

Eozinofilų poveikis tarpląstelinio užpildo baltymų genų raiškai, bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiliškumui ir migracijai sergant astma

THE EFFECT OF EOSINOPHILS ON GENE EXPRESSION OF EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS, CONTRACTILITY AND MIGRATION OF AIRWAY SMOOTH MUSCLE CELLS AND PULMONARY FIBROBLASTS IN ASTHMA

IEVA JANULAITYTĖ

LSMU MA MF Pulmonologijos klinikos Pulmonologijos laboratorija

Santrauka. 2022 m. rugpjūčio 24 d. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto viešajame biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje Ieva Janulaitytė sėkmingai apgynė daktaro disertaciją „Eozinofilų poveikis tarpląstelinio užpildo baltymų genų raiškai, bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiliškumui ir migracijai sergant astma“. Disertacija rengta 2017–2021 m. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Pulmonologijos klinikos Pulmonologijos laboratorijoje. Šiame straipsnyje pateikiami pagrindiniai disertacijos rezultatai.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Kęstutis Malakauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas).

Disertacijos gynimo taryba:

prof. dr. Edgaras Stankevičius, pirmininkas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas);

dr. Paulina Vaitkienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas);

prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas);

prof. dr. Linas Mažutis (Vilniaus universitetas);

doc. dr. Florence Schleich (Lježo universitetas).

Summary. Ieva Janulaitytė successfully defended a doctoral dissertation „The effect of eosinophils on gene expression of extracellular matrix proteins, contractility and migration of airway smooth muscle cells and pulmonary fibroblasts in asthma“ at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on the 24th of August, 2022. The Dissertation has been prepared at the Laboratory of Pulmonology of Department of Pulmonology of the Faculty of Medicine of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2017–2021. The article presents the main results of the dissertation.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Kęstutis Malakauskas (Lithuanian University of Health Sciences).

The Defense Council:

Prof. Dr. Edgaras Stankevičius, chairperson (Lithuanian University of Health Sciences);

Dr. Paulina Vaitkienė (Lithuanian University of Health Sciences);

Prof. Dr. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University);

Prof. Dr. Linas Mažutis (Vilnius University);

Assoc. Prof. Dr. Florence Schleich (University of Liege).

DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.1018>

IVADAS

Astma yra nevienalytė ir sudėtinga liga, kuriai būdingas sutrikęs kvėpavimo takų audinių atsigavimas, susijęs su vietiniu uždegimu ir padidėjusiu jautrumu,

nulemiančiu pasikartojančius kosulio epizodus, švokštimą, dusulį ir spaudimą krūtinėje [1]. Lėtinis kvėpavimo takų uždegimas su ryškia kraujo ir kvėpavimo takų eozinofilija yra esminis astmos bruožas. Kvėpavimo

takų eozinofilija susijusi su dažniais astmos paūmėjimais ir intensyvesniu gydymu [2]. Eozinofilai yra granulocitai, kurių brendimą kaulų čiulpuose aktyvina 2-ojo tipo uždegimo metu gausiai išskiriami citokinai [3]. Astmos metu eozinofilai migruoja iš periferinio kraujo į pažeidimo vietą, prilimpa prie struktūrinių kvėpavimo takų ląstelių, pavyzdžiui, bronchų lygiųjų raumenų ląstelių (BLRL) ir plaučių fibroblastų (PF), ir išskiria įvairias biologiškai aktyvias medžiagas ir citokinus. Manoma, kad šios gausiai eozinofilų išskiriamos medžiagos gali reikšmingai prisidėti prie kvėpavimo takų remodeliavimosi sergant astma.

Kvėpavimo takų remodeliavimas apibūdinamas kaip didžiųjų ir mažųjų kvėpavimo takų ląsteliniai ir tarpląstelinio užpildo pokyčiai: epitelio ląstelių apoptozė, kvėpavimo takų lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija ir fibroblastų aktyvacija [4]. Šiuos patologinius kvėpavimo takų pokyčius lemia skirtingų ląstelių rūšių aktyvinimas kvėpavimo takų sienelėje ir gleivinėje. Kvėpavimo takų sienelės sustorėjimas yra viena svarbiausių remodeliavimosi, kuri lemia padidėjusi BLRL ir PF proliferacija, aktyvacija bei sutrikusi tarpląstelinio užpildo baltymų apykaita, savybė. Tarpląstelinio užpildo baltymai nustato audinių architektūrą, suteikdami mechaninio stabilumo ir elastingumo, kurie reikalingi normaliai plaučių funkcijai. Struktūriniai kvėpavimo takų pokyčiai yra patologiniai požymiai, prisidedantys prie klinikinio astmos pasireiškimo: bronchų spindžio susiaurėjimo, švokštimo, dusulio. Uždegiminių ir struktūrinių ląstelių tarpusavio ryšiai sudaro tinkamas sąlygas lėtiniam uždegimui. Įrodyta, kad profibrozinis citokinas, transformuojamasis augimo veiksnys beta (angl. *transforming growth factor beta*, TGF- β) dalyvauja pagrindiniuose astmos remodeliavimosi procesuose, įskaitant didžiųjų ir mažųjų kvėpavimo takų ląstelinius ir struktūrinius pokyčius [12]. Eozinofilai, BLRL ir PF gamina neaktyvintą TGF- β formą, kuri kaupiasi tarpląsteliniam užpilde kaip latentinis kompleksas, o aktyvinta TGF- β forma gali autokriniškai ir parakriniškai reguliuoti struktūrinių kvėpavimo takų ląstelių tarpląstelinio užpildo baltymų gamybą ir ardymą [13]. Be to, užpildo metaloproteinazės (MMP), pavyzdžiui, MMP-2 ir MMP-9, skaido latentinius TGF- β kompleksus, taip padidindamas aktyvintos TGF- β formos kiekius tarpląsteliniam užpilde [7].

Sergant astma tarpląstelinio užpildo komponentų, pavyzdžiui, kolageno, elastinių skaidulų, fibronektino ir versikano, apykaita kvėpavimo takuose yra sutrikusi. Tarpląstelinio užpildo homeostazė yra esminė organizmo vystymosi ir žaizdų gijimo dalis, o tarpląstelinio užpildo baltymų kaupimasis ir sutrikęs baltymų ardymas sukuria patologines sąlygas ląstelėms. Tarpląstelinio užpildo homeostazę reguliuoja MMP, skaidantys tarpląstelinio užpildo baltymus, ir audinių metaloproteinazių inhibitoriai (angl. *tissue*

metalloprotease inhibitor, TIMP), moduliuojantys MMP aktyvumą. Mikroaplinkos pokyčiai sukelia struktūrinių kvėpavimo takų ląstelių elgesio pokyčius. Sergant astma, kokybiniai ir kiekybiniai tarpląstelinio užpildo baltymų pokyčiai yra dalis kvėpavimo takų remodeliavimosi procesų, prisidedančių prie astmos patogenezės.

TGF- β signalinis kelias susideda iš kanoninio (nuo Smad priklausomas) ir nekanoninio kelių, kurie prideda, kai latentinis TGF- β kompleksas suaktyvinamas veikiant MMP [8]. Aktyvintas TGF- β jungiasi prie išorinėje ląstelių membranoje esančių TGF- β receptorių. Tada Smad 2, Smad 3 ir Smad 4 signalizacija aktyvina kanoninio arba nekanoninio signalinio kelio molekules, kurios lemia citokinų transkripciją, tarpląstelinio užpildo baltymų sintezę ir aktino polimerizaciją [9]. Eozinofilų skatinama TGF- β signalinio kelio elementų raiška ir inhibicinių molekulių raiškos slopinimas susijęs su aktyviu TGF- β signaliniu keliu ląstelėse [10].

BLRL ir PF yra sintetiškai ir mechaniškai aktyvios ląstelės, kurios greitai reaguoja į kvėpavimo takų uždegimą ir pakeičia savo įprastą funkciją: gamina įvairius biologiškai aktyvius mediatorius, tarpląstelinio užpildo baltymus, didėja susitraukimas (kontraktiliškumas) ir migracija. Pakitęs BLRL ir PF kontraktiliškumas ir migracija yra vienas svarbiausių kvėpavimo takų uždegimo procesų, prisidedančių prie kvėpavimo takų remodeliavimosi sergant astma. Ankstesni tyrimai parodė, kad astma sergančiųjų BLRL skiriasi nuo nesergančiųjų astma, nes yra hiperkontraktiliniai, hiperproliferaciniai ir hipersekreciniai [11]. BLRL susitraukimo ir atsipalaidavimo dinamika atlieka pagrindinę kvėpavimo takus susiaurinančią funkciją sergant astma [12]. BLRL susitraukimas ir migracija yra glaudžiai susiję procesai, nes migravimas susijęs su labai konservatyviais molekuliniais mechanizmais, koordinuojančiais susitraukimą [12]. Padidėjusi astma sergančiųjų žmonių kvėpavimo takų BLRL masė siejama su intensyvesne proliferacija ir migracija. Bronchų sienelė taip pat storėja ir dėl PF proliferacijos, migracijos ir tarpląstelinio užpildo kaupimosi. PF yra pagrindinės ląstelės, atsakingos už tarpląstelinio užpildo baltymų apykaitą kvėpavimo takuose. Be to, PF migruoja į uždegimo vietą ir yra pagrindinės ląstelės, atsakingos už žaizdų gijimą. Įrodyta, kad migruojantys PF diferencijuojasi į miofibroblastus, kurie susitraukia ir gamina itin daug tarpląstelinio užpildo baltymų, taip sukeldami audinių fibrozę [13]. Miofibroblastams taip pat būdinga didesnis kiekis židininės adhezijos vietų, ląstelių-ląstelių jungčių ir intensyvesnė α -sm-aktino raiška [14]. Be to, BLRL ir PF išskiria daugybę augimo veiksnių ir citokinų, kurie skatina kvėpavimo takų uždegimą [15]. Taigi, BLRL ir PF atlieka svarbų vaidmenį kvėpavimo takų remodeliavime sergant astma.

Disertacijoje iškelta hipotezė, kad astma sergančiųjų

Disertacijos

jų eozinofilai veikia tarpląstelinio užpildo baltymų ir jų apykaitą reguliuojančių baltymų genų raišką, TGF- β signalinio kelio molekulių genų raišką BLRL ir PF, ir šių ląstelių kontraktiškumą, migraciją ir diferenciaciją.

Tikslas: įvertinti eozinofilų poveikį tarpląstelinio užpildo baltymų genų raiškai, bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiškumui ir migracijai sergant astma.

Uždaviniai:

1. Įvertinti eozinofilų poveikį tarpląstelinio užpildo baltymų, užpildo metaloproteinazių ir metaloproteinazių audinių inhibitorių genų raiškai bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose sergant astma.
2. Nustatyti eozinofilų poveikį kanoninio ir nekanoninio TGF- β signalinio kelio molekulių genų raiškai bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose.
3. Ištirti eozinofilų įtaką bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiškumui, migracijai ir kontraktilinių baltymų genų raiškai.

Tyrimo naujumas

Šis tyrimas suteikia naujų žinių apie astma sergančiųjų eozinofilų poveikį bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms ir plaučių fibroblastams: (1) eozinofilų sukeltą tarpląstelinio užpildo baltymų apykaitos molekulių genų raiškos BLRL ir PF sutrikdymą; (2) eozinofilų skatinamą TGF- β signalinio kelio molekulių genų raišką BLRL ir PF; (3) eozinofilų skatinamą BLRL ir PF kontraktiškumą, migraciją ir šių struktūrinių kvėpavimo takų ląstelių diferenciaciją į kontraktilinių ląstelių fenotipą, pasitelkiant tiriamųjų eozinofilų ir BLRL, PF sudėtines kultūras.

