

## Programul VIASAN

### Raport Final de Activitate Contract VIASAN nr.196/2003

**Denumirea proiectului :** Model celular de studiu a patogenezei fibrozei pulmonare

**Perioada acoperita:**01.01.2004-15.09.2005

**Data prezentarii:**15.09.2005

#### Bugetul proiectului

##### Finanțare de la bugetul de stat

An	Conform contractului de finantare	Modificari prevazute prin act aditional
2004	350.000.000	381.500.000
2005	850.000.000	926.500.000
Total	1.200.000.000	1.308.000.000

#### Obiective

Ob.1. Studiul comparativ al fibroblastelor pulmonare umane [**FPU**] izolate din regiuni cu focare fibrotice și din țesut pulmonar normal

Ob.2. Elaborarea unui model celular ce reproduce modificările morfologice și biochimice ale **FPU** în fibroza pulmonară [**FP**]

Ob.3. Verificarea modelului celular prin studii comparative de biochimie, biologie celulară și moleculară pe fibroblaste pulmonare normale (**nFPU**), separate din focare fibrotice (**fFPU**) și din modelul celular cu **FP** indusă experimental (**mcFPU**)

Ob.4. Studiul acțiunii unor compuși cu activitate anti-fibrotică asupra modelului celular (**mcFPU**)

În majoritatea organelor, lezarea țesuturilor este urmată de procese ciclice inflamatorii și reparatorii. Dacă leziunea este minimă, procesul de reparare va conduce la restaurarea structurii și funcției normale a țesutului. Când lezarea se realizează repetitiv sau este extinsă, procesul de reparare nu reușește total rezultând o un țesut cicatrizat sau fibrozat.

Patologiile fibrogenice sunt o trăsătură caracteristică a unui spectru larg de boli care afectează diverse organe. Astfel fibroza tisulară (pulmonară, renală, hepatică, cardiacă) este o condiție patologică gravă, progresivă, cu o etiologie necunoscută, datorată unor stări inflamatorii sau expunerii repetate la noxe din mediu. Țesutul fibrotic se dezvoltă datorită creșterii vitezei de proliferare a fibroblastelor și producției excesive a componentelor matricei extracelulare (**MEC**), care conduc la apariția unor leziuni și a unor procese inflamatorii. Acestea includ cicatricile miocardice ce rămân după infarctul miocardic, cicatricile renale cronice la pacienții cu glomerulonefrită, fibroză și ciroza hepatică, maladii fibrotice cutanate ca keliodul și scleroderma, maladii pulmonare fibrotice, etc.

FP este consecința unui proces de reparare inițiat de vătămarea țesutului sub acțiunea unui număr de factori – congenitali, chirurgicali, iradiere, chemoterapie, accidente datorită unor factori de mediu, inhalarea profesională a unor particule din praf, infecții sau procese inflamatorii acute și cronice – a cărui gravitate depinde de severitatea și/sau de frecvența lezării țesutului. FP poate afecta succesul transplantării măduvei osoase și a diferitelor țesuturi/organe. Astfel, se exemplă, se dezvoltă FP în boala respingerii grefei după transplantarea măduvei osoase.

După cum deja s-a menționat FP este o condiție caracterizată prin formarea unui țesut cicatricial fibros la nivelul plămânilor, precedată și asociată cu stări inflamatorii, care conduc la perturbări în transferul gazelor și în ventilația pulmonară. FP poate fi: de substituție – când are loc ca urmare a infarctului, pneumoniei, tuberculozei, etc.; focală – ca răspuns la inhalarea unor compuși iritanți ca dioxidul de siliciu, pulberea de cărbune, etc. și interstițială, în alveolita fibrozantă criptogenică, alveolita alergică extrinsecă, etc. FP interstițială este o maladie cronică în care pereții alveolelor sunt inflamați, începe cicatrizarea interstițiului (țesutul dintre alveole) și în final plămânul devine rigid. Fibroză pulmonară idiopatică (FPI) de origine necunoscută este un tip de FP interstițială cu o evoluție progresivă și frecvent letală caracterizată prin diferite grade de inflamație și fibroză a parenchimului pulmonar [Katzenstein și Myers, 1998]. În fazele incipiente ale maladiei se observă acumularea progresivă a proteinelor țesutului conjunctiv [Crouch, 1990] și dezorganizarea membranei bazale [Raghu și colab., 1985].

## 1. Ipotezele de lucru

### 1.1. Unul dintre tipurile celulare majore implicate în FP sunt fibroblastele

Deși există ipoteze contradictorii privind celulele «critice» sau «țintă» responsabile de apariția FP, noi considerăm că FPU sunt implicate major în patogeniza acestei condiții care implică recrutarea HLF, proliferarea și stimularea lor, care sintetizează cantități mari de colagen, ce conduc distorsionarea arhitecturii țesutului normal, deprecierea funcțiilor plămânilor, apariția unor leziuni și uneori procese inflamatorii.

