soodustab raku migratsiooni tänu võimele seonduda tüüp I, II, IV ja VI kollageeni fibrille integriinidega (Thapa jt., 2007; Corona ja Blobe, 2021). ITGA5 ja ITGB5 moodustavad TGFBI valguga seonduva retseptori, mis on ekspresseeritud fibroblastides (Kim jt., 2002). Seejuures tüüp IV ja tüüp VI kollageenid on ülesreguleeritud DC higinäärmete proovides. See leid viitab sellele, et TGFBI integriinide vahetalitlusel võib mängida DC puhul märkimisväärset seni kirjeldamata rolli rakkude migratsioonis higinäärmete ümbruskonnas vastuseks TGF- β signaalile patoloogilisest koest.

Mitmed teised valgud (Joonis 6), mis osalevad TGF- β signaali modelleerimises, on ülesreguleeritud DC higinäärmete proovides.

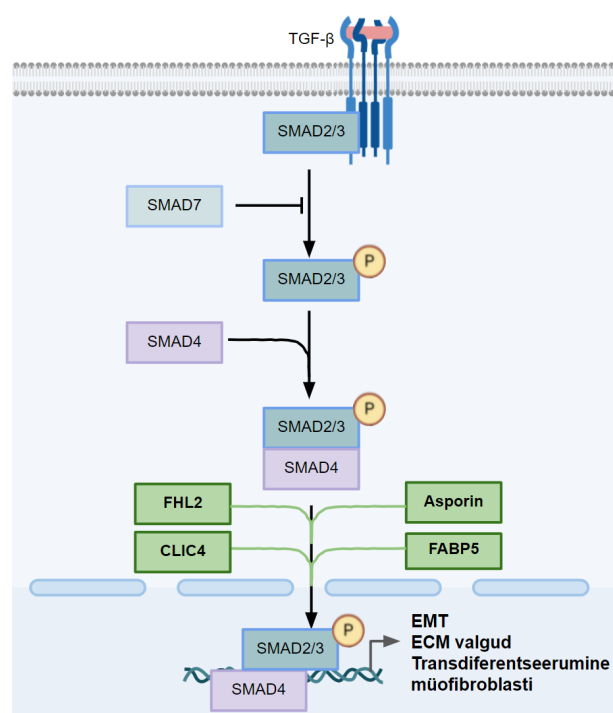
Asporiin (ingl k *Asporin*) valgul on palju toimeid, mis sõltuvad sellest, kas valk paikneb rakus sees või rakust väljas. Asporiini ekspressioon on positiivselt reguleeritud TGF- β poolt ja asporiin omakorda võimendab TGF- β signaali, soodustades fosforülitud SMAD2/3 sisenemist tuuma (Zhan jt., 2019). Siiani on asporiini rollist fibroosis olnud vähe teada. Tänapäevaks on aga leitud, et asporiini on rakusiseselt kopsufibroosi müofibroblastides tugevalt üles reguleeritud. Lisaks sellele, asporiini ekspressiooni vähenemine vähendab ka tüüp I kollageeni ja α -SMA ekspressiooni müofibroblastide poolt (Huang jt., 2022). Varem oli kirjeldatud asporiini ekspressiooni suurenemist RNA tasemel DC sõlmeke koes (Jupp jt., 2016). Selles uurimuses täheldati asporiini ülesregulatsioon valgu tasemel ka DC higinäärmete proovides.

Teine tuvastatud ülesreguleeritud valk, mis võimendab TGF- β signaalrada on FABP5 (ingl k *Fatty acid-binding protein, epidermal*). Soodustades fosforülitud SMAD2/3 translokatsiooni tuuma, soodustab FABP5 ülesregulatsioon TGF- β signalisatsiooni (Song jt., 2018). Varem on FABP5 ülesregulatsiooni valgu tasemel demonstreeritud DC sõlmeke koes (Pavelic jt., 2008). Nende andmete alusel on võimalik väita, et FABP5 osaleb DC koes TGF- β signalisatsiooni düsregulatsioonis ja samuti ka higinäärmetes, soodustades sel teel fibroosi teket.

CLIC4 (ingl k *Chloride intracellular channel 4*) on teadaolevalt üks valkudest, mis soodustab fibroblastide transdiferentseerumist müofibroblastideks (Rønnov-Jessen

jt., 2002). CLIC4 ekspressioon suureneb vastuseks TGF- β signalisatsioonile, moduleerides omakorda SMAD2/3 translokatsiooni (Shukla jt., 2009). Selle valgu ekspressiooni suurenemist on näidatud süsteemse skleroosi proovide ja kasvajaseolistes müofibroblastides vastuseks TGF- β signaalile, mis peegeldab CLIC4 universaalset rolli müofibroblasti fenotüübi tekkimises ning panustamist koe remodelleerimisesse ja fibroosi seni täpsemalt kirjeldamata mehhanismi teel (Yao jt., 2009; Wasson jt., 2021). CLIC4 valgu ekspressiooni sõltuvus TGF- β signaalirajast ning kõrge korrelatsioon müofibroblastide markeri α -SMA valguga (Wasson jt., 2022) annab alust väita, et see valk võib panustada müofibroblastide produktsiooni DC higinäärmete ümbruses.

FHL2 (ingl k *Four and a half LIM-only protein 2*) on fibroosi kontekstis hakatud uurima alles viimaste aastakümnete jooksul seoses selle võimega olla TGF- β ekspressiooni ja signalisatsiooni võtmeregulaatoriks (Dhan jt., 2017). Hiljuti on demonstreeritud FHL2 valgu ülesregulatsiooni neeru fibroosi diagnoosiga patsientide neerudest isoleeritud α -SMA positiivsetes, rakkudes vastuseks TGF- β stimulatsioonile. Seejuures FHL2 pärssimine tagurpidi vähendab EMT ning fibroblastide aktiveerumisega seotud FN1, α -SMA ja tüüp I kollageeni ekspressiooni (Duan jt., 2020).



Joonis 6. Kokkuvõtlik pilt, kuidas TGF- β signaaliraja positiivsed regulaatorid, mis on ülesreguleeritud DC higinäärmete proovides (tähistatud paksu kirjaga rohelisel taustal), soodustavad epiteelirakkude transformatsiooni mesenhümaalseteks (EMT),

võimendavad rakuvälise maatriksi (ECM) valkude ekspressiooni ning käivitavad müofibroblastideks transdifferentseerumist. Joonis on valmistatud "Google Slides" tarkvaraga Shi ja kolleegide artikli alusel (Shi jt., 2020).