Šis tyrimas suteikia daugiau informacijos apie astmos gydymo tikslą – eozinofilų kiekio mažinimą, jų adhezinių savybių blokavimą ir TGF- β signalinio kelio molekulių inaktyvinimą siekiant sumažinti kvėpavimo takuose vykstančius remodeliavimosi pokyčius. Vienintelis gerai žinomas eozinofilijos gydymas pagrįstas jų išsekiniu užblokavus eozinofilų brendimą kaulų čiulpuose; tačiau jis nelabai veiksmingas ir sukelia ryškų šalutinį poveikį. Tyrimo naujumas yra tyrimo metodai, uždaviniams pasiekti naudoti iš įvairaus sunkumo astmos pacientų kraujo išskirti eozinofilai sudėtinėse kultūrose su BLRL ir PF ląstelių linijomis, rodančiomis skirtingą eozinofilų poveikį jų tarpląstelinio užpildo genų raiškai, TGF- β signalinio kelio molekulių genų raiškai, ląstelių kontraktiškumui, migracijai ir diferenciacijai. Šis tyrimo modelis imituoja *in vivo* procesus. Taip pat, šie tyrimai praplečia supratimą apie struktūrinių kvėpavimo takų ląstelių ir eozinofilų išskiriamo TGF- β svarbą kvėpavimo takų remodeliavimuisi sergant astma.

METODAI

Tyrimas vykdytas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Medicinos akademijos Medicinos fakulteto Pulmonologijos klinikos Pulmonologijos laboratorijoje. Pacientų atranka ir klinikinis ištyrimas vykdytas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Pulmonologijos klinikoje, gavus LSMU Regioninio biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimą numeriu BE-2-13 ir Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimą numeriu 2R-7192 (2.6-1).

Tyrimas taip pat registruotas clinicaltrials.gov puslapyje, identifikacijos numeris NCT03388359.

Tyrimas buvo prospektyvinis, trukęs nuo 2017 m. rugsėjo 1 d. iki 2021 m. rugpjūčio 31 d. Į tyrimą įtraukti tik tie tiriamieji, kurie pasirašė informuoto asmens formą. Visi alergine astma (AA) ir sunkia nealergine eozinofiline astma (SNEA) sergantys asmenys buvo tiriami ir gydomi Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Pulmonologijos klinikoje. Sveiki asmenys (SA) dalyvavo tyrime kontrolinėje grupėje ir visi jie buvo savanoriai.

Į tyrimą įtraukti iš viso 95 tiriamieji. Nerūkantys 18–80 metų amžiaus vyrai ir moterys, sergantys nesunkia, įkvėpiamais gliukokortikoidais (IGK) negydyta alergine astma, toliau AA – viso 39 asmenys, sergantys sunkia nealergine eozinofiline astma, toliau SNEA – 20, ir 36 sveiki asmenys (SA) kaip kontrolinė grupė. Detalūs tiriamųjų demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikiami skiltyje Rezultatai (1 ir 2 lentelėse).

Tyrimo eiga

Visi tiriamieji prieš pradėdami tyrimus atitiko įtraukimo kriterijus, pasirašė informuoto asmens sutikimo formas. Tuomet jie buvo kviečiami atvykti ne anksčiau kaip trys dienos ir ne vėliau kaip dvi savaitės po įtraukimo kriterijų patvirtinimo. SNEA pacientai ir dalis SA (n = 11) buvo pakviesti atvykti tyrimams vieną kartą, visi AA sergantieji ir dalis SA (n = 25) buvo kviečiami atvykti du kartus – prieš ir 24 val. po bronchų provokacijos *D. pteronyssinus* alergenu.

Pirmo vizito metu iš visų tiriamųjų buvo paimtas periferinis kraujas, pamatuotas FEV₁ ir FeNO. Detalūs tiriamųjų asmenų ištyrimas apibūdintas publikacijose [16–19]. Taip pat, pateikiamas išsamus eksperimentinis tyrimų planas 1 paveiksle.

REZULTATAI

Demografiniai ir klinikiniai tirtų asmenų duomenys

Į tyrimą įtraukti iš viso 95 tiriamieji (42 vyrai ir 53 moterys), iš kurių 39 buvo sergantys AA, 20 sergančių SNEA ir 36 SA. Visiems 39 sergantiems AA ir 25 SA atlikta bronchų provokacija *D. pteronyssinus* alergenu. SNEA sergantys asmenys išsiskyrė statistiškai reikšmingai vyresniu amžiumi, blogesne plaučių funkcija,

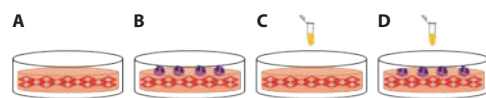


1 pav. Išsamus eksperimentinis tyrimo planas

BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelės; PF – plaučių fibroblastai.

didesne procentine kraujo eozinofilija, FeNO nei AA ir SA, $p < 0,05$. AA sergančių asmenų IgE buvo reikšmingai didesnis, lyginant su SNEA ir SA, $p < 0,05$. Išsamūs tirtų asmenų duomenys pateikiami 1 lentelėje.

Bronchų provokacija *D. pteronyssinus* alergenu atlikta visiems AA sergantiems ir sveikiems asmenims (3 lentelė). Reikšmingas eozinofilų skaičiaus, imunoglobulino E koncentracijos kraujyje ir indukuotų skreplių ląstelių gyvybingumas, indukuotuose skrepliuose padidėjimas nustatytas AA grupėje po provokacijos alergenu, $p < 0,05$. FeNO buvo reikšmingai didesnis



Periferinis kraujas eozinofilų išskyrimui ir serumas surinktas iš visų tiriamųjų ir sudarytos kombinuotosios kultūros su BLRL ir PF tokiu principu: A – kontrolinės BLRL / PF; B – BLRL / PF ir tiriamųjų eozinofilų kombinuotos kultūros; C – BLRL / PF ir tiriamųjų serumas (2 proc. v./v.); D – BLRL / PF ir tiriamųjų eozinofilų ir serumo kombinuotosios kultūros.

AA grupėje abiejų vizitų metu, lyginant su SA grupe, $p < 0,05$. Reikšmingų skirtumų sveikų asmenų grupėje nenustatyta.

Tarpląstelinio užpildo baltymų genų raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose

Nustatyta, kad AA eozinofilai reikšmingai skatina kolageno I, kolageno III, fibronektino, vitronektino, periostino ir vimentino genų raiškas BLRL ląstelėse, lyginant su kontrolinėmis BLRL (2 pav. A).

Disertacijos

AA ir SNEA tiriamųjų eozinofilai reikšmingai padidino kolageno I, kolageno V, fibronektino, dekorino ir vitronektino genų raiškas BLRL ląstelėse, lyginant su SA eozinofilų poveikiu. Taip pat, AA eozinofilai reikšmingai didino kolageno III geno raišką BLRL, lyginant su SA eozinofilų poveikiu. Kolageno I ir fibronektino genų raiška BLRL ląstelėse buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su SNEA eozinofilais nei su AA eozinofilais.

Alerginė astma sergančiųjų eozinofilai reikšmingai didino elastino, versikano ir dekorino genų raiškas PF, lyginant su SA eozinofilų poveikiu, kai SNEA eozinofilai skatino kolageno I, kolageno III, elastino ir dekorino bei mažino vitronektino genų raiškas PF, lyginant su SA eozinofilų poveikiu (2 pav. B). Taip pat, AA ir SNEA eozinofilai reikšmingai mažino tenaskino C geno raišką PF, lyginant su SA eozinofilų poveikiu.

Alergenų aktyvinti eozinofilai reikšmingai skatino kolageno I, fibronektino, elastino ir periostino genų raiškas BLRL, lyginant su neaktyvintų AA eozinofilų poveikiu.

MMP ir TIMP genų raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose

SNEA eozinofilai reikšmingai didino MMP-2 ir MMP-9 genų raiškas BLRL, lyginant su kontrolinėmis BLRL, $p < 0,05$ (4 pav. A). ADAM33 geno raiška BLRL ląstelėse buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su visų tiriamųjų grupių eozinofilais, tačiau SNEA eozinofilų poveikis buvo reikšmingiausias, lyginant su kitomis tiriamųjų grupėmis, $p < 0,05$. MMP-12 geno raiška po inkubacijos su AA eozinofilais buvo reikšmingai didesnė nei po inkubacijos su SA arba SNEA eozinofilais, $p < 0,05$ (4 pav. B). ADAM33 geno raiška PF buvo reikšmingai didesnė, lyginant su SA eozinofilų poveikiu PF, $p < 0,05$.

Alergenų aktyvinti eozinofilai reikšmingai skatino MMP-12 ir ADAM33 genų raiškas BLRL ląstelėse, lyginant su neaktyvintų eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$. Taip pat, alergenų aktyvinti eozinofilai neturėjo reikšmingo skatinamojo poveikio MMP genų raiškoms PF, lyginant su neaktyvintų eozinofilų poveikiu. TIMP-1 ir TIMP-2 genų raiška BLRL ir PF buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su astma sergančiųjų asmenų eozinofilais, lyginant su SA eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$.

1 lentelė. Demografiniai ir klinikiniai tirtų asmenų duomenys

	AA, n = 39	SNEA, n = 20	SA, n = 36
Amžius, mediana (min.–maks.), metai	25 (18–47)#	50 (28–80)*	27 (18–59)
Lytis, (V/M), n	18 / 21	10 / 10	14 / 22
KMI, kg/m ²	24,7 (17,3–40,1)	26,8 (17,5–37,3)	24,0 (17,0–34,4)
Įsijautrinimas <i>D. pteronyssinus</i> / <i>D. farinae</i> / beržų / penkių žolių alergenai, n	39 / 32 / 17 / 19	NR	NR
Papulės diametras sukeltas <i>D. pteronyssinus</i> alergeno, mediana (min.–maks.), mm	8 (4–15)	0	0
PD _{20M} , geometrinis vidurkis (min.–maks.), mg	0,12 (0,03–0,41)	ND	NR
FEV ₁ , proc. būtinio dydžio	88,9 ± 2,0*#	55,8 ± 6,1*	103,9 ± 1,7
FEV ₁ , l	3,7 ± 0,1#	1,8 ± 0,3*	4,0 ± 0,1
Kraujo eozinofilų skaičius, × 10 ⁹ /l	0,50 ± 0,05*	0,70 ± 0,10*	0,19 ± 0,01
Kraujo eozinofilų skaičius, proc.	5,4 ± 0,6*#	10,5 ± 2,0*	2,9 ± 0,3
IgE, IU/ml	316,0 ± 122,4*#	196,7 ± 49,7*	22,8 ± 3,4
FeNO, ppb	46,7 ± 6,7*#	59,0 ± 5,1*	12,9 ± 0,7

Duomenys pateikti mediana (ribos), geometrinis vidurkis (ribos), arba vidurkiu ± standartiniu vidurkiu nuokrypiu. AA NR – alerginė astma; FeNO – azoto monoksido frakcija iškvepiamajame ore; FEV₁ NR – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; IgE NR – imunoglobulinas E; M – moterys; NR – nebuvo atsako; ND NR – neatlikta; PD_{20M} NR – provokacinė metacholino dozė, nulėmusi FEV₁ sumažėjimą 20 proc.; SA NR – sveiki asmenys; SNEA NR – sunki nealerginė eozinofilinė astma; V NR – vyrai.

* $p < 0,05$, palyginus su sveikų asmenų grupe. # $p < 0,05$, palyginus su SNEA grupe. Statistinė analizė – skirtumams lyginti (nepriklausomų grupių duomenis) Mann-Whitney U-testas.