În ultimul timp, fibroblastele erau considerate celule inerte fiziologic, asociate funcției stromale, ce furnizează un suport mecanic care umple leziuni tisulare contribuind la repararea acestora. Studii relativ recente, realizate în numeroase laboratoare, au relevat că în țesuturi normale fibroblastele interacționează cu MEC, într-o manieră dependentă de un număr de factori sistemici. Astfel, factori implicați în fibrogeneză ca ischemia, serotonina, endotelina, trombina, leptina, etc. afectează proliferarea fibroblastelor, producția de colagen și metaloproteinaze MMP (*matrix metalloproteinases*), expresia diferiților receptori, secreția citokinelor, etc [Atamas, 2002]. Interacțiunile cu MEC, în particular într-un spațiu tri-dimensional, sunt cruciale pentru funcțiile fibroblastelor în condiții normale și patologice [Cukierman și colab., 2001]. În timpul proceselor inflamatorii, fibroblastele stabilesc interacții complexe cu o varietate de celule (neutrofile, macrofage, celule T, eosinofile și mastocite), atât prin contacte directe celulă-celulă CD154-CD40 cât și prin rețeaua complexă a citokinelor.

Fibroblastele din plămânii cu FPI produc angiotensine, peptide capabile să inducă moartea celulelor epiteliale *in vitro*, proces care are loc probabil și *in vivo* [Uhal și colab., 1995; 1998]. O caracteristică a FPI este prezența unor focare fibroblastice, dispersate în parenchimul plămânului, care reprezintă zone microscopice cu leziuni acute ale țesutului unde FPU migrează, proliferază și contribuie la acumularea moleculelor MEC în alveola lezată. Ulterior, are loc remodelarea anormală a arhitecturii plămânului datorită depunerii interstițiale și intraluminale a țesutului conjunctiv [Kuhn și McDonald, 1991]. Totuși studiile privind caracteristicile proliferative și sinteza colagenului în fibroblastele izolate din plămâni normali și cu FPI sunt contradictorii. Astfel, Jordana și colab. [1988] au arătat că FPU derivate din țesuturi fibrotice proliferază semnificativ mai rapid decât cele din plămânii normali. Raghu și colab. [1988] au evidențiat că celulele cu cea mai rapidă proliferare se găsesc în zonele în care fibroza este incipientă, în timp ce FPU separate din zone fibrotice dense au cea mai lentă proliferare. Aceste rezultate pot corespunde unei situații reale sau pot fi datorate faptului că populația FPU nu este omogenă, conținând celule cu un fenotip divers, care diferă prin expresia receptorilor și a markerilor de suprafață, aranjamentul citoscheletului și profilul citokinelor [Akamine și colab., 1992].

Componentul celular major din aceste focare fibroblastice sunt miofibroblastele - o subpopulație unică de fibroblaste definite morfologic și imunologic, ca un tip celular intermediar între celula musculaturii netede și fibroblast, identificabilă prin expresia particulară a unor proteine a citoscheletului, precum  $\alpha$ -actina musculaturii netede ( *$\alpha$ -smooth muscle actin*). Numărul miofibroblastelor crește în plămâni cu FPI, contribuind la o reepitelizare alveolară anormală și la depozitarea excesivă și dezorganizată a MEC în parenchimul pulmonar [Kuhn și McDonald, 1991]. În plus aceste celule dobândesc un fenotip agresiv, fiind principalul subset de celule responsabile pentru acumularea colagenului [Zhang și colab., 1994]. Aceste celule mezenchimale reprezintă focare de organizare a leziunilor pulmonare acute și ale procesului fibrogenic activ în derulare și sunt celule fusiforme, aranjate de obicei cu axa longitudinală paralel cu axa longitudinală a septurilor alveolare. Apariția acestor focare este urmată de o remodelare anormală a MEC și de distrugerea ulterioară a arhitecturii pulmonare, motiv pentru care ele sunt considerate piesa cheie capabilă să transforme o maladie potențial reversibilă într-una progresivă și ireversibilă. În prezent, numărul de focare fibroblaste/miofibroblaste este considerat un factor de prognostic major la pacienți FPI [King și colab., 2001]. Totuși, mecanismele *in vivo* care conduc la activarea fibroblastelor și la formarea de focare de miofibroblaste în parenchimul pulmonar lezat nu sunt încă elucidate. Prin paralelism cu vindecarea leziunilor tegumentare se presupune că fibroblastele întâi dobândesc un fenotip migrator, apoi un fenotip proliferativ și în final un fenotip profibrotic miofibroblastic.

Hiperplazia miofibroblastelor este un eveniment inițial în procesul fibrotic și precede în general depunerea MEC [McAnulty și Laurent, 1995]. Factorii care inițiază și perpetuează creșterea miofibroblastelor nu au fost total clarificați. Totuși, în etapele primare ale fibrogenezei pulmonare, s-au evidențiat în fluidul de lavaj bronhoalveolar niveluri crescute ale unor citokine care promovează creșterea, ca: PDGF (*platelet-derived growth factor*), interleukina IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ) și IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) [Kelley, 1990].

O problemă critică este legată de persistența miofibroblastelor în focarele fibroblastice. În mod normal, vindecarea normală a leziunii include o scădere progresivă a miofibroblastelor prin apoptoză. În FPI acest proces nu are loc deși fibroblastele derivate din plămân cu FPI prezintă o rată crescută a apoptozei spontane *in vitro* [Ramos și colab., 2001]. Motivul pentru acest paradox este necunoscut, dar se presupune că rețeaua citokine/factori de creștere/MEC în micromediul pulmonar FPI facilitează supraviețuirea miofibroblastelor *in vivo*. În acest context, expresia notabilă a inhibitorilor tisulari ai metaloproteinazelor (TIMP-2) în focarele fibroblastice poate fi asociată unei supraviețuirii miofibroblastelor deoarece pe lângă funcția TIMP-2 de inhibare a unor MMP, acest inhibitor poate induce și proliferarea [Selman și colab., 2000].