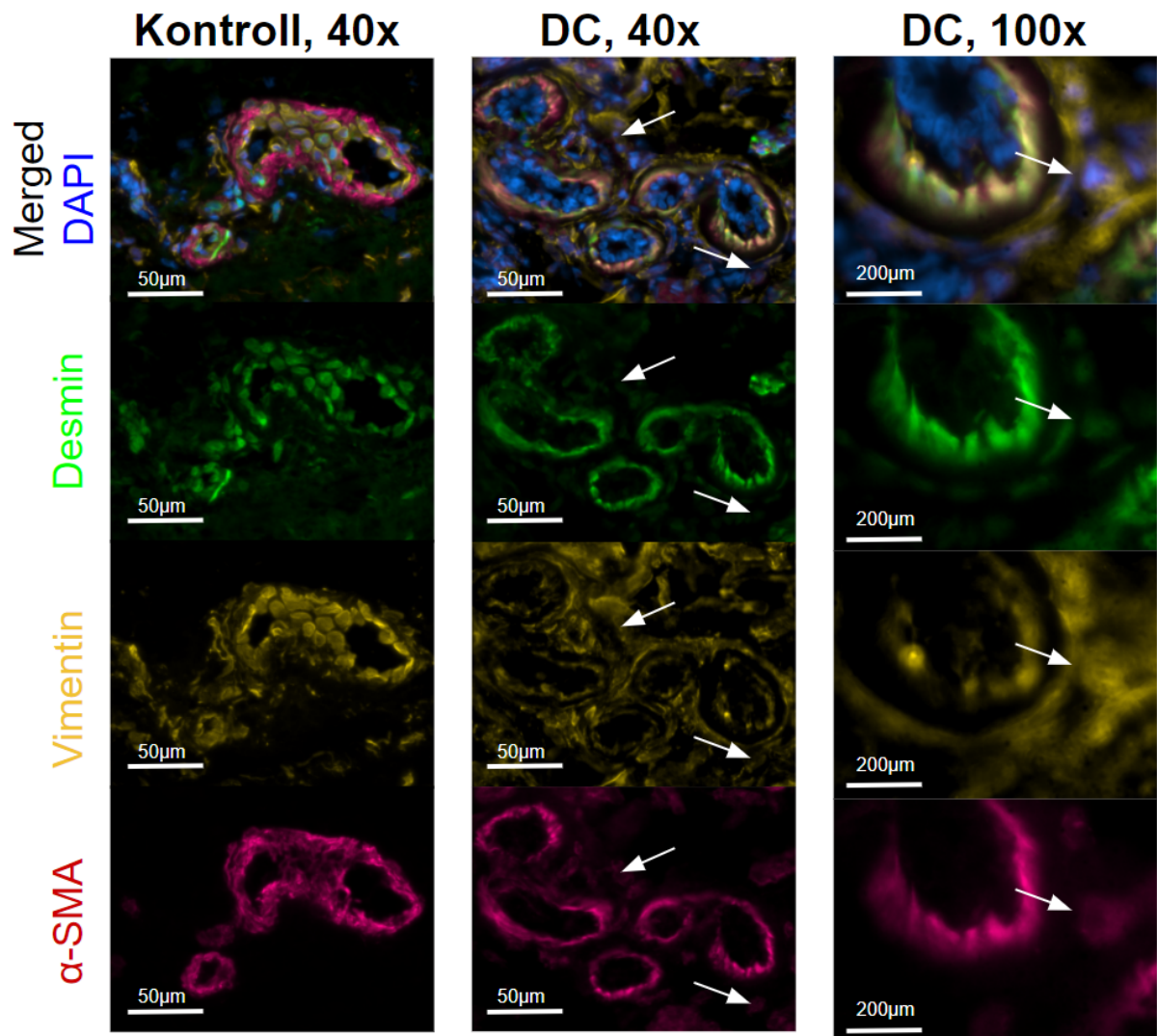
CLIC4 – *Chloride intracellular channel 4*; FABP5 – *Fatty acid-binding protein, epidermal*; FHL2 – *Four and a half LIM-only protein 2*; SMAD – *Mothers against decapentaplegic*; TGF- β – *Transforming growth factor beta*.

Nende valkude ülesregulatsioon DC higinäärmete proovides võrreldes kontrollproovide higinäärmetega viitab sellele, et DC higinäärmetes toimub tõenäoliselt müofibroblastide moodustumine ning nende migratsioon. EMT-d soodustavate valkude ülesregulatsioon koos müoepiteliaalsete ja mesenhümaalsete tüvirakkude loomuliku võimega anda aluse müofibroblastidele tekkele viitavad sellele, et higinääre võib olla DC puhul märkimisväärne müofibroblastide allikas.

2.3.4 Dupuytren'i kontraktuuri higinäärmed müofibroblastide allikana

Selleks, et kontrollida kas higinäärmed võivad olla müofibroblastide allikaks DC koes, analüüsiti DC ning kontrollkoe higinäärmeid sisaldavaid koelõike IFA meetodiga.

VIM-DES- α -SMA (vimentiin-desmiin- α -silelihaskoe aktiin) kolmikvärvimist kasutatakse rutiinselt müofibroblastide eristamiseks silelihaskudest (Eyden, 2008). Nii kontrollproovides kui DC higinäärmetes on näärmesiseselt paiknevaid kolmik-positiivseid rakke, mis kuuluvad tõenäoliselt müoepiteliaalsete rakkude hulka (Joonis 7). Erinevalt kontrollproovidest on DC proovi higinäärmete ümber paiknevad DES ja VIM ning α -SMA kolmikpositiivsed rakud. Kuna nende morfoloogia ei ole tüüpiline müofibroblastidele, ei saa üheselt väita, et need rakud on just müofibroblastid. Samas kolmik-positiivsete rakkude leid DC higinäärmete naabruses on kooskõlas nii proteoomika andmetest tuleneva eeldatavalt suurema rakkude migratsiooniga higinäärme ümbruses, kui ka üldise hüpoteesiga, et higinäärmed võiksid olla müofibroblastide allikaks.



Joonis 7. Dupuytren'i kontraktuuri higinäärmete ümber paiknevad DES-VIM- α -SMA kolmik-positiivsed rakud (tähistatud valge noolega), mis ei ole nähtavad karpaalkanali proovi higinäärmete ümbruses. Nii kontrollis, kui ka DC proovide higinäärmete ümber esinevad VIM⁺ (kollane), DES⁺(roheline) kaksik-positiivsed rakud, kuid ainult DC higinäärmete kõrval on leitavad DES-VIM- α -SMA kolmik-positiivsed rakud, mis võiksid olla müofibroblastid. Tuumad on visualiseeritud DAPI abil. Pildid on tehtud Olympus IX81 fluorestsentsmikroskoobiga.

2.4 Arutelu

Dupuytren'i kontraktuur on kõrge esinemissagedusega Põhja-Euroopa elanike seas, mistõttu püsib aktiivne huvi selle uurimiseks. Lisaks annab DC molekulaarne analüüs eeldatavasti infot ka teiste fibroproliferatiivsete haiguste etiopatogeneesi kohta ja võimaldab välja töötada nende haiguste erinevaid ravitaktikaid. DC puhul on tänaseks uuritud fibroosi molekulaarseid aluseid, leitud uued efektiivsed raviskeemid ning uuritud haigust esile kutsuvaid riskifaktoreid. Varasematele uuringutele vaatamata pakutakse tänapäeval DC ravina eeskätt erineva invasiivsuse astmega

operatiivset ravi ning enamikel juhtudel ei ole võimalik pakkuda DC põdevatele patsientidele unifitseeritud efektiivset etioloogilist ravi (Panigrahi jt., 2022). See olukord näitab selgelt, et praegune teadmine fibroproliferatiivsete haiguste, sealhulgas DC molekulaarsete mehhanismide kohta, ei ole piisavalt põhjalik.

