



Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Matea Glogoški Cedilak

**USPOSTAVA MIŠJEG I LJUDSKOG 3D-
TKIVNOG MODELA PLUĆNE FIBROZE
*EX VIVO***

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Doc. dr. sc. Mihailo Banjanac

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Matea Glogoški Cedilak

**DEVELOPMENT OF MOUSE AND
HUMAN *EX VIVO* 3D LUNG TISSUE
MODEL OF PULMONARY FIBROSIS**

DOCTORAL THESIS

Mentor:

Doc. dr. sc. Mihailo Banjanac

Zagreb, 2026.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Odjelu za *in vitro* farmakologiju u Selviti d.o.o. u Zagrebu, pod voditeljstvom nasl. doc. dr. sc. Mihaila Banjanca, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Doktorski rad u potpunosti je financirala Selvita d.o.o.

Dio rezultata ovog doktorskog rada objavljen je u časopisu „Pulmonary Pharmacology & Therapeutics“ 2019. godine pod naslovom „Precision-cut lung slices from bleomycin treated animals as a model for testing potential therapies for idiopathic pulmonary fibrosis“.

INFORMACIJE O MENTORU

Mihailo Banjanac rođen je u Weselu, Njemačka 1974., a osnovnu i srednju školu završio je u Zadru. Diplomirao je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Medicinska biokemija, 1997. godine. Stručni staž obavio je u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Kliničke bolnice Merkur (1997.-1998.). Doktorirao je 2009. godine (područje biomedicine i zdravstva). Hrvatski jezik mu je materinji, a govori, čita i piše engleski jezik.

Od 1998. do 1999. god. radio je na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a 2000. god. zaposlio se u Istraživačkom institutu, Pliva koji 2006. postaje GlaxoSmithKline - Istraživački centar, a 2010. god. Galapagos - Istraživački centar. Od 2013. god. radi u Fidelita d.o.o., a od 2021. u Selvita d.o.o., ugovornim istraživačkim organizacijama. Trenutno obnaša funkciju direktora odjela In vitro farmakologije, Selvita d.o.o. u Zagrebu. U znanstveno zvanje višeg znanstvenog suradnika izabran je 2013. godine.

Znanstveno se usavršavao u Max-Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin (2004). Godine 2010. dobio je godišnju GSK nagradu za iznimnu znanost. U području istraživanja novih lijekova i razumijevanja mehanizma djelovanja postojećih lijekova u terapijskim područjima upale i infekcije, objavio je, u koautorstvu, 20 znanstvenih radova (CC/SCI) i jedan patent. Sudjelovao je na više od 20 domaćih i međunarodnih skupova. Održao je predavanje na znanstvenom skupu Phenotypic approaches in drug discovery, SCI, London, UK (2015) te na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Zagreb (2016). Bio je recenzent u više različitih međunarodnih časopisa. Održao je niz predavanja na dodiplomskim i poslijediplomskim kolegijima Sveučilišta u Zagrebu i Sveučilišta u Rijeci.

Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatskog društva medicinskih biokemičara te Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

ZAHVALE

Ova doktorska disertacija rezultat je neiscrpne potpore mog mentora, Mihaila, kojem iz sveg srca zahvaljujem što je vjerovao u mene kroz cijelo ovo zajedničko putovanje. Zahvalna sam mu na prilici i povjerenju koje mi je pružio, kao i na vodstvu tijekom izrade doktorata.

Također bih htjela zahvaliti svojim kolegama iz in vitro farmakologije što su mi uljepšali svakodnevni rad i učinili duge sate u labosu veselijima. Najviše hvala Danieli koja me naučila pripremati prve 'sliceove' i s kojom sam radila na razvoju ovog modela, zahvalna sam na svem znanju koje mi je prenijela. Iznimno sam zahvalna i našoj voditeljici dr. sc. Martini Bosnar što mi je omogućila izradu ovog doktorata, kao i na znanstvenoj podršci i savjetima tijekom svih ovih godina.

Osim toga, htjela bih zahvaliti i kolegama iz translacije, in vivo farmakologije te histopatologije bez čijeg doprinosa ne bi bilo ove doktorske disertacije. Veoma sam zahvalna Lidiji, ne samo na pomoći s pokusima na ljudskom materijalu, već i na razgovorima, savjetima i podršci koji su mi puno značili. Velik dio ovog istraživanja ne bi bio moguć bez potpore kolega iz in vivo farmakologije koji su razvili model plućne fibroze izazvane bleomicinom in vivo, a koji je korišten za pripremu prereza, stoga sam im iznimno zahvalna na pomoći i dobroj suradnji. Također bih htjela zahvaliti kolegama iz laboratorija za histopatologiju pod vodstvom dr. sc. Snježane Čužić, na pomoći i podršci s histološkim analizama, kao i na svim diskusijama i savjetima tijekom uhodavanja ovog modela.

Za kraj želim zavaliti svojim roditeljima, prijateljima te posebno mom suprugu Marku na razumijevanju, strpljenju i ljubavi koju su mi iskazivali cijelo ovo vrijeme.

USPOSTAVA MIŠJEG I LJUDSKOG 3D-TKIVNOG MODELA PLUĆNE FIBROZE *EX VIVO*

MATEA GLOGOŠKI CEDILAK

Odjel za *in vitro* farmakologiju, Selvita d.o.o, Zagreb

Prerezi pluća (engl. *precision cut lung slices*) sadrže više tipova stanica organiziranih u relevantne trodimenzionalne strukture s izvanstaničnim matriksom te stoga imaju velik potencijal za istraživanje kompleksnih plućnih bolesti, kao što je primjerice idiopatska plućna fibroza (IPF), a za koje postoji malo adekvatnih modela. Cilj je ovog istraživanja bio uspostaviti mišji i ljudski model plućne fibroze *ex vivo* pogodan za testiranje antifibroznog učinka spojeva u pretkliničkim istraživanjima. Uspostavljen je model prereza pluća *ex vivo* iz miševa kod kojih je plućna fibroza izazvana bleomicinom, trenutno najrelevantnijeg postojećeg mišjeg modela fibroze *in vivo*. Tijekom inkubacije u uvjetima *ex vivo* potvrđena je prisutnost fibroznih promjena, prvenstveno prekomjerne proizvodnje i remodeliranja izvanstaničnog matriksa praćene ekspresijom gena kolagena 1 α 1, fibronektina 1, matriksne metaloproteinaze 12 i inhibitora matriksnih metaloproteinaza 1. Stimulacijom prereza iz zdravih mišjih i ljudskih pluća transformirajućim faktorom rasta (TGF) β u uvjetima *ex vivo* izazvane su fibrozne promjene s ekspresijskim profilom biljega fibroze koji je nalikovao prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te s dodatnim povećanjem biljega aktivacije miofibroblasta, α aktina glatkih mišića, i biljega remodeliranja izvanstaničnog matriksa, inhibitora plazminogenog aktivatora 1. U sva tri modela prereza pluća, potvrđena je antifibrozna aktivnost odobrenog lijeka za IPF, nintedaniba, što potvrđuje da se ovi modeli mogu koristiti za procjenu antifibroznog učinka spojeva u pretkliničkim ispitivanjima, a usporedba aktivnosti između mišjih i ljudskog modela prereza pluća omogućuje translaciju rezultata između vrsta te iz pretkliničkih prema kliničkim ispitivanjima.

Rad sadrži: 142 stranice, 66 slika, 5 tablica, 213 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski

Ključne riječi: prerezi pluća, idiopatska plućna fibroza, modeli plućne fibroze *ex vivo*, plućna fibroza izazvana bleomicinom, signalni put TGF β , pretklinička ispitivanja

Mentor: doc. dr. sc. Mihailo Banjanac

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Maja Matulić

prof. dr. sc. Jerka Dumić

prof. dr. sc. Vesna Eraković Haber

Zamjena: prof. dr.sc. Inga Urlić

DEVELOPMENT OF MOUSE AND HUMAN *EX VIVO* 3D LUNG TISSUE MODEL OF
PULMONARY FIBROSIS

MATEA GLOGOŠKI CEDILAK

In vitro Pharmacology Department, Selvita Ltd., Zagreb

Precision-cut lung slices (PCLS) contain multiple cell types organized into relevant 3D structures in extracellular matrix. They have potential for investigating complex diseases that are difficult to recapitulate *in vitro*, such as Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) with a few other adequate models. The aim of the study was to establish murine and human *ex vivo* models of pulmonary fibrosis for preclinical evaluation of new therapeutic drugs. An *ex vivo* lung slice model from mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis, currently the most relevant murine *in vivo* model, was established. Presence of fibrotic changes was confirmed during *ex vivo* incubation, based on excessive production and remodelling of extracellular matrix, and increased expression of genes encoding collagen 1a1, fibronectin 1, matrix metalloproteinase 12, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1. *Ex vivo* stimulation of lung slices from healthy mice and human lung tissue with transforming growth factor (TGF) β induced fibrotic remodelling, with comparable fibrotic markers expression profile to lung slices from mice with bleomycin-induced fibrosis, along with an additional increase of myofibroblast marker α smooth muscle actin and extracellular matrix remodelling plasminogen activator inhibitor 1. Antifibrotic activity of nintedanib, an approved therapy for IPF, was confirmed in all three lung slice models, indicating that these models can be used to evaluate antifibrotic effects of compounds in preclinical studies. The comparison of activity between murine and human lung slice models enables translation between species and from preclinical into clinical studies.

PhD thesis contains: 142 pages, 66 figures, 5 tables, 213 references, original in Croatian

Keywords: lung slices, idiopathic pulmonary fibrosis, *ex vivo* models of lung fibrosis, bleomycin induced lung fibrosis, TGF β signalling pathway, preclinical studies

Supervisor: Assistant professor Mihailo Banjanac, PhD

Reviewers: Professor Maja Matulić, PhD

Professor Jerka Dumić, PhD

Professor Vesna Eraković Haber, PhD

In lieu of: Professor Inga Urlić, PhD

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1	Ciljevi istraživanja.....	3
1.2	Hipoteze istraživanja	4
1.3	Primijenjene metode za ispitivanje ciljeva istraživanja	4
2.	PREGLED LITERATURE	5
2.1	Idiopatska plućna fibroza	5
2.1.1.	Proces popravka oštećenja.....	5
2.1.2.	Signalni putevi i interakcije između epitelnih stanica i fibroblasta.....	7
2.1.3.	Signalni put TGFβ	9
2.1.4.	Promjene izvanstaničnog matriksa	11
2.1.5.	Čimbenici rizika za razvoj idiopatske plućne fibroze	13
2.1.6.	Odobreni lijekovi.....	15
2.2	Modeli za istraživanje plućne fibroze <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	17
2.2.1.	Modeli <i>in vitro</i>	17
2.2.2.	Prerezi pluća	18
2.2.3.	Model plućne fibroze izazvane bleomicinom <i>in vivo</i>	20
3.	MATERIJALI I METODE	22
3.1	Tretman miševa bleomicinom <i>in vivo</i>	22
3.2	Priprema prereza mišjih pluća.....	22
3.3	Priprema prereza ljudskih pluća	24
3.4	Tretman i inkubacija prereza mišjih i ljudskih pluća	26
3.5	Bojanje hematoksilin-eozin i Crossman trikrom i histološka analiza prereza mišjih i ljudskih pluća	28
3.6	Određivanje vijabilnosti mišjih i ljudskih prereza pluća metodom redukcije Alamar Blue	29

3.7	Određivanje vijabilnosti prereza mišjih i ljudskih pluća metodom mjerenja aktivnosti laktat dehidrogenaze	29
3.8	Određivanje vijabilnosti prereza ljudskih pluća obilježavanjem živih i mrtvih stanica	30
3.9	Imunofluorescencijska detekcija kolagena 1 i fibronektina u prerezima mišjih pluća	30
3.10	Izolacija RNA iz prereza mišjih i ljudskih pluća.....	31
3.11	Određivanje ekspresije gena metodama reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom	32
3.12	Određivanje koncentracije proteina metodom ELISA	34
3.13	Statistička analiza	35
4.	REZULTATI	36
4.1	Vijabilnost prereza mišjih pluća	36
4.1.1.	Histološka karakterizacija prereza mišjih pluća tijekom inkubacije <i>ex vivo</i>	36
4.1.2.	Metabolička aktivnost i propusnost membrana prereza mišjih pluća tijekom inkubacije <i>ex vivo</i>	37
4.2	Analiza ekspresije gena i proteina u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom	39
4.2.1.	Ekspresija gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>MMP12</i> , <i>TIMP1</i> i <i>PAIL</i> u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom na dan pripreme prereza.....	39
4.2.2.	Ekspresija gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>MMP12</i> , <i>TIMP1</i> i <i>PAIL</i> u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom kroz vrijeme inkubacije <i>ex vivo</i>	41
4.2.3.	Koncentracije proteina pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom nakon 3 dana inkubacije <i>ex vivo</i>	45
4.2.4.	Vizualizacija kolagena 1 i fibronektina u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom nakon 3 dana inkubacije <i>ex vivo</i> .	46

4.3	Aktivnost antifibroznih spojeva u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom	48
4.3.1.	Utjecaj antifibroznih spojeva na ekspresiju gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>MMP12</i> i <i>TIMP1</i> u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom.....	49
4.3.2.	Utjecaj antifibroznih spojeva na koncentraciju pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, <i>MMP12</i> i <i>TIMP1</i> u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom	54
4.3.3.	Utjecaj antifibroznih spojeva na vijabilnost prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom.....	57
4.4	Stimulacija prereza mišjih pluća s TGF β	58
4.4.1.	Ekspresija gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>MMP12</i> , <i>TIMP1</i> i <i>PAIL</i> u prerezima mišjih pluća tijekom različitog vremena stimulacije s TGF β <i>ex vivo</i>	58
4.4.2.	Koncentracija proteina pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina u prerezima mišjih pluća nakon 3 dana stimulacije s TGF β <i>ex vivo</i>	62
4.4.3.	Utjecaj antifibroznih spojeva na ekspresiju gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>MMP12</i> , <i>TIMP</i> i <i>PAIL</i> u prerezima mišjih pluća stimuliranim s TGF β	63
4.4.4.	Utjecaj antifibroznih spojeva na koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina u prerezima mišjih pluća stimuliranim s TGF β	68
4.4.5.	Utjecaj antifibroznih spojeva na vijabilnost prereza mišjih pluća stimuliranih s TGF β	70
4.5	Određivanje vijabilnosti prereza ljudskih pluća.....	71
4.5.1.	Histološka karakterizacija prereza ljudskih pluća tijekom inkubacije <i>ex vivo</i>	71
4.5.2.	Fluorescencijsko obilježavanje i vizualizacija živih i mrtvih stanica u prerezima ljudskih pluća tijekom inkubacije <i>ex vivo</i>	74
4.5.3.	Metabolička aktivnost i propusnost membrana prereza ljudskih pluća tijekom inkubacije <i>ex vivo</i>	76
4.6	Stimulacija prereza ljudskih pluća s TGF β	77
4.6.1.	Ekspresija gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>MMP12</i> , <i>TIMP1</i> i <i>PAIL</i> u prerezima ljudskih pluća tijekom različitog vremena stimulacije s TGF β <i>ex vivo</i>	77

4.6.2.	Testiranje različitih koncentracija TGF β tijekom 3 i 5 dana stimulacije <i>ex vivo</i> i utjecaj na ekspresiju gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>TIMP1</i> , <i>MMP12</i> i <i>PAIL</i>	84
4.6.3.	Testiranje različitih koncentracija TGF β tijekom 3 i 5 dana stimulacije <i>ex vivo</i> i utjecaj na koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina	89
4.7	Aktivnost antifibroznih spojeva u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGF β	90
4.7.1.	Utjecaj antifibroznih spojeva na ekspresiju gena <i>COL1A1</i> , <i>FNI</i> , <i>ACTA2</i> , <i>MMP12</i> , <i>TIMP1</i> i <i>PAIL</i> u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGF β	90
4.7.2.	Utjecaj antifibroznih spojeva na koncentracije pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGF β	98
4.7.3.	Utjecaj antifibroznih spojeva na vijabilnost prereza ljudskih pluća stimuliranih s TGF β	100
5.	RASPRAVA.....	102
5.1	Prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom	102
5.2	Prerezi mišjih pluća stimulirani s TGF β	107
5.3	Prerezi ljudskih pluća stimulirani s TGF β	109
6.	ZAKLJUČCI	114
7.	POPIS LITERATURE	115
8.	ŽIVOTOPIS.....	142

1. UVOD

Prerezi pluća (engl. *precision cut lung slices*) jesu model *ex vivo* kojeg karakterizira prisutnost više tipova stanica organiziranih u trodimenzionalne strukture u izvanstaničnom matriksu s originalnim mikrookolišem. U prerezima pluća očuvane su interakcije između različitih tipova stanica, kao i interakcije između stanica i izvanstaničnog matriksa (Kolanko i sur., 2024; Koziol-White i sur., 2024; Lam i sur., 2023). Prerezi se pripremaju rezanjem svježeg tkiva na mikrotomu što omogućuje uniformnu veličinu, a nakon pripreme mogu se uzgajati u uvjetima *ex vivo*. S obzirom na to da se mogu pripremati iz ljudskog ili životinjskog tkiva, kako iz zdravih tako i bolesnih pluća, imaju široku primjenu, a najčešće se koriste u toksikološkim istraživanjima, za proučavanje različitih plućnih bolesti te za farmakološka testiranja (Koziol-White i sur., 2024). Prerezi pluća zadržavaju karakteristike sustava *in vivo* iz kojeg su pripremljeni te su stoga zanimljiv sustav za istraživanje patofiziologije kompleksnih bolesti za koje postoji malo drugih adekvatnih modela, kao što je primjerice idiopatska plućna fibroza (IPF, engl. *idiopathic pulmonary fibrosis*).

IPF je kronična i progresivna bolest koju karakterizira prekomjerno nakupljanje sastavnica izvanstaničnog matriksa u intersticiju pluća, što naposljetku dovodi do gubitka funkcije i otkazivanja pluća (Kolanko i sur., 2024). Smrtnost pacijenata s IPF-om je veoma visoka, u prosjeku 2 do 5 godina nakon dijagnoze (Muri i sur., 2024; Raghu i sur., 2014), uz trenutno odobrena samo tri lijeka – nintedanib, pirfenidon te nedavno odobreni nerandomilast. Nažalost, navedeni lijekovi samo usporavaju progresiju bolesti, a kod pacijenata s uznapredovanim stadijem transplantacija pluća je i dalje jedino rješenje. Trenutno postoji velika potreba za razvojem novih lijekova za IPF, što je uvelike otežano zbog nepotpuno razjašnjenog uzroka i kompleksne patofiziologije, kao i manjka adekvatnih modela bolesti (Bargagli i sur., 2019).

Premda je sam uzrok bolesti nepoznat, smatra se da je u IPF-u patološki promijenjen proces popravka oštećenja tkiva. Popravak oštećenja tkiva je kompleksan proces s više faza koje se međusobno preklapaju. Započinje fazom upalnog odgovora na nastalo oštećenje tkiva, nakon čega slijedi remodeliranje tkiva i proizvodnja novog izvanstaničnog matriksa kako bi se zatvorilo mjesto oštećenja, proliferacija i diferencijacija stanica koje dovode do reepitelizacije, te finalno završetka procesa popravka oštećenja tkiva (Betensley i sur., 2016). U fiziološkim uvjetima je ovo strogo reguliran proces, dok u IPF-u dolazi do stalno ponavljajućeg ciklusa oštećenja alveolarnog epitela i pokušaja popravka, bez rezolucije, što rezultira pojačanom

proizvodnjom i nakupljanjem sastavnica izvanstaničnog matriksa u plućima. Normalno tkivo postaje jako kruto, zamjenjuju ga ožiljci te stoga ima narušenu funkciju, što naposljetku dovodi do potpunog gubitka funkcije pluća. Brojni su signalni putevi poremećeni u IPF-u, uključujući signalni put transformirajućeg faktora rasta (engl. *transforming growth factor*, TGF) β . TGF β je jedan od ključnih profibroznih čimbenika koji je uključen u niz procesa tijekom popravka oštećenja, potiče proliferaciju i diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste – glavni tip stanica odgovoran za prekomjernu proizvodnju sastavnica izvanstaničnog matriksa (Derynck i Zhang, 2003; Fernandez i Eickelberg, 2012). Inhibicija signalnog puta TGF β uspješno smanjuje fibrozne promjene u modelima bolesti kao i u kliničkim studijama, što naglašava njegovu ulogu ključnog čimbenika u fibrozi (Peng i sur., 2022; Shi i sur., 2022).

U istraživanju plućne fibroze koriste se modeli *in vitro* različitih kompleksnosti, od najjednostavnijih 2D staničnih kultura, ko-kultura više tipova stanica do kompleksnijih 3D modela, a za stimulaciju fibroznih procesa najčešće se koristi TGF β . Model prereza pluća *ex vivo* ima karakteristike koje donose prednosti za istraživanje plućne fibroze u odnosu na jednostavnije modele staničnih kultura, kao što su prisutnost različitih tipova stanica i izvanstaničnog matriksa. Model prereza pluća se stoga počeo koristiti za istraživanje mehanizama plućne fibroze, kao i za testiranje novih potencijalnih terapeutika. Prerezi se mogu pripremati iz tkiva pacijenata s IPF-om što ima veliku vrijednost (Decaris i sur., 2021; Mercer i sur., 2016), međutim treba uzeti u obzir da se uglavnom radi o tkivu pacijenata u posljednjem stadiju bolesti kad je fibroza već jako uznapredovala, što potencijalno može dovesti do podcjenjivanja učinkovitosti pri testiranju novih lijekova. Osim toga, ograničena dostupnost pluća pacijenata s IPF-om limitira korištenje ovog modela. Iz tih razloga, istražuje se mogućnost stimulacije fibroznih promjena tretmanima *ex vivo*, primjerice s TGF β ili kombinacijom više profibroznih čimbenika (Alsafadi i sur., 2017; Lehmann i sur., 2018).

Od životinjskih modela plućne fibroze *in vivo*, najčešće se koristi mišji model u kojem su životinje tretirane bleomicinom. Bleomicin uzrokuje oštećenja u plućima, što posljedično dovodi do aktivacije upalnog odgovora, a zatim fibroznog remodeliranja koje ima brojne karakteristike IPF-a. Kod intratrahealne primjene bleomicina miševima u jednoj dozi, plućna fibroza se uspostavlja u periodu između 14. i 28. dana. Dolazi do apoptoze alveolarnih epitelnih stanica, aktivacije miofibroblasta, prekomjerne proizvodnje i nakupljanja kolagena i drugih sastavnica izvanstaničnog matriksa, formiranja fibroznih žarišta (engl. *fibrotic foci*) te drugih promjena karakterističnih za IPF. Plućna fibroza izazvana bleomicinom stoga je trenutno

najrelevantniji model *in vivo* u pretkliničkim ispitivanjima za testiranje učinkovitosti novih potencijalnih lijekova (Della Latta i sur., 2015; Jenkins i sur., 2017).

1.1 Ciljevi istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja bio je uspostava mišjeg i ljudskog modela za plućnu fibrozu *ex vivo* te usporedba fibroznih promjena, što omogućuje translaciju između vrsta i rezultata iz pretkliničkih u klinička istraživanja.

Opisani su prerezi pluća *ex vivo* pripremljeni iz mišjeg modela plućne fibroze izazvane bleomicinom *in vivo*, kao trenutno najrelevantnijeg postojećeg mišjeg modela *in vivo*. Zatim su se prerezi zdravih mišjih pluća stimulirali *ex vivo* jednim od ključnih profibroznih čimbenika, TGFβ, što se koristilo za usporedbu s prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te s prerezima ljudskih pluća. Prerezi ljudskih pluća također su stimulirani s TGFβ *ex vivo* kako bi se uspostavio model plućne fibroze izravno na ljudskom tkivu.

Specifični ciljevi istraživanja su bili:

- a) Odrediti vijabilnost prereza mišjih i ljudskih pluća tijekom više dana inkubacije *ex vivo* praćenjem različitih parametara kako bi se odredilo vrijeme inkubacije unutar kojeg je moguće provoditi istraživanje
- b) Opisati fibrozne procese u prerezima pluća pripremljenim iz mišjeg modela plućne fibroze izazvane bleomicinom *in vivo* te ispitati njihovu prisutnost kroz različito vrijeme inkubacije prereza *ex vivo*
- c) Testirati mogu li se intervencijom spojevima s poznatim antifibroznim djelovanjem smanjiti opisani fibrozni procesi u prerezima miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, a kako bi se ispitala primjena prereza u pretkliničkim ispitivanjima novih lijekova
- d) Odrediti uvjete potrebne za stimulaciju fibroznih procesa čimbenikom TGFβ *ex vivo* te usporediti aktivirane fibrozne procese u prerezima mišjih i ljudskih pluća
- e) Testirati utjecaj spojeva s poznatim antifibroznim djelovanjem u prerezima mišjih i ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ koristeći prethodno uspostavljene uvjete

1.2 Hipoteze istraživanja

S obzirom na to da su prerezi pluća sustav *ex vivo* koji se sastoji od različitih tipova stanica i izvanstaničnog matriksa te zadržavaju neke od karakteristika sustava *in vivo* iz kojeg su pripremljeni, pretpostavka je da se mogu koristiti za istraživanje kompleksne bolesti kao što je plućna fibroza. Pretpostavlja se stoga da se prerezi mišjih i ljudskih pluća mogu inkubirati *ex vivo* tijekom više dana pri čemu ostaju vijabilni i metabolički aktivni, da prerezi pluća pripremljeni iz mišjeg modela plućne fibroze izazvane bleomicinom *in vivo* zadržavaju ekspresiju biljega fibroze tijekom inkubacije *ex vivo*, da je stimulacijom prereza mišjih i ljudskih pluća s TGF β moguće aktivirati fibrozne procese koji su usporedivi s onima u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te da se sva tri uspostavljena modela prereza pluća mogu koristiti za ispitivanje antifibroznog učinka spojeva.

1.3 Primijenjene metode za ispitivanje ciljeva istraživanja

Kako bi se postigli specifični ciljevi ovog istraživanja, pripremljeni su prerezi pluća koristeći tri različita načina izazivanja fibroze – u miševima je izazvana plućna fibroza bleomicinom *in vivo*, a 14 dana nakon su se pluća koristila za pripremu prereza i inkubaciju *ex vivo*; prerezi pluća pripremljeni iz netretiranih (zdravih) miševa te stimulirani s TGF β *ex vivo*; prerezi ljudskih pluća pripremljeni su iz tkiva pacijenata koji nemaju dijagnosticiranu plućnu fibrozu te su stimulirani s TGF β *ex vivo*. Metode za procjenu vijabilnosti prereza pluća tijekom inkubacije *ex vivo* uključile su histološku karakterizaciju bojanjem prereza pomoću Crossman trikrom ili hematoksilin-eozin, mjerenje metaboličke aktivnosti pomoću redukcije Alamar Blue te mjerenje propusnosti staničnih membrana određivanjem aktivnosti enzima LDH u inkubacijskom mediju prereza. Dodatno, u prerezima ljudskih pluća, žive i mrtve stanice su obilježene fluorescencijskim bojama kalcein-AM i etidij homodimer te vizualizirane konfokalnim mikroskopom. Za praćenje fibroznih procesa u prerezima mišjih i ljudskih pluća mjerili su se biljezi fibroze, prvenstveno analizom ekspresije gena kolagena 1 α 1 (*COL1A1*), fibronektina 1 (*FNI*), matriksne metaloproteinaze 12 (*MMP12*), inhibitora matriksnih metaloproteinaza 1 (*TIMP1*), α aktina glatkih mišića (*ACTA2*) i inhibitora plazminogenog aktivatora 1 (*PAI1*) metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR,). Metodom ELISA izmjerene su koncentracije pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 samo u odabranim uvjetima mišjih i ljudskih prereza pluća. Dodatno su metodom imunofluorescencije u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom obilježeni kolagen 1 i fibronektin te vizualizirani konfokalnim mikroskopom.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Idiopatska plućna fibroza

Idiopatska plućna fibroza (engl. *idiopathic pulmonary fibrosis*, IPF) je kronična i progresivna plućna bolest koja zahvaća područje plućnog intersticija. Intersticij pluća podliježe fibroznim promjenama koje rezultiraju smanjenom izmjenom kisika u alveolama, progresivno smanjujući kapacitet pluća, što naposljetku dovodi do zatajenja pluća i smrti (Kolanko i sur., 2024; Raghu i sur., 2014; Richeldi i sur., 2017). Prosječno vrijeme od trenutka dijagnoze do zatajenja pluća je između 2 i 5 godina (Muri i sur., 2024; Raghu i sur., 2014). Incidencija novih slučajeva IPF-a je otprilike 6 na 100 000 ljudi na globalnoj razini, radi čega se svrstava u kategoriju rijetkih bolesti (Golchin i sur., 2025).

2.1.1. Proces popravka oštećenja

Točan uzrok nastanka IPF-a nije poznat, no smatra se da se radi o patološki promijenjenom procesu popravka oštećenja u plućima. Popravak oštećenja tkiva u normalnim je uvjetima veoma složen i dobro reguliran proces. Nekoliko je faza popravka oštećenja tkiva koje se međusobno preklapaju, a uključuju početni upalni odgovor, proizvodnju novog izvanstaničnog matriksa i remodeliranje tkiva te na kraju reepitelizaciju i rezoluciju (Betensley i sur., 2016). IPF karakterizira prekomjerno nakupljanje sastavnica izvanstaničnog matriksa u intersticiju pluća te nastajanje ožiljaka u tkivu jer ne dolazi do rezolucije procesa popravka oštećenja tkiva (Betensley i sur., 2016; Martinez i sur., 2017).

U normalnom procesu popravka oštećenja tkiva, početno oštećenje u plućima uglavnom je uzrokovano različitim alergijskim reakcijama, okolišnim iritansima, infekcijama ili pak mehaničkim oštećenjima. Neovisno o uzroku, potrebno je obnoviti narušenu epitelnu ili endotelnu barijeru. U početnoj fazi, oštećene stanice otpuštaju proupalne citokine i kemokine te faktore rasta, a paralelno dolazi do stvaranja ugruška na mjestu oštećenja i inhibicije fibrinolizne aktivnosti (Wilson i Wynn, 2009). Dolazi također, do aktivacije matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinase*, MMP) 2 i 9 koje omogućuju razgradnju bazalne membrane i izvanstaničnog matriksa, kako bi se omogućio pristup imunostimuliranim stanicama do i od mjesta oštećenja (Corbel i sur., 2002). Istovremeno, vazodilatacija i povećanje propusnosti krvnih žila omogućuju uslijed kemotaksije ekstravazaciju neutrofila, makrofaga, eozinofila te limfocita na mjesto oštećenja gdje fagocitiraju stanične ostatke, otpuštaju proupalne citokine i kemokine te aktiviraju fibroblaste (Wilson i Wynn, 2009). Citokini IL-4 i

IL-13 zaslužni su za diferencijaciju makrofaga u tip 2, koji imaju bitnu ulogu u daljnjem remodeliranju i popravku oštećenog tkiva. Makrofagi M2 fagocitiraju degranulirane neutrofile, a proizvode i profibrozne čimbenike kao što su transformirajući faktor rasta (engl. *transforming growth factor*, TGF) β i trombocitni faktor rasta (engl. *platelet derived growth factor*, PDGF) te prolin, bitan za proizvodnju kolagena (Song i sur., 2000). IL-13 se smatra profibroznim citokinom jer osim diferencijacije makrofaga M2, potiče diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste, proizvodnju kolagena te otpuštanje TGF β iz latentnog kompleksa u izvanstaničnom matriksu (Lee i sur., 2001; Ingram i sur., 2004).

Miofibroblasti su glavne stanice zadužene za sintezu sastavnica izvanstaničnog matriksa kako bi se popunilo nastalo oštećenje. Aktiviraju se i proliferiraju pod utjecajem citokina, faktora rasta i ostalih profibroznih čimbenika, kao što su TGF β , faktor rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*, CTGF) i Sonic Hedgehog (Shh). Miofibroblasti proizvode kolagene tipa 1 i 3, fibronektin, hijaluronsku kiselinu, proteoglikane, elastin, PDGF te su iznimno invazivni tip stanica. Karakterizira ih ekspresija α -aktina glatkih mišića (engl. *α smooth muscle actin*, α SMA), što im omogućuje kontrakciju i zatvaranje rane (Confalonieri i sur., 2022; C. F. Hung, 2020). Postoje različite teorije o podrijetlu miofibroblasta u plućima. Najšire prihvaćeno mišljenje je da su lokalne mezenhimske stanice, kao što su fibroblasti, ključan izvor miofibroblasta. Pod utjecajem profibroznih čimbenika od kojih je TGF β jedan od najbitnijih, mezenhimske stanice mogu diferencirati u miofibroblaste (Hung i sur., 2013; Rock i sur., 2011; Zepp i sur., 2017). Fibrociti su pak cirkulirajuće progenitorne mezenhimske stanice koje nastaju u koštanoj srži, a kemotaksijom dolaze na mjesto oštećenja (Moore i sur., 2006; Phillips i sur., 2004). Neke studije pokazuju da fibrociti mogu diferencirati u miofibroblaste koji eksprimiraju α SMA, također pod utjecajem TGF β (Abe i sur., 2001; Hong i sur., 2007). Osim toga, fibrociti otpuštaju različite čimbenike i egzosome koji mogu aktivirati diferencijaciju lokalnih fibroblasta u miofibroblaste (Chen i sur., 2018; Wang i sur., 2007). Još jedan potencijalni izvor miofibroblasta u plućima su epitelne stanice koje procesom epitelno mezenhimske tranzicije (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) gube epitelne biljege kao što je E-kadherin, prestaju biti adeherentne i počinju eksprimirati mezenhimske biljege kao što su N-kadherin, fibroblastni specifični protein 1 (engl. *fibroblast specific protein 1*, FSP1), α SMA, kolagen tipa 1, vimentin i fibronektin. Aktivacija EMT jest ključna tijekom normalnih procesa embriogeneze i popravka oštećenja, a događa se i u patološkim stanjima kao što je metastaziranje tumora (Kalluri i Weinberg, 2009; Rout-Pitt i sur., 2018; Stone i sur., 2016).

Paralelno s aktivacijom miofibroblasta i odlaganjem sastavnica izvanstaničnog matriksa, u normalnim uvjetima popravka oštećenja odvija se reepitelizacija na mjestu oštećenja. Ovaj je korak ključan za rezoluciju popravka oštećenja. U alveolama, epitelne stanice tipa II (engl. *alveolar epithelial cells type II*, ATII), inače zadužene za proizvodnju surfaktanta koji oblaže alveole i smanjuje površinsku napetost, djeluju također i kao progenitorne stanice (Barkauskas i sur., 2013; Crosby i Waters, 2010; Lucchini i sur., 2021). ATII stanice pod utjecajem različitih faktora rasta proliferiraju i transdiferenciraju u alveolarne epitelne stanice tipa I (ATI), tanke i izdužene stanice zadužene za izmjenu kisika (Olajuyin i sur., 2019). U normalnim uvjetima, nakon što je uspostavljena epitelna barijera popravak oštećenja ulazi u rezoluciju, što uključuje aktivaciju apoptoze u miofibroblastima, uklanjanje preostalih imunskih stanica od strane makrofaga M2 te zaustavljanje upalnih procesa (Wilson i Wynn, 2009).