## 1.2. Clorura de cadmiu este o noxă profesională asociată cu fibroza

Cadmiu este un element neesențial care se acumulează în mediu ca rezultat al unor practici industriale, fiind clasificat de IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ca un carcinogen de grupă I. El este utilizat în galvanizare, la fabricarea bateriilor, a industriei coloranților, etc., fiind un subprodus în industria extracției și prelucrării zincului și plumbului. Sărurile solubile ale cadmiului se acumulează în organismul uman, prezentând efecte toxice la nivelul ficatului, rinichilor, creierului, plămânilor, inimii și sistemului nervos central [Stohs și Bagchi, 1995].

Mecanismele responsabile pentru toxicitatea cadmiului nu sunt cunoscute. Deși Cd este un slab acceptor sau donor de electroni și nu poate genera radicali liberi în condiții fiziologice [Ochi și colab., 1987], s-au acumulat dovezi experimentale că tratamentele cu cadmiu dezvoltă indirect o toxicitate oxidativă datorită blocării glutationului, componentă marcantă a sistemului antioxidant de apărare. Astfel, tratamentele cu doze mici și moderate de clorură de cadmiu cresc gradul de peroxidare a lipidelor în țesuturile șobolanului [Manca și colab., 1991]; cel mai înalt grad de peroxidare fiind găsit la nivelul plămânilor și creierului.

Tratamentul șobolanilor cu o singură doză carcinogenică de CdCl<sub>2</sub> (30 m $\mu$ mol/kg) conduce la un puternic stres oxidativ, cu o producție marcantă de peroxid de hidrogen în celulele Leydig— cu rol de inițiere a carcinogenezei la nivelul testiculelor [Koizumi și Li, 1992]. De fapt, datorită timpului de înjumătățire mare, expunerea la cadmiu este una dintre problemele majore de sănătate ale mediului poluat.

Din punct de vedere al patologiilor pulmonare, s-a demonstrat că expunerea animalelor de laborator într-o atmosferă bogată în vapori/pulbere de  $Cd^{2+}$  conduce la emfizeme și fibroză [Damiano și colab., 1990]. Totuși, studii *in vitro* pe culturi de fibroblaste pulmonare umane au demonstrat că în doze netoxice (30  $\mu M$ ),  $CdCl_2$  inhibă producția de proteoglicani și de procologen [Chambers și colab., 1998].

### 1.3. Niveluri crescute de clorura de cadmiu, asociate cu TGF- $\beta$ - au acțiune fibrinogenă

Există mulți compuși – exogeni și endogeni – cu acțiune fibrinogenă. Astfel de exemplu, supraexprimarea locală de citokine și/sau factori de creștere stimulează fibroblastele rezidente care sintetizează cantități și mai mari de componente ale MEC. Astfel, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) este una dintre cele mai puternice citokine profibrotice și proinflamatoare, ce este supraexprimată la situsuri unde are loc un proces activ de reparare a țesutului și de fibrogenază. Fibroza indusă de TGF- $\beta$  poate fi considerată un proces de reparare aberant, activat anormal. Administrarea anticorpilor anti-TGF- $\beta$  protejează țesutul contra evoluției procesului fibrotic.

Familia TGF- $\beta$  cuprinde citokine multifuncționale implicate în modularea fenotipului diferențiat, în reglarea proliferării celulare, sinteza și depozitarea proteinelor matricei extracelulare. Se cunosc patru membri înrudiți (70-80 % omologie în secvența proteică) ai familiei TGF- $\beta$ , sintetizați sub forma unor molecule precursor mai mari, ce conțin forma matură a citokinei în partea C-terminală. După scindarea proteolitică, rezultă două fragmente: TGF- $\beta$  și LAP (*latency-associated peptide*) care rămân legate necovalent și sunt secretate împreună sub forma unui dimer inactiv. În unele cazuri, acest complex este secretat în stare legată la o proteină LTBP (*TGF- $\beta$  binding protein*).

Există dovezi experimentale privind implicarea TGF- $\beta$  în procesul, fiziologic normal, de reparare a țesuturilor după lezare. De exemplu, TGF- $\beta$  stimulează contracția matricei de colagen de către fibroblaste și induce exprimarea colagenelor fibrilare. Totuși efectul benefic al TGF- $\beta$  asupra reparării țesuturilor poate fi contracarat de depunerea excesivă a matricei. Fibroza indusă de TGF- $\beta$  poate fi considerată un proces de reparare aberant, activat anormal.

Efectul profibrotic al TGF- $\beta$  este datorat efectului puternic stimulator asupra expresiei multor gene ale componentelor matricei extracelulare, incluzând genele pentru colagenele I, II, III, IV, V și VII, elastinei și fibronectinei [Roberts și colab., 1986], ceea ce conduce la o producție crescută a matricei extracelulare – una din principalele manifestări ale fibrozei tisulare. Astfel, în cazul colagenului tip I, TGF- $\beta$  induce creșterea producției de colagen prin stimularea promotorilor genelor pentru a transcrie genele respective. Aceasta conduce la o sinteză crescută a speciilor mRNA pentru colagen, care ulterior sunt translate în catenele polipeptidice componente.