DC patogeneesis mängivad kõige märkimisväärsemat rolli müofibroblastid, mille kontrollimatu paljunemine, tüüp III kollageeni kiudude süntees ja kontraktsioon põhjustavad selle haiguse sümptomite teket. Paljud rakutüübid, kaasa arvatud mesenhümaalsed tüvirakud, on võimelised produtseerima müofibroblaste. Higinäärmed paiknevad kõige suurema tihedusega just paksu nahaga piirkondades nagu peopesad ja jalatallad. Kuigi on tõestatud, et need sisaldavad mesenhümaalseid tüvirakke ning müoepiteliaalseid rakke, mis on võimelised diferentseeruma müofibroblastideks, ei ole higinäärmete potentsiaalset rolli DC patogeneesis kunagi varem põhjalikult kirjeldatud. Higinäärmete spetsiifilisi muutusi DC koes on esmakordselt aastal 2015 kirjeldanud Viil ja kolleegid (Viil jt., 2015). Kuna tänaseks päevaks on kirjandusest väga vähe leida higinäärmete potentsiaalse rolli kohta DC etiopatogeneesis ning haigusest tingitud muudatustest higinäärmetes, oli käesoleva töö eesmärgiks uurida valgu tasemel toimuvaid muutusi DC higinäärmetes.

Isoleeritud higinäärmete proteoomi uurimisel selgus, et DC higinäärmetele on omane mitmete valkude ekspressiooni muutus, mille abil on neid võimalik eristada tervetest higinäärmetest. DC higinäärmetele on omane suurem fokaalse adhesiooniga seotud valkude ekspressioon, mis mängivad olulist rolli nii rakkude proliferatsiooni kui ka migratsiooni protsessis. Integriinide $\alpha 5\beta 5$ dimeer, mis võtab osa nii rakkude migratsioonist kui ka ECM sees ladestatud TGF- β aktiveerimisest (Perrucci jt., 2018; Porte jt., 2021), olid DC higinäärmete proovides tugevalt ülesreguleeritud. TGF- β on varem seostatud nii müofibroblastide poolt kollageeni produktsiooni stimuleerimisega kui ka epiteliaalsete rakkude transdiferentseerumisega müofibroblastideks (McAnulty, 2007; Li jt., 2015), kuid selle ülesregulatsiooni DC higinäärmete proovides ei ole kirjeldatud. Üheks seletuseks, miks fibroosiga assotsieeritud TGF- β valgu ülesregulatsiooni ei ole otseselt täheldatud, on selle mobilisatsioon integriinidega müofibroblastide poolt, mis tegi suhteliselt väikese sisaldusega parakriini väljapesemisele veelgi vastuvõtlikumaks proovide valmistamise protsessi ajal.

Kuigi TGF- β ülesregulatsiooni higinäärmete proovides ei ole täheldatud, viitab terve rida teisi ülesreguleeritud valke võimendatud TGF- β -ga seotud signaalsatsioonile.

Üks ülesreguleeritud efektorvalk, mille ekspressioon on TGF- β poolt positiivselt reguleeritud, oli RhoC. RhoC omakorda soodustab rakkude EMT, müofibroblastideks transdifferentseerumist, migratsiooni ning fibroosi. Ei ole teada, et kunagi varem oleks kirjeldatud TGF- β -RhoC telje ülesregulatsiooni higinäärmetes fibroproliferatiivsete haiguste kontekstis. Mõned teised efektorvalgud, mis panustavad EMT-sse ja müofibroblastide stimulatsiooni ning mille suurenenud ekspressioon on assotsieeritud fibroosiga, on samuti ülesreguleeritud DC higinäärmete proovides. Paljud nendest käituvad TGF- β signaalraja modulaatoritena, võimendades fosforüülitud SMAD2/3 translokatsiooni tuuma sisse, nagu näiteks asporiin, FABP5, FHL2 ja CLIC4. Võimendades TGF- β signalisatsiooni ning soodustades ECM komponentide kontraktsiooni ja migratsiooni vahendatavate valkude ekspressiooni, toetab tuvastatud erinevalt ekspresseeritud valkude kogum hüpoteesi, et higinäärmetesse kuuluvad rakud võivad olla DC kontraktuuri puhul seni teadmata müofibroblastide allikas.

IFAst oli võimalik järelda, et DC higinäärmete lähiümbruses paiknesid VIM-DES- α -SMA kolmik-positiivsed rakud, mis võiksid olla just müofibroblastid. Selliseid rakke ei olnud kontrollproovides, mis viitab sellele, et DC higinäärmetes esines müofibroblaste higinäärmetest väljaspool. Samas ei tuvastatud DC higinäärmetes IFA analüüsil selgeid näärmesiseseid morfoloogilisi muutusi.

Antud töö oli fokuseeritud higinäärmete potentsiaalsele rollile DC patogeneesis, mida siiani väga vähe uuritud. Higinäärmed sisaldavad mitmeid eri tüüpi rakkude populatsioone, mis on võimelised andma aluse müofibroblastidele. Käesolevas töös kirjeldati valgu tasemel tekkinud muutusi DC higinäärmetes, mis võiksid anda laiemat pildi nende rollist DC ning teiste fibroproliferatiivsete haiguste patogeneesis. Käesolev uurimus tõestab, et higinäärmed on märkimisväärne ja perspektiivne uurimisobjekt DC ning teiste fibroproliferatiivsete haiguste patogeneesi kontekstis.

KOKKUVÖTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli kirjeldada Dupuytren'i kontraktuuriga kaasnevaid muutusi valgu ekspressiooni tasemel higinäärmetes ning uurida higinäärmete võimalik roll DC etiopatogeneesis.

Isoleeritud higinäärmete proteoomi analüüsi tulemused viitavad DC higinäärmetes toimuvale epiteelial-mesenhümaalsele transformatsioonile, fibroblastide aktiveerimisele ning mitmete proliferatsiooni ja migratsiooniga assotsieeritud ECM struktuursete, signaal- ning efektorvalkude ekspressiooni muutustele. Kirjeldatud on mitmeid TGF- β -signaalrada võimendavate ja müofibroblastide arenguga seostatavate valkude ülesreguleerimine DC higinäärmete proovides.

Need leiud olid kooskõlas immuunfluorestsentsanalüüsi tulemusega, mis kinnitavad struktuurseid muutusi DC higinäärmeid ümbritsevas alas. DC higinäärmeid ümbritsevad vimentiin-desmiin-silelihaste aktiin kolmik-positiivsed rakud, mis meenutavad DC haigusseoselisi müofibroblaste.

Käesoleva töö tulemused viitavad sellele, et higinäärmed on olulised Dupuytren'i kontraktuuri patogeneesis ning higinäärmete rolli edasine detailne uurimine on vajalik, et täiendada meie teadmisi fibroproliferatiivsete haiguste etiopatogeneesi kohta ja anda võimalusi uute DC ravi ja ennetavate meetodite väljaarendamiseks.

The description of Dupuytren's contracture derived sweat glands' protein expression profile

Dmitry Shishmintsev

Summary

Dupuytren's contracture is a fibroproliferative disease of the palmar region that typically starts as a benign asymptomatic lump. As disease progresses, lumps will spread in proximo-dorsal direction, fuse and contract, leading to permanent hand function restriction. The greatest incidence rates have been estimated in states of Northern Europe.

Despite the long history of study and management of DC, its molecular basis is still eluding. In the previous work of our group have been demonstrated DC-related changes in sweat glands, including increased expression of relevant growth factors as well as greater proliferation rates.

