

## STRESZCZENIE

Astma oskrzelowa jest chorobą przewlekłą, która dotyczy ok. 358 mln ludzi na całym świecie. W Polsce na astmę choruje prawie 6% społeczeństwa, a liczba hospitalizacji polskich astmatyków jest przedstawiana jako jedna z najwyższych w Europie. Uważa się powszechnie, że u podłożu astmy leży chroniczny stan zapalny oskrzeli, który prowadzi do przebudowy ściany oskrzeli tzw. remodelingu, powodując wiele strukturalnych zmian patologicznych w oskrzelach. Zmiany te powodują obturację oskrzeli zwiększającą się w czasie przebiegu choroby. Ściany oskrzeli kurcząc się, utrudniają oddychanie, a ich rozrost, spowodowany m.in. nadmiernym odkładaniem składników macierzy pozakomórkowej (ECM) w warstwie podnabłonkowej, powoduje trwałe upośledzenie ich funkcji. Za zwłóknienie podnabłonkowe współodpowiedzialne są miofibroblasty, powstające m.in. w wyniku fenotypowego przejścia (FMT) z fibroblastów oskrzelowych (HBF). Proces FMT zachodzi w wyniku ekspozycji komórek na cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu, i jest szczególnie nasilony u astmatyków. Jednym z najważniejszych stymulatorów FMT jest transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Zarówno podłoż molekularne, jak i przebieg oraz dynamika FMT w patogenezie astmy są nadal słabo poznane. Obecnie leczenie astmy łagodzi jedynie jej objawy, wywierając znikomy wpływ na zmiany strukturalne ściany oskrzeli. Istnieje zatem potrzeba poznania mechanizmów molekularnych zwiększonego FMT u astmatyków oraz poszukiwania nowych związków, które mogą zostać wykorzystane nie tylko jako przeciwzapalne i zapobiegające skurczom oskrzeli, ale również jako hamujące ich przebudowę i niekorzystne zmiany strukturalne. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy są próbą odpowiedzi na te wyzwania.

Celem niniejszej rozprawy była weryfikacja hipotezy zakładającej, że indukowana TGF- $\beta$  aktywacja szlaków przekazu sygnału poprzez ścieżkę(i) molekularną(e) białek Smad jest odmienna w HBF od astmatyków (AS) i osób, u których chorobę wykluczono (NA) i sprzyja nasilonemu FMT u astmatyków. Cele szczegółowe obejmowały: porównanie aktywności szlaków białek Smad w HBF AS i NA, próbę wyjaśnienia przyczyn, które powodują zwiększone FMT u pacjentów AS i zaangażowanie szlaku białek Smad w ten proces w modelu hodowli komórek *in vitro* w warunkach „2D” i „3D”, poszukiwanie związków chemicznych o obiecującym potencjale farmakologicznym poprzez ich działanie na molekularne ścieżki Smad-zależne oraz Smad-niezależne, a także próby wyjaśnienia powiązań funkcjonalnych

nabłonka oskrzelowego z fibroblastami i analizy ich wpływu na FMT w modelu kohodowli komórek, naśladującym epithelialno-mezechymalną jednostkę troficzną oskrzeli (EMTU).