Mecanismul prin care TGF- $\beta$  își manifestă efectele lui variate asupra diferitelor tipuri celulare este puțin cunoscut. Se cunoaște că odată eliberat în micromediul local, TGF- $\beta$  induce efectele sale prin legarea la un receptor specific, care este o proteină transmembranară. Această legare activează receptorul care este apoi fosforilat la resturi de serină și treonină specifice. La activare, partea citoplasmatică a receptorului interacționează cu anumite proteine intracelulare, numite SMAD, pe care le fosforilează. Odată activate, aceste proteine SMAD pot interacționa în diferite combinații și pot suferi translocare în nucleu unde stimulează transcripția unor gene.

### 1.4. Stresul oxidativ este un factor determinant în patogeneza FP

Stresul oxidativ este o condiție în care viteza de formare a speciilor reactive ale oxigenului (ROS) depășește posibilitățile sistemului de apărare antioxidantă și care stă la baza îmbătrânirii și a multor stări patologice. Stresul oxidativ sunt adesea asociat cu fibrogenza ficatului, plămânilor, arterelor și sistemului nervos; mulți agenți etiologici ai fibrozei stimulează reacțiile radicalilor liberi, fie direct, fie prin stimuli inflamatori. Radicalii liberi, precum și produșii reacției lor cu biomolecule, par a modula activitatea a două tipuri celulare implicate în special în acest proces, fagocitele și celulele care produc MEC. În diferite stări patologice,

clinice sau experimentale, determinate de expunerea cronică la agenți etiologici sau datorate unor defecte ereditare, s-a evidențiat implicarea reacțiilor radicalice în perpetuarea unui răspuns inflamator cu depozitarea crescută de colagen și de alte proteine ale MEC.

Degradarea oxidativă a lipidelor membranare poate fi inițiată de către o varietate de radicali liberi și este provocată de generarea crescută de ROS și intermediari radicalici organici, care inițiază reacțiile înlănțuite de propagare. Acest proces este adesea implicat în modificarea echilibrului intracelular redox în favoarea oxidării și stresului oxidativ.

În patogeneza maladiilor fibrotice leziunile oxidative par a juca un rol important, chiar dacă concentrațiile crescute ale speciilor oxidante mai degrabă sunt rezultatul leziunilor tisulare decât un factor care inițiază leziunile. O superproducție secundară de ROS apare când inflamația este declanșată de ionii Fe, eliberați din Fe-proteine sau de concentrații scăzute de antioxidanți. Stresul oxidativ totuși este asociat accentuării fibrogenezei iar suplimentarea adecvată cu antioxidanți previne procesul patologic [Poli și Parola, 1997].

Printre multiplele efecte ale TGF- $\beta$  este stimularea producției celulare de peroxid de hidrogen. Thannickal și Fanburg [1995] demonstrează că tratamentul *in vitro* a fibroblastelor pulmonare umane cu TGF- $\beta$  (8 ore, 1 ng/ml) produce activarea sistemului NADH oxidazei, generator de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 1.5. Metaloproteinazele matriceale MMP-2 și MMP-9 sunt implicate în patogeneza FP

Compoziția MEC din țesutul pulmonar uman este critică pentru menținerea funcțiilor normale ale acestui organ: ventilația și schimbul de gaze. FPU sunt producătorii principali ai componentelor MEC: colagene, elastine și proteoglicani. MEC pulmonară suferă un *turnover* continuu, circa 10 % din componentele ei sunt reînnoite/zi [Dunsmore și Rannels, 1996].

Echilibrul dinamic dintre sinteza și degradarea MEC pulmonare este menținut prin trei mecanisme regulatorii: 1) sinteza *de novo* și depunerea componentelor MEC; 2) degradarea proteolitică a proteinelor MEC de către metaloproteinazele matriceale (MMPs) și 3) inhibiția activității MMP de către inhibitori specifici TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*).

Acumularea crescută a colagenului în spațiile intercelulare poate fi datorată creșterii producției de colagen, scăderii vitezei/capacității de degradare a colagenelor de către MMP sau/și expansiunii locale a populației de fibroblaste active din punctual de vedere al activității sintetice. Mărirea producției de colagen poate fi datorată creșterii vitezei de expresie a genelor care codifică catenele colagenelor (la nivel transcripțional) sau stabilizării mRNA colagenului (la nivel translațional).

Enzimele MMP aparțin unei familii de Zn<sup>2+</sup>-endopeptidaze ce prezintă capacitatea de a scinda componente proteice ale MEC, contribuind la turnoverul matricei la pH fiziologic. Familia MMP include colagenaze, stromelazine și gelatinaze. Ele sunt constituite dintr-o singură catenă polipeptidică de 20-100 kDa, care este sintetizată într-o formă prepro- cu un predomeniu N-terminal ce conține o secvență «*leader*» hidrofobă cu rol în secreție. Concomitent cu secreția, secvența semnal este scindată rezultând o proMMP, uzual inactivă [Nagase și Woessner 1999 ; Sternlicht și Werb 2001]. Activarea proMMP decurge diferențiat, fiecare membru urmând unul din următoarele trei mecanisme de activare : treptată, la suprafața celulară și intracelulară.