The aim of this study was to determine the role of sweat glands in etiopathogenesis of Dupuytren's contracture as well as describe disease related changes in sweat glands' protein expression profile.

During analysis of proteome of the probes containing sweat glands isolated from Dupuytren's contracture suffering and non-suffering individuals there have been described increased expression of proteins, functionally related to positive regulation of epithelial to mesenchymal transition, activation of fibroblasts, cell proliferation and migration. Thereto upregulation of multiple TGF- β signaling pathway positive regulators and myofibroblast's development have been noted.

These findings agree with the result of following immunofluorescence analysis that indicates structural distinction in the DC derived sweat gland surrounding milieu. There have been present some vimentin-desmin-smooth muscle actin triple positive cells around the sweat glands of Dupuytren's contracture probes that resemble myofibroblasts.

On the basis of this study it is possible to assert that sweat glands can take a significant part of Dupuytren's contracture pathogenesis. Hereto this study demonstrates significant potential of the further investigation of sweat gland's role and molecular changes in context of fibroproliferative disease basis exploration.

TÄNUAVALDUSED

Olen tänulik minu juhendajatele Jaks Viljarile ja Mäemets-Allas Kristinale toetava juhendamise ning huvitava uurimisteema eest. Samuti avaldan suurt tänu Claudia Griselda Cárdenas León ja Klaas Mariliisile nende abivalmiduse eest kogu uurimuse vältel.

KIRJANDUSE LOETELU

Hutchison, R. L., & Rayan, G. M. (2011). Astley Cooper: His Life and Surgical Contributions. *The Journal of Hand Surgery*, 36(2), 316–320.

Benson, Leon S. MD; Williams, Craig S. MD; Kahle, Marjorie OTR/L (1998). Dupuytren's Contracture, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*: January 1998 - Volume 6 - Issue 1 - p 24-35

Hart MG, Hooper G (2005). Clinical associations of Dupuytren's disease. *Postgraduate Medical Journal*;81:425-428.

Hindocha, S. (2018). Risk Factors, Disease Associations, and Dupuytren Diathesis. *Hand Clinics*, 34(3), 307–314.

Alser OH, Kuo RYL, Furniss D. (2020). Nongenetic Factors Associated with Dupuytren's Disease: A Systematic Review. *Plast Reconstr Surg. Oct*;146(4):799-807.

Ball, C., Izadi, D., Verjee, L. S., Chan, J., & Nanchahal, J. (2016). Systematic review of non-surgical treatments for early Dupuytren's disease. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1).

Gerber, R. A., Perry, R., Thompson, R., & Bainbridge, C. (2011). Dupuytren's contracture: a retrospective database analysis to assess clinical management and costs in England. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 12(1).

Wilburn, J., McKenna, S. P., Perry-Hinsley, D., & Bayat, A. (2013). The Impact of Dupuytren Disease on Patient Activity and Quality of Life. *The Journal of Hand Surgery*, 38(6), 1209–1214.

Bebbington, E., & Furniss, D. (2015). Linear regression analysis of Hospital Episode Statistics predicts a large increase in demand for elective hand surgery in England. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 68(2), 243–251.

Shaw, R. B., Chong, A. K. S., Zhang, A., Hentz, V. R., & Chang, J. (2007). Dupuytren's Disease: History, Diagnosis, and Treatment. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 120(3), 44e–54e.

Layton, T., & Nanchahal, J. (2019). Recent advances in the understanding of Dupuytren's disease. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-231.

Mikkelsen OA. (1976). Dupuytren's disease--a study of the pattern of distribution and stage of contracture in the hand. *Hand (3)*:265-71.

Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 27(5):549-50.

Bruijn, L. E., van den Akker, B. E. W. M., van Rhijn, C. M., Hamming, J. F., & Lindeman, J. H. N. (2020). Extreme Diversity of the Human Vascular Mesenchymal Cell Landscape. *Journal of the American Heart Association*.

Yuan, Q., Tan, R. J., & Liu, Y. (2019). Myofibroblast in Kidney Fibrosis: Origin, Activation, and Regulation. *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*, 253–283.

Aydin, M. M., & Akcali, K. C. (2018). Liver fibrosis. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 29(1), 14–21.

Archontogeorgis, K., Steiropoulos, P., Tzouvelekis, A., Nena, E., & Bouros, D. (2012). Lung Cancer and Interstitial Lung Diseases: A Systematic Review. *Pulmonary Medicine*, 2012, 1–11.

Sekhon HK, Sircar K, Kaur G, Marwah M. (2016). Evaluation of Role of Myofibroblasts in Oral Cancer: A Systematic Review. *Int J Clin Pediatr Dent. Jul-Sep*;9(3):233-239.

El Agha, E., Kramann, R., Schneider, R. K., Li, X., Seeger, W., Humphreys, B. D., & Bellusci, S. (2017). Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell*, 21(2), 166–177.

Emilio del Cacho, Margarita Gallego, Carlos Felices and José Antonio Bascuas. (1991). Myofibroblasts and myoepithelial cells in the chicken Harderian gland. *Histol Histopath* 6: 303-308

Kurata, Ryuichiro; Futaki, ... Kiyotoshi (2014). Isolation and Characterization of Sweat Gland Myoepithelial Cells from Human Skin. *Cell Structure and Function*, 39(2), 101–112.

Iqbal, S. A., Manning, C., Syed, F., Kolluru, V., Hayton, M., Watson, S., & 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 and Development*, 21(4), 609–622.

Tan, K., Withers, A., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). The Role of Stem Cells in Dupuytren's Disease: A Review. *Plastic and reconstructive surgery. Global open*, 6(5), e1777.

Giulio Gabbiani, MD and Guido Majno, MD. (1972). Dupuytren's Contracture: Fibroblast Contraction? *Am J Pathol* 66:131-146.

Rombouts, Jean-Jacques; Noël, Henri; Legrain, Yvonne; Munting, Everard (1989). Prediction of recurrence in the treatment of Dupuytren's disease: Evaluation of a histologic classification. *The Journal of Hand Surgery*, 14(4), 644–652.

Luck, J. V. (1959). Dupuytren's contracture: a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. *JBJS*, 41(4), 635-664.

ELLIOT, D., & RAGOOWANSI, R. (2005). Dupuytren's Disease Secondary to Acute Injury, Infection or Operation Distal to the Elbow in the Ipsilateral Upper Limb – A Historical Review. *Journal of Hand Surgery*, 30(2), 148–156.

Samulėnas, G., Rimdeika, R., Braziulis, K., Fomkinas, M., & Paškevičius, R. (2020). Dupuytren's Contracture: Incidence of Injury-Induced Cases and Specific Clinical Expression. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(7), 323.

Vandecasteele L, Degreeef I. (2020) Pain in Dupuytren's disease. *Acta Orthop Belg*. Sep;86(3):555-562.

Dolmans, G. H., de Bock, G. H., & Werker, P. M. (2012). Dupuytren Diathesis and Genetic Risk. *The Journal of Hand Surgery*, 37(10), 2106–2111.

Mohede, D. C. J., Riesmeijer, S. A., de Jong, I. J., Werker, P. M. N., & van Driel, M. F. (2020). Prevalence of Peyronie and Ledderhose Diseases in a Series of 730 Patients with Dupuytren Disease. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 145(4), 978–984.