Doświadczenia wykonano w oparciu o hodowle komórkowe *in vitro* (fibroblasty, komórki nabłonka oskrzelowego) izolowane z mikrowycinków bronchoskopowych pobranych od pacjentów AS i NA. Wykorzystano standardowe hodowle *in vitro*, hodowle w warunkach „3D” w żelach kolagenowych, hodowle zróżnicowanego nabłonka na granicy powietrze-płyn (ALI) oraz kohodowle nabłonka z fibroblastami w modelu naśladującym EMTU. Do oceny potencjału FMT oraz aktywności badanych szlaku(ów) wykorzystano metody biologii komórki i biologii molekularnej: mikroskopię kontrastowo-fazową i fluorescencyjną, testy cytotoksyczności oraz proliferacji, analizy immuno-fluorescencyjne, immunoblotting, PCR w czasie rzeczywistym, modulację ekspresji genów (wyciszenie i nadekspresję) oraz techniki immunoadsorpcyjne (in-cell ELISA).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, po raz pierwszy na świecie, że zwiększone FMT fibroblastów od astmatyków po stymulacji TGF- $\beta_1$  jest spowodowane zaburzonym balansem pomiędzy aktywnością szlaku prozwłoknieniowego TGF- $\beta$ /Smad2/3 oraz przeciwwałknieniowego Smad1/5(8)9. Szlak prozwłoknieniowy jest nasilony w HBF AS, natomiast szlak przeciwwałknieniowy w HBF NA. Modulacja poziomu ekspresji Smad1 oraz Cx43 powoduje zmiany balansu aktywności poszczególnych szlaków i potęgowanie lub hamowanie efektów FMT. Dowiedziono także, że modulacja aktywności prozwłoknieniowego szlaku TGF- $\beta$ /Smad2/3 w HBF AS związkami takimi jak: teofilina, pentoksylina, lizofilina i fenofibrat, może stanowić potencjalny cel terapeutyczny obniżający proces FMT. Podobnie, stymulacja przeciwwałknieniowego szlaku TGF- $\beta$ /Smad1/5/(8)9 w HBF AS związkami takimi jak BMP-7 oraz izolikwirytygenina może powodować obniżenie FMT. Udowodniono również, że związki z rodziną chalkonów (m.in. izolikwirytygenina oraz flawokawaina A) mogą wykazywać obiecujące właściwości w hamowaniu FMT stymulowanego TGF- $\beta_1$ . Hamowanie to może odbywać się również na drodze Smad-niezależnej poprzez ingerencję farmakologiczną (inhibitormi: Y-27632 oraz SMIFH-2) w architekturę cytoszkieletu aktynowego komórek poprzez szlak RhoA oraz formin. Ponadto potwierdzono, że spotęgowana wrażliwość HBF AS na egzogenny TGF- $\beta_1$  utrzymuje się w hodowlach *in vitro* w modelu „3D” oraz w kohodowli z nabłonkiem (EMTU), co stawia te modele eksperymentalne jako bardzo przydatne do analiz zmian molekularnych leżących u podłożu astmy w warunkach bardziej zbliżonych do warunków *in vivo*.

W ramach doświadczeń przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazano, że przyczyna zwiększonego FMT u astmatyków leży w zaburzonym balansie pomiędzy aktywnością prozwłoknieniowego i przecizwzwłoknieniowego szlaku TGF- $\beta$ /Smad w HBF. Uzyskane w pracy wyniki uzupełniają lukę w dotychczasowej wiedzy na poziomie zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw zwłóknienia podnabłonkowego podczas przebudowy oskrzeli w astmie, a wyniki badań nad związkami hamującymi FMT mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad poszukiwaniem i opracowaniem nowych, skutecznych leków lub suplementów, zastosowanych w przyszłości w terapiach astmy nakierowanych na hamowanie przebudowy ściany oskrzeli.

Wnuk Dawid

dr. Mikołaj

Wnuk

## ABSTRACT

Bronchial asthma is a chronic disease that affects approximately 358 million people worldwide. In Poland, asthma affects almost 6% of the population and the number of hospitalisations of Polish asthmatics is reported as one of the highest in Europe. It is generally believed that the underlying cause of asthma is a chronic inflammation of the bronchi, which leads to remodelling of the bronchial wall, causing many pathological changes in the structure of bronchi. These changes cause bronchial obstruction which increases during the course of the disease. Bronchial walls shrink, making breathing difficult, and their growth, caused, among others, by excessive deposition of extracellular matrix (ECM) components in the subepithelial layer, causes permanent impairment of their function. Myofibroblasts, formed by phenotypic transition (FMT) of bronchial fibroblasts (HBF), are co-responsible for subepithelial fibrosis. The FMT process occurs as a result of prolonged exposure to proinflammatory cytokines and growth factors and is particularly enhanced in asthmatics. One of the most important stimulators of FMT is transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). However, the molecular basis, course and dynamics of FMT in the pathogenesis of asthma are still poorly understood. Current treatment of asthma only alleviates its symptoms, with little effect on structural changes in the bronchial wall. Therefore, there is a need to understand the molecular mechanisms of the increased FMT in asthmatics and to look for new compounds that may be used not only as anti-inflammatory agents that prevent bronchospasm, but also as inhibitors of subepithelial fibrosis and adverse structural changes. The research conducted in this thesis attempts to address these challenges.