Danas se smatra da je narušena uloga alveolarnih epitelnih stanica glavni uzrok što proces popravka oštećenja u bolesnika s IPF ne ulazi u rezoluciju, zajedno s poremećenom komunikacijom između alveolarnih epitelnih stanica i fibroblasta (Chambers i Mercer, 2015; Confalonieri i sur., 2022). U alveolarnim epitelnim stanicama, prekomjerno aktivirani signalni putevi TGF β , Wnt i Shh mogu potaknuti proces EMT (Zhang i sur., 2016). Neke studije potvrđuju koekspresiju epitelnih i mezenhimskih biljega u plućima bolesnika s IPF-om, što upućuje na epitelno podrijetlo miofibroblasta u plućima (Kim i sur., 2006). Jedna je od glavnih karakteristika pluća bolesnika s IPF nakupljanje miofibroblasta u fibroznim žarištima (engl. *fibrotic foci*) gdje se odvija prekomjerna proizvodnja izvanstaničnog matriksa (King i sur., 2001). U fibroznim žarištima lokalizirani su također i fibrociti (Andersson-Sjöland i sur., 2008), a njihove koncentracije u cirkulaciji koreliraju s progresijom IPF-a (Moeller i sur., 2009).

Kod bolesnika s IPF-om često su povišeni i interleukini IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-4, IL-13, kemokin ligand 2/monocitni kemoatraktant protein 1 (engl. *C-C motif chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1*, CCL2/MCP-1), faktor tumorske nekroze α (TNF α , engl. *tumor necrosis factor α*), TGF β , PDGF, (Agostini i Gurrieri, 2006; Zhang i sur., 2023) te M2 makrofagi što upućuje na stalno aktivan proces popravka oštećenja (Prasse i sur., 2006).

2.1.2. Signalni putevi i interakcije između epitelnih stanica i fibroblasta

Za uspješan popravak oštećenja u plućima bitna je koordinacija između različitih tipova stanica – epitelnih stanica, fibroblasta, endotelnih i imunskih stanica. U IPF-u su brojni

signalni putevi u epitelnim stanicama i fibroblastima promijenjeni te dovode do začaranog kruga oštećenja i pokušaja popravka bez rezolucije (Sakai i Tager, 2013).

U IPF-u su također promijenjeni i morfologija ATII stanica kao i ekspresijski profil citokeratina. Hiperplazija ATII stanica i skvamozna metaplazija nalaze se u području fibroznih žarišta, kao i povećan broj senescentnih i apoptoznih epitelnih stanica (Korfei i sur., 2008; Plataki i sur., 2005). Apoptozne epitelne stanice otpuštaju čimbenike kao što su TGF β , Shh i CTGF koji izravno aktiviraju fibroblaste u miofibroblaste koji ekspimiraju α SMA i kolagen. Kod bolesnika s IPF-om ekspresija CTGF je povišena u alveolarnim epitelnim stanicama (Pan i sur., 2001), a vezanjem na receptore na fibroblastima potiče migraciju, proliferaciju, diferencijaciju, proizvodnju sastavnica izvanstaničnog matriksa i apoptozu (Grotendorst i Duncan, 2005; Leask i Abraham, 2006).

S druge strane, smatra se da fibroblasti aktivirani u IPF-u mogu inducirati apoptozu alveolarnih epitelnih stanica i time dodatno narušiti epitelnu barijeru. Pokazano je da miofibroblasti otpuštaju angiotenzin II kao i reaktivne kisikove radikale (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koji uzrokuju apoptozu alveolarnih epitelnih stanica (Psathakis i sur., 2006; R. Wang i sur., 1999). Osim toga, proizvode i TGF β koji može izazvati apoptozu epitelnih stanica (Hagimoto i sur., 2002; Morishima i sur., 2001; Solovyan i Keski-Oja, 2006).

Osim kao odgovor na čimbenike koje proizvode epitelne stanice, fibroblasti kod bolesnika s IPF-om imaju i intrinzične promjene koje mogu objasniti njihovu pretjeranu aktivaciju i proliferaciju. U normalnim se uvjetima fibroblasti preko integrina β 1 vežu na kolagen 1 u izvanstaničnom matriksu, što aktivira protein PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog protein*) koji zatim inhibira signalni put PI3K-Akt i zaustavlja stanični ciklus. Na taj se način proliferacija fibroblasta zaustavlja kad se stanica veže na proteine izvanstaničnog matriksa, što je bitno kod reguliranog popravka oštećenja. Međutim, fibroblasti iz IPF bolesnika imaju promijenjenu aktivnost integrina β 1 i smanjenu ekspresiju proteina PTEN te ne dolazi do negativne regulacije proliferacije (Selman i sur., 2008; Xia i sur., 2008, 2010).

Kod bolesnika s IPF-om ponovno se aktiviraju signalni putevi inače aktivni tijekom embrionalnog i postnatalnog razvoja, kao što su Shh, Wnt i TGF β . Osim za razvoj pluća, ovi su signalni putevi bitni i za održavanje homeostaze pa se stoga aktiviraju tijekom popravka oštećenja (Baarsma i Königshoff, 2017; Selman i sur., 2008). Međutim, kod bolesnika s IPF-om regulacija je ovih signalnih puteva poremećena. Kod aktivnog signalnog puta Shh, alveolarne epitelne stanice proizvode ligand Shh koji parakrino djeluje na receptore PTCH-1

(engl. *patched 1*) i SMO (engl. *smoothened*) na fibroblastima što nizvodno aktivira transkripcijske faktore Gli koji reguliraju stanični ciklus te na taj način omogućuju proliferaciju fibroblasta (Hu i sur., 2015). Kod bolesnika s IPF-om ekspresija liganda Shh je povišena u alveolarnom epitelu (Stewart i sur., 2003). Signalni put Wnt regulira obnavljanje alveolarnih epitelnih stanica tipa II (ATII) te njihovu transdiferencijaciju u ATI stanice. U bolesnika s IPF-om signalni put Wnt konstitutivno je aktivan, a ekspresija liganda Wnt i receptora Frizzled je povišena (Königshoff i sur., 2008). β -katenin je nizvodni efektor signalnog puta Wnt, djeluje kao transkripcijski ko-faktor i veže se s drugim transkripcijskim faktorima, kao što su Smad-ovi iz signalnog puta TGF β . To upućuje na povezanost signalnih puteva Wnt i TGF β . Aktivacija signalnog puta Wnt u alveolarnim epitelnim stanicama može potaknuti ekspresiju proupalnog IL-1 β te proteina WISP1 (engl. *WNT1-inducible-signaling pathway protein 1*) koji regulira funkciju alveolarnih epitelnih stanica (Aumiller i sur., 2013; Königshoff i sur., 2008). Aktivacija signalnog puta Wnt u fibroblastima pak potiče ekspresiju sastavnica izvanstaničnog matriksa i biljega miofibroblasta te štiti stanice od apoptoze uzrokovane oksidacijskim stresom, što sveukupno može pridonijeti razvoju IPF-a (Vuga i sur., 2012).

2.1.3. Signalni put TGF β

TGF β je pleiotropni faktor, eksprimiran u različitim stanicama, a posljedice aktivacije njegovog signalnog puta uvelike ovise o tipu stanice i staničnom okolišu. Signalni put TGF β ima bitnu ulogu u morfogenezi tijekom embrionalnog razvoja te u kasnijem održavanju homeostaze. U IPF-u djeluje kao glavni profibrozni čimbenik i potiče proliferaciju i aktivaciju fibroblasta u miofibroblaste, proizvodnju sastavnica izvanstaničnog matriksa i epitelno-mezenhimsku tranziciju (Derynck i Zhang, 2003; Fernandez i Eickelberg, 2012).

Postoje tri izoforme TGF β , TGF β 1, - β 2 i - β 3, koji imaju iste stanične receptore. Signalni put TGF β aktivira se vezanjem TGF β na receptor TGF β tipa II, koji se zatim fosforilira i heterodimerizira s receptorom TGF β tipa I (engl. *activin receptor-like kinase 5*, ALK5). Aktivirani receptor TGF β tipa I pokreće signalnu kaskadu preko proteina Smad (kanonski signalni put). Najprije fosforilira efektorske proteine Smad – Smad2 i Smad3 koji zatim ulaze u heterodimerni kompleks s proteinom Smad4 (Fernandez i Eickelberg, 2012). Ovi kompleksi ulaze u staničnu jezgru gdje djeluju kao transkripcijski faktori i vežu se na elemente koji vežu Smad u promotorima niza različitih gena, među kojima su geni za kolagen tipa I, fibronektin, α SMA i CTGF (Castelino i Varga, 2010; Sakai i Tager, 2013; Zhou i sur., 2024). Inhibitorni

proteini Smad6 i Smad7 djeluju kao negativni regulatori signalnog puta TGF β jer sprječavaju fosforilaciju proteina Smad2 i Smad3 vezanjem na receptor TGF β tipa I. Osim toga, regrutiraju ubikvitin ligazu Smurf2 koja djeluje na receptor TGF β tipa I kako bi se razgradio (Ebisawa i sur., 2001; Hayashi i sur., 1997; Kavsak i sur., 2000). Pomoću Smad7 održava se negativni mehanizam povratne sprege, s obzirom na to da je ekspresija Smad7 regulirana aktivacijom signalnog puta TGF β (Zhou i sur., 2024). Osim navedenog kanonskog signalnog puta TGF β , postoje i nekanonski putevi koji se ne provode proteinima Smad. TGF β tako može aktivirati signalne puteve preko Erk1/2, PI3K-Akt, JNK, p38-MAPK, što dodatno pridonosi njegovoj pleiotropnoj ulozi (Peng i sur., 2022).

Sve tri izoforme TGF β prisutne su u tkivima u inaktivnim latentnim kompleksima. TGF β je nekovalentno vezan s latentnim peptidom (engl. *latency associated peptide*, LAP) u mali latentni kompleks (engl. *small latent complex*, SLC) koji se dalje veže s proteinima koji vežu TGF β u veliki latentni kompleks (engl. *large latent complex*, LLC). LLC se otpušta iz stanica i veže za proteine izvanstaničnog matriksa kao što su fibronektin i fibrilin. TGF β u kompleksu LLC nije aktivan, već ga je potrebno osloboditi proteoliznim kidanjem LAP-a, primjerice pomoću različitih matriksnih metaloproteinaza) ili ne-proteoliznim putem pomoću integrina koji uzrokuju konformacijske promjene peptida LAP (Annes i sur., 2003; Nishimura, 2009). Integrini su heterodimerni transmembranski proteini koji povezuju citoskelet stanice s izvanstaničnim matriksom i na taj način reguliraju procese kao što su migracija, proliferacija i diferencijacija stanica (Hynes, 2002). Nekoliko različitih integrina može osloboditi izoforme TGF β 1 i TGF β 3 iz latentnog kompleksa vezanjem motiva RGD (arginin-glicin-aspartat) na peptidu LAP (Shi i sur., 2011). Među njima, integrin $\alpha\beta$ 6 kojeg ekspimiraju epitelne stanice je posebice važan u aktivaciji latentnog TGF β u plućnoj fibrozi. Ekspresija integrina $\alpha\beta$ 6 povišena je u alveolarnim epitelnim stanicama pacijenata s IPF-om te korelira s povišenim mortalitetom (Saini i sur., 2015). Poznato je također, da mehanizmom povratne sprege TGF β 1 povećava ekspresiju gena za β 6 podjedinicu integrina (Tatler i sur., 2016). Inhibicijom integrina $\alpha\beta$ 6 uspješno se smanjuje fibrozni odgovor u modelima fibroze *in vitro* i *in vivo*, što naglašava ulogu ovog integrina u plućnoj fibrozi (Decaris i sur., 2021; Horan i sur., 2008; John i sur., 2020).

Inhibicija signalnog puta TGF β uspješno zaustavlja fibrozne procese, međutim s, obzirom na to da TGF β sudjeluje i u regulaciji imunskog odgovora te održavanju homeostaze, sistemska inhibicija dovodi do kardiotoksičnosti, nekontroliranog imunskog odgovora i autoimunosti (Peng i sur., 2022; Shi i sur., 2022).

2.1.4. Promjene izvanstaničnog matriksa

Glavna uloga izvanstaničnog matriksa u intersticiju pluća jest strukturna potpora, no uz to sudjeluje i u regulaciji staničnih procesa kao što su proliferacija, migracija, epitelno mezenhimska tranzicija i apoptoza (Booth i sur., 2012; Chuliá-Peris i sur., 2022; Confalonieri i sur., 2022). Izvanstanični matriks čine pravilno organizirani kolageni, glikoproteini (elastin, fibrilin, laminin, fibronektin), proteoglikani (dekorin, lumikan, versikan), a u njemu se nalaze i brojni drugi proteini koji služe za regulaciju (matriksne metaloproteinaze, lizil oksidaze, inhibitori matriksnih metaloproteinaza), aneksini, izlučeni čimbenici kao TGF β i koštani morfogenezni protein (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP) (Ganzleben i Medoff, 2025; Naba i sur., 2011). U IPF-u dolazi do prekomjerne proizvodnje određenih sastavnica izvanstaničnog matriksa, kao i do promjene u sastavu u odnosu na normalni matriks. Ekspresija kolagena tipa I, III i VI, fibronektina, glikozaminoglikana (hijaluronska kiselina) je znatno povećana, a matriks je neorganiziran (Tian i sur., 2019). Bazalna je membrana oštećena, vjerojatno uslijed smanjene ekspresije glavnih sastavnica, kolagena IV i laminina. Za razliku od normalnog matriksa koji je elastičan kako bi se alveole mogle ekspanirati i skupljati, u bolesnika s IPF-om jedna od glavnih karakteristika matriksa je iznimna krutost. Izmjerena čvrstoća normalnog matriksa je oko 2 kPa, dok je u IPF-u oko 16 kPa (Booth i sur., 2012). Krutost matriksa uzrokuje mehanički stres na stanice te potiče otpuštanje TGF β iz latentnog kompleksa i aktivaciju fibroblasta. Smatra se i da promjene u izvanstaničnom matriksu mogu dodatno pojačati upalni odgovor, primjerice elastin i hijaluronska kiselina potiču kemotaksiju imunskih stanica i adheziju neutrofila (Betensley i sur., 2016; Ganzleben i Medoff, 2025; Schultz i Wysocki, 2009).

Matriksne metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinase*, MMP) su endopeptidaze ključne za održavanje homeostaze izvanstaničnog matriksa jer mogu razgraditi specifične sastavnice od kojih je sačinjen. Osim toga, MMP razgradnjom sastavnica matriksa otpuštaju faktore rasta (primjerice, oslobađanje TGF β iz latentnog kompleksa), proupalne čimbenike i druge molekule koji se nalaze u matriksu i tako sudjeluju u regulaciji različitih staničnih procesa (Chuliá-Peris i sur., 2022). Na ovaj način MMP zapravo mogu poticati fibrozne procese kao što je EMT, i povećati ekspresiju profibroznih čimbenika. U skladu s time, ekspresija mnogih MMP, primjerice 1, 2, 3, 7, 9, 12, je povišena u bolesnika s IPF-om (Chuliá-Peris i sur., 2022; DePianto i sur., 2015; Todd i sur., 2020). Koncentracije MMP7 u plazmi se koriste kao biomarker bolesti (Clynick i sur., 2022; Konigsberg i sur., 2021; Rosas i sur., 2008). MMP2, 9 i 12 razgrađuju kolagen IV, jednu od glavnih sastavnica bazalne membrane što promovira

fibrozu jer pogoršava oštećenja alveolarnog epitela, sprječava pravilnu regeneraciju i omogućuje infiltraciju fibroblasta i makrofaga u alveolarni prostor (Pardo i Selman, 2006). Alveolarni makrofagi su glavni izvor MMP12, koja se još naziva i makrofagom elastazom. Osim razgradnje kolagena IV, MMP12 također razgrađuje i elastin, a sudjeluje i u pojačavanju upalnog odgovora i privlačenju neutrofila (Néan i sur., 2005). U mišjem modelu plućne fibroze izazvane bleomicinom, ekspresija MMP12 je znatno povećana već u početnoj fazi razvoja fibroze, nedugo nakon administracije bleomicina (Swaisgood i sur., 2000).

Aktivnost MMP regulirana je na više razina – regulacijom transkripcije, post-translacijskim modifikacijama koje uključuju proteolizno kidanje propeptida MMP te negativnom regulacijom preko inhibitora matriksnih metaloproteinaza (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*, TIMP). Proteini TIMP vežu se za MMP i na taj način inhibiraju njihovo proteazno djelovanje, a ravnoteža u ekspresiji TIMP i MMP omogućuje normalno i kontrolirano obnavljanje izvanstaničnog matriksa (Almuntashiri i sur., 2023; Selman i sur., 2000). Uslijed narušene ravnoteže ovih proteina može doći do različitih bolesti pluća, kao što su emfizem ili fibroza. TIMP1 se ističe od ostalih proteina TIMP po tome što osim inhibicije MMP aktivira također p38 i JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*), čime potiče proliferaciju stanica (Lambert i sur., 2004; Petitfrère i sur., 2000). Različiti faktori rasta, primjerice TGF β , faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF), epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) potiču ekspresiju TIMP1 (Lambert i sur., 2004). U bolesnika s IPF-om razina TIMP1 je povišena (Bertolotto i sur., 2026; DePianto i sur., 2015; Li i sur., 2026; Todd i sur., 2020), kao i kod miševa s plućnom fibrozom izazvanom bleomicinom (Fattman i sur., 2008; Li i sur., 2026; Manoury i sur., 2006).

Uz MMP i TIMP čije promjene u ekspresiji su povezane s jednim od glavnih obilježja IPF-a – prekomjernom proizvodnjom sastavnica izvanstaničnog matriksa, inhibitor plazminogenkog aktivatora (engl. *plasminogen activator inhibitor*, PAI) 1 je također uključen u remodeliranje izvanstaničnog matriksa (Mei i sur., 2022). Plazminogenški aktivatori su proteaze koje kidaju plazminogen u plazmin, a aktivirani plazmin je glavni enzim za razgradnju fibrina u krvnim ugrušcima. Plazmin također, sudjeluje u proteolizi bitnoj za aktivaciju MMP, staničnu migraciju i adheziju, upalne procese te popravak oštećenog tkiva. PAI1 izravno inhibira plazminogenške aktivatore te na taj način inhibira aktivaciju plazmina (Sillen i Declerck, 2021). PAI1 stoga ima bitnu ulogu u smanjenju razgradnje izvanstaničnog matriksa kako bi se u normalnim uvjetima omogućio popravak oštećenja, a njegova je prekomjerna ekspresija povezana s razvojem fibroze. Osim toga, PAI1 može potaknuti senescenciju

alveolarnih epitelnih stanica tipa II, što je bitan čimbenik u nastanku oštećenja i razvoju fibroze (Huang i sur., 2014; Jiang i sur., 2021; Rana i sur., 2023). TGF β je glavni čimbenik koji potiče ekspresiju PAI1, s obzirom na to da je promotor *PAI1* pod regulacijom transkripcijskih faktora Smad2 i 3 (Kawarada i sur., 2016). U bolesnika s IPF-om, ekspresija PAI1 je povećana u alveolarnim epitelnim stanicama tipa II gdje potiče njihovu senescenciju, dok je kod fibroblasta ekspresija PAI1 smanjena što pak sprječava apoptozu i potiče proliferaciju (Marudamuthu i sur., 2015; Rana i sur., 2023).

2.1.5. Čimbenici rizika za razvoj idiopatske plućne fibroze

Etiologija IPF-a je još uvijek nepotpuno razjašnjena, međutim poznato je više čimbenika rizika koji pridonose razvoju bolesti, a podijeljeni su na genske te okolišne čimbenike. Kod otprilike jedne trećine bolesnika pronađen je neki od genskih čimbenika rizika (Mathai i sur., 2016).

Najčešći genski čimbenik rizika koji korelira s pojavnosću IPF-a je prisutnost određene varijante u promotoru gena *MUC5B* koja povećava njegovu ekspresiju (Fingerlin i sur., 2013; Seibold i sur., 2011). *MUC5B* kodira mucin 5B, jednu od glavnih sastavnica mukusa u plućima, koji je bitan za mukocilijarni transport i time zaštitu pluća od udahnutih čestica ili patogena. Nije poznato kako je prisutnost ove varijante u promotoru gena *MUC5B* povezana s IPF-om, međutim smatra se da sama prisutnost nije dovoljna za razvoj bolesti, već da je potrebna interakcija s okolišnim čimbenicima (Martinez i sur., 2017; Mathai i sur., 2016).

Geni bitni za održavanje duljine telomera kod IPF pacijenata često imaju prisutne varijante koje dovode do abnormalno skraćenih telomera, posebice u alveolarnim epitelnim stanicama. U to spadaju geni *TERT* i *TERC*, koji kodiraju za telomeraznu reverznu transkriptazu i telomeraznu RNA (Fingerlin i sur., 2013). Kritično skraćene telomere aktiviraju staničnu senescenciju i apoptozu (Deng i sur., 2008).

Gen *SFTPC* koji kodira za surfaktantni protein C te gen *SFTPA2* koji kodira za surfaktantni protein A2 također su povezani s razvojem IPF-a. Surfaktantni proteini C i A2 koje proizvode alveolarne epitelne stanice tipa II u normalnim uvjetima oblažu alveole i služe za smanjenje površinske napetosti te u zaštiti od infekcija (Han i Mallampalli, 2015). U bolesnika s IPF pronađene su različite mutacije u genima *SFTPC* i *SFTPA2* koje dovode do nepravilnog smatanja proteina i nakupljanja u endoplazmatskom retikulu (engl. *endoplasmic reticulum*, ER), što uzrokuje stres ER-a i posljedično apoptozu ili pak epitelno mezenhimsku tranziciju

alveolarnih epitelnih stanica tipa II (Kropski i sur., 2013; Mulugeta i sur., 2012; Tanjore i sur., 2012).

Određene varijante gena *TOLLIP* također koreliraju s pojavnošću IPF-a. Gen *TOLLIP* kodira protein koji stupa u interakciju s Toll koji je bitan negativni regulator upalnog odgovora, stoga se njegova smanjena ekspresija pronađena u bolesnika s IPF povezuje s kroničnom upalom (Li i sur., 2024; Noth i sur., 2013). Protein koji stupa u interakciju s Toll zanimljiv je i stoga što inhibira signalni put TGF β i na taj način sudjeluje u rezoluciji odgovora na oštećenje, što je deregulirano u IPF-u (Chow i sur., 2023; Zhu i sur., 2012).

Od okolišnih čimbenika rizika, pušenje je najzastupljenije, dok profesionalna izloženost određenim vrstama prašine (npr. u drvnj i metalnoj industriji, kamenolomima, agrikulturi, ratarstvu) te kronične virusne infekcije također koreliraju s pojavnošću IPF-a (Gandhi i sur., 2023; Steele i sur., 2012; Taskar i Coultas, 2006). Smatra se da uz gensku predispoziciju, okolišni čimbenici mogu biti okidači koji dovode do razvoja IPF-a.

Činjenica da se IPF najčešće javlja kod osoba iznad 60 godina (Shakeel i sur., 2023) potaknula je hipotezu i istraživanje IPF-a kao bolesti povezane sa starenjem. Kod procesa starenja stanice ulaze u senescenciju, smanjuje se broj dostupnih matičnih stanica, dolazi do genomske nestabilnosti, skraćivanja telomera, mitohondrijske disfunkcije i niza drugih promjena (López-Otín i sur., 2013). Mnoge od navedenih promjena su uočene u epitelnim i mezenhimskim plućnim stanicama pacijenata s IPF-om (Mora i sur., 2017). Alveolarne epitelne stanice tipa II (ATII) mogu ući u senescenciju zbog mutacija u telomerazi čime gube svoj regeneracijski potencijal (Alder i sur., 2015). To je posebice važno s obzirom na njihovu progenitorsku funkciju. Uz trajni zastoj staničnog ciklusa, jedna od ključnih karakteristika senescentnih stanica je i sekrecija specifičnih čimbenika, primjerice tzv. fenotip povezan sa specifičnom sekrecijom starih stanica (engl. *senescence-associated secretory phenotype*, SASP). Među čimbenicima koji se otpuštaju su TGF β 1, MMP, PAI1 i proupalni citokini CCL2, CXCL1, IL-6, IL-8, IL-1 α , koji sudjeluju u procesu zacjeljivanja oštećenja. Međutim, u slučaju kronične sekrecije ovih čimbenika dolazi do patološkog procesa zacjeljivanja oštećenja i potencijalno do fibroze (Rodier i Campisi, 2011). Sa starenjem se senescentne stanice manje učinkovito uklanjaju, dolazi do sekrecije specifičnih senescentnih čimbenika i patološkog odgovora na oštećenja u plućima. Moguće je i da senescentne ATII stanice otpuštaju fibrozne i proupalne čimbenike i bez prisutnog oštećenja (Alder i sur., 2015).

2.1.6. *Odobreni lijekovi*

Premda se prije više desetljeća smatralo da je IPF posljedica prekomjerne upale, kliničke studije sa steroidnim protuupalnim lijekovima nisu pokazale učinkovitost, već je uočeno da može doći do pogoršanja stanja i povećanja mortaliteta bolesnika s IPF-om (Heukels i sur., 2019; King i sur., 2009; Richeldi i sur., 2003). Stoga se razvoj novih lijekova fokusirao na različite mete u fibroznim procesima. Američka agencija za lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je 2014. godine dva lijeka za IPF, nintedanib i pirfenidon, a 2025. godine odobren je treći lijek, nerandomilast. Važno je napomenuti da nintedanib i pirfenidon mogu imati teške nuspojave, a niti jedan od odobrenih lijekova ne poboljšava funkciju pluća niti zaustavlja fibrozne promjene, već samo usporava progresiju bolesti (Bargagli i sur., 2019). Iz tih je razloga potreba za razvojem novih lijekova za IPF i dalje kritična.

Nintedanib je inhibitor aktivnosti tirozinskih kinaza nekoliko receptora faktora rasta – receptora za trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor receptor*, PDGFR) α i β , receptora za faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor receptor*, FGFR) 1, 2 i 3 te receptora za vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) 1, 2 i 3. Premda je prvotno bio razvijen za inhibiciju angiogeneze u tumorima, pokazao se efikasan u životinjskim modelima plućne fibroze (Hilberg i sur., 2008). Nintedanib inhibira autofosforilaciju receptora PDGF, FGF i VEGF i time sprječava daljnje provođenje njihovih signalnih puteva. Aktivacija signalnog puta PDGF stimulira proliferaciju, migraciju i preživljenje fibroblasta, stoga ima važnu ulogu u IPF-u. Ekspresija liganda PDGF je povećana u IPF-u, a proizvode ga epitelne stanice i alveolarni makrofazi (Bonner, 2004). Sličnu ulogu ima i signalni put FGF koji također potiče proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i preživljenje stanica, kao i proizvodnju kolagena u fibroblastima i miofibroblastima. Ekspresija liganda FGF i receptora povišena je u bolesnika s IPF-om (Hetzl i sur., 2005; Inoue i sur., 2002). Staničnim esejima *in vitro* pokazano je da nintedanib smanjuje proliferaciju i kemotaksiju fibroblasta te njihovu diferencijaciju u miofibroblaste. Uz to je u mišjem modelu plućne fibroze izazvane bleomicinom *in vivo* pokazao antifibrozu i protuupalnu aktivnost. Smanjio je produkciju kolagena te ekspresiju TIMP1, IL-1 β i CXCL1, kao i broj limfocita i neutrofila u bronho-alveolarnoj tekućini (Wollin i sur., 2014). Utvrđeno je također, da tretman nintedanibom usporava opadanje plućne funkcije bolesnika s IPF-om te generalno progresiju bolesti (Richeldi i sur., 2014).

Pirfenidon ima antifibrozo, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje te je također odobren za liječenje IPF-a. Točna biološka meta pirfenidona nije definirana, ali se smatra da djeluje preko više mehanizama, a njegova uključenost potvrđena je u različitim modelima plućne fibroze *in vitro* i *in vivo*. Pirfenidon inhibira diferencijaciju miofibroblasta, proizvodnju kolagena, fibronektina, proupalnih citokina TNF α i IL-6, te smanjuje proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala. Smatra se također da je jedan od glavnih mehanizama njegovog antifibrogog djelovanja inhibicija signalnog puta TGF β (Ruwanpura i sur., 2020). Različite studije su pokazale da pirfenidon može smanjiti ekspresiju TGF β na razini ekspresije mRNA i proteina te smanjiti proizvodnju α SMA stimuliranu s TGF β , proizvodnju glavnih sastavnica izvanstaničnog matriksa, HSP47 bitnog za slaganje i otpuštanje pro-kolagena te proces EMT (Guo i sur., 2019; Hisatomi i sur., 2012; Liu i sur., 2005; Molina-Molina i sur., 2018). Osim toga, može inhibirati i ekspresiju drugih faktora rasta, kao što su PDGF i FGF (Gurujeyalakshmi i sur., 1999; Oku i sur., 2008). Pirfenidon u liječenju IPF-a, slično kao i nintedanib, usporava opadanje plućne funkcije i progresiju bolesti te sveukupno smanjuje stopu smrtnosti (King i sur., 2014; Noble i sur., 2011, 2016).

Nakon višegodišnjih pokušaja da se razviju novi lijekovi uz nintedanib i pirfenidon, prošle godine je odobren nerandomilast, selektivni inhibitor fosfodiesteraze (engl. *Phosphodiesterase*, PDE) 4B. Enzimi iz skupine PDE4 hidroliziraju ciklički adenosin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) i na taj način zaustavljaju cijeli niz signalnih kaskada u stanici (Azevedo i sur., 2014). Inhibitori pan-PDE4 (PDE4A, B, C i D) poznati su po protuupalnim svojstvima te su već neko vrijeme odobreni za liječenje kronične opstruktivske plućne bolesti (roflumilast), psorijaze i psorijatičnog artritisa (apremilast), te atopijskog dermatitisa (krisaborol) (Hatzelmann i sur., 2010; Kolb i sur., 2023). Inhibitori pan-PDE4 imaju i antifibroza svojstva, ali tek pri visokim dozama koje imaju teške nuspojave u gastrointestinalnom sustavu. Pokazano je da je specifičnom inhibicijom PDE4B, primjerice nerandomilastom, moguće smanjiti nuspojave uz zadržanu protuupalnu i antifibrozu aktivnost. U studijama *in vitro* i *in vivo* nerandomilast je inhibirao proizvodnju TNF α i akumulaciju neutrofila stimuliranu lipopolisaharidom (engl. *lipopolysaccharide*, LPS), aktivaciju miofibroblasta i ekspresiju gena za sastavnice izvanstaničnog matriksa te proliferaciju fibroblasta dobivenih od bolesnika s IPF-om stimuliranu s TGF β (Herrmann i sur., 2022). Osim potvrđenog utjecaja na fibroblaste, postoje indikacije da nerandomilast djeluje i na epitelne stanice u kojima sprječava ponavljajuća oštećenja i omogućava pravilnu regeneraciju

(Reininger i sur., 2024). Kliničkim je studijama pokazano da terapija nerandomilastom stabilizira funkciju pluća u bolesnika s IPF-om (Maher i sur., 2023; Richeldi i sur., 2022, 2023).

2.2 Modeli za istraživanje plućne fibroze *in vitro* i *in vivo*

Jedan od glavnih izazova u istraživanju patofiziologije i pronalasku novih terapija za IPF je manjak pouzdanih pretkliničkih modela koji bi što bolje prikazivali kompleksnost ove bolesti. Brojni su spojevi pokazali antifibrozu aktivnost u pretkliničkim ispitivanjima, međutim nisu bili učinkoviti u kliničkim ispitivanjima. Razvoj novih modela stoga bi mogao pridonijeti boljoj translaciji pretkliničkih u klinička ispitivanja (Kolanko i sur., 2024; Xie i sur., 2023).

2.2.1. Modeli *in vitro*

Dvodimenzionalne (2D) stanične kulture su najjednostavniji model *in vitro*, a za istraživanje plućne fibroze najčešće se koriste stanice za koje je poznato da imaju važnu ulogu u patofiziologiji ove bolesti, kao što su plućni fibroblasti, alveolarne epitelne stanice, endotelne stanice i makrofagi (Kolanko i sur., 2024). 2D stanične kulture omogućuju praćenje molekularnih procesa uključenih u patofiziologiju IPF-a u specifičnim stanicama. Primarni fibroblasti i alveolarne epitelne stanice izolirani iz bolesnika s IPF-om koriste se u studijama kako bi se identificirali promijenjeni signalni putevi, pratio fenotip i diferencijacija stanica, što omogućuje bolje razumijevanje patoloških procesa uključenih u razvoj i progresiju plućne fibroze, kao i identifikaciju novih bioloških meta (Ramos i sur., 2001; Xu i sur., 2016). 2D kulture stanica izoliranih iz bolesnika s IPF i zdravih ljudi koriste se za ispitivanje učinkovitosti potencijalnih spojeva s antifibroznom aktivnošću, pri čemu se često primjenjuje stimulacija različitim čimbenicima, najčešće TGF β (Hostettler i sur., 2014; Lehtonen i sur., 2016). Nedostatak 2D staničnih kultura kao modela za plućnu fibrozu je manjak kompleksnosti, odnosno ne postoji izvanstanični matriks niti više tipova stanica čije interakcije su jedan od ključnih pokretača fibroznih promjena u IPF-u (Kolanko i sur., 2024). Kompleksniji modeli *in vitro* koji se koriste u istraživanju IPF-a uključuju ko-kulture različitih tipova stanica, 3D modele stanica nasađenih u hidrogelove, sferoide i organoide, te prereze pluća (Asmani i sur., 2018; Leeman i sur., 2019; Prasad i sur., 2014; Surolia i sur., 2017).

2.2.2. *Prerezi pluća*

Prerezi tkiva mogu se pripremati iz raznih organa, uključujući pluća. Prvi korišteni model prereza tkiva su bili prerezi jetre (Parrish i sur., 1995), koji su danas često korišten model u metaboličkim i toksikološkim ispitivanjima, kao i u istraživanjima bolesti jetre. Prvi prerezi tkiva počeli su se pripremati još sredinom 20 stoljeća, a velik napredak u preciznosti i kvaliteti prereza je postignut razvojem novih mikrotoma za rezanje tkiva (Koziol-White i sur., 2024; Liu i sur., 2019).