J.T. Hueston (1982). The table top test. , 14(1), 0–103.

Hindocha, S., Stanley, J. K., Watson, J. S., & Bayat, A. (2008). Revised Tubiana's staging system for assessment of disease severity in Dupuytren's disease-preliminary clinical findings. *Hand (New York, N.Y.)*, 3(2), 80–86.

Pratt, A. L., & Ball, C. (2016). What are we measuring? A critique of range of motion methods currently in use for Dupuytren's disease and recommendations for practice. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1).

Walthall J, Anand P, Rehman UH. (2022). Dupuytren Contracture. *In StatPearls [Internet]*.

Hovius, S. E. R., & Zhou, C. (2018). Advances in Minimally Invasive Treatment of Dupuytren Disease. *Hand Clinics*, 34(3), 417–426.

- Zoubos, A. B., Stavropoulos, N. A., Babis, G. C., Mavrogenis, A. F., Kokkalis, Z. T., & Soucacos, P. N. (2014). THE McCASH TECHNIQUE FOR DUPUYTREN'S DISEASE: OUR EXPERIENCE. *Hand Surgery*, 19(01), 61–67.
- Lesiak, A. C., Jarett, N. J., & Imbriglia, J. E. (2017). Modified McCash Technique for Management of Dupuytren Contracture. *The Journal of Hand Surgery*, 42(5), 395.e1–395.e5.
- Rodrigues, J. N., Becker, G. W., Ball, C., Zhang, W., Giele, H., Hobby, J., Pratt A., Davis, T. (2015). Surgery for Dupuytren's contracture of the fingers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Wong, C. R., Huynh, M. N. Q., Fageeh, R., & McRae, M. C. (2021). Outcomes of Management of Recurrent Dupuytren Contracture: A Systematic Review and Meta-analysis. *HAND*, 155894472199422.
- Krefter, C., Marks, M., Hensler, S., Herren, D. B., & Calcagni, M. (2017). Complications after treating Dupuytren's disease. A systematic literature review. *Hand Surgery and Rehabilitation*, 36(5), 322–329.
- Sanjuan-Cerveró, R., Carrera-Hueso, F. J., Vazquez-Ferreiro, P., & Ramon-Barrios, M. A. (2018). Efficacy and adverse effects of collagenase use in the treatment of Dupuytren's disease. *The Bone & Joint Journal*, 100-B(1), 73–80.
- Sanjuan-Cervero, R. (2020). Current role of the collagenase *Clostridium histolyticum* in Dupuytren's disease treatment. *Ir J Med Sci* 189, 529–534.
- Cooper, T. B., Poonit, K., Yao, C., Jin, Z., Zheng, J., & Yan, H. (2020). The efficacies and limitations of fasciectomy and collagenase *clostridium histolyticum* in Dupuytren's contracture management: A meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 28(2), 230949902092174.
- Geoghegan L, Man J, Jain A, Price A, Gibbons E, Jerosch-Herold C, Sidey-Gibbons C, Rodrigues JN. (2021). Factors Associated with the Development, Progression, and Outcome of Dupuytren Disease Treatment: A Systematic Review. *Plast Reconstr Surg*. Nov 1;148(5):753e-763e.
- An, H. S., Southworth, S. R., Thomas Jackson, W., & Russ, B. (1988). Cigarette smoking and Dupuytren's contracture of the hand. *The Journal of Hand Surgery*, 13(6), 872–874.
- Marsh, A. R., & Kelly, C. P. (2008). Dupuytren's Disease in an 8 Year-Old. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 33(1), 89–90.
- Mathieu, S., Naughton, G., Descatha, A., Soubrier, M., & Dutheil, F. (2020). Dupuytren's Disease and exposure to vibration: systematic review and Meta-analysis. *Joint Bone Spine*.
- Larsen, S., Krogsgaard, D. G., Larsen, L. A., Iachina, M., Skytthe, A., & Frederiksen, H. (2014). Genetic and environmental influences in Dupuytren's disease: A study of 30,330 Danish twin pairs. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 40(2), 171–176.
- Hindocha, S., John, S., Stanley, J. K., Watson, S. J., & Bayat, A. (2006). The Heritability of Dupuytren's Disease: Familial Aggregation and Its Clinical Significance. *The Journal of Hand Surgery*, 31(2), 204–210.
- Capstick, R., Bragg, T., Giele, H., & Furniss, D. (2012). Sibling recurrence risk in Dupuytren's disease. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 38(4), 424–429.
- Williams, F. M., Kalson, N. S., Fabiane, S. M., Mann, D. A., & Deehan, D. J. (2015). Joint Stiffness Is Heritable and Associated with Fibrotic Conditions and Joint Replacement. *PLOS ONE*, 10(7), e0133629.

Dolmans, G. H., Werker, P. M., Hennies, H. C., Furniss, D., Festen, E. A., Franke, L., ... Wijmenga, C. (2011). Wnt Signaling and Dupuytren's Disease. *New England Journal of Medicine*, 365(4), 307–317.

Becker, K., Siegert, S., Toliat, M. R., ... Dolmans, G. H. (2016). Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies and Network Analysis-Based Integration with Gene Expression Data Identify New Suggestive Loci and Unravel a Wnt-Centric Network Associated with Dupuytren's Disease. *PLOS ONE*, 11(7), e0158101.

Ng, M., Thakkar, D., Southam, ... Furniss, D. (2017). A Genome-wide Association Study of Dupuytren Disease Reveals 17 Additional Variants Implicated in Fibrosis. *The American Journal of Human Genetics*, 101(3), 417–427.

Ten Dam, E.-J. P. M., van Beuge, M. M., Bank, R. A., & Werker, P. M. N. (2015). Further evidence of the involvement of the Wnt signaling pathway in Dupuytren's disease. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10(1), 33–40.

Shih, B., & Bayat, A. (2010). Scientific understanding and clinical management of Dupuytren disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(12), 715–726.

Samulėnas, G., Smalinskienė, A., Rimdeika, R., Braziulis, K., Fomkinas, M., & Paškevičius, R. (2021). Evaluation of WNT Signaling Pathway Gene Variants WNT7B rs6519955, SFRP4 rs17171229 and RSPO2 rs611744 in Patients with Dupuytren's Contracture. *Genes*, 12(9), 1293.

Lee, L. C., Zhang, A. Y., Chong, A. K., Pham, H., Longaker, M. T., & Chang, J. (2006). Expression of a Novel Gene, MafB, in Dupuytren's Disease. *The Journal of Hand Surgery*, 31(2), 211–218.

Eychène, A., Rocques, N., & Pouponnot, C. (2008). A new MAFia in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 683–693.

Itoh, Y., Ng, M., Wiberg, A., ... Furniss, D. (2021). A common SNP risk variant MT1-MMP causative for Dupuytren's disease has a specific defect in collagenolytic activity. *Matrix Biology*, 97, 20–39.

Sayadi, Lohrasb R.; Alhunayan, Danah; Sarantopoulos, Nikolaos; Kong, Christina; ... Widgerow, Alan D. (2019). The Molecular Pathogenesis of Dupuytren Disease. *Annals of Plastic Surgery*, 83(5), 594–600.