2 lentelė. Klinikiniai tirtų asmenų duomenys 24 val. po bronchų provokacijos *D. pteronyssinus* alergenais

	AA, n = 39		SA, n = 25	
	1 vizitas	2 vizitas	1 vizitas	2 vizitas
Kraujo eozinofilų skaičius, × 10 ⁹ /l	0,50 ± 0,05*	0,58 ± 0,05*#	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Kraujo eozinofilų skaičius, proc.	5,4 ± 0,6*	6,6 ± 0,5*#	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,3
IgE, IU/ml	316,0 ± 122,4*	401,7 ± 118,0*#	25,9 ± 4,1	24,0 ± 4,3
FeNO	59,0 ± 5,1*	68,7 ± 7,2*	12,5 ± 0,9	12,5 ± 1,0

Duomenys pateikti vidurkiu ± standartinis vidurkio nuokrypis. AA – alerginė astma; IgE – imunoglobulinas E; FeNO – azoto monoksido frakcija iškvepiamajame ore; SA – sveiki asmenys; 1 vizitas – prieš bronchų provokaciją alergenais; 2 vizitas – 24 val. po bronchų provokacijos alergenais.

* $p < 0,05$, palyginus su SA to paties vizito metu. # $p < 0,05$, palyginus su pirmo apsilankymo rezultatu toje pačioje grupėje.

Statistinė analizė – skirtumams toje pačioje grupėje, lyginant duomenis prieš ir 24 val. po bronchų provokacijos *D. pteronyssinus* alergenais – Wilcoxon suderintų porų ranginis testas.

Alergenų aktyvinti eozinofilai reikšmingai sumažino TIMP-1 geno raišką PF, lyginant su alergenais neaktyvintų eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$.

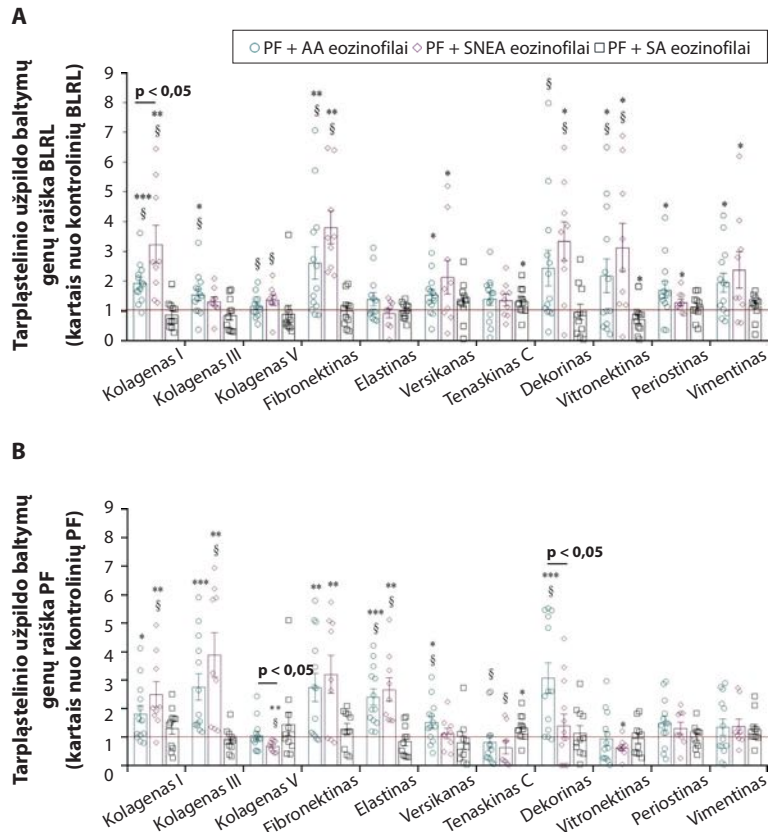
TGF-β1 signalinio kelio molekulių genų raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose

AA eozinofilų poveikis buvo reikšmingai didesnis TGF-β1, o SNEA eozinofilų – TGF-β1, LTBP1, LTBP3 genų raiškoms BLRL, lyginant su SA eozinofilų poveikiu.

kiu (5 pav. A). TGF- β 2 geno raiška PF buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su AA ir SNEA eozinofilais nei SA eozinofilais, o LTBP2 ir LTBP3 genų raiškos PF – po inkubacijos su SNEA eozinofilais, lyginant su SA eozinofilais. AA eozinofilai reikšmingai skatina TGFBRAP1 geno raišką BLRL ir ACVR1, ACVR1B, ACVR2A, TGFBR2 genų raiškas PF, lyginant su SA eozinofilų poveikiu (5 pav. B).

Taip pat, SNEA eozinofilų poveikis buvo reikšmingai didesnis ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, TGFBR1, TGFBRAP1 genų raiškai BLRL ir ACVR1, ACVR1B, ACVR2A, TGFBR2, TGFBR3, TGFBRAP1 genų raiškai PF, lyginant su SA eozinofilų poveikiu. AA eozinofilų poveikis Smad 5 geno raiškai BLRL ir Smad 1/2/3/4/7 genų raiškoms PF buvo reikšmingai didesnis nei SA eozinofilų. O SNEA eozinofilai reikšmingai didina Smad 2/3/4/7 genų raišką BLRL ir Smad 1/2/3/4/5/7 genų raišką PF, lyginant su SA eozinofilų poveikiu (5 pav. C; 6 pav. C).

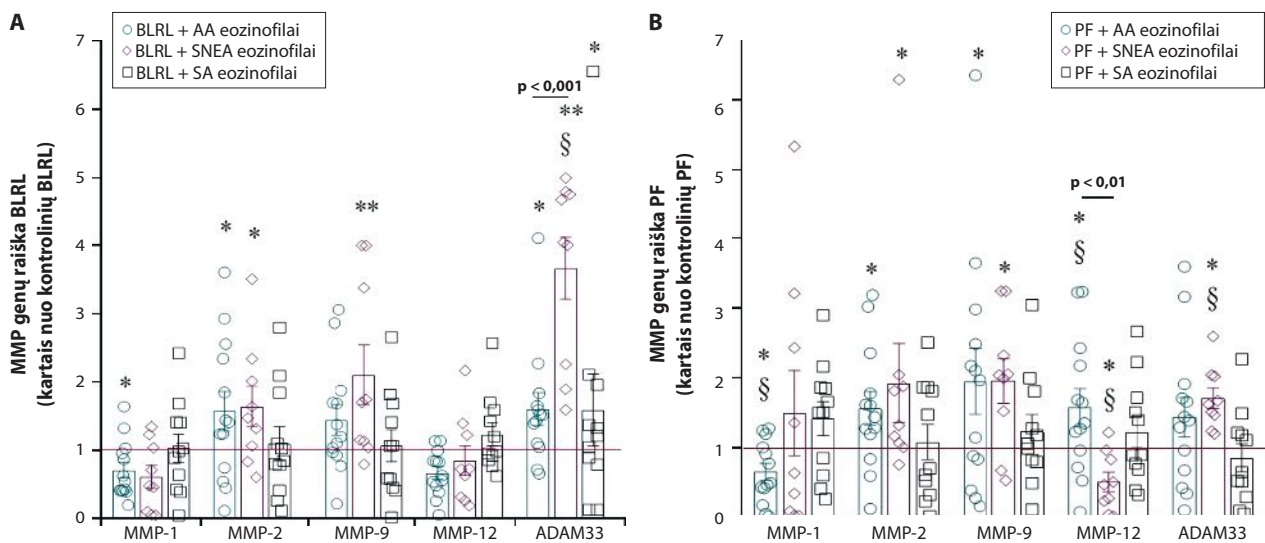
MAPK1, MAPK3, ROCK1, ROCK2, Smurf 1, Smurf 2 genų raiška BLRL ir RHOA, ROCK1, ROCK2 genų raiška PF buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su AA eozinofilais, lyginant su SA eozinofilų poveikiu (6 pav. D). SNEA eozinofilai reikšmingai skatina MAPK1, MAPK3, RHOA, ROCK1, ROCK2 genų raiškas abiejose ląstelių kultūrose, kai Smurf 1



2 pav. A – tarpląstelinio užpildo genų raiška BLRL; B – tarpląstelinio užpildo genų raiška PF

Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm standartinė paklaida, kartais nuo kontrolinių BLRL arba PF. AA – alerginė astma; BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelė; PF – plaučių fibroblastai; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. AA n = 13; SNEA n = 9; SA n = 11.

*p < 0,05, lyginant su kontrolinėmis BLRL ir PF. **p < 0,01, lyginant su kontrolinėmis BLRL arba PF. ***p < 0,001, lyginant su kontrolinėmis BLRL arba PF. §p < 0,05, lyginant su SA eozinofilų poveikiu.



3 pav. A – MMP genų raiška BLRL; B – MMP genų raiška PF

Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm standartinė paklaida, kartais nuo kontrolinių BLRL arba PF ir kartais nuo alergenu neaktyvintų AA eozinofilų poveikio BLRL arba PF. AA – alerginė astma; ADAM33 – disintegrinas ir metaloproteinazė 33 (angl. *A disintegrin and metalloproteinase 33*); BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelė; MMP – užpildo metaloproteinazė; PF – plaučių fibroblastai; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. AA n = 13; SNEA n = 9; SA n = 11. *p < 0,05, lyginant su kontrolinėmis BLRL ir PF. **p < 0,01, lyginant su kontrolinėmis BLRL arba PF; §p < 0,05, lyginant su SA eozinofilų poveikiu. §p < 0,05, lyginant su alergenu neaktyvintų AA eozinofilų poveikiu.

Disertacijos

ir Smurf 2 genų raiška buvo didesnė tik PF, lyginant su SA eozinofilų poveikiu (6 pav. D).

Alergenu aktyvinti eozinofilai reikšmingai didino TGF- β 1, TGF- β 2, Smad 4, ROCK1 genų raišką BLRL ir TGF- β 1, TGF- β , LTBP3, Smad 7 genų raišką PF, tačiau reikšmingai sumažino Smad 5 ir Smad 9 genų raiškas PF, lyginant su neaktyvintais eozinofilais.

Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiškumas

AA ir SNEA eozinofilai reikšmingai skatino BLRL sukiamą kolageno gelio disko susitraukimą, lyginant su SA eozinofilais, $p < 0,05$ (7 pav. A). Taip pat, SNEA eozinofilų poveikis BLRL sukiamo kolageno gelio disko susitraukimą, lyginant su AA eozinofilais, $p < 0,0001$. PF sukeltas kolageno gelio disko susitraukimas buvo reikšmingai skatinamas AA ir SNEA eozinofilų, lyginant su SA eozinofilų poveikiu, $p < 0,001$ (7 pav. B). AA ir SNEA serumo poveikis BLRL sukiamam kolageno gelio susitraukimui buvo reikšmingai mažesnis nei eozinofilų poveikis, $p < 0,05$. Sudėtinis AA ir SNEA eozinofilų ir tiriamųjų serumo poveikis buvo reikšmingai didesnis nei vien serumo poveikis, $p < 0,05$.