Prerezi pluća jesu model *ex vivo* koji sadrži brojne karakteristike tkiva iz kojeg je pripremljen, prije svega prisutnost više relevantnih tipova stanica organiziranih u 3D strukture te očuvan izvanstanični matriks. Međustanične interakcije i interakcije između stanica i izvanstaničnog matriksa su očuvane, što je posebice važno kod istraživanja plućne fibroze. Prerezi pluća mogu se pripremati iz ljudskog ili životinjskog tkiva, iz zdravih ili bolesnih pluća. Radi svega navedenog imaju širok raspon primjene, pa se tako koriste se za funkcionalna i toksikološka istraživanja, proučavanje raznih plućnih bolesti i utjecaja patogena, kao i za farmakološka testiranja (Kolanko i sur., 2024; Koziol-White i sur., 2024; Lam i sur., 2023).

Prerezi pluća korišteni su u brojnim studijama za proučavanje bakterijskih i virusnih infekcija te upalnog odgovora. Switalla i sur., 2010. pokazali su da se prerezi pluća mogu koristiti kao model za proučavanje akutnih upalnih bolesti. U ljudskim prerezima pluća uspješno su aktivirali imunosni odgovor tretmanom LPS-om iz bakterije *Escherichia coli* koji aktivira TLR (engl. *toll-like receptor*) 4. Aktivacija TLR4 LPS-om uzrokovala je povećanu proizvodnju proupalnih citokina TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IFN γ te kemokina MIP-1 β , CCL2 (MCP-1), CCL-5 (RANTES), što uvelike korelira s imunosnim odgovorom na endotoksin LPS kod ljudi (Schaumann i sur., 2008). Osim toga, tretman kortikosteroidom deksametazonom smanjio je upalu izazvanu LPS-om u prerezima pluća, što pokazuje potencijal ovog modela u farmakološkim testiranjima. U drugim studijama, prerezi pluća tretirani su bakterijama kao što su *Pseudomonas aeruginosa* (Cramer i sur., 2022; Tony-Odigie i sur., 2022) i *Staphylococcus aureus* (Brann i sur., 2019) na koje su posebice osjetljivi pacijenti s cističnom fibrozom. R. Liu i sur., 2015. uspostavili su model infekcije mišjih prereza pluća virusom influenza. Virusi H1N1 i H1N3 uspješno su se umnažali u prerezima pluća te su izazvali upalni odgovor usporediv s onim u miševa inficiranim *in vivo*. Postoje modeli infekcije prereza pluća i drugim respiratornim virusima, kao što su rinovirusi (Reamon-Buettner i sur., 2019; Wronski i sur., 2021), respiracijski sincicijski virus (Pearson i sur., 2020), SARS-Cov2 (Zimniak i sur., 2021). Ovi modeli koriste se za testiranje novih antivirusnih i protuupalnih spojeva, a probir aktivnih

spojeva u modelu prereza pluća može smanjiti upotrebu životinja u daljnjim studijama *in vivo*. U prerezima pluća ne postoji dotok novih imunosnih stanica iz krvi, primjerice neutrofila i limfocita, što je jedan od nedostataka ovog modela. Bez obzira na to, prisutnost lokalnih imunosnih stanica u prerezima pluća omogućuje proučavanje početnog upalnog odgovora.

Prisutnost bronhiola i krvnih žila u prerezima pluća omogućuje praćenje njihovih kontrakcija, što je jedna od često korištenih primjena prereza pluća. Postoje brojne studije u kojima se u prerezima pluća prate bronhokontrakcije u stvarnom vremenu pomoću mikroskopa, a prednost je što se paralelno mogu mjeriti i drugi čimbenici kao na primjer oscilacije u razinama iona kalcija. Koriste se za istraživanje mehanizama kontrakcija u astmi i kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti (Delmotte i sur., 2010), za istraživanje utjecaja pušenja i virusnih infekcija na kontrakcije (Donovan i sur., 2016), kao i za testiranje novih lijekova (Lam i sur., 2023). Prerezi pluća koriste se i kao model za testiranje gubitka osjetljivosti na agoniste β_2 receptora, najčešće korištene bronhodilatatore u akutnim pogoršanjima astme (Bourke i sur., 2014; Donovan i sur., 2015).

Prerezi pluća koriste se također za istraživanje plućne fibroze. Mercer i sur., 2016 koristili su prereze pluća dobivene od bolesnika s IPF-om kako bi istražili ulogu signalnog puta fosfoinozitol-3 kinaznog (PI3K) u ovoj bolesti te ispitali mogućnost terapijske intervencije inhibitorom PI3K. Signalni put PI3K regulira stanični rast i proliferaciju te je prethodno prepoznat kao terapijska meta u tumorima (Belli i sur., 2023). U prerezima pluća iz bolesnika s IPF-om, Mercer i sur., 2016 su dokazali da je signalni put PI3K aktiviran u miofibroblastima, koristeći imunofluorescencijsko obilježavanje α SMA kao biljega miofibroblasta te fosforiliranog proteina Akt koji se nalazi nizvodno od aktiviranog PI3K. Osim toga, utvrdili su i da inhibicija signalnog puta PI3K dovodi do smanjene proizvodnje kolagena u prerezima pluća, mjerenjem koncentracije pro-kolagen 1 N-terminalnog peptida izlučenog u inkubacijski hranjivi medij. Decaris i sur., 2021 su također koristili prereze pluća iz bolesnika s IPF-om za ispitivanje terapijskog potencijala novih molekula, inhibitora integrina α v. Integrini α v imaju ključnu ulogu u plućnoj fibrozi jer aktiviraju latentni TGF β (Saini i sur., 2015). Decaris i sur., 2021 su pokazali da dualni inhibitor integrina α v β 1 i α v β 6 smanjuje fosforilaciju proteina Smad, kao i ekspresiju gena *COL1A1* u prerezima pluća iz pacijenata s IPF-om. Učinkovitost ovog inhibitora integrina α v β 1 i α v β 6 kasnije je potvrđena i u kliničkim studijama na IPF bolesnicima (Lancaster i sur., 2024), što upućuje na potencijal ljudskih prereza pluća kao modela za probir spojeva s antifibroznim djelovanjem u pretkliničkim istraživanjima. Premda se prerezi pluća mogu pripremati iz tkiva bolesnika s IPF-om, nedostupnost takvih pluća

ograničava korištenje ovog modela. U obzir treba uzeti i da se pluća pacijenata s IPF-om uglavnom prikupljaju kada se pacijenti podvrgnu transplantaciji pluća. To znači da je fibroza već jako uznapredovala, stoga prerezi pluća pripremljeni iz takvog tkiva predstavljaju posljednji stadij bolesti (Alsafadi i sur., 2017; Lehmann i sur., 2018). Iz navedenih razloga istražuje se mogućnost razvoja modela plućne fibroze na prerezima pripremljenim iz zdravog (ne fibroznog) tkiva gdje se zatim stimuliraju fibrozne promjene tretmanima *ex vivo*. Alsafadi i sur., 2017 su uspostavili jedan takav model na prerezima zdravih ljudskih pluća stimulacijom profibroznim čimbenicima TGF β , TNF α , PDGF i lizofosfatidilnom kiselinom (engl. *lysophosphatidic acid*, LPA) *ex vivo* kako bi aktivirali različite signalne puteve uključene u patofiziologiju IPF-a. Pokazali su da je stimulacija prereza navedenim profibroznim čimbenicima potaknula niz promjena nalik onima u plućnoj fibrozi. Genska i proteinska ekspresija surfaktantnog proteina C bila je smanjena što upućuje na gubitak alveolarnih epitelnih stanica tipa II, dok je ekspresija fibronektina, tenascina C i kolagena 1 bila povišena što pokazuje da je došlo do odlaganja sastavnica izvanstaničnog matriksa. Ovaj model prikazuje rane fibrozne promjene u IPF-u te se potencijalno može koristiti za proučavanje ranih mehanizama razvoja IPF-a (Alsafadi i sur., 2017). Osim toga, Lehmann i sur., 2018 su u navedenom modelu prereza ljudskih pluća stimuliranih s TGF β , TNF α , PDGF i LPA testirali odobrene lijekove za IPF, nintedanib i pirfenidon. Oba spoja su inhibirala ekspresiju kolagena kao biljega fibroze, a nintedanib je dodatno povećao ekspresiju surfaktant proteina C, biljega alveolarnih epitelnih stanica tipa II što upućuje na obnavljanje narušene funkcije alveolarnog epitela. Ova je studija pokazala da se prerezi ljudskih pluća s fibroznim promjenama induciranim *ex vivo* mogu koristiti za istraživanje novih lijekova kao i za bolje razumijevanje postojećih antifibroznih terapija (Lehmann i sur., 2018).

2.2.3. Model plućne fibroze izazvane bleomicinom *in vivo*

Plućna fibroza izazvana bleomicinom trenutno je najrelevantniji i najbolje okarakterizirani životinjski model *in vivo* za pretklinička ispitivanja novih lijekova za IPF (Jenkins i sur., 2017).

Bleomicin je antibiotik koji proizvodi bakterija *Streptomyces verticillus*, a koristi se kao kemoterapeutik za limfome, karcinome testisa, jajnika te skvamoznih stanica glave i vrata. Bleomicin uzrokuje jednolančane i dvolančane lomove DNA i posljedično apoptozu stanica, zbog čega se i koristi za kemoterapiju (Della Latta i sur., 2015). Kod velikog broja bolesnika

ima toksični učinak u plućima gdje uzrokuje fibrozne promjene. Pluća imaju nisku ekspresiju enzima bleomicin hidrolaze koja inaktivira bleomicin, zbog čega su i podložna oštećenjima uzrokovanim bleomicinom (Allawzi i sur., 2018). Iz tog se razloga bleomicin koristi za induciranje plućne fibroze u životinjskom modelu. Najčešće se koristi intratrahealna primjena bleomicina životinjama, u jednoj dozi. Uspostavljeni su modeli u različitim životinjskim vrstama, s time da se najčešće koriste miševi soja C57BL/6J (Moore i Hogaboam, 2008). Nakon ove metode primjene bleomicina, u plućima dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala te oštećenja i apoptoze epitelnih stanica. U plućima posljedično dolazi do aktivacije upalnog odgovora i infiltracije imunskih stanica kao što su neutrofili i limfociti te povećane ekspresije proupalnih citokina IL-1, IL-6, TNF α , interferona (IFN) γ , kao i profibroznog čimbenika TGF β (Moeller i sur., 2008). Ovi procesi događaju se tijekom prvih 7 dana od primjene bleomicina. Slijedi aktivacija fibroblasta i prekomjerna proizvodnja sastavnica izvanstaničnog matriksa koja se odvija do otprilike 14 dana nakon primjene bleomicina. Smatra se da se fibroza pluća uspostavlja između 14.-og i 28.-og dana nakon primjene bleomicina (Della Latta i sur., 2015; Jenkins i sur., 2017).

Fibrozne promjene u plućima vidljive su na molekularnoj i histološkoj razini, a nalikuju promjenama u akutnoj fazi IPF-a kod ljudi (Cai i sur., 2013; Peng i sur., 2013; Sueblinvong i sur., 2012). Razina fibroze u plućima nakon tretmana bleomicinom najčešće se određuje histološkom analizom tkiva Masson trikrom i hematoksilin-eozinskim bojanjem uz klasifikaciju Ashcroft, kvantifikacijom hidroksiprolina kao mjere proizvedenog kolagena, mjerenjem sastava i količine infiltriranih imunskih stanica te mjerenjem funkcije pluća *in vivo* (Tashiro i sur., 2017). Otprilike 6 tjedana nakon tretmana bleomicinom dolazi do spontanog popravka nastalih oštećenja u plućima i završetka fibroznih procesa, što je glavna razlika ovog mišjeg modela u odnosu na progresivnu i ireverzibilnu fibrozu kod ljudi s IPF-om, kao i jedan od nedostataka ovog modela (Della Latta i sur., 2015).

Bez obzira na gore naveden nedostatak potpune podudarnosti s ljudskom bolesti, životinjski model plućne fibroze izazvane bleomicinom ostaje najvažniji i najčešće korišten model *in vivo* u pretkliničkim ispitivanjima učinkovitosti potencijalnih antifibroznih lijekova. Poslužio je za identifikaciju novih terapijskih meta i brojnih spojeva koji su napredovali u daljnja klinička ispitivanja. Sva tri trenutno odobrena lijeka za IPF, pirfenidon, nintedanib i nerandomilast, pokazali su antifibroznu aktivnost u ovom modelu *in vivo* prije nego što su bili testirani u kliničkim studijama, a zatim i odobreni za liječenje IPF-a (Reininger i sur., 2024; Schaefer i sur., 2011; Wollin i sur., 2014).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Tretman miševa bleomicinom *in vivo*

U istraživanju su korišteni mužjaci miševa soja C57BL/6N, starosti 8–13 tjedana. Miševi su podrijetlom iz Charles River Inc., Njemačka, a držani su u registriranoj nastambi Selvite d.o.o. u uvjetima temperature zraka 22 ± 2 °C i relativne vlažnosti zraka 55 ± 10 %, s ciklusom od 12 sati svjetla i 12 sati mraka. Hrana u peletima VRF 1 (P) (Special Diets Services) i voda su bili dostupni *ad libitum*.

Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (Ur. broj: 251-58-10617-25-417; Klasa: 643-02/25-01/17; datum odobrenja: 17. rujna 2025.).

Prije primjene bleomicina, miševi su anestetizirani primjenom 10 mL/kg tjelesne težine otopine narkamona (100 mg/mL ketamin hidroklorid, Bioveta) i ksilazina (2 %, Alfasan) intrepaeritonelanom rutom. Svakoj životinji je zatim intranazalno administrirano 50 µL bleomicina (koncentracije 0,6 mg/mL) pripremljenog u fiziološkoj otopini, tako da je konačna koncentracija bleomicina u životinji bila ~1 mg/kg. Tijekom administracije bleomicina miševi su držani u ležećem nagnutom položaju, s glavom povišenom između 60 i 75 stupnjeva u odnosu na noge. Kontrolnoj skupini miševa je umjesto bleomicina administrirana fiziološka otopina. Nakon administracije bleomicina ili fiziološke otopine, miševi su držani u kavezima u nastambi 14 dana tijekom kojih su se svaki dan klinički pratili (mjerila se tjelesna težina, pratilo se konzumira li životinja hranu i vodu te pokazuje li znakove stresa ili boli).

3.2 Priprema prereza mišjih pluća

Prezezi pluća pripremani su iz netretiranih miševa te iz miševa tretiranih bleomicinom ili fiziološkom otopinom (kontrolna skupina) *in vivo*.

Miševi su najprije anestetizirani otopinom narkamona (100 mg/mL ketamin hidroklorid, Bioveta) i ksilazina (2 %, Alfasan) intrepaeritonelanom rutom, a zatim smješteni na grijaći blok na 37 °C. Ventralna strana tijela je sterilizirana 70 % etanolom, koža prerezana od brade do pelvisa, a trbušna šupljina otvorena i životinja iskrvarena terminalnim krvarenjem preko šuplje vene (lat. *vena cava*) kako bi se pluća ispraznila od krvi. Zatim je dijafragma škarama odvojena od inferiornog prsnog otvora, a rebra i ključna kost su lateralno prerezani da bi se odvojio ventralni dio prsnog koša. Žlijezde slinovnice, mišići i vezivno tkivo su uklonjeni s traheje, a

traheja je odvojena od okolnog vezivnog tkiva. Pomoću mikro škara izrezana je rupa u gornjem dijelu traheje između dvije hrskavice, a plastični kateter je umetnut u traheju. Dišni putevi su zatim polako napunjeni kroz kateter u traheji toplom ($\sim 37^\circ\text{C}$), tekućom 1,5 % otopinom agaroze s niskom točkom taljenja (Sigma) u hranjivom mediju Advanced DMEM/F12 (Gibco). Punjenje pluća otopinom agaroze je završeno kada su pluća napuhana do volumena sličnog fiziološkom stanju, što je otprilike 2 mL otopine agaroze. Nakon što su pluća napunjena agarozom, traheja je podvezana koncem za šivanje da se spriječi isticanje agaroze iz pluća. Traheja je zatim prerezana iznad podveza, a pluća su odvojena od trbušne šupljine, izvađena i premještena u hladni hranjivi medij na ledu kako bi se agarozu u plućima polimerizirala.

Nakon otprilike 30 min polimerizacije agaroze u hranjivom mediju na ledu, pluća napunjena agarozom su izvađena na sterilnu Petrijevu zdjelicu unutar biološkog sterilnog kabineta. Režnjevi pluća su razdvojeni i odvojeni od traheje jednokratnim sterilnim skalpelom te sterilnim pincetama. Zatim je pomoću metalnog rezača svaki režanj izrezan u cilindre promjera 8 mm. Tako pripremljeno tkivo je prebačeno u mikrotom (Live Tissue Slicer, Alabama R&D) napunjen ohlađenim medijem DMEM (Gibco) s dodatkom 1 % antibiotika i antimikotika (Gibco) gdje se pristupilo rezanju na prereze debljine otprilike $250\ \mu\text{m}$ te promjera 8 mm. Prerezi pripremljeni iz istog miša su zatim skupljeni iz spremnika mikrotoma i pažljivo prebačeni sterilnim pincetama u pločice sa 6 jažica napunjene toplim hranjivim medijem Advanced DMEM/F12 (Gibco) s dodatkom 1 % antibiotika i antimikotika (Gibco) i zatim inkubirani pri 37°C , 5 % CO_2 , 95 % vlažnosti.



Slika 1. Mišja pluća napunjena agarozom prije pripreme prereza na mikrotomu (vlastita fotografija).



Slika 2. Mikrotom (Live Tissue Slicer, Alabama R&D) za pripremu prereza pluća (vlastita fotografija).

3.3 Priprema prereza ljudskih pluća

Ljudsko tkivo pluća prikupljeno je od bolesnika s medicinski indiciranim kirurškim zahvatom na plućima u Odjelu za torakalnu kirurgiju Kliničke bolnice Dubrava. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava (Br. odobrenja: 2022/1104-01, datum odobrenja: 11. travnja 2022.), kao i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. broj: 251-59-10106-25-111/130, Klasa: 641-01/25-02/04, datum odobrenja: 17. srpnja 2025.).

Svi bolesnici od kojih je uzimano tkivo pluća potpisali su informirani pristanak, nakon čega im je dodijeljena jedinstvena šifra donora (troznamenkasti broj) koja se nadalje u istraživanju koristila kao donorov pseudonim umjesto imena i drugih podataka pomoću kojih bi se mogao utvrditi identitet donora. Podaci se mogu povezati s pacijentom samo pomoću Identifikacijske liste donora sigurno pohranjene u Kliničkom centru kojoj pristup ima glavni klinički istraživač. U sklopu ovog istraživanja korišteni su šifrirani podaci: dob, spol, klinička dijagnoza, komorbiditeti, pušački status, datum uzorkovanja, lokacije s kojih su uzorci prikupljeni. Prikupljanje uzoraka i podataka provedeno je u skladu s Dobrom kliničkom praksom, temeljnim načelima za biomedicinska istraživanja prema trenutnoj verziji Helsinške deklaracije i važećim regulatornim propisima, uključujući propise o zaštiti osobnih podataka.

Prikupljeni su uzorci tkiva pluća nakon uzimanja materijala potrebnog za histopatološku dijagnostiku te prije neškodljivog uklanjanja ostatnog kirurški odstranjenog tkiva. Bolesnici

čije tkivo je korišteno u ovom istraživanju imali su kirurški zahvat indiciran tumorom pluća, a prikupljeno je tkivo koje nije zahvaćeno tumorom. Bolesnici nisu imali kliničku dijagnozu neke plućne bolesti što je potvrdio i histološki nalaz dijela korištenog ostatnog tkiva. Informacije o donorima tkiva pluća koji su korišteni u ovom istraživanju prikazani su u Tablica 1. Donori koji su klasificirani kao bivši pušači su prestali pušiti 12 mjeseci prije operacije. Niti jedan od donora nije primao predoperativnu antitumorsku terapiju (npr. kemoterapiju).

Uzorkovano tkivo odmah se potom transportiralo u hladnom hranjivom mediju Advanced DMEM/F12 (Gibco) s dodatkom 1 % antibiotika i antimikotika (Gibco) na ledu do laboratorija gdje se pristupilo njegovoj obradi.

Prikupljeno se tkivo pluća odmah po primitku premjestilo u sterilnu Petrijevu zdjelicu unutar biološkog sterilnog kabineta. Plastični kateteri oprezno su umetnuti u sve dostupne otvore krvnih žila i/ili dišnih puteva na površini prikupljenog tkiva pluća, nakon čega su kroz katetere napunjeni toplom ($\sim 37^{\circ}\text{C}$), tekućom 1,5 % otopinom agaroze s niskom točkom taljenja (Sigma) u hranjivom mediju Advanced DMEM/F12 (Gibco). Napunjeno tkivo pluća zatim je premješteno u hladni hranjivi medij na ledu kako bi se agarozna polimerizirala. Nakon otprilike 30 min polimerizacije agaroze, napunjeno tkivo pluća premješteno je u sterilnu Petrijevu zdjelicu te je sterilnim jednokratnim skalpelom odstranjen sav višak tkiva koji nije bio napunjen agarozom. Skalpelom je tkivo narezano u cilindre promjera otprilike 8 mm i zatim prebačeno u držač tkiva na mikrotomu (Live Tissue Slicer, Alabama R&D), također promjera 8 mm. Mikrotom je napunjen ohlađenim medijem DMEM (Gibco) s dodatkom 1 % antibiotika i antimikotika (Gibco). Tkivo pluća je na mikrotomu rezano na prereze debljine otprilike 500 μm te promjera 8 mm. Pripremljeni prerezi pažljivo su prebačeni u pločice sa 6 jažica napunjene toplim hranjivim medijem Advanced DMEM/F12 (Gibco) s dodatkom 1 % antibiotika i antimikotika (Gibco) i zatim inkubirani pri 37°C , 5 % CO_2 , 95 % vlažnosti.



Slika 3. Dio ljudskih pluća napunjen agarozom prije pripreme prereza na mikrotomu (vlastita fotografija).

Tablica 1. Informacije o donorima tkiva pluća: spol, dob, dijagnoza, pušački status.

Donor	Spol	Dob	Dijagnoza	Pušački status
001	muški	65	NSCLC, adenokarcinom	bivši pušač
002	muški	63	NSCLC, adenokarcinom	bivši pušač
003	muški	64	NSCLC, planocelularni karcinom	nepušač
004	muški	69	NSCLC, planocelularni karcinom	aktivni pušač
005	muški	57	NSCLC, planocelularni karcinom	aktivni pušač
006	muški	67	NSCLC, planocelularni karcinom	aktivni pušač
007	ženski	60	NSCLC, adenokarcinom	aktivni pušač

NSCLC = rak pluća nemalih stanica (engl. *Non Small Cell Lung Cancer*).

3.4 Tretman i inkubacija prereza mišjih i ljudskih pluća

Nakon pripreme prereza mišjih i ljudskih pluća kao što je opisano, prerezi su pažljivo sterilnom pincetom prebačeni u pločice s 24 jažice, jedan prerez po jažici napunjenoj toplim hranjivim medijem Advanced DMEM/F12 (Gibco) s dodatkom 1 % antibiotika i antimikotika (Gibco). Ukupni volumen hranjivog medija sa i bez dodanih tretmana uvijek je iznosio 0,7 mL po jažici.

U pokusima određivanja vijabilnosti, prerezi mišjih i ljudskih pluća inkubirani su u hranjivom mediju tijekom 1 do maksimalno 7 dana pri 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlažnosti. Na

različitim vremenima inkubacije, prerezi su korišteni za različite metode određivanja vijabilnosti prema protokolima opisanima niže (bojanje hematoksilin-eozin i Crossman trikrom, metoda redukcije Alamar Blue, fluorescencijsko obilježavanje živih i mrtvih stanica). Inkubacijski hranjivi medij je skupljen i pohranjen na -80°C do korištenja za određivanje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (engl. *lactate dehydrogenase*, LDH) također prema protokolu niže opisanom.

Za pokus imunofluorescencijskog obilježavanja kolagena i fibronektina u prerezima mišjih pluća, prerezi su inkubirani u hranjivom mediju tijekom 3 dana pri 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlažnosti nakon čega su fiksirani u otopini 10 % formalina i dalje korišteni kao što je opisano niže.

U pokusima testiranja spojeva, mišji i ljudski prerezi inkubirani su tijekom 3 ili 5 dana u hranjivom mediju koji je sadržavao spoj SB525334 (inhibitor receptora TGFβ tipa I) ili nintedanib. Pripremljene su matične otopine (10 mM) oba spoja u dimetil sulfoksidu (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) iz koje su dalje pripremane testne otopine razrjeđivanjem u hranjivom mediju. Testne otopine različitih koncentracija spojeva navedene su za svaki pokus u rezultatima. U svim pokusima gdje su testirani spojevi, pripremani su kontrolni prerezi koji su inkubirani u hranjivom mediju s odgovarajućim postotkom DMSO-a. Prerezi su inkubirani pri 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlažnosti, nakon čega su korišteni za analizu ekspresije gena kao što je opisano niže. Inkubacijski hranjivi medij je skupljen i pohranjen na -80 °C do korištenja za određivanje koncentracija proteina od interesa metodom ELISA, koristeći niže opisane protokole.

U pokusima stimulacije mišjih i ljudskih prereza s TGFβ, prerezi su inkubirani u hranjivom mediju koji je sadržavao rekombinantni mišji ili ljudski TGFβ (R&D Systems). Matične otopine TGFβ bile su pripremljene u koncentraciji od 20 µg/mL u sterilnoj vodi MilliQ s 4 mM HCl (Kemika) i 1 mg/mL goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (Sigma). Testne otopine različitih koncentracija dobivene su razrjeđivanjem u hranjivom mediju. Testne koncentracije navedene su za svaki pokus u rezultatima. U pokusima gdje su testirani spojevi uz stimulaciju s TGFβ, prerezi su najprije inkubirani 1 h pri 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlažnosti u hranjivom mediju koji je sadržavao spojeve, nakon čega je u medij dodan TGFβ. Prerezi su inkubirani pri 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlažnosti, nakon čega su korišteni za analizu ekspresije gena kao što je opisano niže. Inkubacijski hranjivi medij je skupljen i pohranjen pri -80 °C do korištenja za određivanje koncentracija proteina od interesa metodom ELISA, koristeći niže opisane protokole.

3.5 Bojanje hematoksilin-eozin i Crossman trikrom i histološka analiza prereza mišjih i ljudskih pluća

Histološka analiza korištena je za raspoznavanje različitih sastavnica i struktura tkiva u mišjim i ljudskim prerezima pluća. Uspoređeni su prerezi inkubirani *ex vivo* tijekom različitog vremena sa svježe pripremljenim prerezima (dan 0). Prerezi pluća fiksirani su 10 % otopinom formalina (Thermo Fisher Scientific) tijekom 24 h pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije, prerezi su dehidrirani u rastućem postotku etanola (Merck), najprije 96 % etanol tijekom 2 min, zatim ≥ 99.5 % etanol tijekom 2 min, zatim uronjeni u ksilen (Merck) tijekom 3 min i uklopljeni u parafinske blokove. Parafinski blokovi izrezani su na debljinu od 1 μm , zatim deparafinizirani u ksilenu i hidrirani u padajućem postotku etanola (≥ 99.5 % etanol tijekom 2 min, zatim 96 % etanol tijekom 2 min) do destilirane vode.

Mišji prerezi pluća obojani su metodom Crossman trikrom koja omogućuje vizualizaciju kolagena pri čemu je kolagen obilježen zeleno, mišićno tkivo plavo-ljubičasto te jezgre stanica tamno plavo. Pripremljeni parafinski rezovi najprije su uronjeni u otopinu Mayerovog hemalauma, isprani u destiliranoj vodi, a zatim uronjeni u tri različite otopine s ispiranjem između njih. Otopina 1 sadržavala je 0,3 % fuksin, 2 % orange G i 1 % octenu kiselinu, otopina 2 sadržavala je 1 % hidrat fosfomolibdinske kiseline, otopina 3 sadržavala je 1 % boju svjetlo zeleni SF yellowish i 1 % octenu kiselinu (sve Merck). Nakon bojanja, rezovi su ponovno dehidrirani u rastućem postotku etanola (najprije 96 % etanol tijekom 2 min, zatim ≥ 99.5 % etanol tijekom 2 min) i uronjeni u ksilen.

Ljudski prerezi pluća obojani su metodom hematoksilin-eozin. Parafinski rezovi najprije su uronjeni u otopinu Mayerovog hemalauma (Merck), isprani u destiliranoj vodi i zatim uronjeni u otopinu 0,5 % eozina Y (Merck). Nakon bojanja, rezovi su ponovno isprani i zatim dehidrirani u rastućem postotku etanola (najprije 96 % etanol tijekom 2 min, zatim ≥ 99.5 % etanol tijekom 2 min) i uronjeni u ksilen.

Obojani mišji i ljudski parafinski rezovi pokriveni su predmetnim pokrovnica te korišteni za histološku analizu svjetlosnim mikroskopom od strane patologa.

3.6 Određivanje vijabilnosti mišjih i ljudskih prereza pluća metodom redukcije Alamar Blue

Reagens Alamar Blue (Invitrogen) korišten je za mjerenje vijabilnosti stanica prereza pluća. Reagens Alamar Blue sadrži resazurin koji se u reducirajućim uvjetima u metabolički aktivnim stanicama pretvara u resorufin pri čemu se pojačava fluorescencija.

Reagens Alamar Blue razrijeđen je 10 puta u hranjivom mediju Advanced DMEM/F12 (Gibco) i zatim je dodano 700 µL u jažicu pločice u kojoj se nalaze prerezi pluća. Prerez pluća zatim je inkubiran s razrijeđenim reagensom Alamar Blue pri 37 °C, 5 % CO₂, 95 % vlažnosti tijekom 2 h. Za kontrolu, razrijeđeni reagens Alamar Blue dodan je u jažice napunjene samo medijem te inkubiran 2 h. Fluorescencija je očitana uređajem EnVision (Perkin Elmer) koristeći ekscitaciju pri valnoj duljini 530 nm i emisiju pri valnoj duljini 590 nm.

3.7 Određivanje vijabilnosti prereza mišjih i ljudskih pluća metodom mjerenja aktivnosti laktat dehidrogenaze

Enzim laktat dehidrogenaza (LDH), zbog svoje male veličine, izlazi iz stanica s oštećenim membranama u inkubacijski hranjivi medij te se kvantifikacija njegove aktivnosti u inkubacijskom mediju može koristiti kao mjera vijabilnosti stanica. LDH katalizira pretvorbu laktata u piruvat pri čemu reducira NAD⁺ u NADH, a apsorbancija NADH pri valnoj duljini od 450 nm koristi se kao mjera aktivnosti enzima.

Aktivnost LDH u inkubacijskom hranjivom mediju prereza pluća mjerena je koristeći kolorimetrijski komplet (AbCam). Alikvot (50 µL) inkubacijskog hranjivog medija u kojem je bio inkubiran prerez pluća dodano je u jažicu pločice, a u preostale jažice dodani su standard NADH u koncentracijama 12,5, 10, 7,5, 5 i 2,5 nmol te pufer LDH za slijepu probu. U sve je jažice potom dodan supstrat prethodno razrijeđen 25 puta u puferu LDH. Odmah nakon dodatka supstrata te nakon 30 min inkubacije pri 37 °C, apsorbancija na 450 nm je očitana pri valnoj duljini od 450 nm uređajem SpectraMax i3 (Molecular Devices).

Količina NADH (nmol) u inkubacijskom hranjivom mediju prereza pluća izračunata je interpolacijom sa standardne krivulje različitih količina NADH. Aktivnost LDH (mU/mL) u uzorku nadalje je izračunata koristeći formulu:

$$\text{aktivnost LDH} = \left(\frac{\text{količina NADH u uzorku}}{\text{vrijeme reakcije} \times \text{volumen uzorka u reakciji}} \right) \times \text{faktor razrjeđenja uzorka}$$

3.8 Određivanje vijabilnosti prereza ljudskih pluća obilježavanjem živih i mrtvih stanica

Prisutnost živih i mrtvih stanica u ljudskim prerezima pluća određena je koristeći fluorescencijske boje kalcein-AM i etidij homodimer (Invitrogen), a obojenje je vizualizirano konfokalnim mikroskopom LSM980 (Zeiss). Kalcein-AM prolazi kroz neoštećene stanične membrane, a ulaskom u stanicu esterase ga hidroliziraju u fluorescentni kalcein. Detekcija zelenog fluorescentnog kalceina upućuje na prisutnost živih i metabolički aktivnih stanica. Etidij homodimer prolazi kroz stanične membrane samo kad su oštećene, ulazi u jezgru gdje se vezanjem na nukleinske kiseline pojačava njegova crvena fluorescencija što omogućuje detekciju oštećenih i mrtvih stanica. Korištenjem boja kalcein-AM i etidij homodimer je moguće u istom uzorku vizualizirati prisutnost živih i mrtvih stanica.

Prerezima pluća u jažicama dodana je otopina boja kalcein-AM (4 μ M) i etidij homodimer (4 μ M). Prerezi su zatim inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije, prerezi pluća su isprani 3 puta puferom D-PBS (Sigma), prebačeni na predmetno stakalce i vizualizirani konfokalnim mikroskopom LSM980 (Zeiss). Signali za kalcein detektirani su koristeći ekscitaciju pri valnoj duljini 494 nm i emisiju pri valnoj duljini 514 nm, dok su signali za etidij homodimer detektirani koristeći ekscitaciju pri valnoj duljini 543 nm i emisiju pri valnoj duljini 617 nm.

3.9 Imunofluorescencijska detekcija kolagena 1 i fibronektina u prerezima mišjih pluća

Kolagen 1 i fibronektin u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom *in vivo*, kao i kontrolnih miševa tretiranih fiziološkim otopinom, detektirani su imunofluorescencijskim obilježavanjem specifičnim protutijelima te vizualizacijom konfokalnim mikroskopom LSM980 (Zeiss). Prerezi su najprije fiksirani 20 min pri sobnoj temperaturi 4 % otopinom formaldehida (Polysciences) te zatim blokirani 1 h u otopini 5 % BSA i 0,3 % Tritona-X (Sigma). Specifična protutijela za kolagen 1 (1:200, AbCam) i fibronektin (1:100, AbCam) razrijeđena su u otopini za blokiranje i dodana prerezima na inkubaciju preko noći pri 4 °C. Sutradan su prerezi isprani 3 puta puferom D-PBS i zatim inkubirani 2 h pri sobnoj temperaturi u otopini sekundarnog protutijela na zečje antigene obilježenog fluoroforom AF488 (1:250, Invitrogen). Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom i ispiranja prereza 3 puta puferom D-PBS, Hoechst 33342 (Invitrogen) razrijeđen 1:2000 u otopini za blokiranje dodan je prerezima na inkubaciju 20 min pri sobnoj temperaturi.