O'Gorman, D. B., Vi, L., & Gan, B. S. (2010). Molecular mechanisms and treatment strategies for Dupuytren's disease. *Therapeutics and clinical risk management*, 6, 383–390.

Park, Tae Hwan; Kim, Dongha; Lee, Young-Seok; Kim, Sung Young (2019). A Meta-analysis to Identify Novel Diagnostic and Therapeutic Targets for Dupuytren's Disease. *Wound Repair and Regeneration*, 28(2):202-210.

Gonzalez AM, Buscaglia M, Fox R, Isacchi A, Sarmientos P, Farris J, Ong M, Martineau D, Lappi DA, Baird A. (1992). Basic fibroblast growth factor in Dupuytren's contracture. *Am J Pathol*.141(3):661-71.

Shimura, T., Ando, T., Narao, M., Sasatani, M., Kamiya, K., & Ushiyama, A. (2020). Mechanism of turnover or persistence of radiation-induced myofibroblast in vitro. *Cell Cycle*, 19(23), 3375–3385.

Holzer, L. A., Cör, A., Pfandlsteiner, G., & Holzer, G. (2013). Expression of VEGF, its receptors, and HIF-1 α in Dupuytren's disease. *Acta Orthopaedica*, 84(4), 420–425.

Van Beuge, M. M., ten Dam, E.-J. P. M., Werker, P. M. N., & Bank, R. A. (2015). Wnt pathway in Dupuytren disease: connecting profibrotic signals. *Translational Research*, 166(6), 762–771.e3.

Vallée, A., Lecarpentier, Y., Guillevin, R., & Vallée, J. N. (2017). Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget*, 8(52), 90579–90604.

Wang, J.-P., Yu, H.-H. M., Chiang, E.-R., Wang, J.-Y., Chou, P.-H., & Hung, S.-C. (2018). Corticosteroid inhibits differentiation of palmar fibromatosis-derived stem cells (FSCs) through downregulation of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *PLOS ONE*, 13(6), e0198326.

O'Gorman, D.B., Wu, Y., Seney, S. et al. (2006). Wnt expression is not correlated with β -catenin dysregulation in Dupuytren's Disease. *J Negat Results Biomed* 5, 13.

Saupe, F., Schwenzer, A., Jia, Y., ... Orend, G. (2013). Tenascin-C Downregulates Wnt Inhibitor Dickkopf-1, Promoting Tumorigenesis in a Neuroendocrine Tumor Model. *Cell Reports*, 5(2), 482–492.

Fujita M, Ito-Fujita Y, Iyoda T, Sasada M, Okada Y, Ishibashi K, Osawa T, Kodama H, Fukai F, Suzuki H. (2019). Peptide TNIIIA2 Derived from Tenascin-C Contributes to Malignant Progression in Colitis-Associated Colorectal Cancer via β 1-Integrin Activation in Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 5;20(11):2752.

Shih B, Wijeratne D, Armstrong DJ, Lindau T, Day P, Bayat A. (2009). Identification of biomarkers in Dupuytren's disease by comparative analysis of fibroblasts versus tissue biopsies in disease-specific phenotypes. *J Hand Surg Am*. 34(1):124-36.

Berndt A, Kosmehl H, Katenkamp D, 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(2):55-8.

Barbolina, M. V., Liu, Y., Gurler, H., ... Stack, M. S. (2012). Matrix Rigidity Activates Wnt Signaling through Down-regulation of Dickkopf-1 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 141–151.

Dees, C., Schlottmann, I., Funke, R., ... Distler, J. H. W. (2013). The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(6), 1232–1239.

Hodge BD, Sanvictores T, Brodell RT. (2018). *Anatomy, Skin Sweat Glands*. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Saga K. (2002). Structure and function of human sweat glands studied with histochemistry and cytochemistry. *Prog Histochem Cytochem*. 37(4):323-86.

Sato K, Nishiyama A, Kobayashi M. (1979). Mechanical properties and functions of the myoepithelium in the eccrine sweat gland. *Am J Physiol.*, 237(3):C177-84.

Bonnie D. Hodge; Terrence Sanvictores; Robert T. Brodell. (2021). *Anatomy, Skin Sweat Glands*. Publishing, Treasure Island (FL)

Lobitz, W. C., Holyoke, J. B., & Brophy, D. (1956). Response of the Human Eccrine Sweat Duct to Dermal Injury. *Journal of Investigative Dermatology*, 26(4), 247–262.

Petschnik AE, Klatte JE, Evers LH, Kruse C, Paus R, Danner S. (2010). Phenotypic indications that human sweat glands are a rich source of nestin-positive stem cell populations. *Br J Dermatol*. 1;162(2):380-3.

Lu, C., & Fuchs, E. (2014). Sweat gland progenitors in development, homeostasis, and wound repair. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(2), a015222.

Leung, Y., Kandyba, E., Chen, Y. B., Ruffins, S., & Kobiela, K. (2013). Label retaining cells (LRCs) with myoepithelial characteristic from the proximal acinar region define stem cells in the sweat gland. *PLoS one*, 8(9), e74174.

- Danner, Sandra; Kremer, Mathias; Petschnik, Anna Emilia; ... Egaña, José T (2012). The Use of Human Sweat Gland–Derived Stem Cells for Enhancing Vascularization during Dermal Regeneration. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(6), 1707–1716.
- Diao J, Liu J, Wang S, Chang M, Wang X, Guo B, Yu Q, Yan F, Su Y, Wang Y. (2019). Sweat gland organoids contribute to cutaneous wound healing and sweat gland regeneration. *Cell Death Dis*, 10(3):238.
- Ma, Y., Li, M., Liu, J., Pang, C., Zhang, J., Li, Y., & Fu, X. (2018). Location, Isolation, and Identification of Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Sweat Glands. *Stem cells international*, 2018, 2090276.
- Takahashi M, Akamatsu H, Yagami A, ... Matsunaga K. (2013). Epithelial-mesenchymal transition of the eccrine glands is involved in skin fibrosis in morphea. *J Dermatol*, 40(9):720-5.
- Gao, Yunhe; Li, Meiyang; Zhang, Xueyan; Bai, Tingting; Chi, Guanfan; Liu, Jin; Li, Yulin (2014). Isolation, culture and phenotypic characterization of human sweat gland epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(4):997-1003
- Zybailov, Boris; Mosley, Amber L.; Sardi, Mihaela E.; Coleman, Michael K.; Florens, Laurence; Washburn, Michael P. (2006). Statistical Analysis of Membrane Proteome Expression Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2339–2347.
- Nomikou, E., Livitsanou, M., Stournaras, C. et al. (2018). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the genes encoding the small GTPases RhoA, RhoB, and RhoC: implications for the pathogenesis of human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2111–2124.
- Ji, H., Tang, H., Lin, H., Mao, J., Gao, L., Liu, J., & Wu, T. (2014). Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- β /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Biomedical reports*, 2(6), 787–792.
- Bernau, K., Torr, E. E., Evans, M. D., Aoki, J. K., Ngam, C. R., & Sandbo, N. (2017). Tensin 1 Is Essential for Myofibroblast Differentiation and Extracellular Matrix Formation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 56(4), 465–476.
- Wilson AC, Chiles J, Ashish S, Chanda D, Kumar PL, Mobley JA, Neptune ER, Thannickal VJ, McDonald MN. (2022). Integrated bioinformatics analysis identifies established and novel TGF β 1-regulated genes modulated by anti-fibrotic drugs. *Sci Rep.*12(1):3080.
- Xu, F., Tanabe, N., Vasilescu, D. M., McDonough, J. E., ... Hogg, J. C. (2021). The transition from normal lung anatomy to minimal and established fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *EBioMedicine*, 66, 103325.
- Narendra Thapa; Byung-Heon Lee; In-San Kim (2007). TGFBIp/ β ig-h3 protein: A versatile matrix molecule induced by TGF- β . , 39(12), 0–2194.
- Armando Corona;Gerard C. Blobe; (2021). The role of the extracellular matrix protein TGFBI in cancer . *Cellular Signalling*, volume 84, 110028
- Kim, J.-E. (2002). Identification of Motifs in the Fasciclin Domains of the Transforming Growth Factor-beta -induced Matrix Protein beta ig-h3 That Interact with the alpha vbeta 5 Integrin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46159–46165.
- Zhan Shaohua, Li Jinming, Ge Wei. (2019). Multifaceted Roles of Asporin in Cancer: Current Understanding. *Frontiers in Oncology*. 9, 2234-943X
- Huang S, Lai X, Yang L, Ye F, Huang C, Qiu Y, Lin S, Pu L, Wang Z, Huang W. (2022). Asporin Promotes TGF- β -induced Lung Myofibroblast Differentiation by Facilitating Rab11-Dependent Recycling of T β RI. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 66(2):158-170.