Therefore, the aim of this thesis was to verify the hypothesis that the TGF- $\beta_1$ -induced activation of signal transduction pathways through the molecular pathway(s) of Smad proteins differs in HBF from asthmatics (AS) and non-asthmatics (NA), and that it favours the increased FMT in asthmatics. Specific objectives included: i) comparison of the activity of the Smad protein pathway(s) in HBF AS and NA, ii) evaluation of mechanisms of the increased FMT in AS patients, including the role of the Smad protein pathway in this process in 2D and 3D culture *in vitro*; iii) search for compounds with promising pharmacological influence on Smad-dependent and Smad-independent molecular pathways; iv) elucidation of the functional cooperation between bronchial epithelium and fibroblasts, as well as analysis of its effect on

FMT in a co-culture model that mimics the epithelial-mesenchymal trophic unit (EMTU). Experiments were performed using *in vitro* cell cultures (fibroblasts, bronchial epithelial cells) isolated from bronchoscopy explants derived from AS patients and NA patients.

Standard *in vitro* cultures, cultures under "3D" conditions in collagen gels, differentiated bronchial epithelial cultures at the air-liquid interface (ALI), and epithelial co-cultures with fibroblasts in a model mimicking the EMTU were used. Several cell biology and molecular biology methods were used to assess the FMT potential and activity of the studied pathway(s), including phase-contrast and fluorescence microscopy, cytotoxicity and proliferation assays, immuno-fluorescent staining, immunoblotting, real-time PCR, modulation of gene expression (silencing and overexpression) and immune-adsorbent techniques (in-cell ELISA).

Obtained results have shown for the first time that the increased FMT of fibroblasts from AS after TGF- $\beta_1$  stimulation is a consequence of an imbalance between the activity of pro-fibrotic TGF- $\beta$ /Smad2/3 pathway and the anti-fibrotic Smad1/5(8)9 pathway. The pro-fibrotic pathway is increased in AS-derived HBF (which was also confirmed in the "3D" model), whereas the anti-fibrotic pathway is increased in NA-derived HBF. Additionally, the modulation of Smad1 and Cx43 expression alters the balance of response of the different pathways, elevating or inhibiting the FMT effects. It has also been shown that several tested compounds such as theophylline, pentoxifylline, lysophylline and fenofibrate, may attenuate pro-fibrotic TGF- $\beta$ /Smad2/3 pathway activity in HBF AS. Therefore, these compounds may be potentially used as therapeutic agents reducing the asthma-related FMT. Similarly, stimulation of the anti-fibrotic TGF- $\beta$ /Smad1/5/(8)9 pathway in AS-derived HBF with other compounds such as BMP7 and isoliquiritigenin may reduce FMT. It has been also shown that molecules from the chalcone family (e.g. isoliquiritigenin and flavokavain A) may be promising factors inhibiting the TGF- $\beta_1$ -stimulated FMT. Moreover, this inhibition may also take place in the Smad-independent pathway through pharmacological interference (with inhibitors: Y-27632 and SMIFH-2) with the architecture of the cellular actin cytoskeleton via the RhoA pathway and formins. The enhanced sensitivity of AS-derived HBF to exogenous TGF- $\beta_1$  persists in *in vitro* cultures in a '3D' model and in an epithelial co-culture (EMTU), which indicates that these experimental models, as more relevant to the *in vivo* conditions comparing to standard 2D culture, may be useful for molecular analyses of underlying asthma lesions.

Wnuk  
Dawid

To conclude, the obtained results presented in this study demonstrate that the mechanism of the increased FMT in asthmatics is related to the disturbed balance between the activity of the pro-fibrotic and anti-fibrotic Smad pathway in HBF. Therefore, these data extend current knowledge about understanding the molecular mechanisms underlying subepithelial fibrosis during bronchial remodelling in asthma. Additionally, the obtained results on the activity of several compounds as potential FMT inhibitors may provide a basis for further studies on the development of new, effective drugs or supplements for future use in the therapy of asthma, that would target bronchial wall remodelling.

Wnuk Dawid

Ph. Michael