Prerezi su vizualizirani konfokalnim mikroskopom. Kao kontrole su korišteni uzorci prereza kojima su dodana samo sekundarna protutijela. Signali za Hoechst 33342 detektirani su koristeći ekscitaciju pri valnoj duljini 348 nm i emisiju pri valnoj duljini 455 nm, dok su signali za kolagen 1 ili fibronektin detektirani koristeći ekscitaciju pri valnoj duljini 493 nm i emisiju pri valnoj duljini 517 nm. Svaki prerez snimljen je kod 20–30 različitih ravnina (engl. *Z stack*) koje su zatim preklopljene u jednu 2D sliku ortogonalnom projekcijom koristeći program ZEN (Zeiss). S obzirom na to da je imunofluorescencijsko obilježavanje te snimanje konfokalnim mikroskopom rađeno na prerezima debljine 250 µm, dobivene signale nije bilo moguće precizno kvantificirati jer se signali iz različitih slojeva preklapaju, stoga služe kao kvalitativna provjera ostalih korištenih kvantitativnih metoda (PCR, ELISA).

3.10 Izolacija RNA iz prereza mišjih i ljudskih pluća

Protokol za izolaciju RNA iz prereza mišjih i ljudskih pluća uspostavljen je prilagodbom protokola iz Ogura i sur., 2015 koji uključuje ekstrakciju fenol-kloroformom uz dodatno pročišćavanje od agaroze.

Pojedinačni prerezi pluća homogenizirani su u 750 µL reagensa TRIzol (otopina fenola i gvanidin izotiocijanata, Invitrogen) u epruvetama CK28 Precellys s 2.8 mm keramičkim kuglicama (Bertin Technologies) koristeći homogenizator Precellys (Bertin Technologies) namješten na 6000 rpm uz hlađenje. Nakon homogenizacije, dodano je 150 µL kloroforma, promiješano i zatim centrifugirano. Centrifugiranjem je otopina razdvojena na gornju vodenu fazu, međufazu te donju fenolnu fazu. Vodena faza je pažljivo skupljena i zatim pomiješana s 375 µL 100 % izopropanola (1/2 volumena TRIzola korištenog za homogenizaciju) kako bi došlo do precipitacije RNA. Nakon centrifugiranja, RNA talog je ispran sa 750 µL 75 % etanola te ponovo centrifugiran. RNA talog je zatim otopljen u 200 µL pufera NTC (Macherey-Nagel) i inkubiran 10 min na 50 °C. Otopina je pomiješana s 200 µL 70 % etanola i prebačena na kolonu NucleoSpin za pročišćavanje RNA (Macherey-Nagel). Kolone NucleoSpin su isprane dva puta sa 700 µL pufera NT3 (Macherey-Nagel), uz centrifugiranje između koraka ispiranja. RNA je na kraju eluirana s membrane kolone u 30 µL pufera NE (Macherey-Nagel) i skupljena u 1,5 mL epruvete (Eppendorf). Svi uzorci RNA su spremljeni pri -80 °C do daljnjeg korištenja u reakciji reverzne transkripcije.

3.11 Određivanje ekspresije gena metodama reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom

Iz izolirane RNA, metodom reverzne transkripcije sintetizirana je cDNA koristeći komplet SuperScript III (Invitrogen). U reakcijsku smjesu s RNA dodane su nasumične početnice (250 ng), dNTP (0,5 mM), DTT (5 mM), RNase Out (inhibitor RNaza, 40 jedinica), enzim SuperScript III reverzna transkriptaza (200 jedinica) i pufer First-Strand, ukupnog volumena 20 µL. Reakcija reverzne transkripcije odvijala se u termokružniku (Eppendorf) pri uvjetima 65 °C 5 min (denaturacija sekundarnih RNA struktura), 25 °C 5 min (prijanjanje početnica), 50 °C 60 min (sinteza cDNA) i 70 °C 15 min (inaktivacija reakcije). Po završetku reakcije reverzne transkripcije, novonastala cDNA razrijeđena je 5 puta u čistoj vodi bez RNaza prije daljnjeg korištenja u reakciji lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR).

Za detekciju ekspresije gena od interesa korištena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. U reakcijsku smjesu s cDNA dodane su početnice i sonda TaqMan za specifični gen od interesa, smjesa TaqMan Master (Applied Biosystems) koji sadrži enzim AmpliTaq DNA polimerazu, enzim uracil-N glikozilazu (UNG), dNTP i referentnu boju ROX, ukupnog volumena 10 µL. Lančana reakcija polimerazom odvijala se u kvantitativnom termokružniku QuantStudio 6 (Applied Biosystems) pri uvjetima 50 °C 2 min (aktivnost enzima UNG radi sprečavanja unakrsnih kontaminacija), 95 °C 10 min (denaturacija enzima UNG i aktivacija DNA polimeraze), te 40 izmjeničnih ciklusa denaturacije pri 95 °C 15 sec i sinteze novih lanaca pri 60 °C 60 sec. Navedeni uvjeti korišteni su za detekciju svih gena od interesa, a korištene početnice i sonde navedene su u Tablica 2 i Tablica 3. Za detekciju ljudskog gena *MMP12* korištene su komercijalno dostupne, unaprijed dizajnirane i optimirane početnice i sonde (Integrated DNA Technologies), s ID brojem 225243678, stoga točna sekvenca početnica i sonde nije dostupna. Ekspresija gena *GAPDH* korištena je za normalizaciju ekspresije gena od interesa ΔC_t metodom (C_t gen od interesa – C_t *GAPDH*). Relativna ekspresija gena od interesa nadalje je izračunata koristeći formulu $2^{-\Delta C_t}$.

Tablica 2. Sekvence početnica i sonda korištenih za detekciju ekspresije mišjih gena od interesa metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Sonde su označene fluorescencijskom bojom FAM.

Početnice i sonda	Sekvenca nukleotida
<i>GAPDH</i>	5' TGTGTCCGTCGTGGATCTGA 3'
	5' CCTGCTTCACCACCTTCTTGA 3'
	5' FAM – CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG – TAMRA 3'
<i>COL1A1</i>	5' CCCGCCGATGTCGCTAT 3'
	5' GCTACGCTGTTCTTGCAGTGAT 3'
	5' FAM – CTTCTGCGCCTAATGTCCACCGA – TAMRA 3'
<i>FN1</i>	5' ACAGAGAAGTGACACGCTTCGA 3'
	5' TCCGGTCACCGTGTTGCT 3'
	5' FAM – CAGCGCCAGCACCCCTGTGAC – TAMRA 3'
<i>ACTA2</i>	5' CTGACGGGCAGGTGATCAC 3'
	5' AATGAAAGATGGCTGGAAGAGAGT 3'
	5' FAM – AAACGAACGCTTCCGCTGCCC – TAMRA 3'
<i>MMP12</i>	5' GATGTGAGGCAGGAGCTCATG 3'
	5' GGCTTGATTCCTGGGAAGTG 3'
	5' FAM – CCCTGCTTACCCCAAGCTGATTTCCA – TAMRA 3'
<i>TIMP1</i>	5' GCCCTTCGCATGGACATTTA 3'
	5' CCCCATCTGCGATGATG 3'
	5' FAM – TCTCCACTGTGCAGCCCCTGCC – TAMRA 3'
<i>PAI1</i>	5' TTGTCCAGCGGGACCTAGAG 3'
	5' AAGTCCACCTGTTTCACCATAGTCT 3'
	5' FAM – CAGGGCTTCATGCCCCACTTCTTCA – TAMRA 3'

Tablica 3. Sekvence početnica i sonde korištenih za detekciju ekspresije ljudskih gena od interesa metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Sonde su označene fluorescencijskom bojom FAM.

Početnice i sonda	Sekvenca nukleotida
<i>GAPDH</i>	5' ACCCACTCCTCCACCTTTGAC 3'
	5' CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA 3'
	5' FAM – CTGGCATTGCCCTCAACGACCA – TAMRA 3'
<i>COL1A1</i>	5' AGGAAGGGCCACGACAAAG 3'
	5' CAGTTACACAAGGAACAGAACAGTCTCT 3'
	5' FAM – CGTGTCAATCCCTTGTGCCGCA – TAMRA 3'
<i>FN1</i>	5' TGGCCCCACCTTCTTG 3'
	5' TGCGGGAAAAATCCCTTCTA 3'
	5' FAM – CGACAACCCCCGGGAGGCA – TAMRA 3'
<i>ACTA2</i>	5' CAAGTGATCACCATCGGAAATG 3'
	5' GACTCCATCCCGATGAAGGAT 3'
	5' FAM – CGTTTCCGCTGCCCAGAGACCC – TAMRA 3'
<i>TIMP1</i>	5' GCTTGGAACCCTTTATACATCTTG 3'
	5' CCTTCTGCAATTCCGACCT 3'
	5' FAM – TCAACCAGACCACCTTATACCAGCG – TAMRA 3'
<i>PAI1</i>	5' TGCCCATGATGGCTCAGA 3'
	5' GGCAGTTCCAGGATGTCGTAGT 3'
	5' FAM – AGTTCACCACGCCCGATGGCC – TAMRA 3'

3.12 Određivanje koncentracije proteina metodom ELISA

Za određivanje koncentracija pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 korišten je enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Navedeni proteini izmjereni su u inkubacijskom mediju prereza pluća. Za analizu mišjeg pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 korišteni su unaprijed optimirani setovi protutijela (AbCam). Za analizu ljudskog pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina korišteni su unaprijed optimizirani setovi protutijela (R&D Systems).

Pločice s 96 jažica najprije su inkubirane u otopini specifičnog protutijela tijekom noći na 4 °C kako bi se protutijelo imobiliziralo u jažicama. Jažice su isprane otopinom PBS-a (Gibco) s 0,05 % Tween 20 (Sigma) ukupno 3 puta, nakon čega su blokirane otopinom PBS s 1 % BSA (Sigma) 1 h pri sobnoj temperaturi. Zatim su jažice isprane i dodani su uzorci (inkubacijski medij prereza pluća), standard u više koncentracija i slijepa proba (PBS s 1 % BSA). Standard je pripremljen od specifičnih rekombinantnih proteina (AbCam i R&D Systems) poznatih koncentracija. Standard za svaki protein pripremljen je u ukupno 8 koncentracija u PBS-u s 1 % BSA. Uzorci, standardi i slijepa proba inkubirani su 2 h pri sobnoj temperaturi, nakon čega je uslijedilo ispiranje. Zatim su u jažice dodana specifična detekcijska protutijela konjugirana biotinom, razrijeđena u PBS-u s 1 % BSA i inkubirana 2 h pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, jažice su ponovno isprane i dodana je otopina streptavidina konjugiranog enzimom peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) i inkubirana 20 min pri sobnoj temperaturi. Jažice su ponovno isprane, dodan je supstrat koji je sadržavao peroksid i TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) te je uslijedilo razvijanje signala i zaustavljanje reakcije otopinom 1 M sumporne kiseline (Kemika). Nakon zaustavljanja reakcije, apsorbancija primalnoj duljini 450 nm je izmjerena koristeći uređaj SpectraMax (Molecular Devices).

Za izračun koncentracija proteina najprije su napravljene krivulje standarda mjerenjem apsorbancije rekombinantnih proteina poznatih koncentracija. Koncentracije proteina u uzorcima izračunate su interpolacijom pomoću standardne krivulje, koristeći jednadžbu linearne funkcije.

3.13 Statistička analiza

Statistička obrada svih dobivenih podataka rađena je koristeći program GraphPad Prism. Za provjeru normalnosti distribucije podataka korišten je test Shapiro-Wilk. Za analizu značajnosti između uspoređivanih grupa korišteni su odgovarajući testovi navedeni za svaki pojedinačni pokus u rezultatima: t-test za uspoređivanje dvije skupine, One-Way ANOVA s *post hoc* testom Dunnett za uspoređivanje više skupina, Two-Way ANOVA s *post hoc* testom Bonferroni za uspoređivanje više skupina kroz različito vrijeme inkubacije. U svim testovima razina značajnosti bila je postavljena na $p < 0,05$.

Svi grafovi su pripremljeni koristeći program GraphPad Prism. Na grafovima su prikazane srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama, a broj replika naveden je za svaki pojedinačni pokus u rezultatima.

4. REZULTATI

4.1 Vijabilnost prereza mišjih pluća

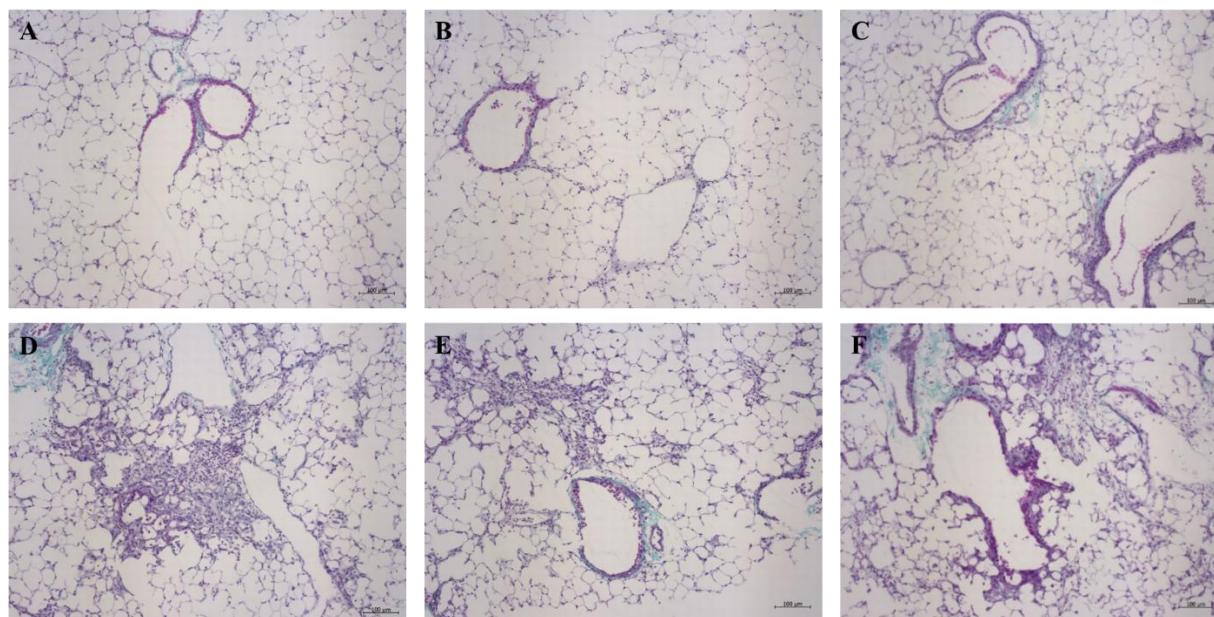
Prerezi pluća pripremljeni su iz netretiranih (zdravih) miševa te iz miševa tretiranih bleomicinom *in vivo*. Pluća iz miševa tretiranih bleomicinom korištena su za pripremu prereza 14 dana nakon primjene bleomicina *in vivo* kada je fibroza pluća već uspostavljena. Vijabilnost pripremljenih prereza mišjih pluća određena je tijekom više dana inkubacije *ex vivo* kako bi se procijenili kvaliteta prereza kroz vrijeme i optimalno vrijeme inkubacije za pokuse *ex vivo*. Kako bi se što adekvatnije procijenila vijabilnost različitih vrsta stanica u kompleksnom sustavu tkivnih prereza, mjereni su različiti parametri vijabilnosti. Histološka karakterizacija prereza pluća od iznimne je važnosti jer omogućuje izravno praćenje morfologije stanica te arhitekture tkiva. Histološke analize nadopunjene su mjerenjem propusnosti staničnih membrana te mjerenjem metaboličke aktivnosti stanica.

4.1.1. Histološka karakterizacija prereza mišjih pluća tijekom inkubacije *ex vivo*

Prerezi pluća iz zdravih miševa te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom korišteni su za histološku karakterizaciju odmah nakon pripreme (označeni kao dan 0) te nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Prerezi su obojani metodom Crossman trikrom, vizualizirani svjetlosnim mikroskopom i analizirani od strane patologa. Ovom histološkom metodom kolagen je obojan zeleno, mišićno tkivo je plavo-ljubičasto, a jezgre stanica tamno plave. Na svakom vremenu inkubacije analizirano je po 4 prereza iz zdravog miša te po 10 prereza iz 2 miša s fibrozom izazvanom bleomicinom, a reprezentativne slike prikazane su niže (Slika 4).

Na dan pripreme prereza alveolarne i bronhijalne strukture su bile dobro očuvane u svim analiziranim prerezima, s normalnom morfologijom stanica. U prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom uočena su fibrozna žarišta (engl. *fibrotic foci*) s upalom i fibroznim promjenama tkiva (povećana količina kolagena, zadebljane alveolarne stijenke). Nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*, fibrozne promjene tkiva u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom su bile i dalje vidljive te su nalikovale promjenama viđenim u rezovima na danu 0. Nakon 3 i 5 dana inkubacije, u prerezima iz zdravih i bleomicinom tretiranih miševa bio je vidljiv manji dio apoptoznih stanica u alveolarnom i bronhijalnom epitelu, kao i deskvamacija (ljuštenje površinskih stanica) bronhijalnog epitela u nekim prerezima. Nakon 5 dana inkubacije više je područja deskvamacije i metaplazije bronhijalnog epitela (zamjena cilindričnih stanica epitela višeslojnim pločastim stanicama) nego što je bilo

uočeno nakon 3 dana inkubacije. Dodatno se nakon 5 dana inkubacije vidjela proliferacija stanica u području alveolarnog epitela. Uz navedene promjene koje su bile primijećene u prerezima iz zdravih (kontrolnih) miševa kao i u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, alveolarne i bronhijalne strukture u oba tipa prereza su bile generalno dobro očuvane nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*.



Slika 4. Reprezentativne slike bojanja prereza mišjih pluća metodom Crossman trikrom. Prerezi pluća iz zdravog miša fiksirani su i pripremljeni za bojanje odmah nakon pripreme (A) te nakon 3 dana (B) i 5 dana inkubacije *ex vivo* (C). Prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom također su fiksirani i pripremljeni za bojanje odmah nakon pripreme (D) te nakon 3 dana (E) i 5 dana inkubacije *ex vivo* (F). Povećanje 5 puta.

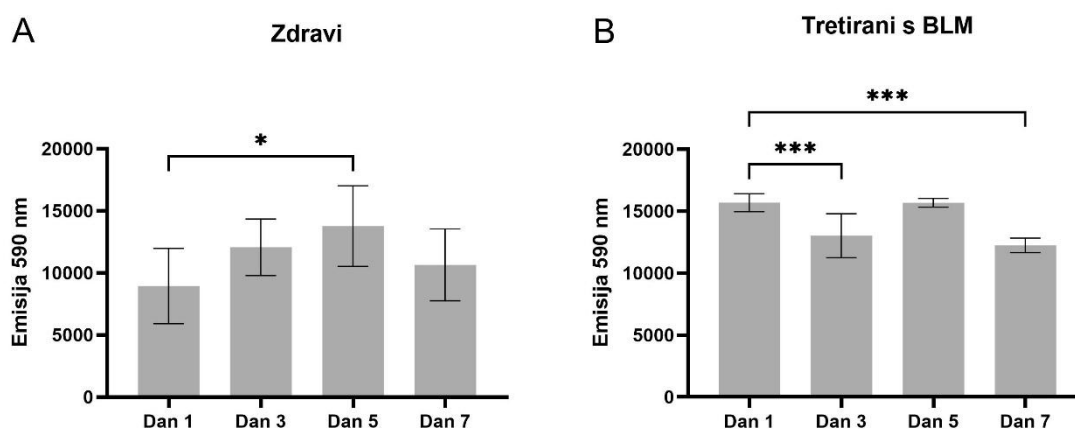
4.1.2. Metabolička aktivnost i propusnost membrana prereza mišjih pluća tijekom inkubacije *ex vivo*

Metabolička aktivnost mjerena redukcijom reagensa Alamar Blue te propusnost membrana mjerena otpuštanjem enzima LDH, određeni su u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom nakon 1, 3, 5 i 7 dana inkubacije *ex vivo*.

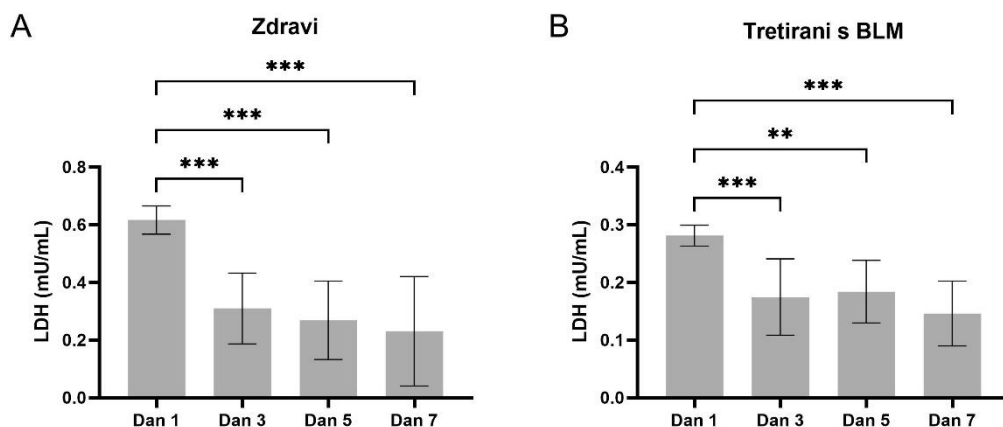
Prerezi pluća iz zdravih miševa pokazali su sličnu metaboličku aktivnost mjerenu redukcijom reagensa Alamar Blue tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo*, bez uočenog smanjenja u

metaboličkoj aktivnosti ($p = 0,13$ nakon 3 dana, $p = 0,56$ nakon 7 dana). Štoviše, blagi porast redukcije reagensa Alamar Blue izmjeren je nakon 5 dana inkubacije u odnosu na prvi dan inkubacije ($p = 0,01$) (Slika 5A). Metabolička aktivnost u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom je smanjena nakon 3 dana ($p < 0,001$) i 7 dana ($p < 0,001$) inkubacije u odnosu na prvi dan, dok nakon 5 dana inkubacije nije bilo razlike ($p > 0,99$) (Slika 5B). Primijećeno je također, da je metabolička aktivnost općenito nešto veća (oko 1,3 puta) u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na prereze iz zdravih miševa.

U prerezima pluća iz zdravih i iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom količina enzima LDH u inkubacijskom mediju je bila snižena nakon 3, 5 i 7 dana inkubacije *ex vivo* u odnosu na prvi dan inkubacije, što znači da se manje enzima otpustilo iz stanica (Slika 6A i B). Slične vrijednosti LDH aktivnosti su izmjerene nakon 3, 5 i 7 dana inkubacije, dakle nije bio uočen progresivni trend smanjenja LDH aktivnosti.



Slika 5. Redukcija reagensa Alamar Blue kao mjera metaboličke aktivnosti prereza pluća pripremljenih iz (A) zdravih miševa ($n=6$ iz 3 miša) te (B) iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom ($n=6$ iz 3 miša) tijekom više dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.



Slika 6. Aktivnost enzima LDH (mU/mL) u inkubacijskom mediju prereza pluća pripremljenih iz (A) zdravih miševa (n=6 iz 3 miša) te (B) iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=6 iz 3 miša) tijekom više dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

4.2 Analiza ekspresije gena i proteina u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom

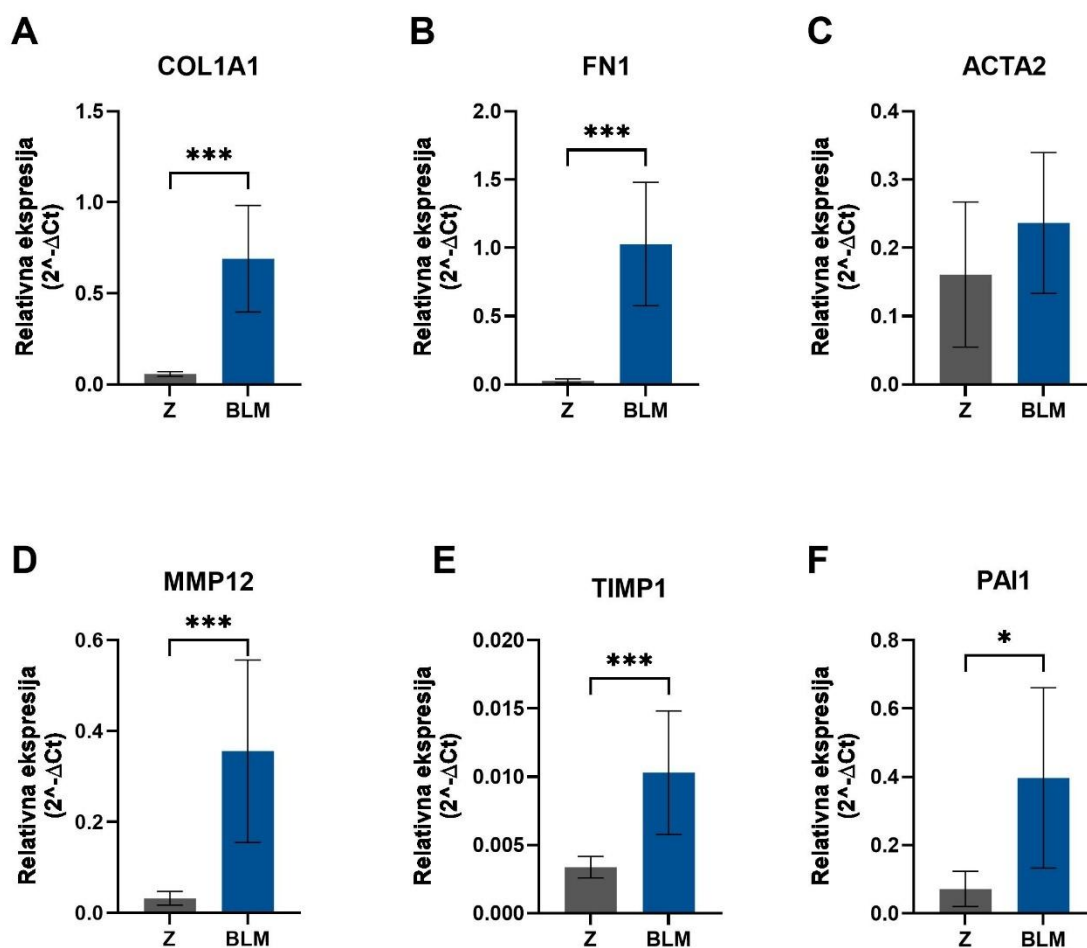
Prerezi pluća pripremljeni su iz mišjeg modela plućne fibroze izazvane bleomicinom *in vivo* 14 dana nakon primjene, obzirom na to da je to najčešće korišten i najbolje opisan životinjski model plućne fibroze *in vivo*. U prerezima pluća najprije je ispitana prisutnost i stabilnost profibroznih procesa tijekom inkubacije *ex vivo*, praćenjem ekspresije različitih biljega fibroze.

4.2.1. Ekspresija gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAI1* u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom na dan pripreme prereza

Metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu određena je ekspresija gena *COL1A1* (kolagen 1 α 1) i *FN1* (fibronektin 1) kao glavnih sastavnica izvanstaničnog matriksa, *ACTA2* (α -aktin glatkih mišića) kao biljega aktivacije fibroblasta u miofibroblaste te *MMP12* (matriksna metaloproteinaza 12), *TIMP1* (inhibitor matriksnih metaloproteinaza 1) i *PAI1* (inhibitor plazminogenog aktivatora 1) kao biljega remodeliranja izvanstaničnog

matriksa, uz normalizaciju na ekspresiju gena *GAPDH*. Ekspresija navedenih gena određena je u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa te iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Analiza je napravljena na dan pripreme prereza kako bi se ustanovio početni profil biljega fibroze i ispitala razlika između prereza pluća iz zdravih i bleomicinom tretiranih životinja.

Prerezi pluća pripremljeni iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom imali su značajno povišenu ekspresiju gena *COL1A1*, *FN1*, *MMP12* i *TIMP1* (svi $p < 0,001$), kao i *PAI1* ($p = 0,03$) na dan pripreme (dan 0) u odnosu na prereze pluća pripremljene iz zdravih miševa (Slika 7). Premda je uočen trend povišene ekspresije gena *ACTA2* u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na prereze pluća iz zdravih miševa ($p = 0,07$) (Slika 7C).



Slika 7. Ekspresija gena *COL1A1* (A), *FN1* (B), *ACTA2* (C), *MMP12* (D), *TIMP1* (E) i *PAI1* (F) u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (n=10 iz 4 miša) te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=22 iz 10 miševa). Ekspresija gena određena je na dan pripreme

prereza (dan 0). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. t – test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

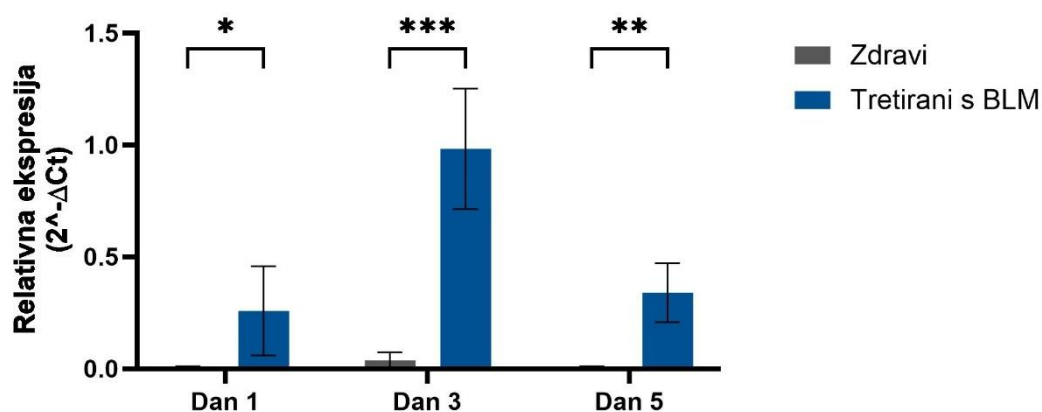
4.2.2. Ekspresija gena *COL1A1*, *FNI*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAII* u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom kroz vrijeme inkubacije *ex vivo*

Ekspresija gena od interesa u prerezima pluća iz zdravih te iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom praćena je tijekom inkubacije *ex vivo*, s mjerenjima nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije kako bi se odredilo zadržavaju li prerezi pluća karakteristike fibroze i tijekom inkubacije *ex vivo*.

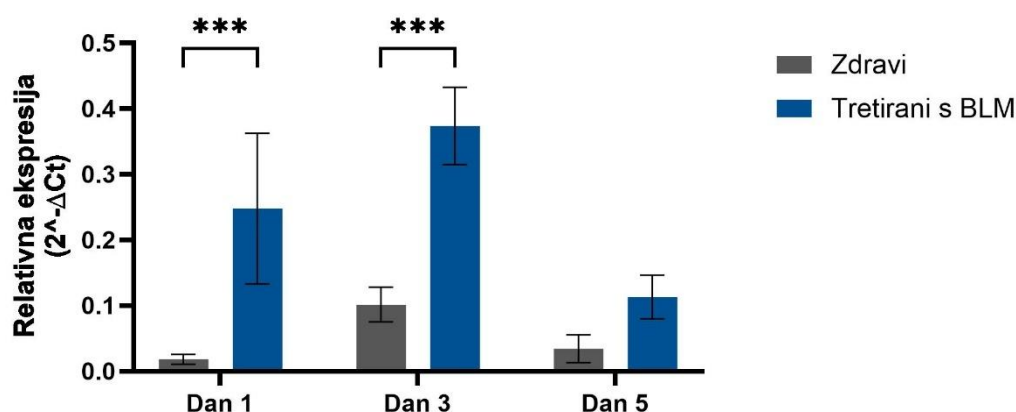
Nakon 1 dan ($p = 0,02$), 3 dana ($p < 0,001$) i 5 dana ($p = 0,001$) inkubacije *ex vivo* u prerezima pluća pripremljenih iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom utvrđena je statistički značajno veća ekspresija gena *COL1A1* u odnosu na prereze pluća pripremljene iz zdravih miševa (Slika 8). Ekspresija gena *FNI* bila je također povišena u prerezima dobivenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom nakon 1 dan ($p < 0,001$) i 3 dana ($p < 0,001$) inkubacije *ex vivo*, dok je nakon 5 dana inkubacije ekspresija povećana, bez statističke značajnosti ($p = 0,07$) (Slika 9). Usporedivi rezultati dobiveni su i za druge analizirane gene *MMP12* ($p = 0,001$, $p < 0,001$ i $p = 0,16$) i *TIMP1* ($p < 0,001$, $p < 0,001$ i $p > 0,99$) koji su bili povećani u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na prereze iz zdravih miševa nakon 1 i 3 dana inkubacije *ex vivo*, uz trend povećanja nakon 5 dana inkubacije (Slika 11, Slika 12). Nakon 1 dan inkubacije *ex vivo* nije bilo razlike u ekspresiji gena *PAII* ($p > 0,99$) između prereza iz bleomicinom tretiranih i zdravih miševa. Nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, postojao je trend povećane ekspresije *PAII* u prerezima iz bleomicinom tretiranih miševa ($p = 0,18$), dok je tek nakon 5 dana inkubacije ekspresija *PAII* bila značajno povećana ($p = 0,01$) (Slika 13). Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na prereze iz zdravih miševa bila je smanjena nakon 1 dan inkubacije *ex vivo* ($p = 0,002$), dok je nakon 3 i 5 dana inkubacije bila povišena ($p < 0,001$) (Slika 10).

Općenito, ekspresijski profil gena *COL1A1*, *FNI*, *MMP12* i *TIMP1* u prerezima pluća nakon inkubacije *ex vivo* 1, 3 i 5 dana bio je sličan ekspresijskom profilu prereza na dan pripreme, s povećanim ekspresijama u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom

u odnosu na prereze iz zdravih miševa. Primijećen je također, trend smanjenja relativne ekspresije većine izmjerenih gena nakon 5 dana inkubacije *ex vivo* u odnosu na ranija vremena inkubacije.