În grupa gelatinazelor care interacționează sinergic în degradarea tuturor componentelor MEC sunt incluse MMP-2 (gelatinaza A de 72 kDa) și MMP-9 (gelatinaza B de 95 kDa) care hidrolizează eficient colagenul tip IV, componentul major structural al membranelor bazale. Ambele gelatinaze MMP-2 și MMP-9 conțin domenii *like*-fibronectină de legare a colagenului, au o specificitate de substrat apropiată, scindând colagene tip I, IV, V, VII și XI și laminina.

MMP-2 este secretată de țesuturi, într-o formă latentă, ca pro-enzimă (pro-MMP-2), care suferă o scindare la o formă solubilă, activă. Activarea MMP-2 la forma maturată este un proces complex ce are loc în principal la suprafața celulei, prin scindarea prodomeniului N-terminal, ce implică MMP de tip membranar (MT1-MMP). Gena MMP-2 este localizată pe cromozomul 16q13, are o lungime de 17 kbaze, cu 13 exoni a căror mărime variază de la 110 la 901 pb și 12 introni de 175 – 4.350 pb. Alinierea intronilor arată că intronii 1→ 4 și 8→12 coincid cu locațiile intronilor din genele MMP-1 și MMP-3 indicând o relație structurale a acestor gene MMP. În promotorul genei MMP-2 au fost evidențiate 6 polimorfisme - corelate cu factori de risc cardiovascular deoarece au fost evidențiate la persoane cu CHF (*chronic heart feature*), hipercolesterolemie și hipertensiune [Vasku și colab., 2003].



MMP-9 este produsă de o varietate de celule și țesuturi, iar activitatea ei este reglată complex la cinci nivele. Transcripția genei MMP-9 depinde de prezența unor elemente *cis* în promotorul ei, fiind indusă sau represată de o mare varietate de factori solubili (citokine, factori de creștere și hormoni) și contacte intracelulare – care acționează prin căi de semnalizare specifice [Kobayashi și colab., 2001]. Reglarea specifică a secreției ei are loc în celule care stochează MMP-9 în granule. După secreție, *pro*-MMP-9 poate fi activată printr-o rețea de evenimente. Apoi activitatea enzimei este reglată prin inhibiție și prin alte mecanisme astfel ca «*fine-tuning*» și stabilizarea prin glicozilare. Capacitatea MMP-9 de a degrada componente ale MEC și de a fi reglată de citokine și factori de creștere îi conferă un rol important în diferite procese fiziologice și patologice, ca reproducerea, creșterea, dezvoltarea, inflamația, în maladii vasculare și proliferative [Van den Steen și colab., 2002].

Fabumi și colab. [1996] au demonstrat un răspuns diferit al MMP-9 și a inhibitorilor TIMP la factori de creștere și citokine. Prezența PDGF și a IL-1 $\alpha$  corelat cu un răspuns inflamator acut cresc puternic activitatea MMP-9 și slab nivelul TIMP ceea ce favorizează degradarea membranei bazale, promovând migrarea și proliferarea celulelor musculaturii netede. Prezența TGF- $\beta$  stimulează expresia TIMP favorizând formarea membranei bazale și limitând proliferarea acestor celule.

Sinteza, gradul de activare, reglarea unor MMP sunt afectate în multe stări patologice. Astfel, în FPI - miofibroblastele sintetizează MMP-2 și MMP-9 care contribuie la eșecul reparării sistematice a celulelor epiteliale alveolare tip I și la intensificarea migrării fibroblastelor/miofibroblastelor în spațiile alveolare [Selman și colab., 2000]. Mai mult, în unele maladii s-au stabilit corelații între nivelul MMP și stresul oxidativ, mai ales că ROS pot induce sinteza unor citokine și MMP. Astfel, peroxidarea lipidelor și anumiți produși ai peroxidării lipidice induc supraexpresia genică a citokinelor fibrogenice, moleculele cheie în mecanismele patogenice ale fibrozei, precum și transcripția crescută și sinteza de collagen. Ambele evenimente pot fi inhibate, cel puțin în modele experimentale, prin utilizarea de antioxidanți. Efectul stresului oxidativ asupra expresiei genelor citokinelor pare a fi un mecanism important prin care are loc depunerea de țesut conjunctiv [Poli și Parola, 1997].

Brown și Bicknell (2001) au demonstrat că în tumorile sânelui stresul oxidativ facilitează invazia și metastaza prin activarea MMP (în special MMP-2) și inhibiția antiproteazelor. Hiemstra (2000) într-un studiu privind patogeneza COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) a subliniat importanța dezechilibrului între nivelul oxidanților/ antioxidanților care stă la baza procesului inflamator observat și rolul MMP și a inhibitorilor lor.

Stresul oxidativ a fost implicat și în patofiziologia infarctului miocardic. Siwik și colab., (2001) a demonstrat ipoteza că stresul oxidativ poate regla MEC în fibroblastele cardiace. Astfel, expunerea acestor celule la H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05-5  $\mu$ M) conduce la creșterea activității gelatinazice a MMP-2, MMP-9 și MMP-13. Acești autori sugerează că stresul oxidativ joacă un rol în patogeneza remodelării miocardului prin reglarea cantității și calității MEC.