Jupp, O., Pullinger, M., Marjoram, T., Lott, M., Chojnowski, A.J., Clark, I.M. (2017). Biomarkers of Postsurgical Outcome in Dupuytren Disease. In: Werker, P., Dias, J., Eaton, C., Reichert, B., Wach, W. (eds) Dupuytren Disease and Related Diseases - The Cutting Edge. Springer, Cham.

Werker, Paul M. N.; Dias, Joseph; Eaton, Charles; Reichert, Bert; Wach, Wolfgang (2017). Dupuytren Disease and Related Diseases - The Cutting Edge || Biomarkers of Postsurgical Outcome in Dupuytren Disease. (7), 55–61.

Song, Jianyuan; Zhang, Huojun; Wang, Zhenyu; ... Zhang, Shuyu (2018). The Role of FABP5 in Radiation-Induced Human Skin Fibrosis. *Radiation Research*, 189(2), 177–186.

Sandra Kraljevic Pavelic; Mirela Sedic; Karlo Hock; ... Kresimir Pavelic (2009). An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren's disease. , 217(4), 524–533.

Lone Rønnev-Jessen; René Villadsen; John C. Edwards; Ole W. Petersen (2002). Differential Expression of a Chloride Intracellular Channel Gene, CLIC4, in Transforming Growth Factor- β 1-Mediated Conversion of Fibroblasts to Myofibroblasts. , 161(2), 0–480.

Shukla, A., Malik, M., Cataisson, C., Ho, Y., Friesen, T., Suh, K. S., & Yuspa, S. H. (2009). TGF-beta signalling is regulated by Schnurri-2-dependent nuclear translocation of CLIC4 and consequent stabilization of phospho-Smad2 and 3. *Nature cell biology*, 11(6), 777–784.

Yao Q, Qu X, Yang Q, Wei M, Kong B. (2009). CLIC4 mediates TGF-beta1-induced fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in ovarian cancer. *Oncol Rep*. 22(3):541-8.

Christopher W. Wasson, Rebecca L. Ross, Ruth Morton, Jamel Mankouri, Francesco Del Galdo (2021). The intracellular chloride channel 4 (CLIC4) activates systemic sclerosis fibroblasts, *Rheumatology*. 60(9), 4395–4400

Wasson CW, Caballero-Ruiz B, Gillespie J, Derrett-Smith E, Mankouri J, Denton CP, Canettieri G, Riobo-Del Galdo NA, Del Galdo F (2022). Induction of Pro-Fibrotic CLIC4 in Dermal Fibroblasts by TGF- β /Wnt3a Is Mediated by GLI2 Upregulation. *Cells*. 3;11(3):530.

Dahan, Jennifer; Levillayer, Florence; Xia, Tian; ... Wei, Yu (2017). The LIM-only protein FHL2 is a negative regulator of TGF- β 1 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 37(10).

Duan Y, Qiu Y, Huang X, Dai C, Yang J, He W (2020). Deletion of FHL2 in fibroblasts attenuates fibroblasts activation and kidney fibrosis via restraining TGF- β 1-induced Wnt/ β -catenin signaling. *J Mol Med (Berl)*.98(2):291-307.

Shi X, Young CD, Zhou H, Wang X-J. (2020). Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules*. 10(12):1666

Eyden B. (2008). The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1), 22–37.

Panigrahi S, Barry A, Multner S, Kasting GB, Figueroa JAL, Satish L, Kumari H (2022). Pirfenidone as a potential antifibrotic injectable for Dupuytren's disease. *Pharm Dev Technol*. 20:1-9.

Viil J, Maasalu K, Mäemets-Allas K, Tamming L, Lõhmussaar K, Tooming M, Ingerpuu S, Märtson A, Jaks V. (2015). Laminin-rich blood vessels display activated growth factor signaling and act as the proliferation centers in Dupuytren's contracture. *Arthritis Res Ther*.17(1):144.

Perrucci GL, Barbagallo VA, Corlianò M, Tosi D, Santoro R, Nigro P, Poggio P, Bulfamante G, Lombardi F, Pompilio G (2018). Integrin $\alpha\beta$ 5 in vitro inhibition limits

pro-fibrotic response in cardiac fibroblasts of spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med.* 16(1):352.

Porte, J., Jenkins, G., & Tatler, A. L. (2021). Myofibroblast TGF- β Activation Measurement In Vitro. *Myofibroblasts* (pp. 99-108).

Robin J. McNulty (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. 39(4), 0–671.

Li M, Luan F, Zhao Y, Hao H, Zhou Y, Han W, Fu X. (2016). Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. *Exp Biol Med* (Maywood). 241(1):1-13.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P. et al. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13, 731–740.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

www.uniprot.org

www.perseus-framework.org

<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>

<https://mymemory.translated.net/>

LISAD

LISA 1. Proteoomika analüüsi tulemused.