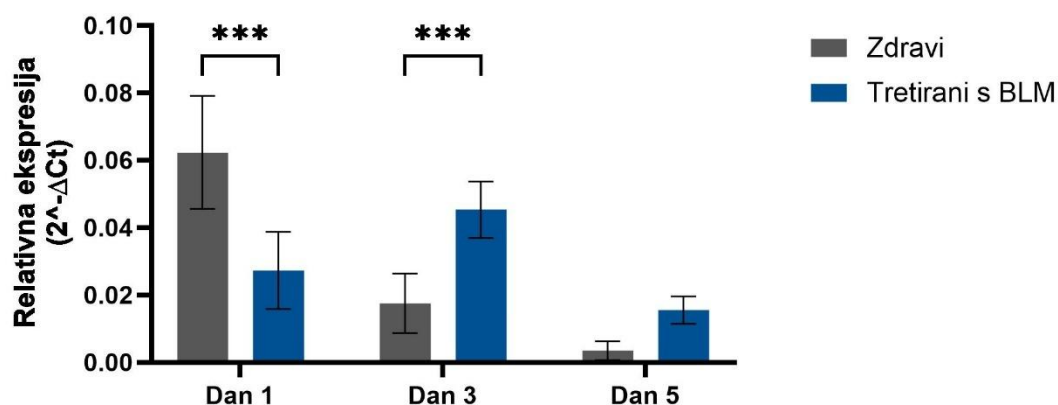


Slika 8. Ekspresija gena *COL1A1* u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (n=6 iz 2 miša) te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=6 iz 2 miša). Ekspresija gena je određena nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

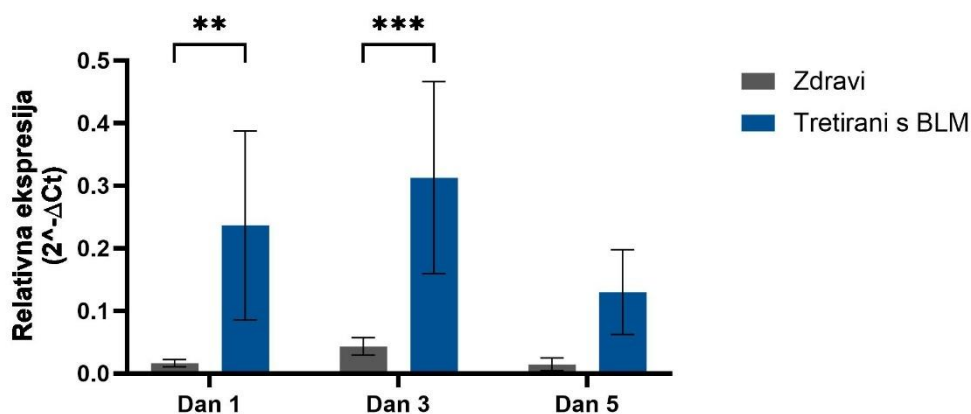


Slika 9. Ekspresija gena *FNI* u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (n=6 iz 2 miša) te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=6 iz 2 miša). Ekspresija gena je određena nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost

± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, *** $p < 0,001$. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

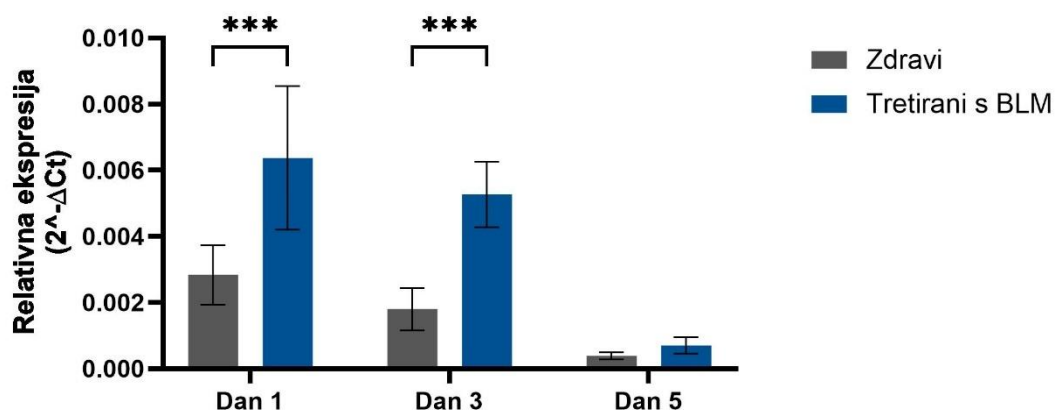


Slika 10. Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (n=6 iz 2 miša) te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=6 iz 2 miša). Ekspresija gena je određena nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, *** $p < 0,001$. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

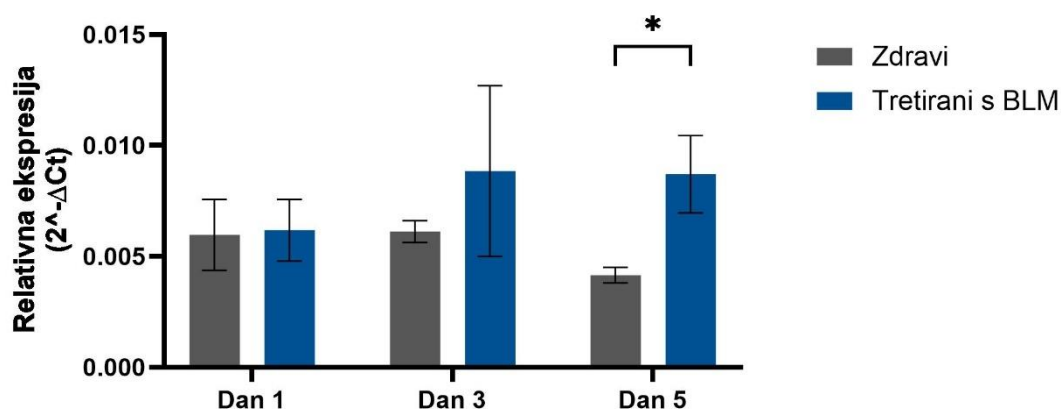


Slika 11. Ekspresija gena *MMP12* u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (n=6 iz 2 miša) te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=6 iz 2 miša). Ekspresija gena je određena nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

0,001. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.



Slika 12. Ekspresija gena *TIMP1* u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (n=6 iz 2 miša) te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=6 iz 2 miša). Ekspresija gena je određena nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standarda devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, ***p < 0,001. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.



Slika 13. Ekspresija gena *PAII* u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (n=4 iz 2 miša) te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (n=6 iz 2 miša). Ekspresija gena je određena nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standarda devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, *p < 0,05. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

4.2.3. Koncentracije proteina pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*

Razina proteinske ekspresije biljega fibroze pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 određena je mjerenjem koncentracije metodom ELISA. Za analizu navedenih proteina korišten je inkubacijski medij prereza iz zdravih miševa te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom kojima je prethodno određena ekspresija gena. Koncentracija ovih proteina izmjerena je samo u uzorcima inkubiranim tijekom 3 dana *ex vivo*, kada je izmjerena najveća relativna ekspresija ovih biljega na genskoj razini.

Nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom pokazali su statistički značajno povišenu koncentraciju svih izmjerenih proteina; pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 te TIMP1 u odnosu na prereze pluća iz zdravih miševa (Tablica 4). Koncentracije pro-kolagena 1 α 1 iznosile su 0,8 ng/mL i 19 ng/mL, fibronektina 39 ng/mL i 2124 ng/mL, TIMP1 2,7 ng/mL i 43 ng/mL te MMP12 0,9 ng/mL i 10 ng/mL u prerezima iz zdravih i miševa tretiranih bleomicinom (Tablica 4).

Ovi rezultati potvrđuju da je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo* ekspresija pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 ostala povišena na proteinskoj razini, kao što je bilo izmjereno i na razini ekspresije gena.

Tablica 4. Koncentracije proteina u inkubacijskom mediju prereza pluća iz zdravih (n=8 iz 2 miša) i miševa tretiranih bleomicinom (n=16 iz 4 miša) nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*.

Koncentracija proteina (ng/mL, srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija)				
	Pro-kolagen1 α 1	Fibronektin	MMP12	TIMP1
<i>Zdravi</i>	0,77 $\pm$ 0,71	38,8 $\pm$ 23,8	0,93 $\pm$ 0,34	2,68 $\pm$ 1,71
<i>Tretirani s BLM</i>	19,3 $\pm$ 15,5	2124 $\pm$ 861	10,0 $\pm$ 7,0	43,4 $\pm$ 41,0
<i>p vrijednost</i>	** 0,005	*** < 0,001	* 0,02	* 0,01

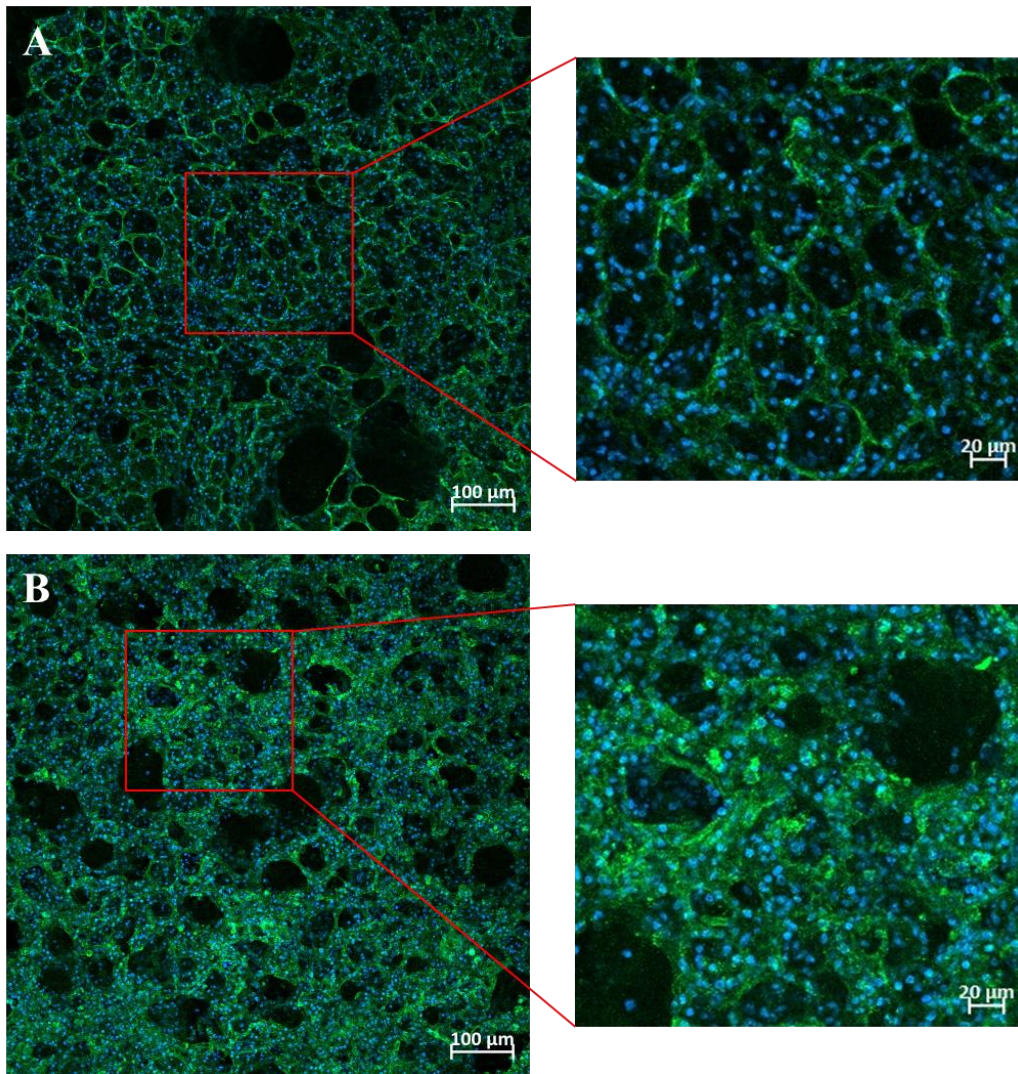
Statistička analiza napravljena je koristeći t-test. Zdravi – prerezi iz zdravih miševa, tretirani s BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom, MMP12 – matriks metaloproteinaza 12, TIMP1 – inhibitor matriks metaloproteinaza 1.

4.2.4. Vizualizacija kolagena 1 i fibronektina u prerezima pluća iz zdravih miševa i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*

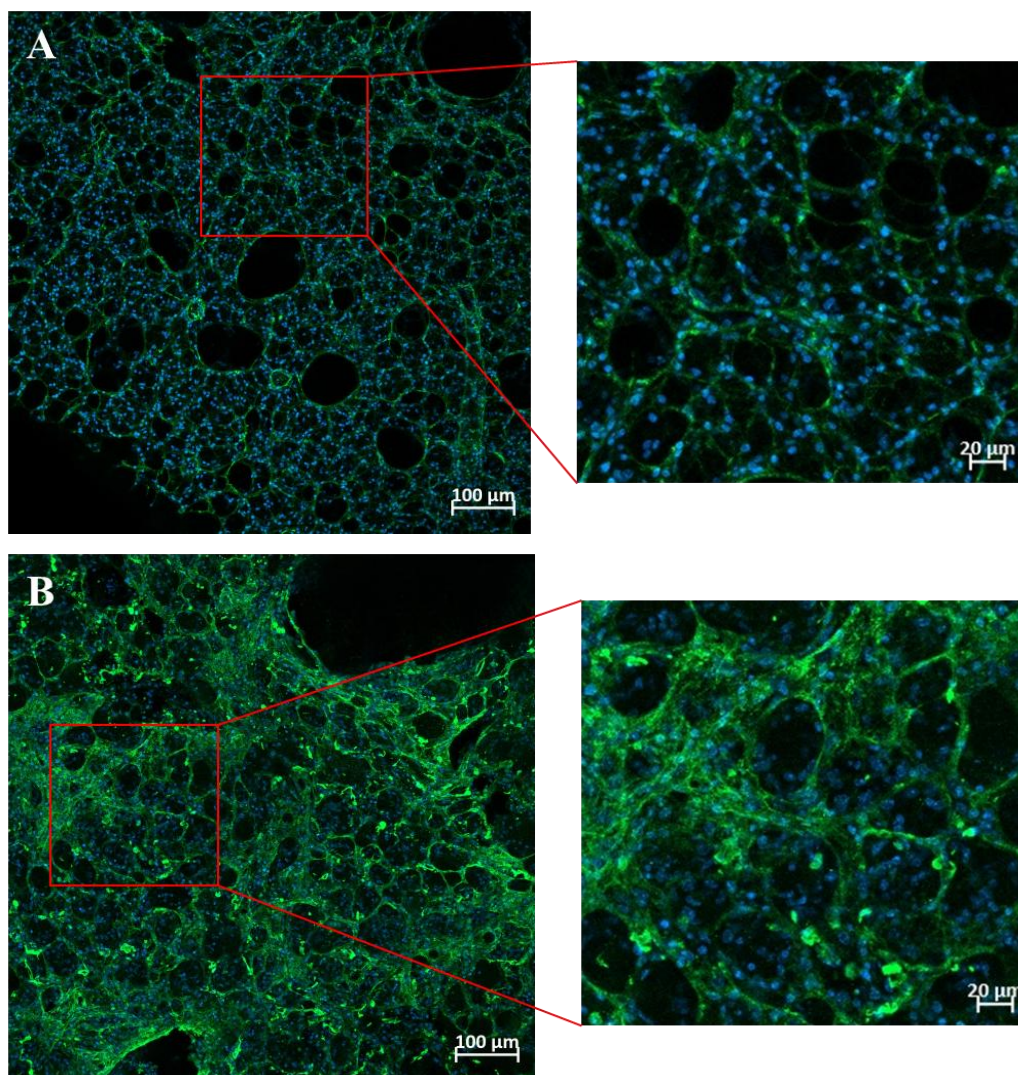
Kolagen 1 i fibronektin obilježeni su metodom imunofluorescencije u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa te iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Na temelju prethodno dobivenih rezultata ekspresije gena i proteina biljega fibroze, odabrano je vrijeme inkubacije *ex vivo* od 3 dana. Kolagen 1, fibronektin te stanične jezgre obilježeni Hoechst bojom su vizualizirani konfokalnim mikroskopom.

Na Slika 14 B vidljiva je povećana ekspresija kolagena 1 kroz cijeli presjek prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na prereze pluća iz zdravih miševa (Slika 14 A). U prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom parenhim je zadebljan i vidljive su naslage kolagena 1 (Slika 14 B).

U prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom ekspresija fibronektina također je povećana (Slika 15 B) u odnosu na prereze pluća iz zdravih miševa (Slika 15 A) nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Fibronektin je eksprimiran u parenhimu pluća koji je zadebljan u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, a struktura pluća je promijenjena u usporedbi s prerezima iz zdravih životinja (Slika 15).



Slika 14. Vizualizacija kolagena 1 metodom imunofluorescencije u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (A) te iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (B) nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Povećanje 10 puta. Kolagen 1 obilježen je zeleno, stanične jezgre obilježene su plavo.



Slika 15. Vizualizacija fibronektina metodom imunofluorescencije u prerezima pluća pripremljenim iz zdravih miševa (A) te iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (B) nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Povećanje 10 puta. Fibronektin je obilježen zeleno, stanične jezgre obilježene su plavo.

4.3 Aktivnost antifibroznih spojeva u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom

U prethodno uspostavljenim uvjetima inkubacije *ex vivo* prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, testirani su spojevi s poznatim antifibroznim djelovanjem kako bi se validirala primjena modela u istraživanjima potencijalnih novih lijekova. Za inkubaciju *ex vivo* je na temelju prethodnih rezultata odabrano vrijeme od 3 dana, kada je ekspresija biljega fibroze bila povišena na genskoj i proteinskoj razini u prerezima iz miševa s

fibrozom izazvanom bleomicinom. Testirani su nintedanib kao odobreni lijek za idiopatsku plućnu fibrozu (IPF) te spoj SB525334 koji je inhibitor receptora TGF β tipa I (ALK5). Prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom tretirani su nintedanibom i spojem SB525334 *ex vivo*, a nakon 3 dana inkubacije određena je ekspresija biljega fibroze koji su prethodno pokazali povišenu ekspresiju u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom: *COL1A1*, *FNI*, *ACTA2*, *MMP12* i *TIMP1*. Utjecaj spojeva na ekspresiju gena *PAIL* nije analiziran s obzirom na to da prethodno nije bilo razlike između prereza iz zdravih i miševa tretiranih bleomicinom. Kontrolni prerezi iz zdravih te miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom tretirani su s 0,1 % DMSO umjesto spojevima. Prerezi su pripremljeni iz 2 zdrava miša te iz 4 miša s fibrozom izazvanom bleomicinom od čega su prerezi iz 2 miša korišteni za testiranje nintedaniba uz odgovarajuću kontrolu DMSO, a iz preostala 2 miša za testiranje SB525334 i odgovarajuću kontrolu DMSO.

4.3.1. Utjecaj antifibroznih spojeva na ekspresiju gena *COL1A1*, *FNI*, *ACTA2*, *MMP12* i *TIMP1* u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom

Nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, kontrolni prerezi pluća (0,1 % DMSO) iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom pokazali su statistički značajno višu ekspresiju gena *COL1A1* ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolne prereze pluća iz zdravih miševa (Slika 16 A i B). Tretman spojem SB525334 pokazao je također smanjenje ekspresije gena *COL1A1* pri koncentracijama 5 μM ($p < 0,001$), 1 μM ($p < 0,001$), 0,2 μM ($p = 0,004$) te 0,04 μM ($p = 0,01$), dok pri najnižoj testiranoj koncentraciji 0,008 μM ($p = 0,98$) nije imao utjecaja na ekspresiju *COL1A1* u odnosu na kontrolne prereze iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 16 A). Tretman nintedanibom pri koncentracijama 10 μM , 2 μM i 0,4 μM ($p < 0,001$), kao i pri 0,016 μM ($p = 0,02$) smanjio je ekspresiju gena *COL1A1* u odnosu na kontrolne prereze pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 16 B). Nintedanib pri koncentraciji 0,08 μM nije imao statistički značajnog utjecaja na ekspresiju *COL1A1* ($p = 0,11$), iako je uočen trend smanjenja.

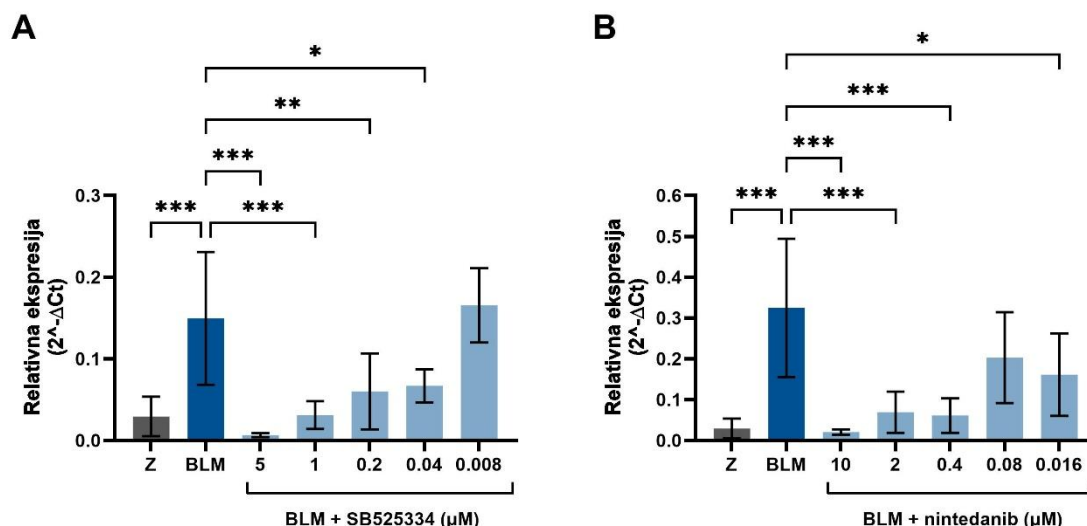
Slični rezultati dobiveni su za ekspresiju gena *FNI* koja je bila značajno viša u kontrolnim prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na kontrolne prereze pluća iz zdravih miševa ($p = 0,001$ i $p < 0,01$, Slika 17 A i B). Tretman spojem SB525334 smanjio je ekspresiju *FNI* pri koncentracijama 5 μM i 1 μM ($p < 0,01$), kao i pri 0,2 μM ($p = 0,01$). SB525334 pri koncentracijama 0,04 μM ($p = 0,54$) i 0,008 μM ($p > 0,99$) nije

imao utjecaja na ekspresiju gena *FNI* (Slika 17 A) u odnosu na kontrolne prereze pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Tretman nintedanibom smanjio je ekspresiju *FNI* pri svim testiranim koncentracijama ($p < 0,001$ za 10 μM , 2 μM , 0,4 μM i 0,016 μM ; $p = 0,04$ za 0,08 μM) kao što je prikazano na Slika 17 B.

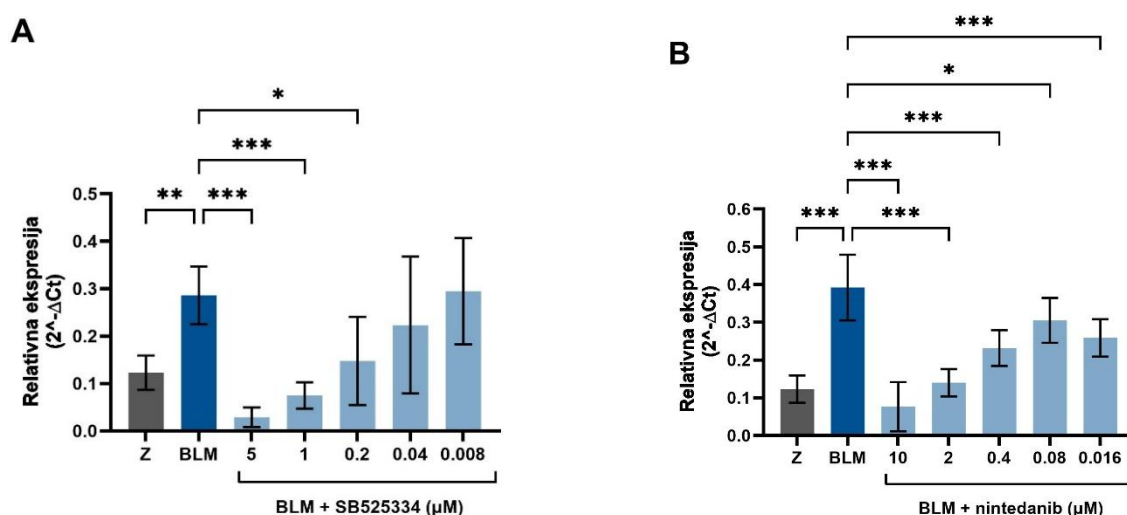
Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *ACTA2* između kontrolnih prereza iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te kontrolnih prereza iz zdravih miševa ($p = 0,69$ i $p > 0,99$, Slika 18 A i B). Tretman spojem SB525334 izazvao je statistički značajno sniženje ekspresije gena *ACTA2* pri koncentracijama 5 μM ($p = 0,001$), 1 μM ($p = 0,004$) i 0,2 μM ($p = 0,02$) u odnosu na kontrolne prereze iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, dok tretman u koncentracijama 0,04 μM ($p = 0,51$) i 0,008 μM ($p > 0,99$) nije imao utjecaja na ekspresiju gena *ACTA2* (Slika 18 A). Tretman nintedanibom nije imao statistički značajnog utjecaja na ekspresiju *ACTA2* pri testiranim koncentracijama u odnosu na kontrolne prereze iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 18 B).

U kontrolnim prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom utvrđena je statistički značajno viša ekspresija gena *MMP12* u odnosu na kontrolne prereze iz zdravih miševa ($p = 0,003$ i $p < 0,001$, Slika 19 A i B). Tretman spojem SB525334 u testiranim koncentracijama nije imao učinka na ekspresiju gena *MMP12* u odnosu na kontrolne prereze iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 19 A). Tretman nintedanibom u koncentracijama 10 μM i 2 μM ($p < 0,001$) te 0,4 μM ($p = 0,002$) je pokazao značajno nižu ekspresiju *MMP12*, dok u koncentracijama 0,08 μM ($p = 0,06$) i 0,016 μM ($p = 0,42$) nije imao utjecaja na ekspresiju *MMP12* (Slika 19 B).

Ekspresija gena *TIMP1* također je bila statistički značajno veća u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u usporedbi s prerezima iz zdravih miševa ($p < 0,001$, Slika 20 A i B). Tretman spojem SB525334 smanjio je ekspresiju gena *TIMP1* u koncentracijama 5 μM , 1 μM i 0,2 μM ($p < 0,001$, $p < 0,001$ i $p = 0,006$) u odnosu na kontrolne prereze iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Spoj SB525334 u koncentracijama 0,04 μM ($p = 0,07$) i 0,008 μM ($p = 0,85$) nije imao učinak na ekspresiju *TIMP1* (Slika 20 A). Tretman nintedanibom nije imao utjecaja na ekspresiju *TIMP1* niti pri jednoj od testiranih koncentracija (Slika 20 B).

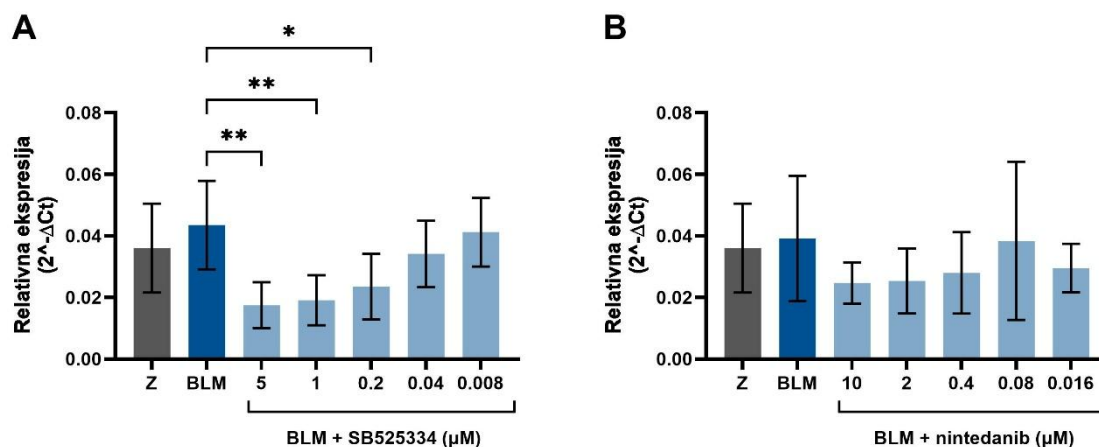


Slika 16. Ekspresija gena *COL1A1* u prerezima pluća pripremljenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (A) i nintedanibom (B) u više koncentracija. Ekspresija gena od interesa određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=8$ iz 2 miša za zdrave i bleomicinom tretirane kontrole + 0,1 % DMSO, $n=6$ iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

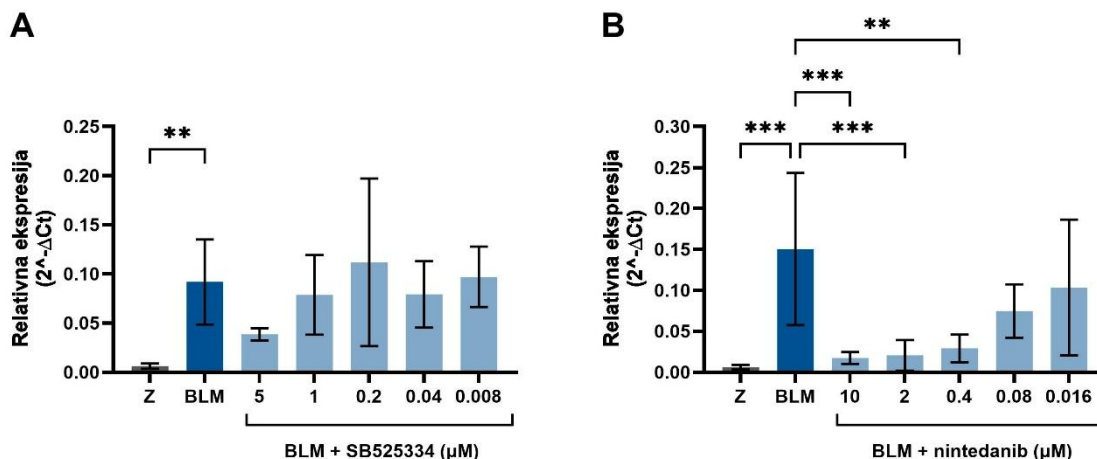


Slika 17. Ekspresija gena *FNI* u prerezima pluća pripremljenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (A) i nintedanibom (B) u više koncentracija. Ekspresija gena od interesa je određena nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*.

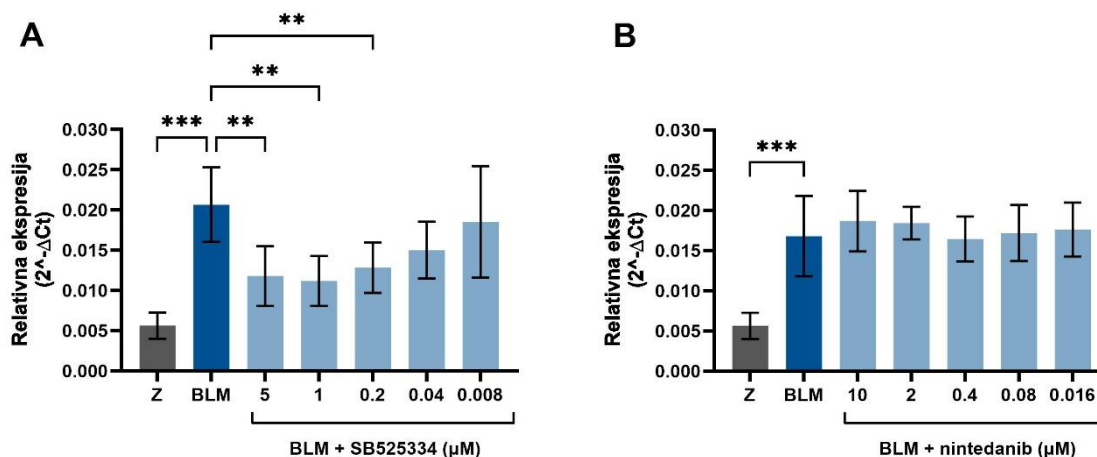
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=8$ iz 2 miša za zdrave i bleomicinom tretirane kontrole + 0,1 % DMSO, $n=6$ iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.



Slika 18. Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima pluća pripremljenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (A) i nintedanibom (B) u više koncentracija. Ekspresija gena od interesa je određena nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=8$ iz 2 miša za zdrave i bleomicinom tretirane kontrole + 0,1 % DMSO, $n=6$ iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.



Slika 19. Ekspresija gena *MMP12* u prerezima pluća pripremljenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (A) i nintedanibom (B) u više koncentracija. Ekspresija gena od interesa je određena nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=8$ iz 2 miša za zdrave i bleomicin tretirane kontrole + 0,1 % DMSO, $n=6$ iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.



Slika 20. Ekspresija gena *TIMP1* u prerezima pluća pripremljenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (A) i nintedanibom (B) u više koncentracija. Ekspresija gena od interesa je određena nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=8$ iz 2 miša za zdrave i bleomicin tretirane kontrole + 0,1 % DMSO, $n=6$ iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem.

One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

4.3.2. Utjecaj antifibroznih spojeva na koncentraciju pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom

U inkubacijskom mediju prereza pluća određene su koncentracije pro-kolagena 1 α 1, fibronektina, MMP12 i TIMP1 metodom ELISA nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Korišteni su inkubacijski mediji prereza pluća kojima je prethodno određena ekspresija gena. Analizirane su koncentracije proteina u uzorcima prereza inkubiranih s DMSO (kontrolne DMSO) i uzorcima tretiranim najvišim testiranim koncentracijama spojeva SB525334 (5 μ M) i nintedanib (10 μ M). Spojevi SB525334 i nintedanib testirani su u prerezima iz različitih miševa tretiranih bleomicinom (prerezi iz 2 miša korišteni su za kontrole DMSO i testiranje nintedaniba, dok su prerezi iz druga 2 miša korišteni za kontrole DMSO i testiranje spoja SB525334).