## 1.6. KGF poate avea o acțiune anti-fibrotică

În ciuda frecvenței și severității FPU, a morbidității și mortalității acestei condiții patologice, tratamentele actuale sunt nespecifice (anti-inflamatoare și imunosupresoare) și au efecte benefice minime. Tratamentul cu corticosteroizi nu este totdeauna benefic datorită efectelor secundare negative. Uneori este necesară terapia cu oxigen pentru ca bolnavul să-și realizeze activitățile zilnice în condițiile unei eficiențe pulmonare reduse. În prezent sunt analizate strategii de tratament care inhibă proliferarea fibroblastelor și acumularea MEC. Progresul cunoașterii mecanismelor celulare și moleculare care stau la baza FPU va permite elaborarea de noi strategii terapeutice.

O posibilă strategie terapeutică este restabilirea echilibrului dintre citokinele tip 1 și 2 prin administrarea IFN- $\gamma$ . Ziesche și colab. [1999] au realizat un studiu clinic preliminar de tratament comparativ a FPI cu IFN- $\gamma$ -1b și prednisolon (grupul A) și numai cu prednisolon (grupul B), demonstrând numai la grupul A - o ameliorare a capacității pulmonare totale, a oxigenării arteriale, scăderea mRNA pentru TGF- $\beta$  și CTGF. Există puține studii privind strategiile anti-TGF  $\beta$  și acestea numai pe animale model cu FP. Astfel, Giri și colab. [1993] au demonstrat că tratamentul cu anticorpi anti-TGF  $\beta$  inhibă dezvoltarea FP produsă cu bleomicină la rozătoare. Kolb și colab. [2001] au demonstrat că supraexprimarea pulmonară a miezului

proteic al decorinei - un proteoglican mic ce se leagă la TGF  $\beta$ , inhibă răspunsul fibrogenic la bleomicină. În afara acestor strategii de blocare a acțiunii extracelulare a TGF  $\beta$  este posibil a modula calea de semnalizare intracelulară a acestei citokine. [Adawi și colab. \[1998\]](#) au utilizat anticorpi monoclonali anti-CD40 L, în protecția contra leziunilor pulmonare hiperoxice și a FP indusă de radiații la șoareci observând anularea stării inflamatorii și progresul FP.

Ipoteza noastră de lucru este că factorul **KGF** (*keratinocyte growth factor*) are o acțiune hipoproliferativă la nivelul plămânilor. KGF aparține familiei **FGF** (*Fibroblast growth factors*) ce cuprinde o grupă de 16 polipeptide mitogene înrudite structural, ce stimulează proliferarea unei varietăți de celule de origine mezodermală, ectodermală și endodermală și pot acționa ca factori neurotrofici și angiogenici *in vivo*. KGF, numit și FGF-7 este un mitogen specific pentru diferite tipuri de celule epiteliale [[Finch și colab., 1989](#); [Werner, 1998](#)].

KGF este produs de diferite tipuri de celule mezenhimale, *in vitro* și *in vivo*, ca fibroblastele din diferite surse, celule endoteliale microvasculare, celule ale musculaturii netede. Mai mult celulele  $\gamma\delta$ T activate obținute din piele și intestin exprimă KGF. Alte tipuri de limfocite, ca monocitele și macrofagele, celulele endoteliale din vena umbilicală nu exprimă acest mitogen. Expresia KGF nu a fost detectată în celulele de origine epitelială, deși majoritatea acestor celule exprimă FGF-R2 IIIb care are o mare afinitate pentru KGF și răspund la acțiunea KGF *in vitro* și *in vivo*. Aceste rezultate sugerează că KGF acționează predominant într-o manieră paracrină [[Werner, 1998](#)]. KGF joacă un rol cheie în repararea epiteliiilor pulmonare, având o activitate potențial anti-fibrotică [[Galiacy și colab., 2003](#)].

## 2. Rezultate experimentale

Indelinierea Ob.1 s-a realizat prin investigații pe fibroblaste izolate din 21 biopsii de la pacienți cu patologii pulmonare complicate de procese fibrotice, discutate comparativ cu același tip celular din plămâni normale. S-au pus în evidență aspecte caracteristice care sugerează că diversitatea factorilor care induc FP conduce la mecanisme particulare de acumulare a componentelor matricei extracelulare (MEC) și de remodelare ale acesteia.

Modelul celular al FP, elaborat în cadrul acestui proiect constă din HLF separate din țesut conjunctiv pulmonar normal, tratate cu 25  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> timp de 24 ore și apoi cu 5 ng/ml TGF- $\beta$ . Tratamentul cu CdCl<sub>2</sub> (25  $\mu$ M) nu are efecte citotoxice (conținutul procentual de celule viabile rămâne nemodificat față de experimentul control și eliberarea LDH din celulă în mediu este redusă), observându-se chiar un slab efect de stimulare a proliferării celulare după 24 ore de tratament (cu ~ 19 %). De asemenea, acest tratament are efecte mici asupra morfologiei celulare comparativ cu celulele netratate. După 24 ore se remarcă o proliferare crescută a fibroblastelor, cu mărirea gradului de granulație a celulelor ceea ce poate sugera o activitate sintetică crescută. Tratamentul nHLF cu 5 ng/ml TGF- $\beta$  conduce la stimularea proliferării celulare și accentuarea profilului acicular al acestor celule, având o mică toxicitate. Tratamentul dublu 25  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> + 5 ng/ml TGF- $\beta$  induce o slabă creștere a nivelului intracelular de specii reactive ale oxigenului (ROS), fără a produce efecte citotoxice și peroxidarea lipidelor.