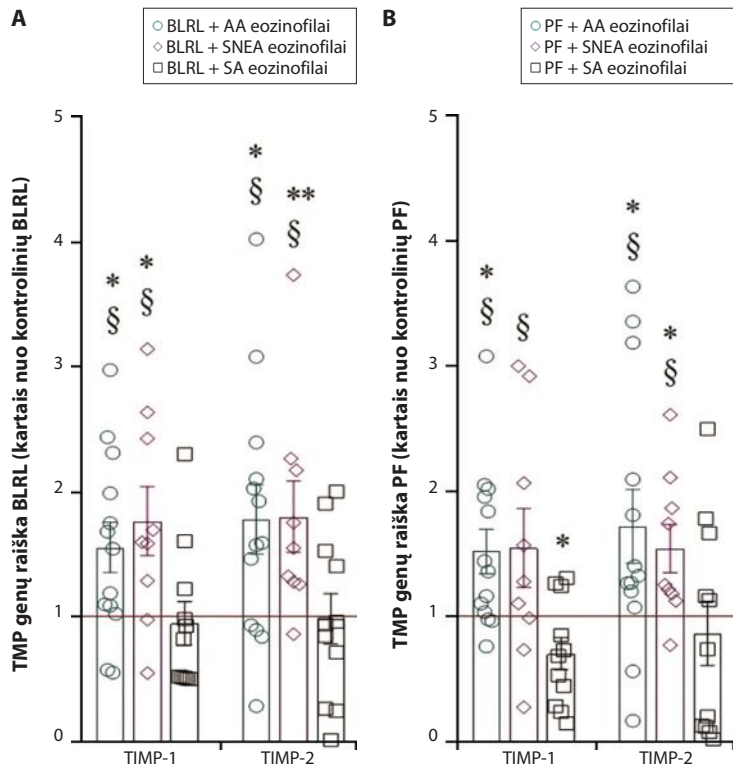
Sudėtinis AA ir SA eozinofilų ir tiriamųjų serumo poveikis PF sukiamam kolageno gelio disko susitraukimui buvo reikšmingai didesnis nei vien eozinofilų arba tiriamųjų serumo poveikis, $p < 0,05$.

Tarp SNEA tiriamųjų serumo ir sudėtinio SNEA eozinofilų B ir tiriamųjų serumo poveikio reikšmingų skirtumų PF sukiamam kolageno gelio disko susitraukimui nenustatyta.

Alergenu aktyvinti AA eozinofilai reikšmingai didina BLRL sukiamą kolageno gelio disko susitraukimą, lyginant su alergenu neaktyvintų AA eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$, kuomet PF sukiamam kolageno gelio disko susitraukimui, lyginant su alergenu neaktyvintų AA eozinofilų poveikiu, neturėjo.

Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų diferenciacija į sintetinį-proliferacinį ir kontraktilinį fenotipus

Kontraktilinių žymenų genų raiška (α -sm-aktino, sm-MHC, SM22, sm-MLCK BLRL ir α -sm-aktino PF) ir pagrindinių skaidulinių tarpląstelinio užpildo baltymų (kolageno I ir fibronektino) BLRL ir PF buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su AA ir SNEA eozinofilais, lyginant su SA eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$. Kolageno V geno raiška BLRL ir PF po inkubacijos su AA, SNEA ir SA tiriamųjų eozinofilais



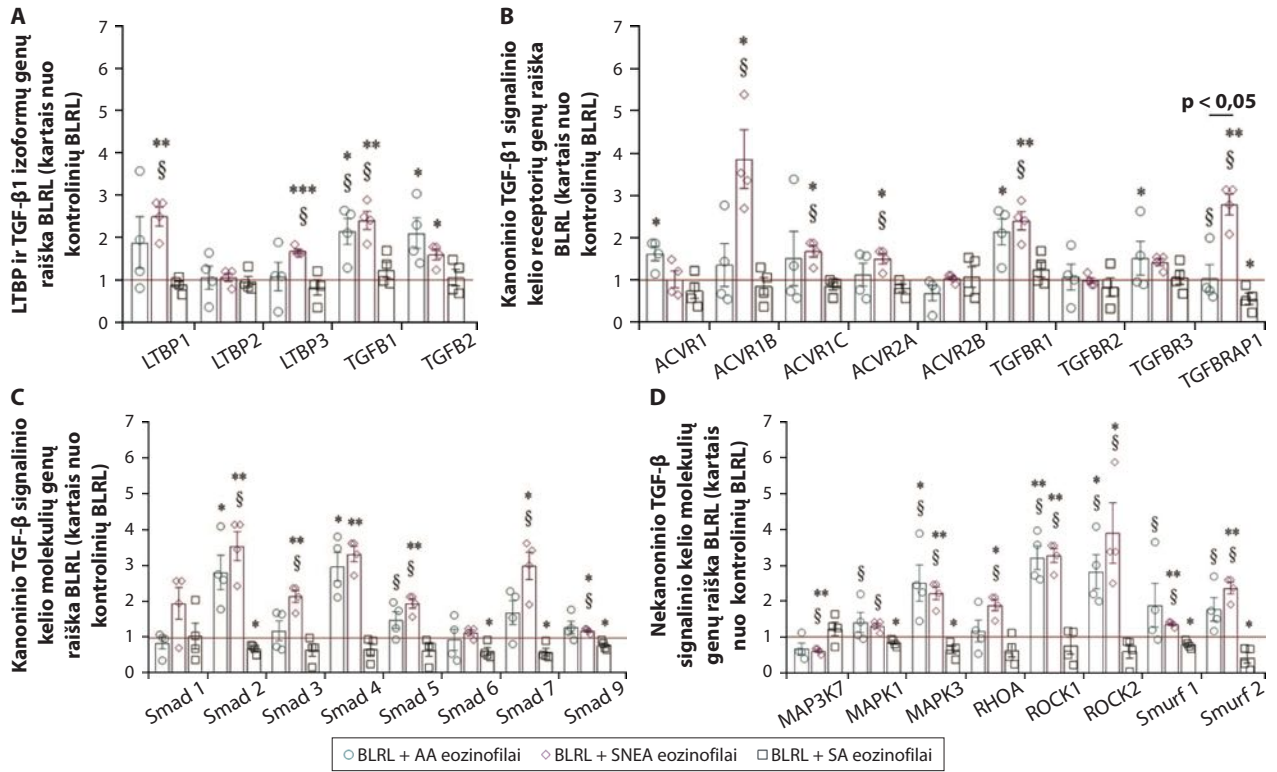
4 pav. A – TIMP genų raiška BLRL; B – TIMP genų raiška PF

Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm standartinė paklaida, kartais nuo kontrolinių BLRL arba PF ir kartais nuo alergenu neaktyvintų AA eozinofilų poveikio BLRL arba PF. AA – alerginė astma; BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelė; MMP – užpildo metaloproteinazė; PF – plaučių fibroblastai; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma; TIMP – metaloproteinazių audinių inhibitoriai (angl. *Tissue inhibitor of metalloproteinases*). AA n = 13; SNEA n = 9; HS n = 11.

* $p < 0,05$, lyginant su kontrolinėmis BLRL ir PF. ** $p < 0,01$, lyginant su kontrolinėmis BLRL arba PF. § $p < 0,05$, lyginant su SA eozinofilų poveikiu. # $p < 0,05$, lyginant su alergenu neaktyvintų AA eozinofilų poveikiu.

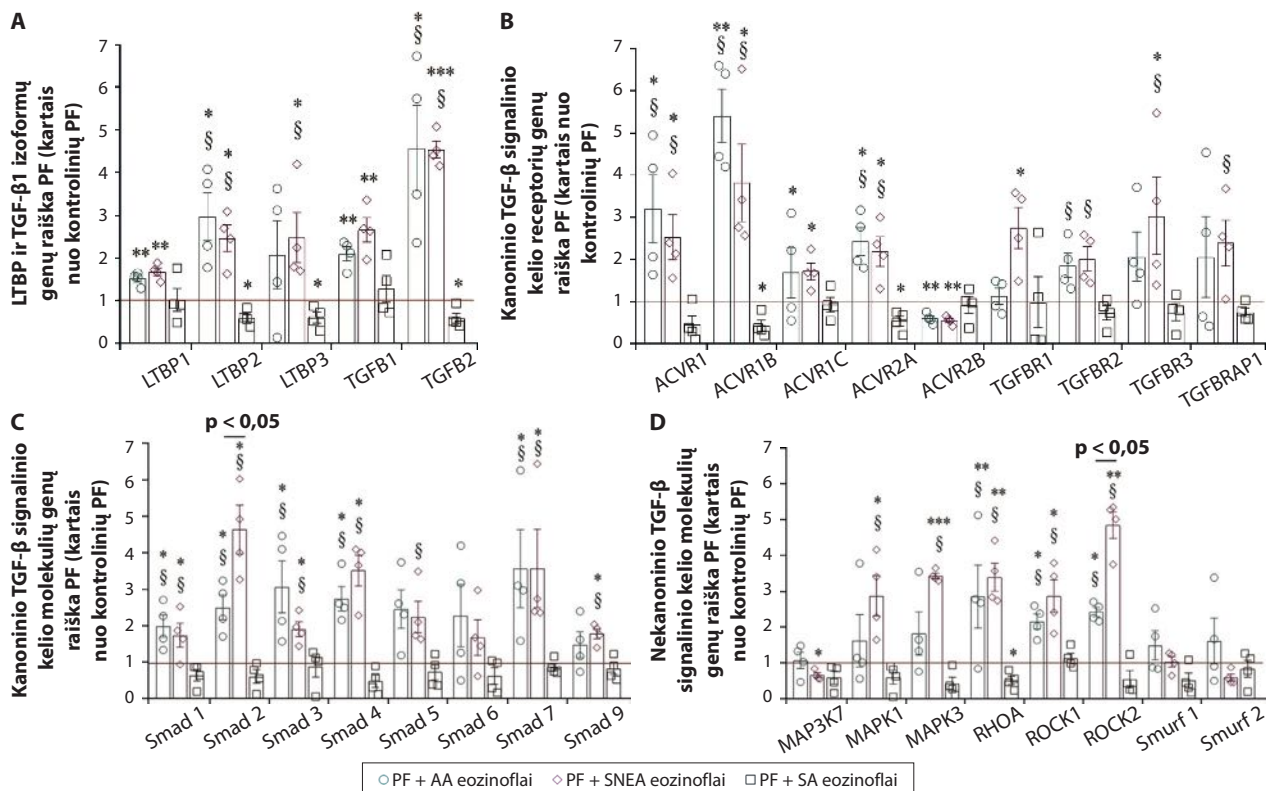
tarp grupių nesiskyrė. SNEA eozinofilai reikšmingai skatino α -sm-aktino, sm-MHC, SM22 genų raišką BLRL, lyginant su AA eozinofilais, $p < 0,05$; kai skirtumų tarp AA ir SNEA eozinofilų poveikio kolageno I, fibronektino ir sm-MLCK genų raiškoms nebuvo nustatyta (10 pav. A). Kolageno I ir α -sm-aktino genų raiška PF buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su SNEA eozinofilais, lyginant su AA eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$; kai reikšmingų skirtumų fibronektino genų raiškai PF tarp AA ir SNEA grupių nenustatyta (8 pav. B).

Alergenu aktyvinti AA eozinofilai visų prieš tai įvardytų genų raišką, išskyrus kolageno V, reikšmingai padidino BLRL ir PF, lyginant su neaktyvintų AA eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$. Kolageno I, fibronektino, α -sm-aktino, sm-MHC, SM22 ir sm-MLCK genų raiška BLRL buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su alergenu aktyvintais AA eozinofilais, lyginant su SA eozinofilais, $p < 0,05$. Kolageno I, fibronektino, α -sm-aktino genų raiška PF buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su alergenu aktyvintais AA eozinofilais, lyginant su SA eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$.



5 pav. TGF-β signalinio kelio molekulių genų raiška BLRL

AA – alerginė astma; BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelės; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. AA, n = 4, SNEA, n = 4, HS, n = 4. Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinė paklaida, kartais nuo kontrolinių BLRL. *p < 0,05, lyginant su kontrolinėmis BLRL. **p < 0,01, lyginant su kontrolinėmis BLRL. ***p < 0,001, lyginant su kontrolinėmis BLRL. §p < 0,05, lyginant su SA eozinofilų poveikiu.



6 pav. TGF-β signalinio kelio molekulių genų raiška PF

AA – alerginė astma; PF – plaučių fibroblastai; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. AA, n = 4, SNEA, n = 4, HS, n = 4. Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinė paklaida, kartais nuo kontrolinių PF. *p < 0,05, lyginant su kontrolinėmis PF; **p < 0,01, lyginant su kontrolinėmis PF; ***p < 0,001, lyginant su kontrolinėmis PF; §p < 0,05, lyginant su SA eozinofilų poveikiu.

Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų migracija

AA ir SNEA eozinofilai reikšmingai skatina BLRL migraciją, lyginant su SA eozinofilų poveikiu, $p < 0,0001$ (9 pav.). Taip pat, SNEA eozinofilai reikšmingai skatina BLRL migraciją, lyginant su AA eozinofilų poveikiu, $p < 0,05$. AA ir SNEA tiriamųjų grupių serumas statistiškai reikšmingai mažiau skatino BLRL migraciją nei šių grupių eozinofilai, $p < 0,05$. Taip pat, sudėtinis AA ir SNEA tiriamųjų grupių eozinofilų ir serumo poveikis BLRL migracijai buvo reikšmingai didesnis nei vien eozinofilų poveikis, $p < 0,05$.

PF migracija buvo reikšmingai didesnė po inkubacijos su AA ir SNEA eozinofilais, lyginant su AA ir SNEA tiriamųjų serumo poveikiu, $p < 0,05$. Taip pat, PF migracija buvo reikšmingai intensyvesnė po inkubacijos su AA ir SNEA grupių eozinofilais ir serumu, lyginant su tik serumo poveikiu, $p < 0,05$.

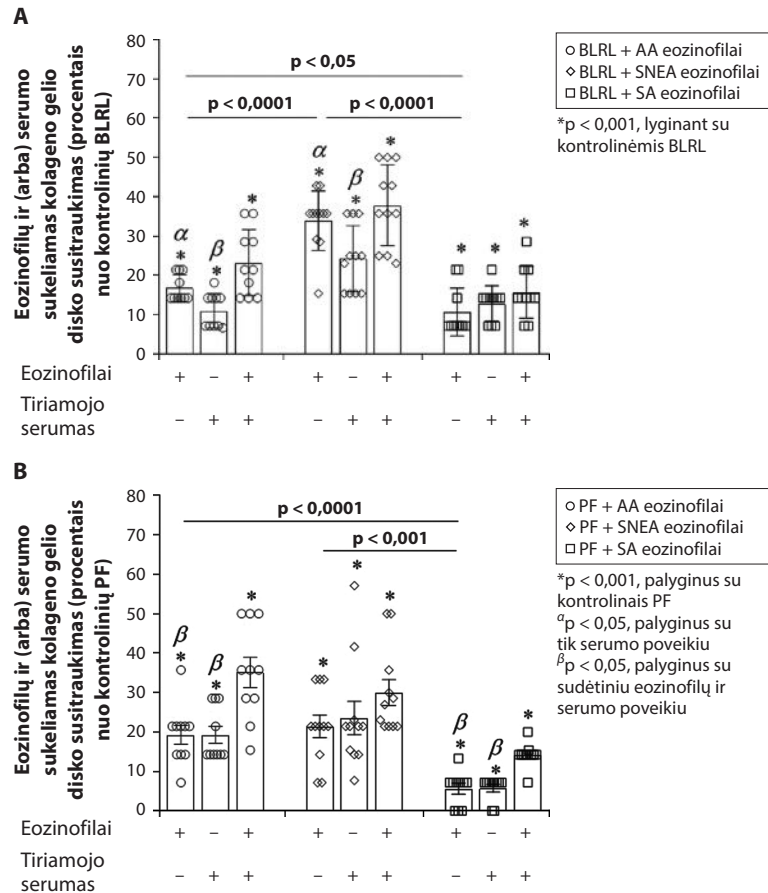
Sudėtinis AA eozinofilų ir serumo poveikis PF migracijai buvo reikšmingai didesnis nei tik AA eozinofilų poveikis, $p < 0,05$.

BLRL ir PF migracija buvo reikšmingai intensyvesnė po inkubacijos su alergenu aktyvintais AA eozinofilais, palyginus su neaktyvintais, $p < 0,05$. AA serumas po provokacijos alergenu turėjo reikšmingai didesnę poveikį BLRL migracijai nei prieš provokaciją alergenu, $p < 0,05$. AA sergančių asmenų eozinofilų ir sudėtinis poveikis po provokacijos buvo reikšmingai didesnis nei serumo; sudėtinis eozinofilų ir serumo poveikis buvo reikšmingai didesnis BLRL migracijai nei vien serumo poveikis, $p < 0,05$. Sudėtinis eozinofilų ir serumo poveikis BLRL ir PF migracijai buvo labiau išreikštas po provokacijos alergenu, lyginant su duomenimis prieš provokaciją, $p < 0,01$.

REZULTATŲ APTARIMAS

Tarpląstelinio užpildo baltymų genų raiška bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose

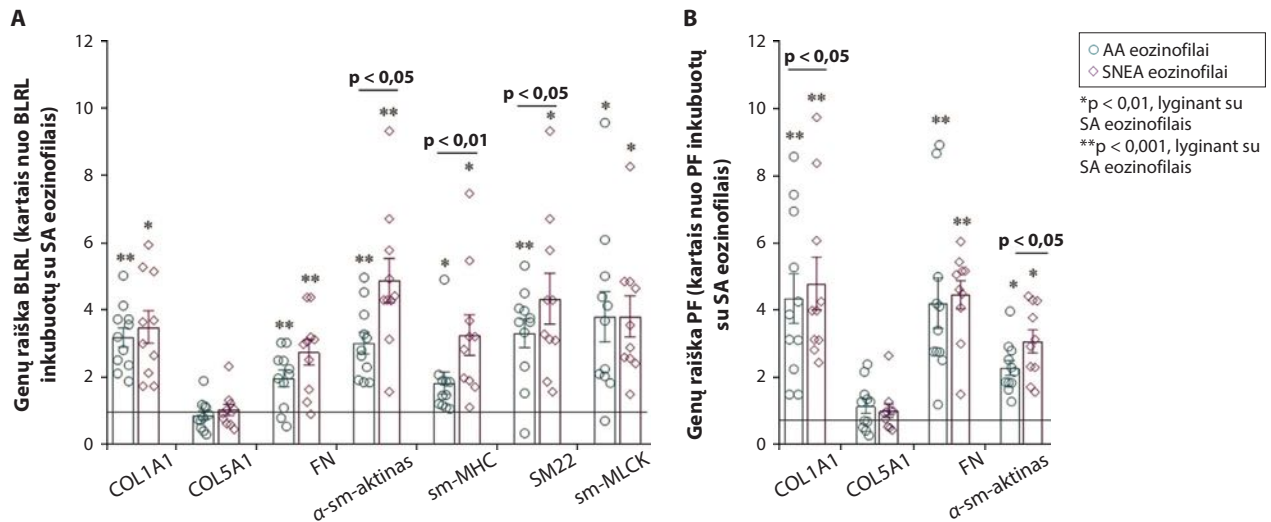
Tarpląstelinio užpildo apykaita yra nuolatinė tarpląstelinio užpildo baltymų sintezė ir ardymas. Mūsų tyrimo duomenimis, astma sergančių asmenų eozinofilai skatina tarpląstelinio užpildo baltymų, tokių kaip kolagenas I, fibronektinas, versikanas, elastinas, tenaskinas C, dekorinas, periostinas ir vimentinas, genų raišką BLRL ir PF. Kitų autorių duomenys neprieštarauja mūsų tyrimo gautiems duomenims: žmogaus astmos



7 pav. A – Tiriamųjų eozinofilų ir (arba) serumo poveikis BLRL sukeltam kolageno gelio disko susitraukimui; B – Tiriamųjų eozinofilų ir (arba) serumo poveikis PF sukeltam kolageno gelio disko susitraukimui

Duomenys pateikti kaip procentai nuo kontrolinių BLRL ir PF ląstelių, kurios nebuvo inkubuojamos su eozinofilais ir (arba) serumu, kaip vidurkis \pm standartinė paklaida. Į individualias sudėtines ląstelių kultūras pilamas kiekvieno tiriamąjo serumas, 2 proc. v/v. AA – alerginė astma; BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelės; PF – plaučių fibroblastai; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. α $p < 0,05$, palyginus su tik serumo poveikiu; β $p < 0,05$, palyginus su sudėtinis eozinofilų ir serumo poveikiu. A – * $p < 0,001$, palyginus su kontrolinėmis BLRL. B – * $p < 0,01$, palyginus su kontroliniais PF. AA n = 12; SNEA n = 11; SA n = 10.

tyrimų metu (*in vivo*, *ex vivo*), gyvūnų modeliuose ir ląstelių kultūrų tyrimuose nustatytas kolageno I [39, 40], fibronektino [40–42], versikano [43, 44], elastino [45], tenaskino C, periostino [46–54] ir vimentino [55] genų ir (arba) baltymų raiškos padidėjimas BLRL ir PF. Taip pat, mūsų tyrimo metu nustatytas tarpląstelinio užpildo baltymus degraduojamųjų fermentų – užpildo metaloproteinazių – MMP-2, MMP-9, ADAM33 genų raiškos padidėjimas BLRL ir PF po inkubacijos astma sergančių asmenų eozinofilais. Panašūs rezultatai nustatyti ir kitų autorių tyrimų metu – MMP-2 ir MMP-9 kiekiai buvo didesni astma sergančių asmenų kvėpavimo takuose nei sveikų asmenų [45, 56]. Taip pat, kito tyrimo metu parodyta, kad sergant astma MMP-2 perdėta raiška veikia kaip apsauginis mechanizmas, kurio metu MMP-2 skatina makrofagų diferenciaciją į M1 fenotipą, mažina kvėpavimo takų įsijautrinimą,



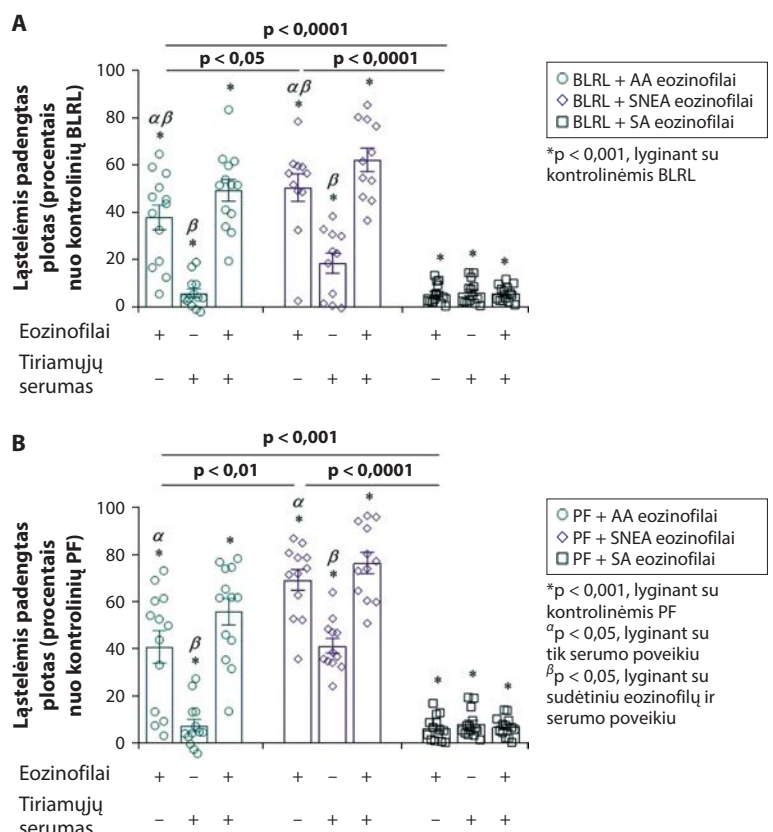
8 pav. BLRL (A) ir PF (B) diferenciacijos žymenų genų raiška

Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida kartais nuo SA eozinofilų poveikio. AA – alerginė astma; BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelės; PF – plaučių fibroblastai; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. AA n = 12; SNEA n = 11; SA n = 10. *p < 0,01, lyginant su SA eozinofilų poveikiu. **p < 0,001, lyginant su SA eozinofilų poveikiu.