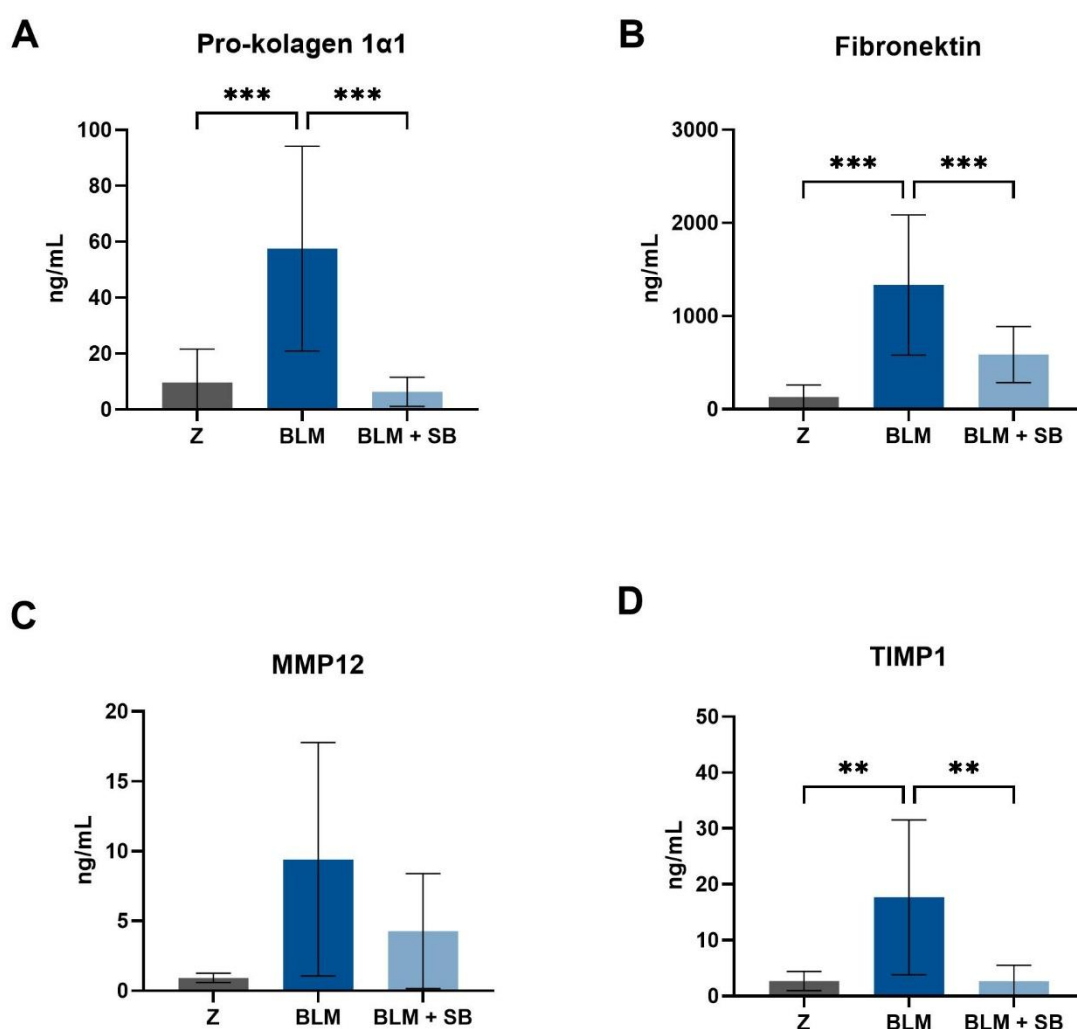
Koncentracija pro-kolagena 1 α 1 bila je veća u inkubacijskom mediju kontrolnih (0,1 % DMSO) prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na kontrolne (0,1 % DMSO) prereze pluća iz zdravih miševa nakon 3 dana inkubacije *ex vivo* ($p < 0,001$) (Slika 21A i Slika 22A). Tretman spojem SB525334 u koncentraciji 5 μ M je smanjio koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 ($p < 0,001$) (Slika 21A) u odnosu na kontrolne prereze. Tretman nintedanibom u koncentraciji 10 μ M smanjio je koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolne prereze pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 22A).

Koncentracija fibronektina također je bila povišena u inkubacijskom mediju kontrolnih prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u usporedbi s prerezima iz zdravih miševa ($p < 0,001$) (Slika 21B i Slika 22B). Tretman 10 μ M nintedanibom smanjio je koncentraciju fibronektina ($p = 0,01$) u odnosu na kontrolne prereze pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 22B), kao i tretman 5 μ M spojem SB525334 ($p < 0,001$) (Slika 21B).

Koncentracija MMP12 bila je povišena u inkubacijskom mediju kontrolnih prereza iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom ($p = 0,006$), dok je tretman 10 μ M nintedanibom smanjio koncentraciju MMP12 ($p = 0,03$) (Slika 22C). Međutim, zbog velikih varijacija u koncentracijama MMP12 izmjerenim u inkubacijskom mediju prereza iz nekih od miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 21C) vidljiv je samo trend povišene koncentracije MMP12 u odnosu na prereze iz zdravih miševa, bez statističke značajnosti ($p = 0,09$). U skladu

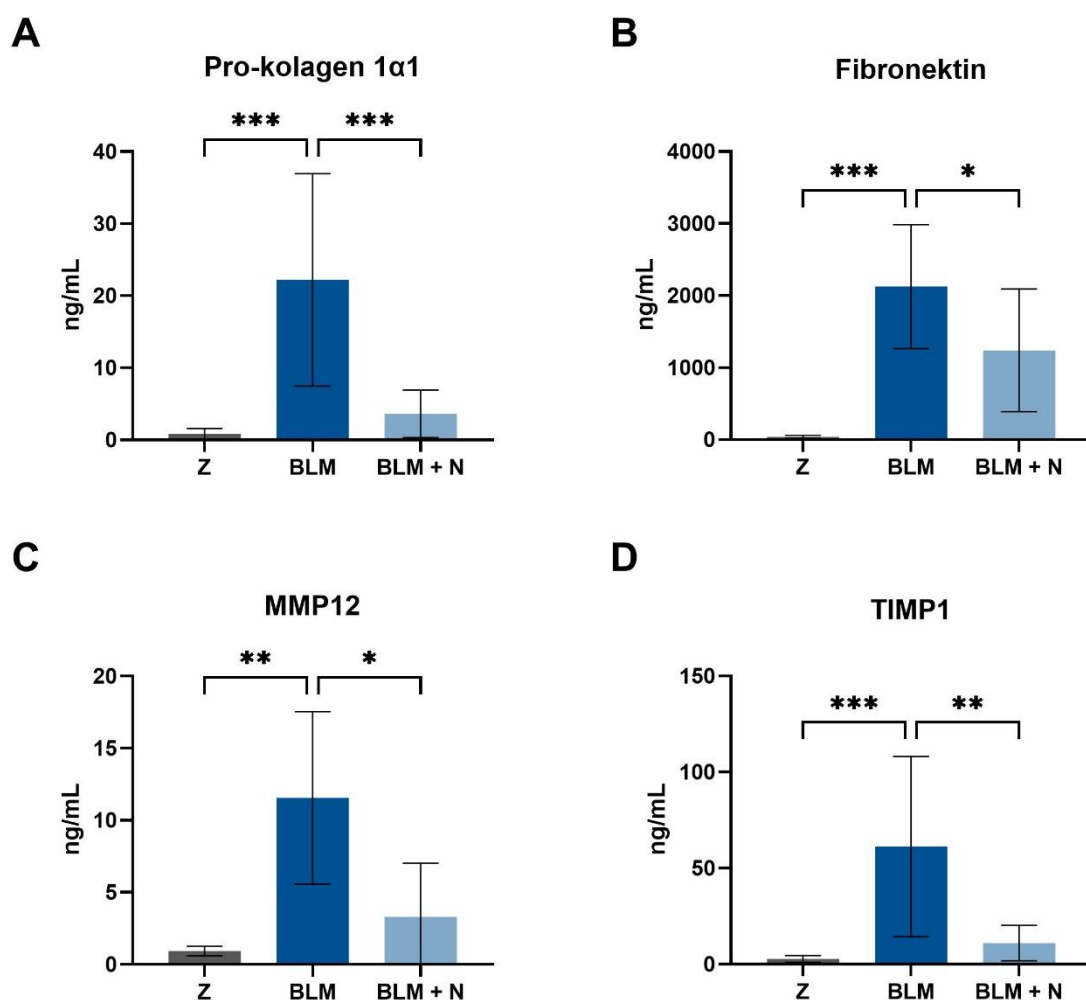
s tim, velike varijacije u koncentracijama MMP12 izmjerene su i u inkubacijskim medijima prereza tretiranih spojem SB525334 te nije utvrđena statistički značajna razlike u odnosu na kontrolne prereze iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom ($p = 0,35$) (Slika 21C).

Koncentracija TIMP1 je bila povišena u inkubacijskom mediju kontrolnih prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na kontrolne prereze iz zdravih miševa ($p < 0,001$ i $p = 0,004$) (Slika 21D i Slika 22D). Tretman nintedanibom u koncentraciji $10 \mu\text{M}$ smanjio je koncentraciju TIMP1 ($p = 0,003$) u odnosu na kontrolne prereze pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom (Slika 22D). Sličan utjecaj na koncentraciju TIMP1 imao je i spoj SB525334 koji je doveo do sniženja ($p = 0,005$) u odnosu na kontrolne prereze pluća (Slika 21D).



Slika 21. Koncentracije proteina pro-kolagena 1α1 (A), fibronektina (B), MMP12 (C) i TIMP1 (D) u inkubacijskom mediju prereza pluća pripremljenih iz miševa s fibrozom izazvanom

bleomicinom te tretiranim *ex vivo* 5 μ M spojem SB525334. Koncentracije proteina su određene nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. n=8 iz 2 miša za zdrave i bleomicin tretirane kontrole + 0,1 % DMSO, n=6 iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim post hoc testom, **p < 0,01, ***p < 0,001. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom, SB – prerezi tretirani spojem SB525334, MMP12 – matriks metaloproteinaza 12, TIMP1 – inhibitor matriks metaloproteinaza 1.



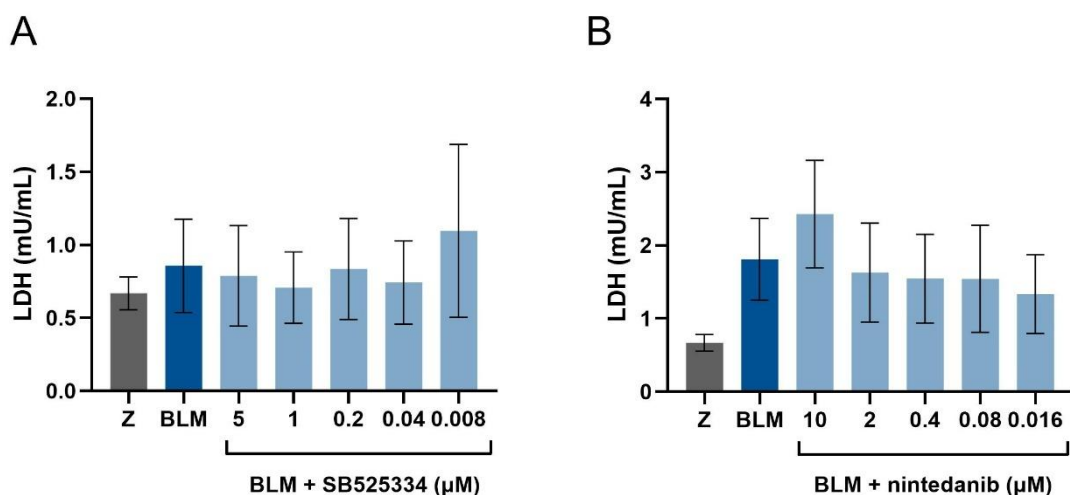
Slika 22. Koncentracije proteina pro-kolagena 1 α 1 (A), fibronektina (B), MMP12 (C) i TIMP1 (D) u inkubacijskom mediju prereza pluća pripremljenih iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom te tretiranim *ex vivo* 10 μ M nintedanibom. Koncentracije proteina su određene

nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=8$ iz 2 miša za zdrave i bleomicin tretirane kontrole + 0,1 % DMSO, $n=6$ iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim post hoc testom, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom, N – prerezi tretirani nintedanibom, MMP12 – matriks metaloproteinaza 12, TIMP1 – inhibitor matriks metaloproteinaza 1.

4.3.3. Utjecaj antifibroznih spojeva na vijabilnost prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom

U istim prerezima pluća u kojima je ispitan učinak antifibrozim spojevima SB525334 i nintedanibom na ekspresiju biljega fibroze, promatran je i njihov utjecaj na vijabilnost prereza mjerenjem aktivnosti LDH otpuštene u inkubacijski medij tijekom 3 dana inkubacije *ex vivo*. Kao što je prethodno opisano, u ovom je pokusu učinak spoja SB525334 i nintedaniba ispitan u prerezima iz različitih miševa tretiranih bleomicinom (prerezi iz 2 miša korišteni su za kontrole DMSO i testiranje SB525334, dok su prerezi iz druga 2 miša korišteni za kontrole DMSO i testiranje nintedaniba).

Tretman prereza pluća spojem SB525334 u koncentracijama od 5 μ M do 0,008 μ M nije imao učinka na otpuštanje enzima LDH u odnosu na kontrolne prereze pluća (Slika 23 A). Tretman prereza pluća nintedanibom nije imao učinka na otpuštanje enzima LDH u inkubacijski medij niti u jednoj od testiranih koncentracija (od 10 μ M do 0,016 μ M) u odnosu na kontrolne prereze pluća (Slika 23 A). Prema ovim rezultatima, niti jedan od testiranih antifibroznih spojeva nije utjecao na vijabilnost prereza pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom tijekom 3 dana inkubacije.



Slika 23. Aktivnost LDH u inkubacijskom mediju prereza pluća pripremljenih iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom nakon 3 dana inkubacije *ex vivo* spojem SB525334 (A) i nintedanibom (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=8$ iz 2 miša za bleomicin tretirane kontrole, $n=6$ iz 2 miša za bleomicin + tretman spojem. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom. Z – prerezi iz zdravih miševa, BLM – prerezi iz miševa tretiranih bleomicinom.

4.4 Stimulacija prereza mišjih pluća s TGF β

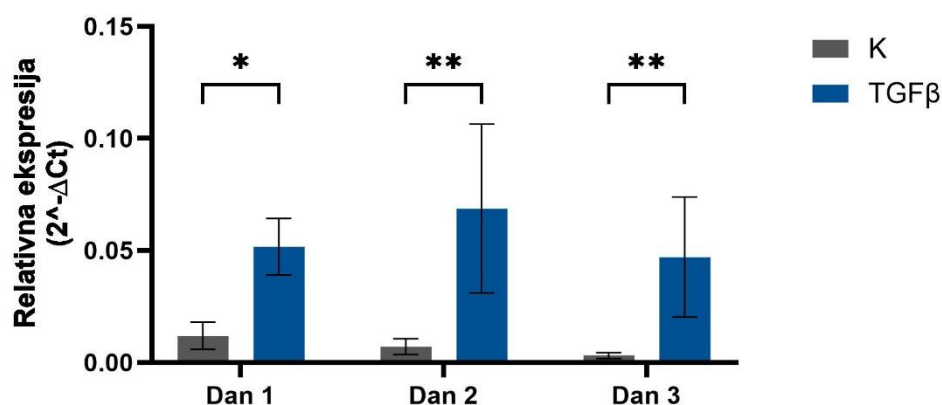
Prerezi pluća pripremljeni iz zdravih miševa tretirani su s TGF β tijekom više dana inkubacije *ex vivo* kako bi se odredio utjecaj na aktivaciju profibroznih procesa. Mjerena je ekspresija istih biljega fibroze kao u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, a to su geni *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAIL*.

4.4.1. Ekspresija gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAIL* u prerezima mišjih pluća tijekom različitog vremena stimulacije s TGF β *ex vivo*

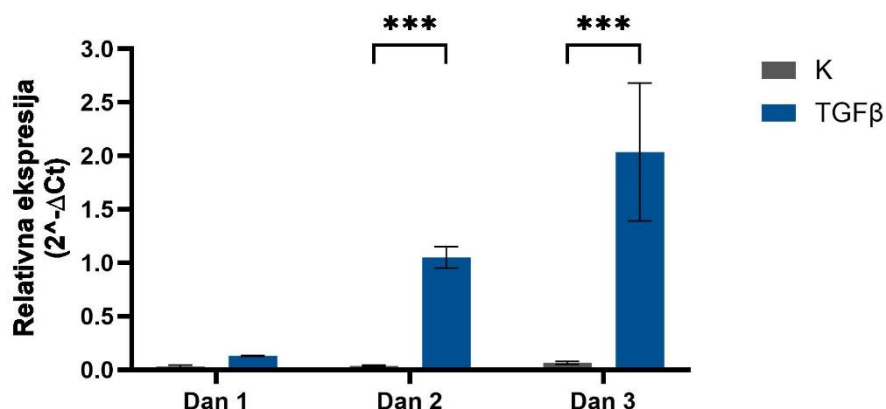
Prerezi pluća stimulirani su s TGF β u koncentraciji 10 ng/mL i inkubirani *ex vivo* 1, 2 i 3 dana. U svakom vremenu ekspresija biljega fibroze u prerezima stimuliranim s TGF β uspoređena je s ekspresijom tih gena u nestimuliranim kontrolnim prerezima.

Ekspresija gena *COL1A1* bila je veća u prerezima pluća stimuliranim s TGF β u odnosu na kontrolne prereze nakon 1 dan ($p = 0,02$), 2 dana ($p = 0,001$) i 3 dana ($p = 0,01$) inkubacije *ex vivo* (Slika 24). Ekspresija gena *FN1* također je bila veća u prerezima stimuliranim s TGF β

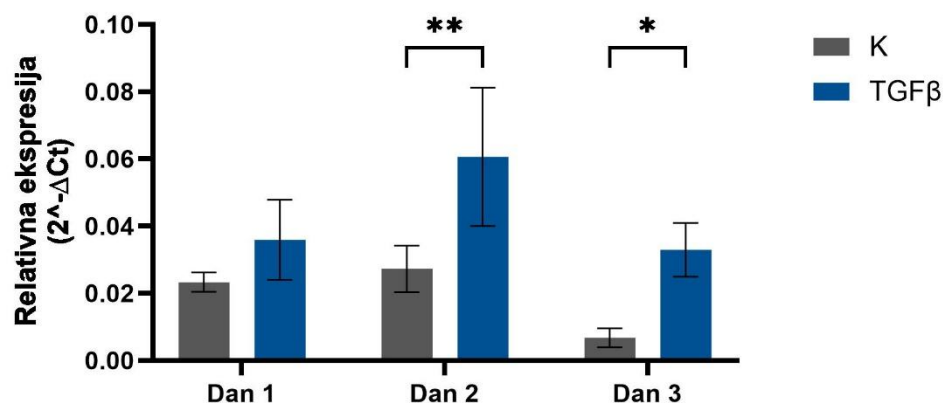
u odnosu na kontrolne prereze, nakon 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* (oba $p < 0,001$), dok nakon samo 1 dan inkubacije nije bilo razlike ($p > 0,99$) (Slika 25). U prerezima stimuliranim s TGF β uočen je trend rasta relativne ekspresije gena *FNI* tijekom vremena, tako da je najviša ekspresija uočena nakon 3 dana inkubacije. Nakon 1 dan inkubacije *ex vivo* nije bilo razlike u ekspresiji gena *ACTA2* između prereza stimuliranih s TGF β i kontrolnih prereza pluća ($p = 0,19$), dok je nakon 2 dana ($p = 0,002$) i 3 dana ($p < 0,001$) inkubacije, ekspresija gena *ACTA2* bila veća u prerezima stimuliranim s TGF β (Slika 26). Nije bilo razlike u ekspresiji gena *MMP12* između prereza stimuliranih s TGF β i kontrolnih prereza pluća u testiranim vremenima inkubacije *ex vivo* ($p = 0,15$, $p = 0,7$, $p = 0,05$) (Slika 27). Ekspresija gena *TIMP1* bila je veća u prerezima stimuliranim s TGF β u odnosu na kontrolne prereze nakon 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* (oba $p < 0,001$), dok nakon samo 1 dan inkubacije razlika nije uočena ($p = 0,12$). Slično kao kod ekspresije gena *FNI*, u prerezima stimuliranim s TGF β primijećen je trend rasta relativne ekspresije gena *TIMP1* tijekom inkubacije (Slika 28). Ekspresija gena *PAIL* također je bila povišena u prerezima pluća stimuliranim s TGF β u odnosu na kontrolne prereze na svim vremenima inkubacije *ex vivo* ($p < 0,001$, $p = 0,002$, $p < 0,001$) (Slika 29).



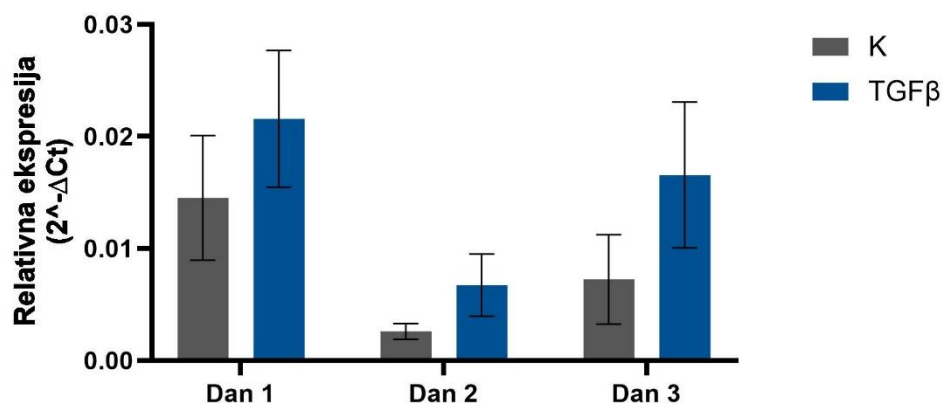
Slika 24. Ekspresija gena *COL1A1* u prerezima mišjih pluća stimuliranim *ex vivo* s TGF β u koncentraciji 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* s TGF β ili kontrolom. $n=4$ iz 2 miša. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β .



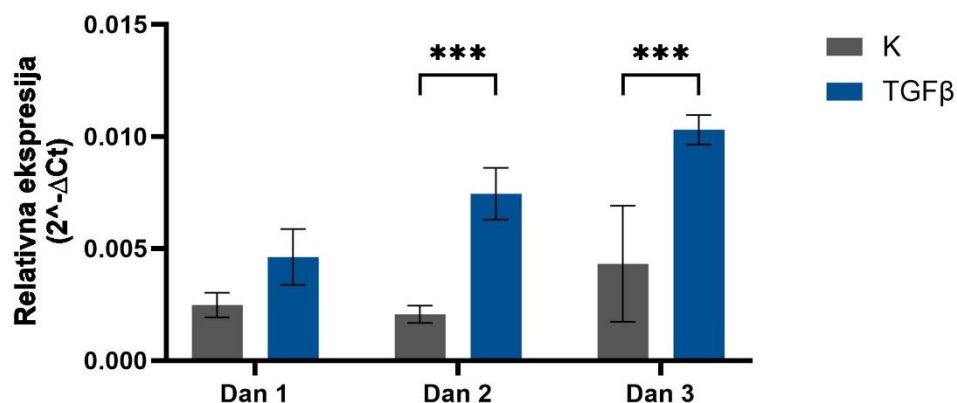
Slika 25. Ekspresija gena *FNI* u prerezima mišjih pluća stimuliranim *ex vivo* s TGFβ u koncentraciji 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* s TGFβ ili kontrolom. n=4 iz 2 miša. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.



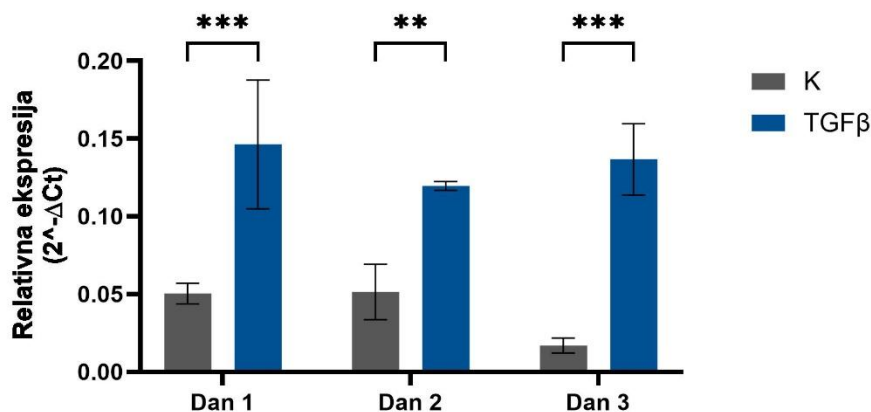
Slika 26. Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima mišjih pluća stimuliranim *ex vivo* s TGFβ u koncentraciji 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* s TGFβ ili kontrolom. n=4 iz 2 miša. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, *p < 0,05, **p < 0,01. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.



Slika 27. Ekspresija gena *MMP12* u prerezima mišjih pluća stimuliranim *ex vivo* s TGFβ u koncentraciji 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* s TGFβ ili kontrolom. n=4 iz 2 miša. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.



Slika 28. Ekspresija gena *TIMP1* u prerezima mišjih pluća stimuliranim *ex vivo* s TGFβ u koncentraciji 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* s TGFβ ili kontrolom. n=4 iz 2 miša. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.



Slika 29. Ekspresija gena *Pail* u prerezima mišjih pluća stimuliranim *ex vivo* s TGFβ u koncentraciji 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* s TGFβ ili kontrolom. n=4 iz 2 miša. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, **p < 0,01, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

4.4.2. Koncentracija proteina pro-kolagena 1α1 i fibronektina u prerezima mišjih pluća nakon 3 dana stimulacije s TGFβ *ex vivo*

Koncentracija proteina pro-kolagena 1α1 i fibronektina izmjerena je u inkubacijskom mediju prereza pluća nakon 3 dana stimulacije *ex vivo* s TGFβ, s obzirom na to da je na ovom vremenu inkubacije primijećena povećana ekspresija gena *COL1A1* i *FNI*. Za analizu koncentracije proteina korišteni su inkubacijski mediji istih prereza pluća u kojima je prethodno ispitana ekspresija gena.

Koncentracija pro-kolagena 1α1 bila je statistički značajno viša (p < 0,001) u inkubacijskom mediju prereza stimuliranih s TGFβ (534 ng/mL) u odnosu na nestimulirane kontrolne prereze (177 ng/mL) (Tablica 5). Slični rezultati dobiveni su i za koncentraciju fibronektina koja je bila značajno viša (p = 0,007) u prerezima pluća stimuliranim s TGFβ (5570 ng/mL), u odnosu na nestimulirane prereze (3119 ng/mL) (Tablica 5).

Tablica 5. Koncentracije proteina u inkubacijskom mediju prereza pluća stimuliranih *ex vivo* s TGFβ u koncentraciji 10 ng/mL te u kontrolnim prerezima.

	Pro-kolagen Iα1	Fibronektin
<i>Kontrola</i>	177 ± 71	3119 ± 1340
<i>TGFβ</i>	534 ± 96	5570 ± 1180
<i>p vrijednost</i>	*** < 0,001	** 0,007

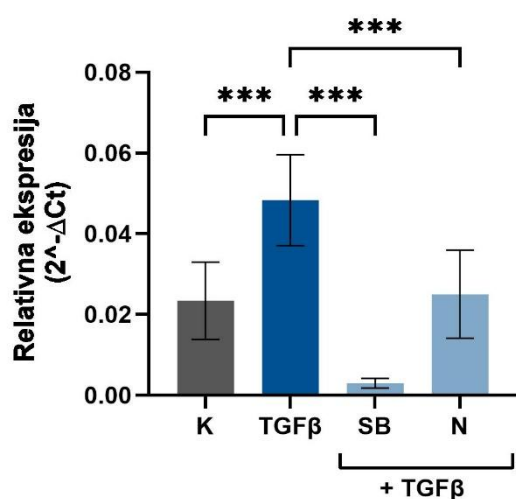
n=6 iz 3 miša. Koncentracije proteina izmjerene su nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Statistička analiza napravljena je koristeći t-test. Kontrola – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

4.4.3. Utjecaj antifibroznih spojeva na ekspresiju gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP* i *PAI1* u prerezima mišjih pluća stimuliranim s TGFβ

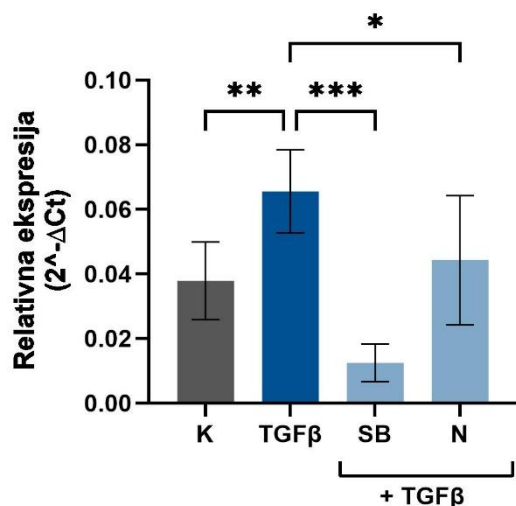
Stimulacija prereza s TGFβ prethodno je pokazala povećanje ekspresije gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *TIMP* i *PAI1* s najvećom razlikom u odnosu na nestimulirane prereze nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, stoga su ovi uvjeti dalje korišteni kako bi se ispitao učinak spojeva SB525334 i nintedaniba. U ovom dijelu istraživanja, spojevi su testirani samo u jednoj koncentraciji koja je prethodno pokazala inhibiciju biljega fibroze u prerezima iz miševa tretiranih bleomicinom, kako bi se smanjio broj potrebnih miševa. Prerezi pluća su tretirani nintedanibom u koncentraciji 10 μM te spojem SB525334 u koncentraciji 5 μM, nakon čega su stimulirani s TGFβ u koncentraciji 10 ng/mL. Paralelno su pripremani kontrolni prerezi iz istih miševa, tretirani s 0,1 % DMSO umjesto spojevima, te zatim stimulirani s TGFβ ili ostavljeni bez stimulacije.

Ekspresija gena *COL1A1* ($p < 0,001$), *FN1* ($p = 0,005$) i *ACTA2* ($p = 0,01$) bila je veća u prerezima pluća stimuliranim s TGFβ u odnosu na nestimulirane prereze (Slika 30, Slika 31 i Slika 32), u skladu s prethodnim rezultatima testiranja stimulacije s TGFβ. Prerezi tretirani nintedanibom i spojem SB525334, a potom stimulirani s TGFβ imali su značajno manju ekspresiju gena *COL1A1* (svi $p < 0,001$) u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGFβ (Slika 30). Ekspresija gena *FN1* također je bila snižena u prerezima tretiranim spojem SB525334 ($p < 0,001$) i nintedanibom ($p = 0,04$) u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGFβ (Slika 31). Ekspresija gena *ACTA2* bila je manja samo u prerezima tretiranim spojem SB525334 ($p = 0,004$), dok nije bilo značajne razlike između prereza tretiranih nintedanibom i kontrolnih prereza stimuliranih s TGFβ ($p = 0,24$) (Slika 32).

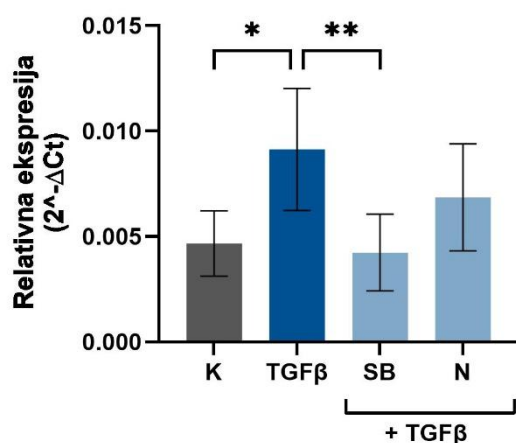
Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *MMP12* ($p = 0,06$), *TIMP1* ($p = 0,12$) i *PAII* ($p = 0,97$) između prereza stimuliranih s $TGF\beta$ i nestimuliranih prereza (Slika 33, Slika 34 i Slika 35), što je različito od prethodno dobivenih rezultata prema kojima su prerezi stimulirani s $TGF\beta$ imali povećanu ekspresiju gena *TIMP1* i *PAII* nakon 3 dana inkubacije *ex vivo* u odnosu na nestimulirane prereze. Prerezi tretirani spojem SB525334 ipak su pokazali smanjenu ekspresiju gena *MMP12* ($p = 0,008$) i *PAII* ($p = 0,001$) u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s $TGF\beta$ (Slika 33 i Slika 35). U uzorcima prereza tretiranih nintedanibom utvrđena je smanjena ekspresiju gena *MMP12* ($p = 0,009$), dok nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji gena *PAII* ($p = 0,94$) u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s $TGF\beta$ (Slika 33 i Slika 35). Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji gena *TIMP1* između prereza tretiranih spojem SB525334 i kontrolnih prereza stimuliranih s $TGF\beta$ ($p = 0,95$), dok je ekspresija u prerezima inkubiranim s nintedanibom bila povećana u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s $TGF\beta$ ($p = 0,002$) (Slika 34).



Slika 30. Ekspresija gena *COL1A1* u prerezima mišjih pluća tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranim s $TGF\beta$ (10 ng/mL). $TGF\beta$ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Ekspresija gena od interesa određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=6$ iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, $TGF\beta$ – prerezi tretirani s $TGF\beta$, SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

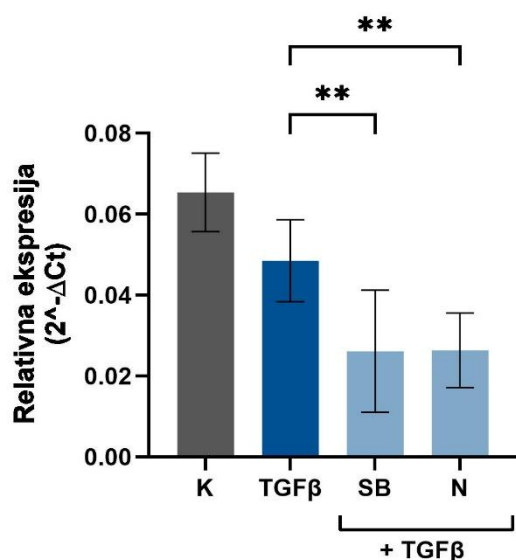


Slika 31. Ekspresija gena *FNI* u prerezima mišjih pluća tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranim s TGF β (10 ng/mL). TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Ekspresija gena od interesa određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. n=6 iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

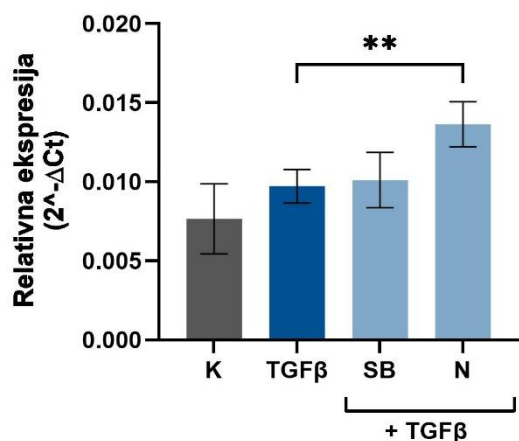


Slika 32. Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima mišjih pluća tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranim s TGF β (10 ng/mL). TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Ekspresija gena od interesa određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. n=6 iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc*

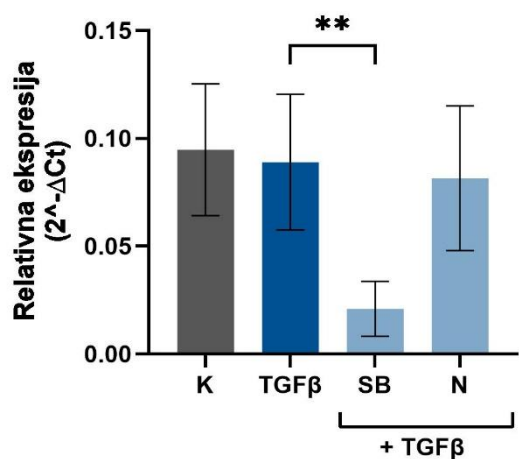
testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.