Verificarea modelului celular de studiu al FP s-a realizat prin studii comparative pe nHLF separate de la un copil de 3 luni, decedat din cauza unor malformații cerebrale, fără modificări pulmonare și pe celule separate din țesutul pulmonar a trei pacienți cu patologie pulmonară netumorală. Dintre toate cazurile, modelul celular seamănă în cel mai mare grad cu cazul unui bărbat de 48 ani cu FP produsă în urma unei activități profesionale în mine de cărbune când se evidențiază acumularea ROS și un stres oxidativ care produce leziuni oxidative cel puțin la nivelul lipidelor membranare. Studiul secreției IL-4 în mediul de cultură al HLF arată existența unor concentrații mari de citokină numai în cazul celulelor izolate de la un pacient cu FP difuză corelată cu o boală de collagen, în care pacientul are și o bronșită cu secreție purulentă și emfizem pulmonar secundar și lipsa unui semnal în cazul celulelor normale și a modelului celular. Investigarea acțiunii KGF asupra nHLF și mHLF arată că în doză maximă de 100 ng/ml, acest factor are o slabă acțiune anti-proliferativă asupra celulelor din modelul celular.

## Bibliografie

[Adawi, A. și colab. Blockade of CD40-CD40 ligand interactions protects against radiation-induced pulmonary inflammation and fibrosis. Clin. Immunol. Immunopathol. 89, 222-230, 1998](#)

- Akamine, A., Raghu, G., Narayanan, S. Human lung subpopulations with different C1q binding and functional properties. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6:382–389, 1992.
- Atamas, S.P., Complex cytokine regulation of tissue fibrosis, *Life Sciences*, 72, 631-643, 2002
- Brown, N.S., Bicknell, R., Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress - its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer, *Breast Cancer Res.*, 3, 323-327, 2001
- Chambers, R. C., Laurent, G.J., Westergreen-Thorsson, G., Cadmium inhibits proteoglycan and procollagen production by cultured lung fibroblasts, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 19, 498-506, 1998
- Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 259, L159–L184, 1990.
- Cukierman, E, Pankov, R, Stevens, D.R., Yamada, K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294, 1708–1712, 2001
- Damiano, V. V., Varghese Cherian, P., Frankel, F. R., Steeger, J.R., Sohn, M., Oppenheim, D., Weinbaum, G. Intraluminal fibrosis induced unilaterally by lobar instillation of CdCl<sub>2</sub> into the rat lung. *Am. J. Pathol.* 137, 883–894, 1990.
- Driscoll, K.E., Maurer, J.K., Poynter, J., Higgins, J., Asquith, T., Miller, N.S., Stimulation of rat alveolar macrophage fibronectin release in a cadmium chloride model of lung injury and fibrosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 116, 30–37, 1992.
- Dunsmore, S. E., Rannels, D.E., Extracellular matrix biology in the lung. *Am. J. Physiol.* 270 (Lung Cell. Mol. Physiol. 14), L3–L27, 1996
- Eickelberg, O., Kohler, E., Reichenberger, F., Bertschin, S., Woodtli, T., Erne, P., Perruchoud, A.P., Roth, M., Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. *Am. J. Physiol.*, 276, L 814-824, 1999.
- Fabunmi, R.P., Baker, A.H., Murray, E.J., Booth, R.F., Newby, A.C., Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells, *Biochem.J.*, 315, 335-342, 1996
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D., Aaronson, S.A. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cells. *Science*, 145, 752-755, 1989
- Frankel, F.R., Steeger, J.R., Damino, V.V., Sohn, M., Oppenheim, D., Weinbaum, G., Induction of unilateral pulmonary fibrosis in the rat by cadmium chloride. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5, 383–394. 1991
- Galiacy, S. și colab. KGF promotes cell motility during alveolar epithelial repair in vitro, *Exp. Cell Res.*, 283, 215-229, 2003
- Giri, S. N. și colab. Effect of transforming growth factor beta on a bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax*, 48, 959–966, 1993.
- Hansen, C.H., Brunner, N., MTT-cell proliferation assay, *Cell Biology. A Laboratory handbook*, Ediția 2, vol.1, p.16-18, 1998, Academic Press
- Hiemstra, P.S., Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Respiratory Research*, 1,178-179, 2000,
- Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M., Saller, R., Aqueous ethanolic extract of *Hypericum perforatum* L. induces growth inhibition and apoptosis in human malignant cells in vitro, *Pharmazie*, 57, 323-331, 2002
- Izbicki, G., Or, R., Christensen, T.G., Segel, M.J., Fine, A., Goldstein, R.H., Breuer, R., Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4 overexpressing and knockout mice, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 283, L1110-1116, 2002
- Jordana, M., Schulman, J., McSharry, C., Irving, L.B., Newhouse, M.T., Jordana, G., Gauldie, J. Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:579–584, 1988.
- Katzenstein, A.L.A., Myers, J.L. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 1301–1315, 1998
- Kelley, J. Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 765–788, 1990.
- King Jr., T.E., Schwarz, M.I., Brown, K., Tooze, J.A., Colby, T.V., Waldron Jr., J.A., Flint, A., Thurlbeck, W., Cherniack, R.M. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 1025–1032, 2001.
- Kobayashi, T., Kishimoto, J., Ge, Y., Jin, W., Hudson, D.L., Ouahes, N., Ehama, R., Shinkai, H., Burgeson, R.E., A novel mechanism of matrix metalloproteinase-9 gene expression implies a role for keratinization, *EMBO*, 21, 604-8, 2001
- Koizumi, T., Li, Z.G., Role of oxidative stress in single-dose cadmium-nduced testicular cancer, *J.Toxicol. Environ. Health*, 37, 25-36, 1992
- Kolb, M. și colab. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163, 770-777, 2001