Geeni nimetus	Erinevus	P-value
COL6A3	2,34293778737386	0,00665930337308795
COL6A1	1,8569507598877	0,00106268832183446
COL6A2	1,73131783803304	0,00185208788113612
VIM	0,876034418741862	0,0264647177867145
MYH9	0,662321726481119	0,0184882486972118
LMNA	0,631242434183756	0,0366702992365914
FBN1	3,62773545583089	0,00248813682123082
APCS	2,58576265970866	0,036102442681232
TGFBI	5,92616176605225	0,00108145170331074
IGHG1	1,10740121205648	0,0104433098475047
ASPN	1,59699122111003	0,0168456495636165
FLNC	2,30706342061361	0,0366546211473038
FHL1	1,48517386118571	0,029365593020471
EHD2	1,01759401957194	0,0393423928080675
TLN1	0,722452163696289	0,0310602466412102
CAV1	1,72364807128906	0,0275203396321834
MYOF	0,731311480204266	0,0266842076169241
CAP1	0,659667015075684	0,0457820185393568
MSN	0,271270434061686	0,0139558841595528
IGKC	1,01992607116699	0,0147107794697449
C3	2,20301882425944	0,0422926794000884
HP	1,81367142995198	0,041684862357384

VWF	3,8970308303833	0,00123202449531222
FABP5	0,661583264668781	0,036761353110024
PDLIM7	2,12848472595215	0,00436366332552859
A2M	2,26113287607829	0,0181384465954374
MFAP4	2,51671409606934	0,00358867397420451
VTN	3,06910292307536	0,00615989987028821
SEPTIN2	0,533326466878256	0,0225353014566261
LPP	1,22787666320801	0,00287156135290945
SERPINH1	0,857202847798666	0,0191912996575076
PDGFRB	2,86499245961507	0,000896698116151883
TUBB	0,593619028727213	0,015883210488839
TNS1	2,11429309844971	0,00938540864692402
LIMS1	2,1764554977417	0,0481238684927587
SUSD2	3,15366744995117	0,0453075138079221
COL12A1	4,3020232518514	0,00495535392301476
HPX	1,80595874786377	0,0188812420619988
DDAH2	0,803540229797363	0,0494398810576571
MVP	1,29721323649088	0,00511141419381177
MFGE8	3,88891379038493	0,00213016451095557
SUN1	0,381850242614746	0,0308784958345956
IGHM	1,79619789123535	0,0232828190051605
APOB	2,19554646809896	0,0194805487964043
CLIC4	1,01879056294759	0,043935363940752
MYO1D	1,55502351125081	0,034194764270557
FN1	3,94102636973063	0,0237126169101652

WARS1	0,669907887776693	0,0110563774613435
LRP1	2,84746233622233	0,012523831543907
CCT5	0,269437154134115	0,0262117045632163
CPNE3	-0,246760050455729	0,0325667116506122
DCXR	-0,753934542338053	0,0431957717877087
APOD	0,713142395019531	0,0419855854455425
FBLN2	3,02818202972412	0,0276017850284045
STEAP4	3,21788247426351	0,00157845082641734
PRDX4	0,72109572092692	0,00609200175148762
AMBP	3,01571750640869	0,013314455836364
LAMC1	3,12049261728922	0,0138901974175009
PHGDH	-1,62374019622803	0,0359113700706331
PDIA5	1,70642693837484	0,0285402820151119
SEPTIN8	1,76192760467529	0,0209444707149268
ENTPD1	1,68956184387207	0,0135525809806141
TECR	-0,773334821065266	0,0372650778644414
RPLP0	-0,676628430684406	0,00712601972342435
CAV2	1,8069527943929	0,0241649876195688
TTR	2,98440233866374	0,0317389715393069
KANK2	3,11517524719238	0,00286767620325963
COL4A1	1,34877236684163	0,00516508286318761
CDH13	1,70556863149007	0,00802625516561784
ABI3BP	1,64026228586833	0,037566091502939
EZR	-2,07996686299642	0,0489001200877778
HSPG2	4,10600090026855	0,0164932362499426

APOH	3,72520001729329	0,017674111633124
CAMK2D	1,26109441121419	0,00679146987125827
TUBB6	1,10459931691488	0,0292271001120193
SORBS3	2,29376475016276	0,00992494225795291
MRGPRF	2,79595470428467	0,0173580196199713
FHL2	0,71528402964274	0,0289264195510325
TWF2	0,594428062438965	0,0333128907048876
PSMC2	-0,928857803344727	0,00234736402114248
CD55	2,58685429890951	0,0183351343610531
CLU	1,44253476460775	0,0219777725502369
USP14	-0,741047541300455	0,000570194790823925
MRC1	3,55855814615885	0,00802259388476272
PDLIM3	1,49309253692627	0,000304511754576334
ITGA5	2,67226409912109	0,015098138341156
ATP6V1H	-2,01519807179769	0,030908217119783
TSTA3	-2,14516099294027	0,00342378690616298
MGLL	2,80338319142659	0,0431529358416353
DKC1	-0,896226565043131	0,0494012322215421
TTLL12	-1,88178412119547	0,0256918144116541
ITGB5	3,32005627950033	0,00219128780356738
NPEPL1	2,16858323415121	0,013732505945005
TNXB	3,04846000671387	0,0136971372033785
FKBP9	2,23005739847819	0,0198850627602635
VAPB	-2,45989767710368	0,0453713587475237
C1QTNF3-AMACR	2,6361042658488	0,0109390644898042

FN3KRP	-1,41302808125814	0,0161090483361136
CD81	1,93373489379883	0,0308753970068603
ATP6V1B2	-1,02399158477783	0,0232374779018846
SEPTIN6	1,31773630777995	0,0338541588937975
NEXN	1,85158316294352	0,0221601848666114
ABLIM1	1,42290337880453	0,0241941230327623
MT-CO3	-1,60961532592773	0,0239587122584503
COL4A2	2,2845573425293	0,0246750654366856
CYB5A	-0,738905906677246	0,017187581809406
GUK1	-0,943809191385904	0,00639159246135698
UBA2	0,586854298909506	0,0345379161299979
RHOC	0,812878290812174	0,0394598965962768
TOLLIP	-1,42520395914713	0,0274930925777153
HSPA12B	2,55855782826742	0,00383866853841278
LOX	1,95122400919596	0,0331875498318263
PMVK	-2,13825257619222	0,00815193489192641
MCAM	2,87241872151693	0,0174252862284221
CAPN5	2,35792191823323	0,0175664343598686
STRN3	1,30829238891602	0,0481289878980317
NFIX	-2,28584734598796	0,0253817282675212
CASP1	-1,96905040740967	0,019203636222663
CCAR2	-1,6887248357137	0,0415875507954693
ATP2B1	1,65978940327962	0,0405262849104928
ABI1	-1,7640012105306	0,0430775315730117
AGA	-1,49666118621826	0,0444896561399674

GMPPB	-2,03649743398031	0,00310723949734643
RANBP3	1,34877300262451	0,00635524547080979
PFDN2	-2,52412605285645	0,0191622322443157
LRRC57	-2,45675722757975	0,0126077461694719
HSPA4L	-1,47970294952393	0,0312775501034907
DIP2B	-1,61849943796794	0,00136087262346849
TOM1	-1,7734390894572	0,0422727643740297
DYNC1LI2	-2,2176612218221	0,0289949151569797
RPL34	-2,5595064163208	0,0482714622057991
TRIOBP	1,54375966389974	0,0234343366233347
CORO1A	-1,3609889348348	0,0341523649443151
SEC24D	1,08046054840088	0,0141855975659095
ADPRS	-1,50741163889567	0,0426938628777062
PPFIBP1	1,49802112579346	0,0203672871152653
TSTD1	-2,85616556803386	0,0139355482582928
PRPF6	1,49005317687988	0,0315113213107167
P3H1	1,63963540395101	0,0284876111182735
EPS15L1	1,13083839416504	0,00213942610602773

LIHTLITSENTS

Mina, Dmitri Šišmintsev (19.07.1998)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Dupuytren kontraktuuri higinäärmete valgukspressiooni profiili iseloomustamine,

Mille juhendajad on Viljar Jaks ja Kristina Mäemets-Allas

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Dmitri Šišmintsev

14.05.2022