2 tipo uždegimo citokinų ir IgE sintezę [56, 57]. MMP, valdančių inhibitorių raišką, tokių kaip TIMP-1 ir TIMP-2 raišką, mūsų tyrime buvo padidėjusi BLRL ir PF po inkubacijos su astma sergančių asmenų eozinofilais. Dėl TIMP-1 ir TIMP-2 padidėjusios raiškos MMP aktyvumas yra blokuojamas, todėl didėja nesuirusių ir kvėpavimo takų sienelėje susikaupusių tarpląstelinio užpildo baltymų kiekis [58]. Taigi, eozinofilai skatina tarpląstelinio užpildo baltymų ir MMP ir TIMP genų raišką BLRL ir PF, prisidedami prie kvėpavimo takų remodeliavimosi procesų.

TGF- β signalinis kelias ir jo reikšmė bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms ir plaučių fibroblastams

TGF- β yra pleotropinis citokinas, kuris dalyvauja daugelyje ląstelei svarbių gyvavimo etapų, įskaitant proliferaciją, diferenciaciją į aktyvesnius ląstelių fenotipus, išgyvenamumą ir apoptozę. Uždegiminės ir kvėpavimo takų struktūrinės ląstelės ne tik reaguoja į pasikeitusį TGF- β kiekį aplinkoje per gausų TGF- β receptorių tinklą, tačiau ir pačios sintetina ir išskiria šį citokiną. TGF- β poveikis gali būti skiriamas į du skirtingus mechanizmus, veikiančius antagonistiskai: viena vertus, TGF- β gali būti prouždegiminis, kita vertus – antiuždegiminis mediatorius [32]. TGF- β skatina poepitelinę fibrozę,



9 pav. A – Tiriamųjų eozinofilų ir (arba) serumo poveikis BLRL migracijai; B – Tiriamųjų eozinofilų ir (arba) serumo poveikis PF migracijai

Duomenys pateikti kaip ląstelėmis padengtas plotas, procentai nuo kontrolinių BLRL ir PF ląstelių, kurios nebuvo inkubuojamos su eozinofilais ir (arba) serumu, kaip vidurkis \pm standartinė paklaida. Į individualias sudėtines ląstelių kultūras piltas kiekvieno tiriamojo serumas, 2 proc. v./v. AA – alerginė astma; BLRL – bronchų lygiųjų raumenų ląstelės; PF – plaučių fibroblastai; SA – sveiki asmenys; SNEA – sunki nealerginė eozinofilinė astma. α p < 0,05, palyginus su tik serumo poveikiu; β p < 0,05, palyginus su sudėtinu eozinofilų ir serumo poveikiu. A – *p < 0,001, palyginus su kontrolinėmis BLRL. B – *p < 0,001, palyginus su kontroliniais PF. AA n = 12; SNEA n = 11; SA n = 10.

Disertacijos

didindamas tarpląstelinio užpildo baltymų sintezę ir kaupimąsi kvėpavimo takuose [33]. Pagrindinės ląstelės, atsakingos už tarpląstelinio užpildo sintezę sergant astma, yra kvėpavimo takų struktūrinės ląstelės, tokios kaip BLRL ir PF. Šios ląstelės, veikiant TGF- β , diferencijuoja į aktyvesnius ląstelių fenotipus, dėl ko BLRL ir PF tampa aktyvesnės – didėja tarpląstelinio užpildo baltymų sintezė, gamyba, ir ląstelės geba intensyviau susitraukti. Šie procesai yra kvėpavimo takų remodeliavimosi sergant astma dalis.

BLRL ir PF gausiai išskiria neaktyvintą TGF- β formą, kuri kaupiasi tarpląsteliniam užpilde. Neaktyvinta (latentinė) TGF- β forma yra TGF- β ir peptido 1 junginys, kai pastarojo pašalinimas laikomas TGF- β aktyvinimu. Ši reakcija katalizuojama keletu proteazių, tokių kaip MMP-2 ir MMP-9, plazminas, trombospondinas-1, kalpaninų ir kitų įvairių mediatorių [34, 35].

TGF- β signalinis kelias yra skirstomas į kanoninį – nuo Smad molekulių priklausomą – ir nekanoninį – nuo Smad molekulių nepriklausomą – signalinius kelius. Kanoninis signalinis kelias susijęs su intensyvesne tarpląstelinio užpildo baltymų gamyba ir susikaupimu kvėpavimo takų sienelėje, o nekanoninis kelias susijęs su ląstelių kontraktiškumu, migracija ir proliferacija [61]. TGF- β šeimai priklauso trys jo izoformos: TGF- β 1, TGF- β 2 ir TGF- β 3. Tyrimo metu nustatyta, kad TGF- β 1 ir TGF- β 2 genų raiška padidėjo BLRL ir PF po inkubacijos su astma sergančių asmenų eozinofilais, o TGF- β 3 geno raiška analizės metu išvis nebuvo nustatyta. Taigi, TGF- β signalinis kelias aktyvinamas, kai TGF- β fosforilina receptorius – TGF- β R1, TGF- β R2 ir TGF- β R3. Nustatyta, kad BLRL ir PF astma sergančių asmenų eozinofilai didina TGF- β R1 ir TGF- β R3 genų raiškas. Buvo parodyta, kad TGF- β R1 ir TGF- β R2 raiška ant ląstelės išorinės membranos yra didesnė sergant astma [37, 38].

Kanoninis arba Smad signalinis kelias aktyvinamas, kai TGF- β receptoriai fosforilinami – fosforilintos Smad 2 ir Smad 3 molekulės prisijungia prie Smad 4, o tai inicijuoja genų taikinių transkripciją ir skatina ląstelių proliferaciją, tarpląstelinio užpildo baltymų raišką, ląstelių išgyvenamumą, uždegiminius procesus [69]. Šiame tyrime eozinofilai skatina abiejų – kanoninio ir nekanoninio – TGF- β signalinio kelio molekulių genų raišką. Wnuk ir kt. atliktame tyrime nustatyta, kad Smad 2 ir Smad 3 raiška ir aktyvumas buvo didesni astma sergančių asmenų pirminiuose bronchų fibroblastuose nei ne astmos pacientų [40]. Mūsų tyrimo duomenys atitinka anksčiau minėto tyrimo rezultatus – Smad 2 ir Smad 3 genų raiška PF buvo didesnė po inkubacijos su astma sergančių asmenų eozinofilais nei SA eozinofilais. Tačiau šiame tyrime nustatytas ir antifibrozinis Smad 1 ir Smad 5 genų raiškos padidėjimas PF, kai Wnuk ir kt. nustatė Smad 1 ir Smad 5 genų raiškos sumažėjimą, kurį galėjo lemti gydymo

taikymas astma sergantiems asmenims. Schwartze ir kt. duomenimis, gliukokortikosteroidai aktyvino receptorius, Smad 1, Smad 5 ir Smad 9 raišką, ir mažino TGFBR1, Smad 2, Smad 3 aktyvumą [41]. Kito tyrimo duomenimis, gydymas TGF- β 1-neutralizuojamaisiais antikūnais mažina TGF- β 1 raišką ir Smad 2 ir Smad 3 signalinio kelio aktyvumą pelių nosies ir plaučių audiniuose [42]. Taigi, reikėtų apsvarstyti visus galimus gydymo būdus, susijusius su eozinofilais ir TGF- β signaliniu keliu kvėpavimo takų struktūrinėse ląstelėse.

SNEA eozinofilų reikšmė TGF- β signalinio kelio molekulių genų raiškai BLRL ir PF buvo didžiausia iš visų tiriamųjų grupių ir tai gali būti pagrįsta eozinofilų aktyvumo skirtumais. SNEA eozinofilai buvo aktyvesni, lyginant su AA eozinofilais, todėl jie išskyrė daugiau įvairių uždegiminių citokinų ir buvo jautresni aplinkos pokyčiams dėl padidėjusios receptorių raiškos ant išorinės membranos [43]. Taigi, eozinofilai turi neabejotiną reikšmę BLRL ir PF aktyvinimui ir TGF- β signalinio kelio molekulių genų raiškai. Eozinofilų, BLRL ir PF išskiriamas TGF- β reikšmingai prisideda prie sergant astma vykstančių kvėpavimo takų remodeliavimosi mechanizmų.

Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiškumas ir migracija

Ankstesniuose tyrimuose įrodyta, kad astma sergančių asmenų eozinofilų adhezija prie kvėpavimo takų struktūrinių ląstelių buvo padidėjusi [19]. Į kvėpavimo takus migravę ir adhezavę eozinofilai degranuliuoja ir išskiria įvairius augimo veiksnius, kurie keičia BLRL, PF ir epitelinių ląstelių elgseną – sukliamas kvėpavimo takų remodeliavimasis [44]. Kvėpavimo takų remodeliavimasis apibūdinamas kaip struktūrinis ląstelių sudėties persitvarkymas, sutrikusi normali ląstelių funkcija ir sutrikusi tarpląstelinio užpildo baltymų gamyba. Vienas iš kvėpavimo takų remodeliavimosi požymių yra padidėjęs kvėpavimo takų struktūrinių ląstelių kontraktiškumas ir diferenciacija į ląstelių kontraktilinį fenotipą. Padidėjęs BLRL ir PF kontraktiškumas ir migracija reikšmingai prisideda prie astmos simptomų pasireiškimo, tačiau apie eozinofilų reikšmę šiems procesams informacijos vis dar trūksta.

Pirminė BLRL funkcija yra reguliuoti kvėpavimo takų tonusą per susitraukimo ir atsipalaidavimo pusiausvyrą, reaguojant į vietinius arba cirkuliuojamuosius veiksnius [45]. BLRL yra vienos pagrindinių reguliacinių ląstelių sergant astma, kurios ne tik gamina tarpląstelinio užpildo baltymus, prouždegiminius ir antiuždegiminius veiksnius, tačiau ir reguliuoja kitų struktūrinių ląstelių proliferaciją, migraciją ir apoptozę [45]. Kitų autorių tyrimai parodė, kad astma sergančiųjų BLRL sugeneravo didesnę susitraukimo jėgą ir atsipalaidavimą nei sveikų asmenų BLRL [46]. Mūsų tyrime astma sergančiųjų eozinofilai skatino BLRL

sukeliamo kolageno gelio susitraukimą. Didžiausią poveikį susitraukimui turėjo SNEA eozinofilai. Šiuos rezultatus galima paaiškinti eozinofilų aktyvumo skirtumais įvairiose astmos grupėse.

Lygiųjų raumenų ląstelėse yra aktino ir miozino gijų tinklas [47]. Susitraukimą inicijuoja Ca^{2+} kalmodulino sąveika, kuri skatina miozino lengvosios grandinės fosforilinimą. Šis procesas priklauso nuo RhoA/Rho signalinio kelio aktyvumo. Sergant astma, šis procesas sutrinka ir BLRL susitraukimas yra spazminis, ilgesnis nei įpastai, dėl ko susiaurėja bronchai [48]. Tai gali būti paaiškinta kvėpavimo takų eozinofilija ir eozinofilų išskiriamais prouždegiminiais mediatoriais, tokiais kaip TGF- β , kuris jungiasi prie BLRL išorinio membranos paviršiaus esančių TGF- β receptorių ir aktyvina TGF- β signalinį kelią, taip pat aktyvindamas ir RhoA signalinio kelio aktyvumą. Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad RhoA genų raišką didina astma sergančiųjų eozinofilai, dėl ko galėjo didėti ir BLRL kontraktiškumas. Šie pokyčiai ryškiausi po inkubacijos su SNEA eozinofilais.