Korfhagen, T.R., Swantz, R.J., Wert, S.E., McCarty, J.M., Kerlakian, C.B., Glasser, S.W., Whitsett, J.A., Respiratory epithelial cell expression of human transforming growth factor- $\alpha$  induces lung fibrosis in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 93, 1691–1699, 1994.

Kuhn, C., McDonald, J.A.. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am. J. Pathol.* 138: 1257–1265, 1991.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951

Manca, D., Ricard, A.C., Trottier, B., Chevalier, G., Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride, *Toxicology*, 67, 303-323, 1991

McAnulty, R. J., Laurent, G.J.. Collagen and its regulation in pulmonary fibrosis. In *Pulmonary Fibrosis*, edited by S. Phan și R. Thrall. New York: Dekker, 1995, vol. 80, p. 59–85. (Lung Biol. Health Dis. Ser.)

Morliere, P., Moysan, A., Santus, R., Huppe, G., Maziere J-C., Dubertret, UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts, *Biochim.Biophys.Acta*, 1084, 261-268, 1991

Nagase, H., Woessner, J.F., Jr. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491-4, 1999.

Ochi, T., Takahashi, K., Ohsawa, M. Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction, *Mutat. Res.* 180, 257–266, 1987.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem.*, 95, 351-358, 1979

Perez-Ramos, J., Segura-Valdez, M.L., Vanda, B., Selman, M., Pardo, A., Matrix metalloproteinases 2, 9 and 13 and tissue inhibitors TIMP-1 and 2 in experimental lung silicosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160, 1274-1282, 1999

Phan, S.H., Kunkel, S.L., Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp. Lung Res.* 18, 29–43, 1992.

Poli, G., Parola, M. Oxidative damage and fibrogenesis. , *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 287-305, 1997

Raghu ,G., Striker L., Hudson L.D., Striker, G.E. Extracellular matrix in normal and fibrotic lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 281–289, 1985.

Raghu, G., Chen, Y.Y., Rusch, V., Rabinovitch, P.S. Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human Lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:703–708, 1988.

Ramos, C., Montaña, M., García-Alvarez, J., Ruiz, V., Uhal, B.D., Selman, M., Pardo, A. Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Lungs Differ in Growth Rate, Apoptosis, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 24, pp. 591–598, 2001

Rao, J., Otto, W.R., Fluorimetric DNA assay for cell growth estimation, *Anal. Biochem.*, 207, 86-92, 1992

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH. Transforming growth factor type b: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*,83, 4167–71, 1986.

Royall, J.A., Ischiropoulos, H., Evaluation of 2,7-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells *Arch Biochem Biophys.*, 302, 348-355, 1993

Saldivar, L., Luna, M., Reyes, E., Soto, R., Fortoul, T.I., Cadmium determination in Mexican-produced tobacco. *Environ. Res.* 55, 91–96, 1991.

Selman, M., Ruiz, V., Cabrera, S., Segura, L., Ramírez, R., Barrios, R., Pardo, A., TIMP-1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non degradative lung microenvironment? *Am. J. Physiol.* 279, L562–L574, 2000.

Shopsis, C., Mackay, G.J., A semi-automated protein assay for cell cultures, *Anal. Biochem.*, 140, 104-107, 1984

Siwik, D.A., Pagano, P.J., Colucci, W.S., Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C53-C60, 2001;

Sternlicht, M.D., Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*17, 463-516, 2001.

Stohs, S.J., Bagchi, D., Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 321-336, 1995

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L. Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -generating NADH Oxidase in Human Lung Fibroblasts by Transforming Growth Factor  $\beta$ 1, *J.Biol.Chem.*, 270, 30334–30338, 1995

Uhal, B.D., Joshi, I., True, A.L., Mundle, S., Raza, A., Pardo, A., Selman, M. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro, *Am. J. Physiol.* 269, L819–828, 1995.

Uhal, B.D., Joshi, I., Hughes, W.F., Ramos, C., Pardo, A., Selman, M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung, *Am. J. Physiol.* 275, L1192–L1199, 1998.

Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 375-536, 2002

Vaškú, A., Goldbergová, M., Holla, L. I., Špinarová, L., Špinar, J., Vítovec, J., Vácha, J. Two MMP-2 Promoter Polymorphisms (–790T/G and –735C/T) in Chronic Heart Failure. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1299–1303, 2003

Zhang, K., Rekhter, M.D., Gordon, D., Phan, S.H. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 145:114–125, 1994.

Ziesche, R. și colab. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 341, 1264– 1269, 1999.

Werner, S., KGF: a unique player in epithelial repair processes, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9, 153-165, 1998