Slika 33. Ekspresija gena *MMP12* u prerezima mišjih pluća tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranim s TGF β (10 ng/mL). TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Ekspresija gena od interesa određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=6$ iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, ** $p < 0,01$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.



Slika 34. Ekspresija gena *TIMP1* u prerezima mišjih pluća tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranim s TGF β (10 ng/mL). TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Ekspresija gena od interesa određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. n=6 iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, **p < 0,01. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.



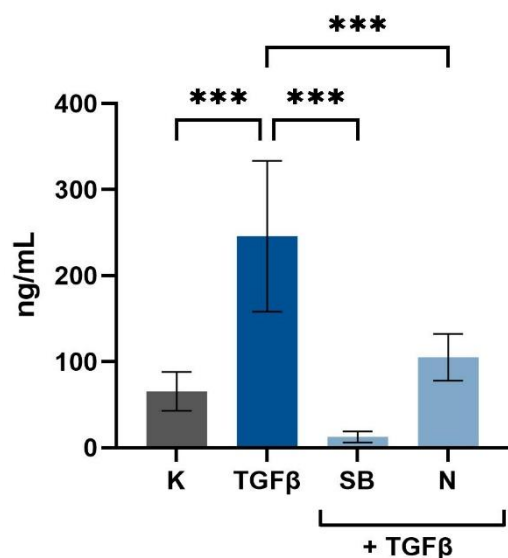
Slika 35. Ekspresija gena *FNI* u prerezima mišjih pluća tretiranim *ex vivo* spojem SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranim s TGF β (10 ng/mL). TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Ekspresija gena od interesa određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. n=6 iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc*

testom, $**p < 0,01$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

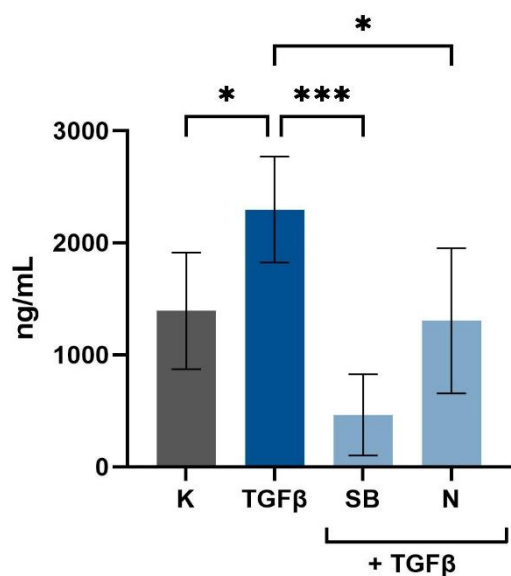
4.4.4. Utjecaj antifibroznih spojeva na koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina u prerezima mišjih pluća stimuliranim s TGF β

U inkubacijskom mediju prereza pluća u kojima je prethodno određena ekspresija gena *COL1A1* i *FNI*, ispitana je ekspresija na proteinskoj razini, mjereći koncentracije pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina metodom ELISA. Prerezi su bili tretirani nintedanibom (10 μ M) i spojem SB525334 (5 μ M), nakon čega su stimulirani s TGF β tijekom 3 dana *ex vivo*. Paralelno su pripremani kontrolni prerezi iz istih miševa, tretirani s 0,1 % DMSO umjesto spojevima, te zatim stimulirani s TGF β ili ostavljeni bez stimulacije.

Nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, koncentracija pro-kolagena 1 α 1 ($p < 0,001$) i fibronektina ($p = 0,02$) bila je viša u inkubacijskom mediju prereza pluća stimuliranih s TGF β u odnosu na nestimulirane prereze (Slika 36 i Slika 37). Prerezi tretirani spojem SB525334 (5 μ M), a zatim stimulirani s TGF β imali su značajno nižu koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina (oba $p < 0,001$) u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGF β (Slika 36 i Slika 37). Prerezi tretirani nintedanibom (10 μ M), a zatim stimulirani s TGF β imali su također značajno nižu koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 ($p < 0,001$) i fibronektina ($p = 0,01$) u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGF β (Slika 36 i Slika 37).



Slika 36. Koncentracija pro-kolagena 1 α 1 u inkubacijskom mediju prereza mišjih pluća tretiranih *ex vivo* spojevima SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranih s TGF β (10 ng/mL). Kontrola stimulirana s TGF β i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojem. Koncentracija proteina određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. n=6 iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

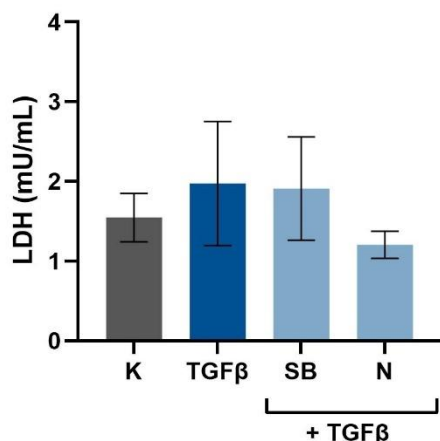


Slika 37. Koncentracija fibronektina u inkubacijskom mediju prereza mišjih pluća tretiranih *ex vivo* spojevima SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranih s TGF β (10 ng/mL). Kontrola stimulirana s TGF β i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojem. Koncentracija proteina određena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=6$ iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

4.4.5. Utjecaj antifibroznih spojeva na vijabilnost prereza mišjih pluća stimuliranih s TGF β

Učinak spojeva nintedaniba i SB525334 na vijabilnost prereza mišjih pluća stimuliranih s TGF β tijekom 3 dana *ex vivo* određen je mjerenjem otpuštanja enzima LDH u inkubacijski medij. Analiziran je inkubacijski medij istih prereza pluća u kojima je prethodno određen utjecaj na biljege fibroze.

Tretman prereza pluća tijekom 3 dana spojem SB525334 (5 μ M) ($p > 0,99$), kao i nintedanibom (10 μ M) ($p = 0,08$) nije utjecao na otpuštanje LDH u inkubacijski medij u odnosu na kontrolne prereze pluća stimulirane s TGF β (Slika 38). Ovi rezultati potvrđuju da niti jedan od spojeva pri testiranim koncentracijama nije utjecao na vijabilnost prereza pluća tijekom 3 dana inkubacije *ex vivo*.



Slika 38. Aktivnost LDH u inkubacijskom mediju prereza mišjih pluća tretiranih *ex vivo* spojevima SB525334 (5 μ M) i nintedanibom (10 μ M) te stimuliranih s TGF β (10 ng/mL) tijekom 3 dana. TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=6$ iz 3 miša. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

4.5 Određivanje vijabilnosti prereza ljudskih pluća

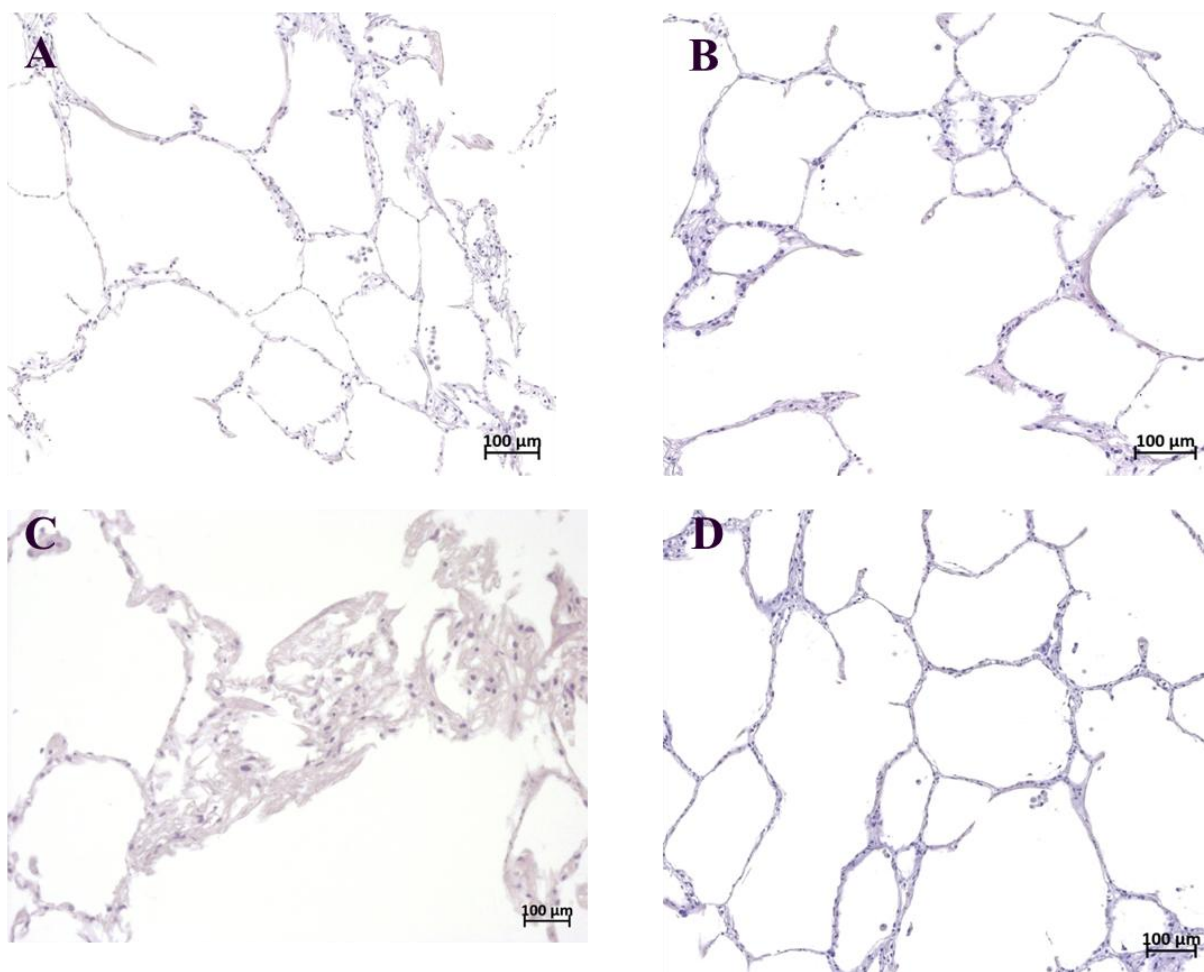
Vijabilnost prereza ljudskih pluća određena je tijekom više dana inkubacije *ex vivo* i uspoređena sa svježe pripremljenim prerezima, slično kao što je rađeno u prerezima mišjih pluća. Napravljena je histološka karakterizacija prereza ljudskih pluća, fluorescencijsko obilježavanje i vizualizacija živih i mrtvih stanica u prerezima te biokemijske metode mjerenja metaboličke aktivnosti stanica (redukcija reagensa Alamar Blue) i propusnosti staničnih membrana (aktivnost enzima LDH u inkubacijskom mediju prereza).

4.5.1. Histološka karakterizacija prereza ljudskih pluća tijekom inkubacije *ex vivo*

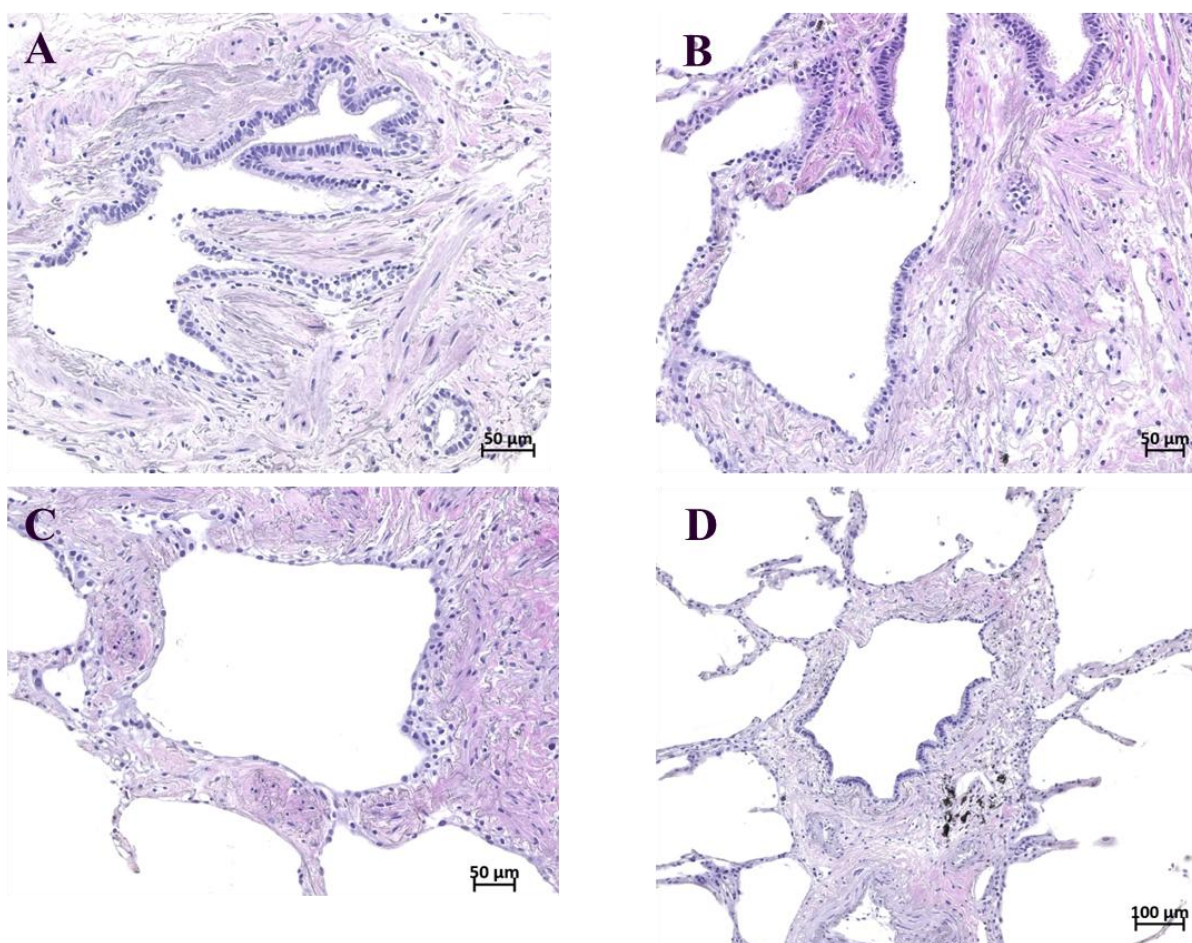
Prerezi ljudskih pluća obojani su hematoksilin-eozinom (HE), vizualizirani svjetlosnim mikroskopom i analizirani od strane patologa kako bi se karakterizirala struktura tkiva i vijabilnost stanica tijekom inkubacije *ex vivo*. Prerezi pluća korišteni su za histološku karakterizaciju odmah nakon pripreme (dan 0) te svaki dan tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo*, s po 3 prereza na svakom vremenu inkubacije. Reprezentativne slike jednog donora nalaze se

na Slika 39 i Slika 40, a histološka analiza napravljena je na prerezima pluća iz 4 donora tkiva koristeći različita vremena inkubacije *ex vivo* od 1 dan do ukupno 5 ili 7 dana.

Prerezi pluća su na dan pripreme imali potpuno očuvanu morfologiju bronhijalnog i alveolarnog epitela koja je nalikovala normalnim ljudskim plućima. U nekim prerezima je u alveolarnom epitelu primijećena prisutnost staničnog otpada i apoptoznih tjelešaca. Nakon 1 i 2 dana inkubacije *ex vivo*, morfologija prereza pluća je bila usporediva s morfologijom na dan pripreme, uz dodatnu pojavu apoptoznih stanica i u bronhijalnom epitelu. Nakon 3 i 4 dana inkubacije *ex vivo*, broj apoptoznih stanica i staničnog otpada uglavnom je bio veći nego na prethodnim vremenima inkubacije, međutim morfologija tkiva i stanica i dalje su bili očuvani. Kod nekih prereza primijećena je proliferacija stanica nakon 4 dana inkubacije *ex vivo*. Tek nakon 4-5 dana inkubacije *ex vivo* primijećene su morfološke promjene stanica alveolarnog i bronhijalnog epitela, uz pojavu vakuolarne degeneracije i displazije staničnih jezgri. Slične promjene primijećene su nakon 6 i 7 dana inkubacije *ex vivo*, uz dodatnu proliferaciju stanica. Generalno, bronhijalni epitel je pokazao očuvaniju morfologiju i vijabilnost u usporedbi s alveolarnim epitelom, a većina opisanih morfoloških promjena u više donora tkiva bila je zamijećena nakon 4 ili 5 dana inkubacije *ex vivo*.



Slika 39. Reprezentativne slike alveola u prerezima ljudskih pluća iz donora 001 obojanih hematoksilin-eozinom (HE). Prerezi pluća fiksirani su i pripremljeni za bojanje odmah nakon pripreme (A) te nakon 3 dana (B), 5 dana (C) i 7 dana (D) inkubacije *ex vivo*. Povećanje 5 puta.

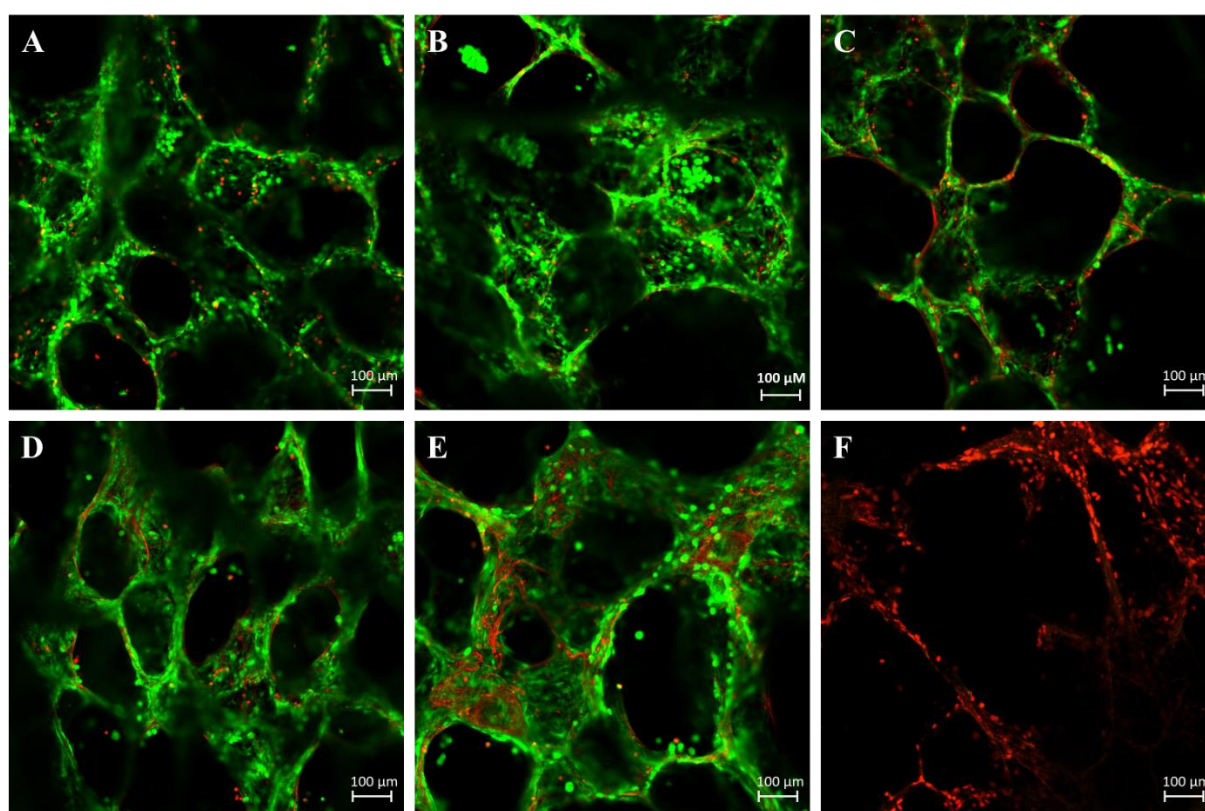


Slika 40. Reprezentativne slike bronhiola u prerezima ljudskih pluća iz donora 001 obojanih hematoksilin-eozinom (HE). Prerezi pluća fiksirani su i pripremljeni za bojanje odmah nakon pripreme (A) te nakon 3 dana (B), 5 dana (C) i 7 dana (D) inkubacije *ex vivo*. Povećanje 5 puta.

4.5.2. Fluorescencijsko obilježavanje i vizualizacija živih i mrtvih stanica u prerezima ljudskih pluća tijekom inkubacije *ex vivo*

Prisutnost živih i mrtvih stanica u prerezima ljudskih pluća kvalitativno je određena fluorescencijskim bojanjem uz vizualizaciju konfokalnim mikroskopom. Kalcein fluorescira zeleno u metabolički aktivnim stanicama, dok etidij homodimer fluorescira crveno u stanicama s oštećenim staničnim membranama. Bojanje živih i mrtvih stanica tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo* rađeno je na prerezima pluća iz četiri donora ljudskog tkiva, a reprezentativne slike jednog od donora prikazane su na Slika 41. Prerez pluća inkubiran u mediju s 1 % Tritonom-X tijekom 30 min korišten je kao kontrola narušene vijabilnosti obzirom da bi nakon tretmana Tritonom-X sve stanice u prerezu trebale biti lizirane i imati oštećene membrane. Na Slika 41F prikazan je navedeni kontrolni prerez pluća gdje se vide samo crveni signali etidij homodimera

za mrtve stanice, dok nema zelenog signala kalceina. Na dan pripreme, cijeli prerez fluorescira zeleno što potvrđuje prisutnost velikog broja živih stanica, uz manji broj raspršenih i točkastih crvenih signala mrtvih stanica (Slika 41A). Slični rezultati dobiveni su i nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*, s dominantno većim brojem živih stanica u prerezima (Slika 41B-D). Nakon 7 dana inkubacije *ex vivo* također je prisutan velik broj živih stanica, međutim primijećeno je da se povećao broj mrtvih stanica u odnosu na prethodne dane (Slika 41E). Crveni signali mrtvih stanica su nakon 7 dana inkubacije grupirani, za razliku od uglavnom točkastih crvenih signala na prethodnim danima.

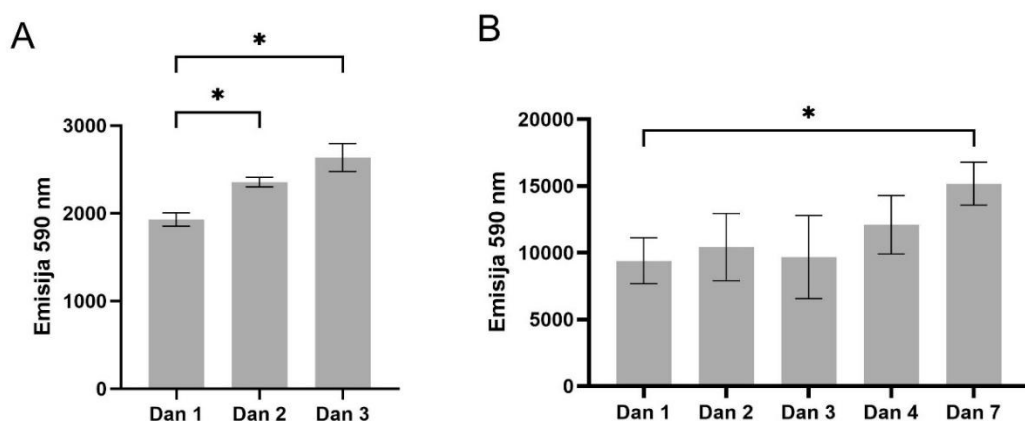


Slika 41. Obilježavanje živih i mrtvih stanica u prerezima ljudskih pluća na dan pripreme (A) te nakon 1 dan (B), 3 dana (C), 5 dana (D) i 7 dana (E) inkubacije *ex vivo*. Kao kontrola za mrtve stanice, u prerezu tretiranom 1 % Tritonom-X 30 min obojane su žive i mrtve stanice (F). Prerezi su pripremljeni iz donora 001. Žive stanice obilježene su zeleno (kalcein), mrtve stanice obilježene su crveno (etidij homodimer). Povećanje 10 puta.

4.5.3. Metabolička aktivnost i propusnost membrana prereza ljudskih pluća tijekom inkubacije *ex vivo*

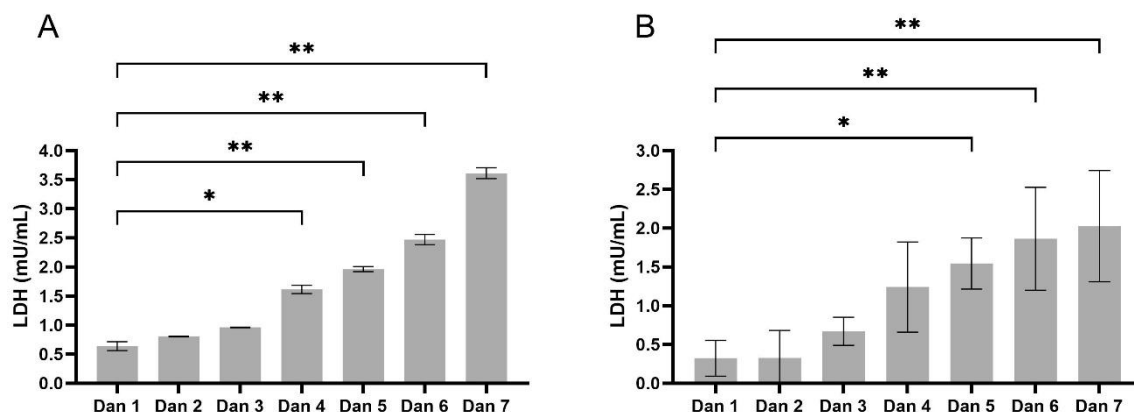
Metodom Alamar Blue mjerena je metabolička aktivnost prereza ljudskih pluća pripremljenih iz dva donora tkiva. Prerezi pluća iz donora 002 inkubirani su *ex vivo* tijekom 1, 2 i 3 dana te je izmjeren porast metaboličke aktivnosti s vremenom inkubacije ($p = 0,05$ i $p = 0,001$ nakon 2 i 3 dana) (Slika 42A). Stoga je vrijeme inkubacije *ex vivo* produljeno do 7 dana koristeći prereze pluća iz donora 003. U prerezima pluća iz donora 003 također je zabilježen blagi porast metaboličke aktivnosti nakon 7 dana u odnosu na prvi dan inkubacije *ex vivo* ($p = 0,04$) (Slika 42B). Na ostalim izmjerenim vremenima inkubacije nije bilo statistički značajne razlike u metaboličkoj aktivnosti u odnosu na prvi dan inkubacije ($p = 0,95$, $p > 0,99$ i $p = 0,45$ nakon 2, 3 i 4 dana).

Aktivnost LDH u inkubacijskom mediju prereza ljudskih pluća iz dva donora (donori 001 i 005) tkiva mjerena je svaki dan tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo*. Kod prereza pluća iz oba donora primijećeno je povećavanje otpuštanja enzima LDH u inkubacijski medij s vremenom inkubacije. Kod donora 005, statistički značajno povećana aktivnost LDH izmjerena je nakon 4, 5, 6 i 7 dana inkubacije *ex vivo* u odnosu na prvi dan inkubacije ($p = 0,4$, $p = 0,22$, $p = 0,02$, $p = 0,007$, $p = 0,006$ i $p = 0,003$ nakon 2, 3, 4, 5, 6 i 7 dana) (Slika 43A). Usporedivi rezultati dobiveni su i kod prereza iz donora 001, sa statistički značajno većom aktivnosti LDH nakon 5, 6 i 7 dana inkubacije *ex vivo* u odnosu na prvi dan inkubacije ($p > 0,99$, $p = 0,88$, $p = 0,14$, $p = 0,03$, $p = 0,007$ i $p = 0,003$ nakon 2, 3, 4, 5, 6 i 7 dana) (Slika 43B).



Slika 42. Redukcija reagensa Alamar Blue kao mjera metaboličke aktivnosti prereza ljudskih pluća pripremljenih iz donora 002 (A) i donora 003 (B) tijekom više dana inkubacije *ex vivo*.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=3$ iz svakog donora. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, $*p < 0,05$.



Slika 43. Aktivnost LDH (mU/mL) u inkubacijskim medijima prereza ljudskih pluća pripremljenih iz donora 005 (A) i donora 001 (B) tijekom više dana inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=3$ iz svakog donora. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

4.6 Stimulacija prereza ljudskih pluća s TGF β

Prerezi ljudskih pluća pripremani su iz tkiva bolesnika koji nemaju dijagnosticiranu plućnu fibrozu kako bi se ispitala mogućnost izazivanja profibroznih procesa *ex vivo*. Za stimulaciju profibroznih procesa u prerezima ljudskih pluća korišten je TGF β , a određen je njegov utjecaj na ekspresiju gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAI1*, kao i u prethodno opisanim eksperimentima na prerezima mišjih pluća.

4.6.1. Ekspresija gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAI1* u prerezima ljudskih pluća tijekom različitog vremena stimulacije s TGF β *ex vivo*

Prerezi ljudskih pluća stimulirani su s TGF β u koncentraciji 10 ng/mL, a kao kontrola korišteni su nestimulirani prerezi. Svi prerezi inkubirani su *ex vivo*. Prerezi pluća dobiveni od donora 004 inkubirani su *ex vivo* 1, 2 i 3 dana, dok je na prerezima pluća dobivenih od donora 005 vrijeme inkubacije *ex vivo* produljeno na 1, 3 i 5 dana.

U prerezima pluća (donor 004) nakon 1 i 2 dana inkubacije *ex vivo* nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji gena *COL1A1* između prereza stimuliranih s TGFβ i nestimuliranih prereza (oba $p > 0,99$) (Slika 44A). Slični rezultati dobiveni su i u prerezima pluća iz donora 005 ($p > 0,99$) nakon 1 dana inkubacije *ex vivo* (Slika 44B). Povišena ekspresija gena *COL1A1* izmjerena je nakon 3 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima pluća stimuliranim s TGFβ iz oba donora ($p = 0,01$ i $p < 0,001$) (Slika 44A i B). U uvjetima produljene inkubacije (5 dana) *ex vivo*, u prerezima pluća stimuliranim s TGFβ (donor 005) ekspresija gena *COL1A1* je i dalje bila veća u prerezima pluća stimuliranim s TGFβ ($p < 0,001$) (Slika 44B). Primijećeno je također povećanje relativne ekspresije gena *COL1A1* tijekom inkubacije *ex vivo* od 1 do 5 dana u prerezima pluća dobivenih od donora 005 (Slika 44B).

U prerezima pluća dobivenih od donora 004 stimuliranih s TGFβ i nestimuliranih nije utvrđena razlika u ekspresiji gena *FNI* niti na jednom vremenu inkubacije ($p > 0,99$, $p > 0,99$, $p = 0,19$), iako je nakon 3 dana primijećen trend povećane ekspresije u stimuliranim prerezima (Slika 45A). Slični rezultati dobiveni su i u prerezima pluća dobivenih od donora 005, odnosno stimulacija s TGFβ nije izazvala promjenu ekspresije gena *FNI* u odnosu na nestimulirane prereze niti u jednom od testiranih vremena inkubacije *ex vivo* ($p = 0,46$, $p > 0,99$, $p = 0,27$) (Slika 45B).

Ekspresija gena *ACTA2* bila je statistički značajno povišena u prerezima stimuliranim s TGFβ u odnosu na nestimulirane prereze samo u uzorcima dobivenih od donora 005 nakon 5 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,002$), dok u ostalim vremenima inkubacije nije bilo značajne razlike ($p > 0,99$, $p = 0,25$) (Slika 46B). U uzorcima dobivenim od donora 004, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji gena *ACTA2* između stimuliranih i nestimuliranih prereza niti u jednom vremenu inkubacije ($p = 0,05$, $p > 0,99$, $p = 0,14$) (Slika 46A).

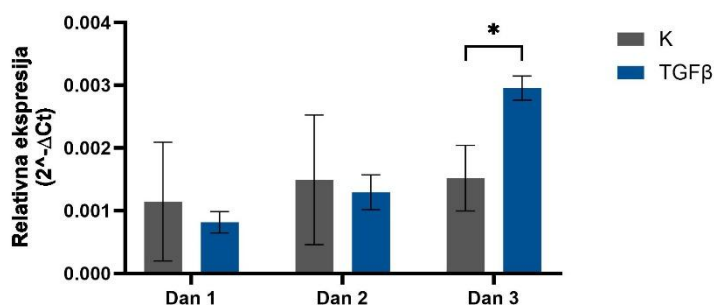
Statistički značajna razlika u ekspresiju gena *MMP12* između prereza stimuliranih s TGFβ i nestimuliranih prereza dobivenih od donora 004 nije utvrđena niti na jednom vremenu inkubacije (svi $p > 0,99$) (Slika 47A). U prerezima dobivenima od donora 005 također nije bilo razlike u ekspresiji gena *MMP12* nakon 1. i 3. dana inkubacije (oba $p > 0,99$), dok je nakon 5 dana inkubacije ekspresija gena *MMP12* čak bila niža u prerezima stimuliranim s TGFβ u odnosu na nestimulirane prereze ($p = 0,008$) (Slika 47B).

Ekspresija gena *TIMP1* bila je veća u prerezima stimuliranim s TGFβ (donor 004) nakon 1 ($p = 0,03$) i 2 dana ($p = 0,04$) inkubacije *ex vivo*, dok nakon 3 dana inkubacije razlika nije utvrđena ($p > 0,99$) (Slika 48A). U prerezima dobivenim od donora 005 nije bilo razlike u

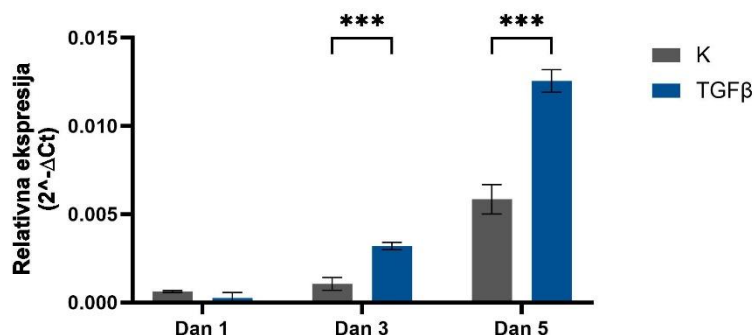
ekspresiji gena *TIMP1* između stimuliranih i nestimuliranih prereza niti u jednom vremenu inkubacije ($p = 0,14$, $p = 0,87$, $p > 0,99$) (Slika 48B).