Fibroblastų susitraukimas yra susijęs su diferenciacija į produktyvesnį ir labiau susitraukiantį fenotipą, žinomą kaip miofibroblastai. Miofibroblastai yra mezenchiminės ląstelės, kurios dažnai apibūdinamos kaip fibroblastų ir lygiųjų raumenų ląstelių hibridas dėl padidėjusios α -sm-aktino raiškos, kuri matoma ląstelių streso skaidulose [49]. Miofibroblastų kontraktiškumo mechanizmas sudarytas iš aktiną turinčių skaidulų, kurios prisijungusios prie ląstelės sienelėje susidarantių židinių adhezijos centrų [49]. Aktino streso skaidulos, aktyvuojamos tirpių mediatorių, susiekia su tarpląstelinio užpildo baltymais per židinius adhezijos centrus [14]. Šiame tyrime nustatyta, kad PF sukeliamas kolageno gelio susitraukimas skatinamas eozinofilų, ypač astma sergančių asmenų. Šiuo atveju eozinofilai yra streso veiksnys, kuris sukelia PF diferenciaciją į miofibroblastus ir susitraukimą.

Padidėjusi fibronektino raiška gali paaiškinti, kodėl SNEA ir AA eozinofilų poveikis PF kontraktiškumui neturi esminių skirtumų – nustatyta, kad fibronektino raiška PF po inkubacijos su SNEA ir PF eozinofilais buvo panaši. Viduląstelinis fibronektinas, α -sm-aktinas ir integrinai yra būtini komponentai fibroblastų susitraukimui [50]. Be to, SNEA eozinofilų poveikis PF susitraukimui gali nesiskirti nuo AA eozinofilų poveikio dėl didelės inhaliuojamųjų steroidų dozės, nes jie slopina kraujo eozinofilų aktyvinimą ir adheziją [51]. T. Zhang ir kt. taikė dinaminę mikroskalės platformą fibroblastų susitraukimui analizuoti, pasitelkė kolageno I gelį ir nustatė, kad eozinofilai skatina PF susitraukimą [52]. T. Zhang ir kt. eksperimentuose naudojama žmogaus mieloidinių leukeminių eozinofilų ląstelių linija, kuri negali atspindėti astma sergančių asmenų kraujo eozinofilų savybių ir poveikio kvėpavimo takų struktūrinėms ląstelėms. Taigi, eozinofilai skatina

BLRL ir PF susitraukimą, taip prisidedami prie astmos metu vykstančių kvėpavimo takų remodeliavimosi procesų.

Vienas iš astmos simptomų pasireiškimui svarbių remodeliavimosi požymių yra kvėpavimo takų sienelės sustorėjimas, kuris yra susijęs su raumeninės masės didėjimu [53]. Ląstelių kontraktiškumas ir migracija yra vienas kitam artimi procesai. Migracija yra sudėtinga ląstelės susitraukimo ir atsipalaidavimo procesų visuma, kuri aktyvinama įvairiais signaliniais keliais ir valdoma reakcijų grandinėmis, kurių metu aktyvinami kontraktiniai baltymai [12]. Manoma, kad BLRL migracija prisideda prie astmai būdingos BLR hiperplazijos [12]. Šio tyrimo metu nustatyta, kad BLRL migraciją skatina astma sergančių asmenų eozinofilai, ypač SNEA eozinofilai. Tai galima paaiškinti eozinofilų aktyvumo skirtumais – astma sergančiųjų eozinofilai yra aktyvesni nei SA, todėl jie išskiria didesnius kiekius įvairių citokinų, kurie aktyvina BLRL. Tarpląstelinio užpildo ir ląstelių tarpusavio sąveika palaiko fiziologines ląstelių funkcijas ir yra svarbi tokiems patologiniams procesams kaip žaizdų gijimas, audinių fibrozė, rando formavimasis [54]. Sergant astma šie procesai taip pat susiję su intensyvesne PF migracija [55].

Eozinofilų išskiriamas katijoninis baltymas ir TGF- β stimuliuoja PF migraciją, kuri sąlygoja kvėpavimo takų pamatinės membranos sustorėjimą [56]. Tyrime astma sergančių asmenų eozinofilai, ypač SNEA eozinofilai, skatino PF migraciją, kuri taip pat galėjo priklausyti nuo aktyvesnių astma sergančiųjų eozinofilų ir padidėjusio uždegiminių mediatorių kiekio. Astma sergančių asmenų kvėpavimo takų biopsijų tyrimai atskleidė skirtingą eozinofilų aktyvumą ir degranuliacines savybes, lyginant asmenis, sergančius AA, alerginiu rinitu, nosies polipoze ir kitomis kvėpavimo takų ligomis [98].

Intensyvesnė BLRL ir PF migracija reikšmingai prisidėjo prie bronchų sienelės sustorėjimo, kuri yra vienas iš kvėpavimo takų remodeliavimosi požymių sergant astma.

Bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų diferenciacija į sintetinamąjį-proliferacinį ir kontraktinį fenotipus

Kvėpavimo takų spindžio siaurėjimas yra susijęs su BLRL geba susitraukti dėl didesnio ir lengvesnio akino ir miozino molekulių sukibimo, BLRL hipertrofijos, hiperplazijos, kvėpavimo takų sienelės edemos ir tarpląstelinio užpildo baltymų kaupimosi [57]. Tyrimai parodė, kad BLRL sluoksnio masės padidėjimas koreliuoja su astmos sunkumu ir kvėpavimo takų jautrumu metacholinui [53].

Eozinofilai gali prikibti prie struktūrinių kvėpavimo takų ląstelių, tokių kaip BLRL ir PF, ir išskirti

Disertacijos

šių ląstelių migraciją skatinančias molekules [58, 59]. BLRL gali būti skiriami į du pagrindinius patologinius fenotipus, siejamus su to proceso didesniu intensyvumu: proliferacinius-sekrecinius BLRL ir kontraktilinius BLRL [46]. Įrodyta, kad padidėjusi BLRL proliferacija ir intensyvesnė tarpląstelinio užpildo gamyba būna kartu, todėl laikoma, kad tai vienas BLRL fenotipas [61]. Mūsų tyrimas parodė, kad tiek kontraktiliniam, tiek sintetinamajam-proliferaciniam BLRL fenotipui būdingų genų raiška buvo intensyvesnė po inkubacijos su AA ir SNEA eozinofilais, vadinasi, BLRL buvo aktyvintos ir diferencijavo į aktyvesnius BLRL fenotipus. Kas sukelia BLRL diferenciaciją iki šiol lieka diskusijų objektu, tačiau sutariama, kad šis procesas prisideda prie astmos patogenezės [80, 108, 109]. Taip pat, nežinoma, koku santykiu pasiskirsto sintetinamasis-proliferacinis ir kontraktilinis fenotipai ir ar jie išvis gali atsirasti *in vivo* [62, 63]. Nustatyta, kad astma sergančių asmenų BLRL reakcija skyrėsi nuo nesergančių astma BLRL: BLRL iš astma sergančių asmenų buvo hiperkontraktilinės, hipersintetinės ir hiperproliferacinės tuo pačiu metu [64]. Fenotipų virsmo teorija supriešina kontraktilinę ir proliferacinę BLRL gebą, todėl teigiama, kad BLRL populiacija yra heterogeniška ir abu fenotipai gali egzistuoti vienu metu [46, 60].

PF yra itin kompleksinės ląstelės, kurios sukuria kitoms, funkcinėms, ląstelėms atramą per tarpląstelinio užpildo baltymų gamybą, nustatančią plaučių ląstelių funkcinius savitumus. Sergant astma, fibroblastų aktyvumas pasikeičia dėl aplinkos poveikio, todėl kinta kokybinė ir kiekybinė tarpląstelinio užpildo sudėtis [65]. Sergant astma, PF svarbūs pažeidimų atsikūrimo ir gijimo procesams, normalios plaučių struktūros ir architektūros ir funkcijos netekimui, kuriuos lemia audinių fibrozė ir sutrikusi kvėpavimo takų audinių homeostazė. PF diferenciacijai į miofibroblastus svarbiausia TGF- β , kurio raiška plaučių audiniuose sergant astma yra itin padidėjusi [66, 67]. Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad astma sergančių asmenų eozinofilai yra atsakingi už padidėjusią α -sm-aktino, kolageno I ir fibronektino genų raišką, todėl galima teigti, kad astma sergančių asmenų eozinofilai sukelia fibroblastų diferenciaciją į miofibroblastus. Be to, kolagenas I ir fibronektinas yra būtini miofibroblastų migracijai [68]. Taigi, didesnis PF kontraktiškumas ir migracija gali būti siejami su eozinofilų sukeliama didesne kolageno I ir fibronektino genų raiška ir diferenciacija į miofibroblastus.

APIBENDRINIMAS

Padidėjęs kvėpavimo takų eozinofilų aktyvumas ir išgyvenamumas yra viena iš pagrindinių kvėpavimo takų remodeliavimosi priežasčių sergant eozinofiline astma. TGF- β yra pagrindinis kvėpavimo takų struktūrinių ląstelių funkcijos ir tarpląstelinio užpildo

baltymų, įskaitant kolageną ir fibronektiną, sintezės reguliatorius. Astma sergančių asmenų eozinofilai taip pat dažniau keitė tarpląstelinio užpildo baltymų genų raišką nei jų apykaitą reguliuojamųjų MMP ir TIMP genų raišką BLRL ir PF. Taip pat, astma sergančių asmenų eozinofilai skatino kanoninio ir nekanoninio TGF- β signalinio kelio molekulių genų raišką. Be to, astma sergančių asmenų eozinofilai skatino BLRL ir PF kontraktiškumą ir migraciją, taip prisidedami prie kvėpavimo takų remodeliavimosi.

IŠVADOS

Alerginė astma ir sunkia nealergine eozinofiline astma sergančių asmenų eozinofilai skatina tarpląstelinio užpildo, užpildo metaloproteinazių ir audinių metaloproteinazių inhibitorių genų raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose. Eozinofilų aktyvinimas alergenu *in vivo* didina pagrindinių tarpląstelinio užpildo baltymų, MMP ir TIMP genų raišką struktūrinėse kvėpavimo takų ląstelėse.

Alerginė astma sergančių asmenų eozinofilai skatina TGF- β geno raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir plaučių fibroblastuose. TGF- β signalinio kelio receptorių genų raišką skatina sunkia nealergine eozinofiline astma sergančių asmenų eozinofilai bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir alergine astma ir sunkia nealergine eozinofiline astma sergančių asmenų eozinofilai plaučių fibroblastuose. Alerginė astma sergančių asmenų eozinofilai labiau skatina nekanoninio signalinio kelio molekulių genų raišką bronchų lygiųjų raumenų ląstelėse ir kanoninio signalinio kelio molekulių genų raišką plaučių fibroblastuose, o sunkia nealergine eozinofiline astma sergančių asmenų eozinofilai skatina tiek kanoninio, tiek nekanoninio kelių molekulių genų raišką abiejose ląstelių linijose.

Alerginė astma ir sunkia nealergine eozinofiline astma sergančių asmenų eozinofilai skatina bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiškumą, migraciją ir diferenciaciją. Sunkia nealergine eozinofiline astma sergančių asmenų eozinofilų poveikis bronchų lygiųjų raumenų ląstelių kontraktiškumui, abiejų ląstelių kultūrų migracijai ir diferenciacijai buvo didesnis nei alergine astma sergančių asmenų eozinofilų poveikis. *In vivo* alergenu aktyvinti alergine astma sergančių asmenų eozinofilai dar labiau padidina bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiškumą, migraciją ir diferenciacijos žymenų genų raišką abiejose ląstelių linijose.

PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Padidėjęs eozinofilų aktyvumas susijęs su intensyvesniu kvėpavimo takų remodeliavimosi: sutrikusia tarpląstelinio užpildo baltymų apykaita, padidėjusiu uždegiminio TGF- β kiekiu, bronchų lygiųjų raumenų ląstelių ir plaučių fibroblastų kontraktiškumu ir

migravimu. Siekiant pagerinti eozinofilinės astmos gydymo galimybes, turi būti siekiama sumažinti eozinofilų poveikį bronchų lygiųjų raumenų ląstelėms ir plaučių fibroblastams slopinant eozinofilų brendimą ir aktyvumą, todėl gydant astmą tikslinga slopinti eozinofilų poveikį.

STRAIPSNIAI, KURIUOSE PASKELBTI DISERTACIJOS REZULTATAI

1. Janulaityte I, Januskevicius A, Rimkunas A, Palacionyte J, Vitkauskiene A, Malakauskas K. Asthmatic Eosinophils Alter the Gene Expression of Extracellular Matrix Proteins in Airway Smooth Muscle Cells and Pulmonary Fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4086.
2. Janulaityte I, Januskevicius A, Kalinauskaite-Zukauske V, Palacionyte J, Malakauskas K. Asthmatic Eosinophils Promote Contractility and Migration of Airway Smooth Muscle Cells and Pulmonary Fibroblasts In Vitro. *Cells.* 2021;10(6):1389.
3. Janulaityte I, Januskevicius A, Kalinauskaite-Zukauske V, Bajoriuniene I, Malakauskas K. In Vivo Allergen-Activated Eosinophils Promote Collagen I and Fibronectin Gene Expression in Airway Smooth Muscle Cells via TGF- β 1 Signaling Pathway in Asthma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1837.

LITERATŪRA

1. Keglłowich LF, Borger P. The three A's in asthma - airway smooth muscle, airway remodeling & angiogenesis. *Open Respir Med J.* 2015; 9:70–80.
2. Bjerregaard A, Laing IA, Backer V, Fally M, Khoo S-K, Childlow G, et al. Clinical characteristics of eosinophilic asthma exacerbations. *Respirology.* 2017; 22(2):295–300.
3. Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Front Pharmacol.* 2013; 4:46.
4. Dekkers BG, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2009; 6(8):683–69.
5. Sagara H, Okada T, Okumura K, et al. Activation of TGF- β 2/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(2):249–54.
6. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol.* 2015; 47:54–65.
7. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16(5):558–64.
8. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor- β function. *J Biochem.* 2012; 152(4):321–9.
9. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13:616–30.
10. Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 44(2):127–33.
11. Burgess JK. The role of the extracellular matrix and specific growth factors in the regulation of inflammation and remodeling in asthma. *Pharmacol Ther.* 2009; 122(1):19–29.
12. Salter B, Pray C, Radford K, Martin JG, Nair P. Regulation of human airway smooth muscle cell migration and relevance to asthma. *Respir Res.* 2017; 18(1):156.
13. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57(4):376–9.
14. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2003; 14(6):2508–19.
15. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014; 5:123.
16. Janulaityte I, Januskevicius A, Rimkunas A, Palacionyte J, Vitkauskiene A, Malakauskas K. Asthmatic Eosinophils Alter the Gene Expression of Extracellular Matrix Proteins in Airway Smooth Muscle Cells and Pulmonary Fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8):4086.
17. Janulaityte I, Januskevicius A, Kalinauskaite-Zukauske V,

- Palacionyte J, Malakauskas K. Asthmatic Eosinophils Promote Contractility and Migration of Airway Smooth Muscle Cells and Pulmonary Fibroblasts In Vitro. *Cells.* 2021;10(6):1389.
18. Janulaityte I, Januskevicius A, Kalinauskaite-Zukauske V, Bajoriuniene I, Malakauskas K. In Vivo Allergen-Activated Eosinophils Promote Collagen I and Fibronectin Gene Expression in Airway Smooth Muscle Cells via TGF- β 1 Signaling Pathway in Asthma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1837.
19. Januskevicius A, Jurkeviciute E, Janulaityte I, Kalinauskaite-Zukauske V, Miliauskas S, Malakauskas K. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells.* 2020;9(5):1248.
20. Mostaço-Guidolin LB, Osei ET, Ullah J, Hajimohammadi S, Fouadi M, Li X, et al. Defective fibrillar collagen organization by fibroblasts contributes to airway remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019; 200(4):431–43.
21. Reeves SR, Kolstad T, Lien T-Y, Elliott M, Ziegler SF, Wight TN, et al. Asthmatic airway epithelial cells differentially regulate fibroblast expression of extracellular matrix components. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134(3):663–70.
22. Benayoun L, Druilhe A, Dombret M-C, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167(10):1360–8.
23. Pini L, Hamid Q, Shannon J, Lemelin L, Olivenstein R, Ernst P, et al. Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics. *Eur Respir J.* 2007; 29(1):71–7.
24. de Medeiros Matsushita M, da Silva LFF, dos Santos MA, Fernezlian S, Schrumpf JA, Roughley P, et al. Airway proteoglycans are differentially altered in fatal asthma. *J Pathol.* 2005; 207(1):102–10.
25. Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LFF, Elliot J, Lindeman JHN, Ferreira DS, et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J.* 2008; 32(1):61–9.
26. James A, Janson C, Malinowski A, Holweg C, Alving K, Ono J, et al. Serum periostin relates to type-2 inflammation and lung function in asthma: Data from the large population-based cohort Swedish GA(2)LEN. *Allergy.* 2017; 72(11):1753–60.
27. Bentley JK, Chen Q, Hong JY, Popova AP, Lei J, Moore BB, et al. Periostin is required for maximal airways inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134(6):1433–42.
28. Wang R, Li Q, Tang DD. Role of vimentin in smooth muscle force development. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291(3):C483–C9.
29. Fujiwara K, Urata K, Tomaru A, Takahashi Y, Onishi M, Takagi T, et al. Lung overexpression of matrix metalloproteinase-2 protects against bronchial asthma. *Eur Resp J.* 2015; 46(59):PA5084.
30. Takahashi Y, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Fujiwara K, Okano T, et al. Protective role of matrix metalloproteinase-2 in allergic bronchial asthma. *Front Immunol.* 2019; 10(1795).
31. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015; 44–46:247–54.
32. Meng X-m, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016; 12(6):325–38.
33. Chen G, Khalil N. TGF- β 1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respir Res.* 2006; 7(1):2.
34. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14(2):163–76.
35. Annes JB, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF β activation. *J Cell Sci.* 2003; 116(2):217–24.
36. Clayton SW, Ban GI, Liu C, Serra R. Canonical and noncanonical TGF- β signaling regulate fibrous tissue differentiation in the axial skeleton. *Sci Rep.* 2020; 10(1):21364.
37. Balzar S, Chu HW, Silkoff P, Cundall M, Trudeau JB, Strand M, et al. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115(1):110–7.
38. Chen G, Grotendorst G, Eichholtz T, Khalil N. GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284(3):L548–56.

39. Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. Stromal Modulators of TGF- β in Cancer. *J Clin Med*. 2017; 6(1):7.
40. Wnuk D, Paw M, Ryczek K, Bochenek G, Śladek K, Madeja Z, et al. Enhanced asthma-related fibroblast to myofibroblast transition is the result of profibrotic TGF- β /Smad2/3 pathway intensification and antifibrotic TGF- β /Smad1/5/(8)9 pathway impairment. *Sci Rep*. 2020; 10(1):16492.
41. Schwartz JT, Becker S, Sakkas E, et al. Glucocorticoids recruit Tgfr3 and Smad1 to shift transforming growth factor- β signaling from the Tgfr1/Smad2/3 axis to the Acvrl1/Smad1 axis in lung fibroblasts. *J Biol Chem*. 2014; 289(6):3262–75.
42. Wei Y, Zhang Z, Wang F, Zhou S. Assessment of tumor growth factor- β 1 neutralizing antibody in the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Exp Ther Med*. 2018; 15(1):649–56.
43. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2014; 44(4):482–98.
44. Busse WW, Kraft M, Rabe KF, Deniz Y, Rowe PJ, Ruddy M, et al. Understanding the key issues in the treatment of uncontrolled persistent asthma with type 2 inflammation. *Eur Respir J*. 2021; 58(2):2003393.
45. Prakash Y. Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016; 311(6):L1113–L140.
46. Zuyderduyn S, Sukkar MB, Fust A, Dhaliwal S, Burgess JK. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*. 2008; 32(2):265–74.
47. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003; 27(1–4):201–6.
48. Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol*. 2013; 114(7):834–43.
49. Michalik M, Wójcik-Pszczola K, Paw M, Wnuk D, Koczurkiewicz P, Sanak M, et al. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell Mol Life Sci*. 2018; 75(21):3943–61.
50. Kohan M, Muro AF, White ES, Berkman N. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to α 4 β 7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *FASEB J*. 2010; 24(11):4503–12.
51. Altman LC, Hill JS, Hairfield WM, Mullarkey MF. Effects of corticosteroids on eosinophil chemotaxis and adherence. *J Clin Invest*. 1981; 67(1):28–36.
52. Zhang T, Day JH, Su X, Guadarrama AG, Sandbo NK, Esnault S, et al. Investigating Fibroblast-Induced Collagen Gel Contraction Using a Dynamic Microscale Platform. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7:196.
53. Sapienza S, Du T, Eidelman D, Wang N, Martin J. Structural changes in the airways of sensitized brown Norway rats after antigen challenge. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 144(2):423–7.
54. Aszodi A, Legate KR, Nakchbandi I, Fässler R. What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006; 22:591–621.
55. Yamauchi E, Shoji S, Nishihara M, Shimoda T, Nishima S. Contribution of lung fibroblast migration in the fibrotic process of airway remodeling in asthma. *Allergol Int*. 2008; 57(1):73–8.
56. Muniz VS, Weller PF, Neves JS. Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *J Leukoc Biol*. 2012; 92(2):281–8.
57. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(5):1720–45.
58. McBrien CN, Menzies-Gow A. The biology of eosinophils and their role in asthma. *Front Med*. 2017; 4:93.
59. Saito K, Nagata M, Kikuchi I, Sakamoto Y. Leukotriene D4 and eosinophil transendothelial migration, superoxide generation, and degranulation via β 2 integrin. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004; 93(6):594–600.
60. Sukkar MB, Stanley AJ, Blake AE, Hodgkin PD, Johnson PR, Armour CL, et al. 'Proliferative' and 'synthetic' airway smooth muscle cells are overlapping populations. *Immunol Cell Biol*. 2004; 82(5):471–8.
61. Makinde T, Murphy RE, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85(5):348–356.
62. Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, Vieira JE, Mitchell RW, Wylam ME, et al. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol*. 1999; 276(1):L197–206.
63. Halayko AJ, Salari H, Ma X, Stephens NL. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol*. 1996; 270(6 Pt 1):L1040–51.
64. Burgess JK, Johnson PR, Ge Q, Au WW, Poniris MH, McParland BE, et al. Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167(1):71–7.
65. White ES. Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann Am Thorac Soc*. 2015; 12.
66. Al-Alawi M, Hassan T, Chotirmall SH. Transforming growth factor β and severe asthma: a perfect storm. *Respir Med*. 2014; 108(10):1409–23.
67. Scharenberg MA, Pippenger BE, Sack R, Zingg D, Ferralli J, Schenk S, et al. TGF- β -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms. *J Cell Sci*. 2014; 127(5):1079–91.
68. Weitoft M, Andersson C, Andersson-Sjöland A, Tufvesson E, Bjermer L, Erjefält J, et al. Controlled and uncontrolled asthma display distinct alveolar tissue matrix compositions. *Respir Res*. 2014; 15(1):67.