

Rozprawa doktorska:

## CZYNNIKI REGULUJĄCE TRANSFORMACJĘ FIBROBLASTÓW OSKRZELOWYCH W MIOFIBROBLASTY U CHORYCH NA ASTMĘ

**Wprowadzenie:** Astma oskrzelowa jest coraz powszechniej występującą przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych. Stanowi zapalnemu toczącemu się w oskrzelach towarzyszą wieloetapowe procesy przebudowy ich ściany. W procesie remodelingu biorą udział komórki strukturalne oskrzeli, komórki układu odpornościowego, a także liczne substancje wydzielane przez te komórki. Za zwiększenie się grubości ściany drzewa oskrzelowego, które stwierdza się u osób chorych na astmę oskrzelową odpowiedzialne jest obok przerostu mięśniówki gładkiej zwłóknienie podnabłonkowe, w którym szczególną rolę odgrywają fibroblasty i miofibroblasty oraz białka macierzy pozakomórkowej. Jednym z najważniejszych czynników wywołujących różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty (FMT) zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*, jest transformujący czynnik wzrostowy typu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Badania wskazują, że może on również współdziałać z innymi czynnikami wzrostu, w tym z czynnikiem wzrostowym tkanki łącznej (CTGF), w indukowaniu procesu FMT. TGF- $\beta$  może aktywować różne wewnątrzkomórkowe szlaki przekazu sygnału, prowadzące między innymi do zwiększonej ekspresji genów profibrotycznych. Z drugiej strony wiadomo także, że na proces FMT może wpływać aktywacja ścieżek sygnałowych niezależnych od TGF- $\beta$ . W ostatnich latach w badaniach prowadzonych przez dr hab. Martę Michalik stwierdzono wyższy, indukowany przez TGF- $\beta_1$  potencjał FMT ludzkich fibroblastów oskrzelowych (HBFs) wyizolowanych od chorych na astmę (AS), w porównaniu do komórek pochodzących od osób, u których wykluczono tę chorobę (NA). Pozwoliło to na sformułowanie hipotezy o istnieniu różnic między komórkami wyizolowanymi od osób z grup AS i NA, które predysponują fibroblasty astmatyków do różnicowania w miofibroblasty. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy stanowią próbę wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw zaobserwowanych różnic.

**Cele:** Celem pracy było zbadanie wpływu czynników mogących regulować stymulowane TGF- $\beta_1$  różnicowanie fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty i porównanie efektów ich oddziaływania na ten proces w kontekście astmy oskrzelowej. Cele szczegółowe obejmowały zbadanie skutków aktywacji szlaku WNT na stymulowany przez TGF- $\beta_1$  proces FMT, określenie wpływu tego czynnika na zdolność fibroblastów oskrzelowych do produkcji CTGF, a także prześledzenie udziału CTGF w wywołanym przez TGF- $\beta_1$  procesie FMT.

**Metody:** Doświadczenia zostały wykonane w modelu *in vitro*, który stanowiły hodowle fibroblastów oskrzelowych wyizolowane z wycinków bronchoskopowych od pacjentów z astmą oskrzelową, oraz od osób, u których w badaniach diagnostycznych wykluczono tę chorobę. Do oceny potencjału FMT wykorzystano współczesne metody biologii komórki i biologii molekularnej: mikroskopię kontrastowo-fazową i fluorescencyjną, Real-Time PCR, techniki: immunocytofluorescencyjne, immunoblotu oraz immunoadsorpcyjne, a także wyciszenie ekspresji genów przy użyciu siRNA.

**Wyniki:** Przeprowadzone za pomocą różnych metod badania potencjału FMT fibroblastów oskrzelowych wykazały, że w komórkach pochodzących od astmatyków aktywacja szlaku WNT, powoduje spadek indukowanej TGF- $\beta_1$  ich zdolności do różnicowania w miofibroblasty. Odwrotny efekt zaobserwowano w populacjach HBFs pochodzących od osób, u których wykluczono astmę oskrzelową, gdzie aktywacja szlaku WNT powodowała wzrost stymulowanego przez TGF- $\beta_1$  potencjału FMT. W trakcie realizacji doświadczeń po raz pierwszy wykazano także, że pod wpływem TGF- $\beta_1$ , fibroblasty oskrzelowe pochodzące od astmatyków są

zdolne do ekspresji, syntezy i wydzielania CTGF. Efekt ten, choć znacznie słabszy, obserwowano także w populacjach, HBFs, pochodzących z grupy osób, u których wykluczono astmę oskrzelową. Co więcej wykazano również addytywność działania TGF- $\beta_1$  i CTGF w kierunku indukcji procesu FMT, w komórkach pochodzących z obydwu badanych grup, jednak w fibroblastach pobranych od astmatyków efekt ich wspólnego działania był silniejszy. Po raz pierwszy dowiedziono także niezwykle istotnej roli CTGF w przebiegu różnicowania fibroblastów oskrzelowych astmatyków w miofibroblasty. Wyniki te uzyskano w serii eksperymentów, w trakcie których wyciszono ekspresję tego czynnika wzrostu w fibroblastach pochodzących od astmatyków, co w rezultacie doprowadziło do istotnego statystycznie obniżenia ich indukowanego przez TGF- $\beta_1$  potencjału FMT.

**Wnioski:** W ramach przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że w stymulowanym przez TGF- $\beta_1$  różnicowaniu w miofibroblasty HBFs pochodzących z obydwu badanych grup znaczącą rolę odgrywa aktywacja szlaku WNT. W fibroblastach astmatyków wzbudzenie tego szlaku powoduje zahamowanie stymulowanego przez TGF- $\beta_1$  różnicowania w miofibroblasty, podczas gdy w komórkach pobranych z grupy NA obserwuje się odwrotny efekt i wzmocnienie stymulowanego przez TGF- $\beta_1$  potencjału FMT. W procesie fenotypowego przejścia fibroblastów w miofibroblasty uczestniczy również CTGF. Odmienna reaktywność HBFs pochodzących z obydwu badanych grup wyrażająca się różnym potencjałem FMT potwierdza hipotezę o istnieniu różnic epigenetycznych między fibroblastami pochodzącymi od osób chorych na astmę, a tymi pobranymi od osób, u których wykluczono tę chorobę. Uzyskane w trakcie realizacji pracy wyniki przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie miofibroblastów w odpowiedzi na czynniki o udowodnionym działaniu profibrotycznym, co w przyszłości może wpłynąć na poszukiwania nowych celów terapeutycznych w przeciwdziałaniu procesom remodelingu drzewa oskrzelowego w astmie.

**Słowa kluczowe:** astma oskrzelowa, miofibroblasty, transformacja fibroblastów w miofibroblasty (FMT), transformujący czynnik wzrostowy typu beta (TGF- $\beta$ ), czynnik wzrostowy tkanki łącznej (CTGF)