Ekspresija gena *PAII* bila je veća u prerezima stimuliranim s $TGF\beta$ u odnosu na nestimulirane prereze nakon 1. dana inkubacije (donor 004: $p = 0,002$; donor 005: $p = 0,04$), dok u ostalim vremenima inkubacije nije bilo značajne razlike između prereza (donor 004: $p = 0,5$, $p = 0,64$; donor 005: oba $p > 0,99$) (Slika 49A i B).

A

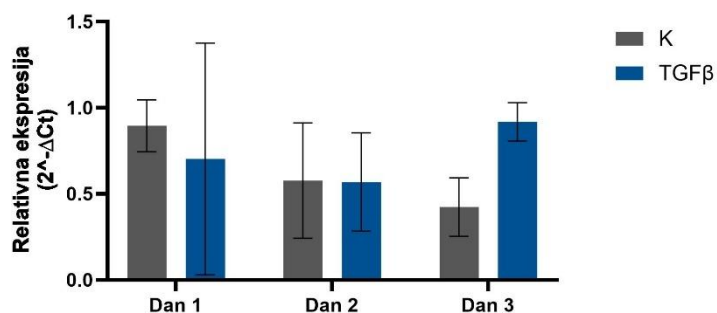


B

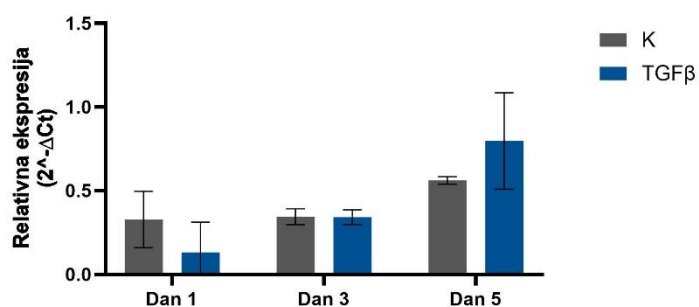


Slika 44. Ekspresija gena *COL1A1* u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s $TGF\beta$ koncentracije 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon (A) 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 004, $n=4$., te nakon (B) 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 005, $n=3$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, $TGF\beta$ – prerezi tretirani s $TGF\beta$.

A

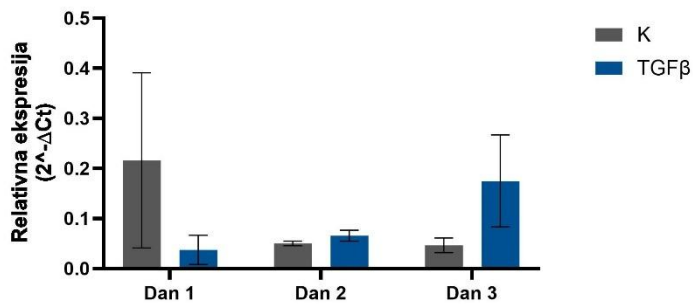


B

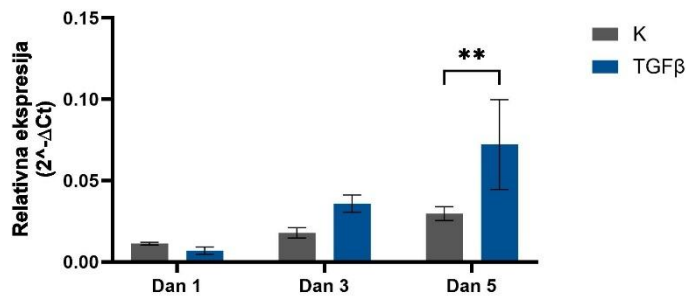


Slika 45. Ekspresija gena *FNI* u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ koncentracije 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon (A) 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 004, n=4., te nakon (B) 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 005, n=3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A

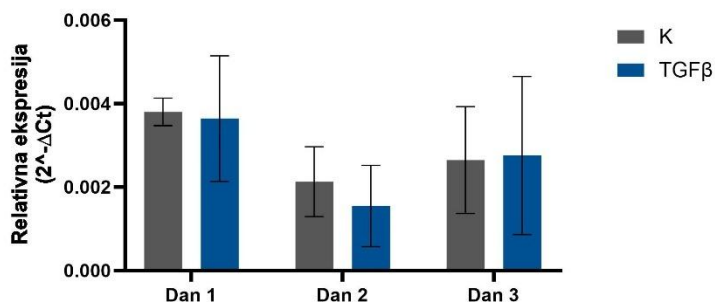


B

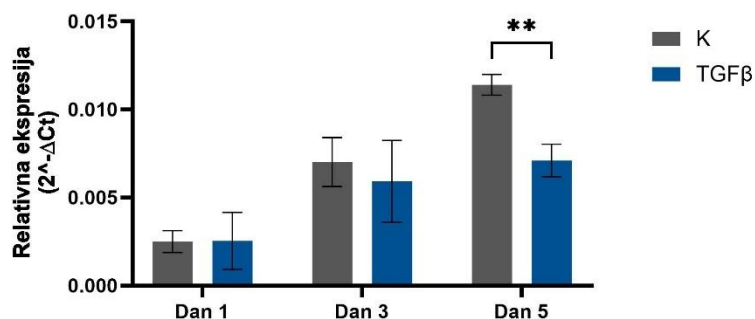


Slika 46. Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ koncentracije 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon (A) 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 004, n=4., te nakon (B) 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 005, n=3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, **p < 0,01. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A

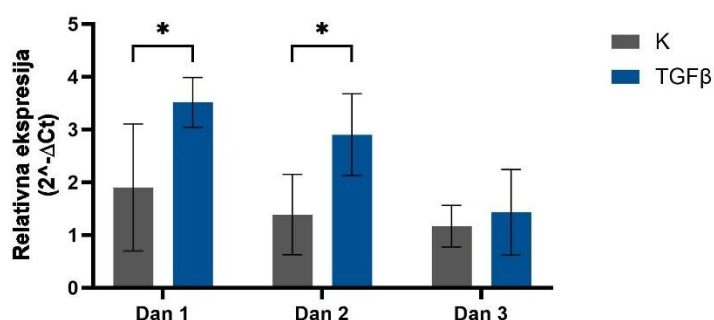


B

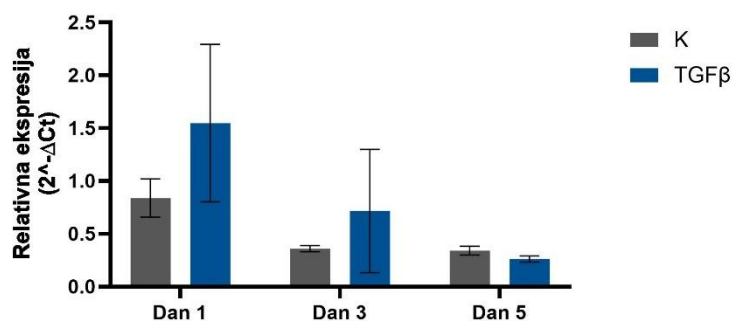


Slika 47. Ekspresija gena *MMP12* u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ koncentracije 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon (A) 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 004, n=4., te nakon (B) 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 005, n=3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, **p < 0,01. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A

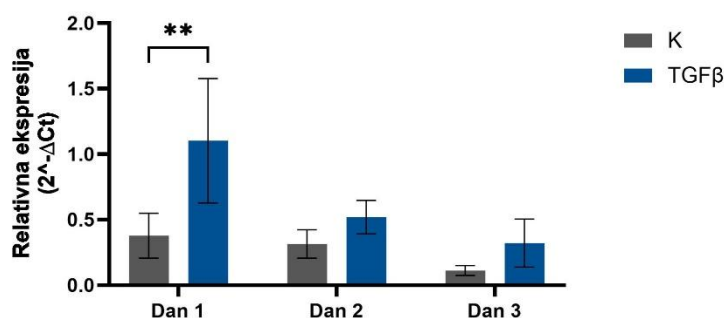


B

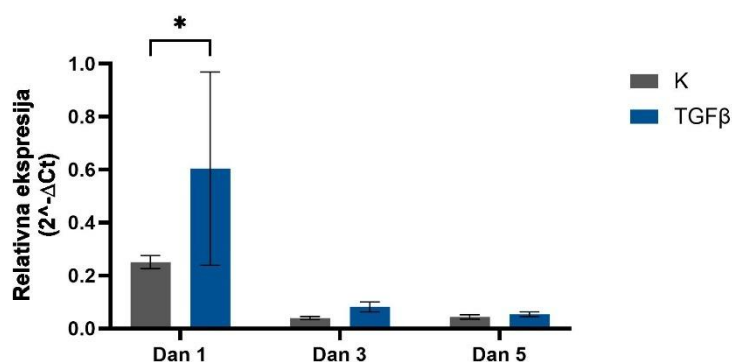


Slika 48. Ekspresija gena *TIMP1* u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ koncentracije 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon (A) 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 004, n=4., te nakon (B) 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 005, n=3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, *p < 0,05. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A



B



Slika 49. Ekspresija gena *PAIL* u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ koncentracije 10 ng/mL. Ekspresija gena određena je nakon (A) 1, 2 i 3 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 004, n=4., te nakon (B) 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* u prerezima dobivenim od donora 005, n=3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Two-Way ANOVA s Bonferroni *post hoc* testom, *p < 0,05, **p < 0,01. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

4.6.2. Testiranje različitih koncentracija TGFβ tijekom 3 i 5 dana stimulacije *ex vivo* i utjecaj na ekspresiju gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *TIMP1*, *MMP12* i *PAIL*

Za stimulaciju profibroznog odgovora u prerezima ljudskih pluća, TGFβ je testiran u više koncentracija. Utjecaj na ekspresiju biljega fibroze određen je nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*, obzirom da se u prethodnim pokusima pokazalo da u tim vremenima inkubacije dolazi do povišene ekspresije nekih od biljega kao odgovor na stimulaciju s TGFβ koncentracije 10 ng/mL. TGFβ je testiran u koncentracijama 20, 10, 5, 1, 0,5 i 0,1 ng/mL, dok su nestimulirani prerezi korišteni kao kontrola.

Ekspresija gena *COL1A1* bila je povišena u prerezima stimuliranim s TGF β u koncentracijama 20 ng/mL ($p = 0,002$), 10 ng/mL ($p = 0,03$) i 5 ng/mL ($p = 0,01$) nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, s usporedivim povećanjem sa sve tri navedene koncentracije TGF β u odnosu na nestimuliranu kontrolu (Slika 50A). Nakon 5 dana inkubacije *ex vivo*, ekspresija gena *COL1A1* bila je povišena u koncentracijama TGF β od 20 ng/mL do 0,5 ng/mL ($p < 0,001$, $p = 0,04$, $p = 0,005$, $p = 0,004$, $p = 0,02$), s najvećim povećanjem u koncentraciji 20 ng/mL (Slika 50B). Kao i u prethodnim pokusima na prerezima iz drugih donora, relativna ekspresija gena *COL1A1* raste s vremenom inkubacije *ex vivo* u prerezima stimuliranim s TGF β i nestimuliranim prerezima (Slika 50A i B).

Ekspresija gena *FNI* bila je povišena nakon 3 i 5 dana stimulacije *ex vivo* s TGF β u koncentracijama 20 ng/mL ($p = 0,001$, $p < 0,001$), 10 ng/mL ($p = 0,02$, $p < 0,001$) i 5 ng/mL ($p = 0,001$, $p = 0,008$) (Slika 51A i B). Slično povećanje ekspresije *FNI* primijećeno je sa sve tri navedene koncentracije TGF β nakon 3 dana inkubacije, dok je nakon 5 dana inkubacije povećanje bilo najveće s 20 ng/mL koncentracijom TGF β . Slično kao i ekspresija *COL1A1*, relativna ekspresija *FNI* je rasla s vremenom inkubacije *ex vivo*.

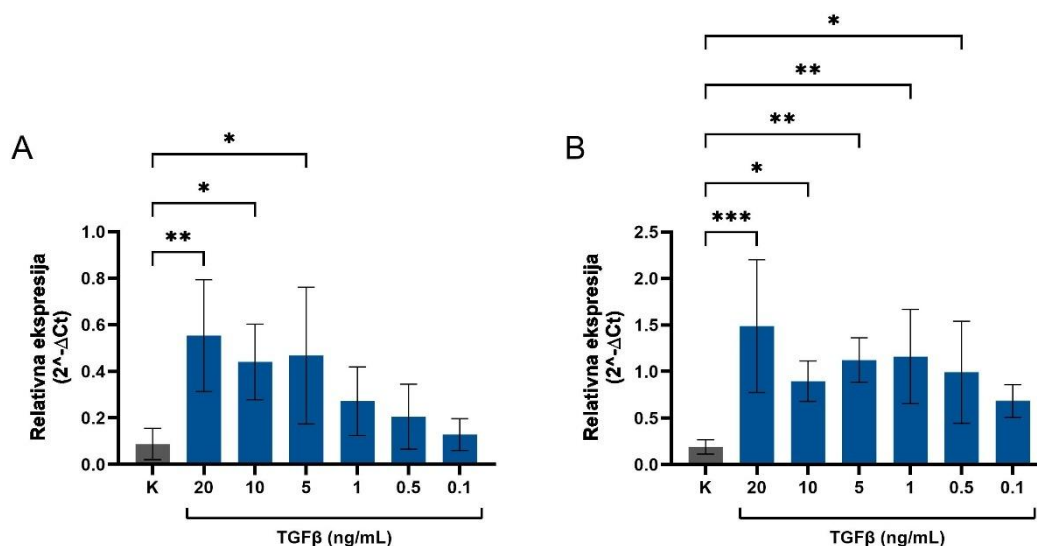
Ekspresija gena *ACTA2* bila je statistički značajno povišena samo u prerezima stimuliranim s TGF β u koncentraciji 20 ng/mL nakon 5 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,007$), dok u ostalim testiranim uvjetima nije bilo razlike u odnosu na nestimuliranu kontrolu (Slika 52A i B).

U prerezima stimuliranim s TGF β u koncentracijama 20 ng/mL, 10 ng/mL i 5 ng/mL primijećen je trend smanjene ekspresije gena *MMP12* u odnosu na nestimulirane kontrolne prereze nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*, iako statistički značajna razlika nije utvrđena (Slika 53).

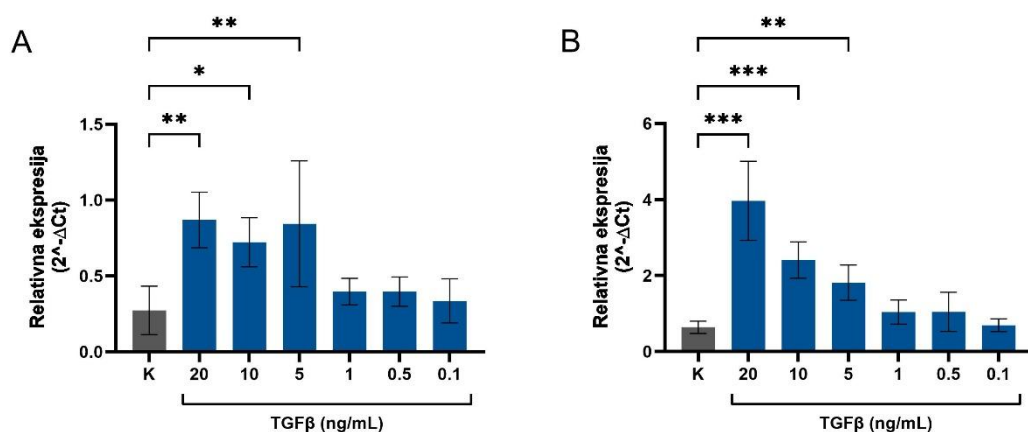
Ekspresija gena *TIMP1* bila je povišena u prerezima stimuliranim s TGF β samo u najvišoj koncentraciji od 20 ng/mL, nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,05$, $p = 0,001$), dok pri ostalim testiranim koncentracijama TGF β nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na nestimulirane prereze (Slika 54A i B).

Nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*, prerezi stimulirani s TGF β u koncentracijama 20 ng/mL ($p < 0,001$, $p < 0,001$), 10 ng/mL ($p < 0,001$, $p < 0,001$) i 5 ng/mL ($p = 0,03$, $p < 0,001$) pokazali su povećanu ekspresiju gena *PAIL* u odnosu na nestimulirane prereze (Slika 55A i B). Nakon 3 dana inkubacije porast ekspresije *PAIL* bio je isti s 20 ng/mL i 10 ng/mL koncentracijama TGF β , dok je nakon 5 dana inkubacije bio nešto veći s 20 ng/mL u odnosu na

10 ng/mL TGF β . Izmjerena relativna ekspresija *PAIL* u prerezima stimuliranim s TGF β i nestimuliranim prerezima bila je slična nakon oba vremena inkubacije *ex vivo*.

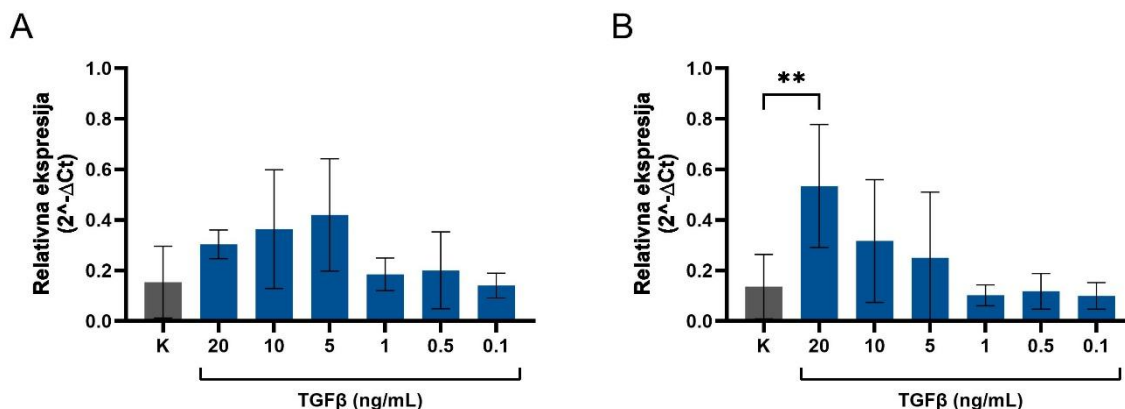


Slika 50. Ekspresija gena *COL1A1* u prerezima ljudskih pluća od donora 006 stimuliranim s TGF β u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=5$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β .

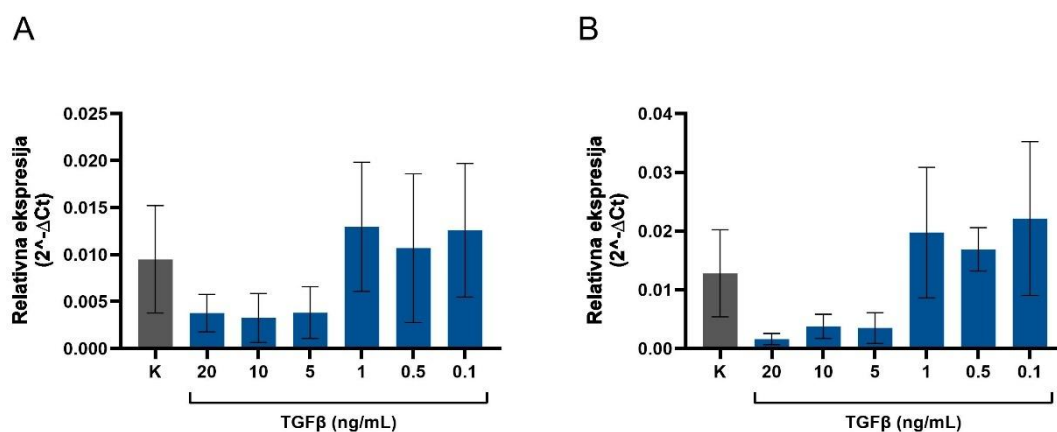


Slika 51. Ekspresija gena *FNI* u prerezima ljudskih pluća od donora 006 stimuliranim s TGF β u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=5$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post*

hoc testom, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β .

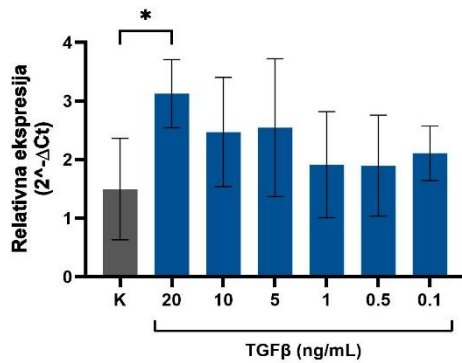


Slika 52. Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima ljudskih pluća od donora 006 stimuliranim s TGF β u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=5$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, ** $p < 0,01$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β .

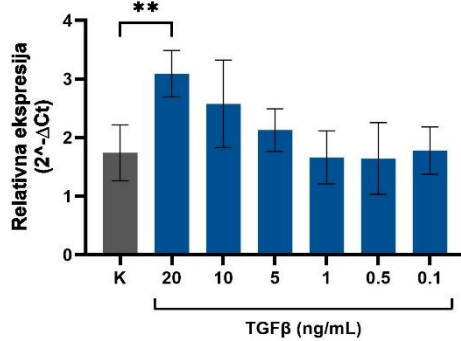


Slika 53. Ekspresija gena *MMP12* u prerezima ljudskih pluća od donora 006 stimuliranim s TGF β u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=5$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β .

A

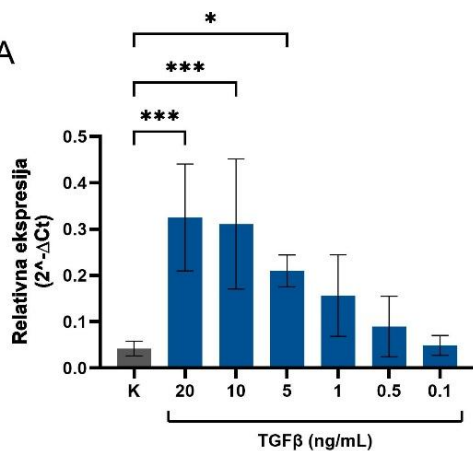


B

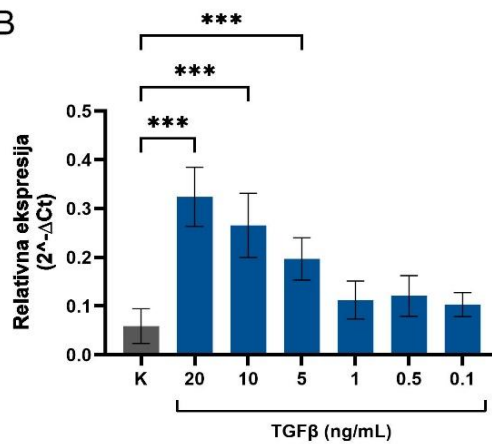


Slika 54. Ekspresija gena *TIMP1* u prerezima ljudskih pluća od donora 006 stimuliranim s TGFβ u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. n=5. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, *p < 0,05, **p < 0,01. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A



B



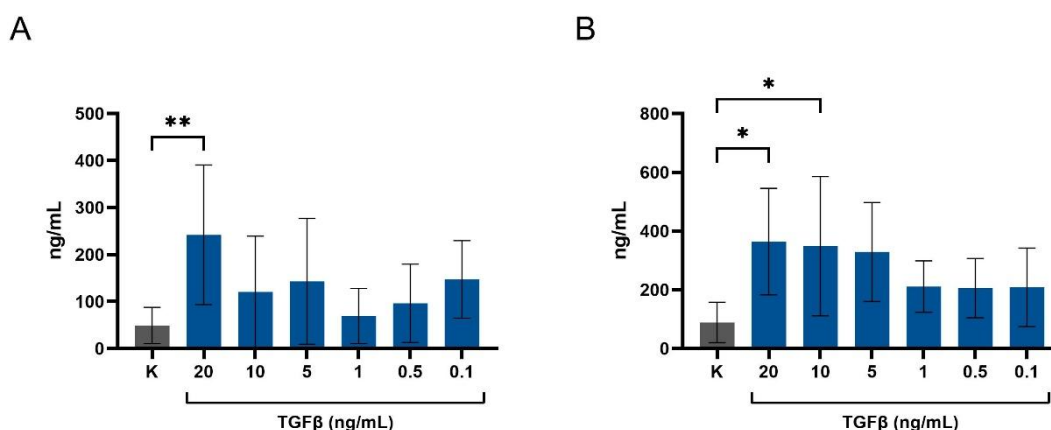
Slika 55. Ekspresija gena *PAII* u prerezima ljudskih pluća od donora 006 stimuliranim s TGFβ u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. n=5. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, *p < 0,05, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

4.6.3. Testiranje različitih koncentracija TGF β tijekom 3 i 5 dana stimulacije *ex vivo* i utjecaj na koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina

Utjecaj stimulacije s TGF β na koncentracije pro-kolagena 1 α 1 i fibronektina određen je u inkubacijskom mediju prereza pluća u kojima je određena ekspresija gena.

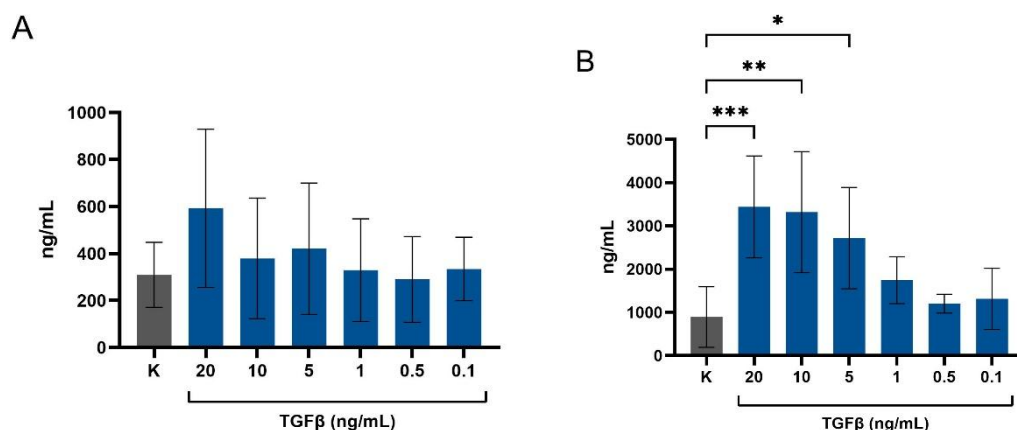
U prerezima stimuliranim s TGF β koncentracije 20 ng/mL koncentracija pro-kolagena 1 α 1 je bila povišena u odnosu na nestimulirane prereze nakon 3 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,006$), dok je nakon 5 dana inkubacije koncentracija bila povišena u prerezima stimuliranim s TGF β koncentracija 20 ng/mL ($p = 0,03$) i 10 ng/mL ($p = 0,05$) (Slika 56A i B). Iako je nakon 5 dana inkubacije stimulacija s TGF β u koncentraciji 5 ng/mL također pokazala trend povećanja koncentracije pro-kolagena 1 α 1, nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na nestimulirane prereze ($p = 0,08$) (Slika 56B). Koncentracija pro-kolagena 1 α 1 u inkubacijskom mediju TGF β stimuliranih i nestimuliranih prereza pluća bila je viša nakon 5 dana inkubacije u odnosu na 3 dana inkubacije *ex vivo*.

Slični rezultati dobiveni su za fibronektin, čija koncentracija je bila značajno povišena u prerezima stimuliranim s TGF β koncentracija 20 ng/mL ($p < 0,001$), 10 ng/mL ($p = 0,002$) i 5 ng/mL ($p = 0,02$) nakon 5 dana inkubacije *ex vivo* (Slika 57B), dok na ranijem vremenu inkubacije od 3 dana nije utvrđena statistički značajna razlika između prereza stimuliranih s TGF β i nestimuliranih prereza (Slika 57B). Također je primijećeno da su koncentracije fibronektina u inkubacijskom mediju svih uzoraka bile više nakon 5 dana inkubacije u odnosu na 3 dana inkubacije *ex vivo*.



Slika 56. Koncentracija pro-kolagena 1 α 1 u inkubacijskom mediju prereza ljudskih pluća (donor 006) stimuliranih s TGF β u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije

ex vivo. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=5$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β .



Slika 57. Koncentracija fibronektina u inkubacijskom mediju prereza ljudskih pluća (donor 006) stimuliranih s TGF β u više koncentracija nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=5$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β .

4.7 Aktivnost antifibroznih spojeva u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGF β

Utjecaj nintedaniba i spoja SB525334 na ekspresiju biljega fibroze u prerezima ljudskih pluća određen je koristeći prethodno uspostavljene uvjete stimulacije s TGF β . Za stimulaciju je TGF β korišten u koncentraciji 10 ng/mL, koja je povećala ekspresiju većine mjerenih biljega usporedivo s najvišom testiranom koncentracijom od 20 ng/mL. Prerezi su tretirani nintedanibom i spojem SB525334 u više koncentracija, nakon čega su stimulirani s TGF β , a ekspresija biljega fibroze određena je nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*.

4.7.1. Utjecaj antifibroznih spojeva na ekspresiju gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAIL* u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGF β

Utjecaj antifibroznih spojeva određen je na ekspresiju gena *COL1A1*, *FN1*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAIL*, čija ekspresija je bila praćena i u prethodnim pokusima.

Ekspresija gena *COL1A1* bila je povećana u prerezima pluća stimuliranim s TGFβ u odnosu na kontrolne prereze nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* (oba $p < 0,001$) (Slika 58). Prerezi stimulirani s TGFβ i tretirani nintedanibom imali su značajno manju ekspresiju gena *COL1A1* u odnosu na prereze stimulirane s TGFβ nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*. Nakon 3 dana inkubacije, nintedanib je smanjio ekspresiju *COL1A1* u koncentracijama od 10 μM ($p < 0,001$), 2 μM ($p = 0,02$), 0,4 μM ($p = 0,008$) i 0,08 μM ($p = 0,006$), dok je nakon 5 dana inkubacije ekspresija bila smanjena u koncentracijama od 10 μM ($p < 0,001$) i 2 μM ($p = 0,02$) (Slika 58). Spoj SB525334 smanjio je ekspresiju gena *COL1A1* u odnosu na prereze stimulirane s TGFβ, u sličnim koncentracijama nakon oba vremena inkubacije od 3 i 5 dana. SB525334 je u koncentracijama od 5 μM ($p < 0,001$), 1 μM ($p < 0,001$), 0,2 μM ($p < 0,001$) i 0,008 μM ($p = 0,006$) smanjio ekspresiju *COL1A1* nakon 3 dana inkubacije, dok je nakon 5 dana inkubacije to bilo vidljivo u koncentracijama od 5 μM ($p < 0,001$), 1 μM ($p < 0,001$), 0,2 μM ($p < 0,001$) i 0,04 μM ($p = 0,02$) (Slika 58).

Ekspresija gena *FNI* također je bila povećana nakon 3 i 5 dana stimulacije *ex vivo* s TGFβ u odnosu na kontrolne prereze (oba $p < 0,001$) (Slika 59). Prerezi tretirani nintedanibom u koncentraciji od 10 μM ($p < 0,001$) imali su smanjenu ekspresiju *FNI* nakon 3 dana inkubacije, dok ostale testirane koncentracije nintedaniba nisu imale utjecaja u odnosu na prereze stimulirane s TGFβ. Nakon 5 dana inkubacije, nintedanib je smanjio ekspresiju *FNI* u koncentracijama od 10 μM ($p < 0,001$) i 2 μM ($p < 0,001$), dok je i pri najnižoj testiranoj koncentraciji od 0,016 μM ($p = 0,03$) uočena smanjena ekspresija (Slika 59B). Tretman spojem SB525334 smanjio je ekspresiju *FNI* u svim testiranim koncentracijama od 5 μM ($p < 0,001$), 1 μM ($p < 0,001$), 0,2 μM ($p < 0,001$), 0,04 μM ($p = 0,02$) i 0,08 μM ($p < 0,001$) nakon 3 dana inkubacije, te u 5 μM ($p < 0,001$), 1 μM ($p < 0,001$) i 0,2 μM ($p < 0,001$) nakon 5 dana inkubacije (Slika 59).

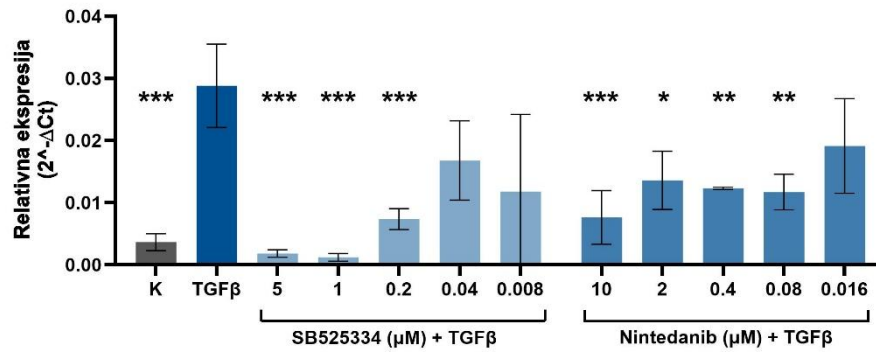
Prerezi stimulirani *ex vivo* s TGFβ imali su povećanu ekspresiju gena *ACTA2* nakon 3 dana ($p < 0,001$) i 5 dana ($p = 0,008$) inkubacije u odnosu na kontrolne prereze (Slika 60). Nakon 3 dana inkubacije, tretman nintedanibom smanjio je ekspresiju gena *ACTA2* u 10 μM koncentraciji ($p = 0,05$), dok je u koncentraciji od 0,4 μM ($p = 0,003$) ekspresija *ACTA2* bila povećana u odnosu na prereze stimulirane s TGFβ (Slika 60A). Nakon 5 dana inkubacije, tretman nintedanibom nije imao utjecaja na *ACTA2* ekspresiju niti u jednoj od testiranih koncentracija (Slika 60B). Tretman spojem SB525334 smanjio je ekspresiju gena *ACTA2* nakon 3 i 5 dana inkubacije, u istim koncentracijama od 5 μM ($p < 0,001$ i $p = 0,01$), 1 μM ($p < 0,001$ i $p = 0,006$) i 0,2 μM ($p < 0,001$ i $p = 0,01$) (Slika 60).

Ekspresija gena *MMP12* imala je suprotan trend od ostalih izmjerenih gena, sa smanjenom ekspresijom u prerezima stimuliranim s TGF β u odnosu na nestimulirane prereze. Iako smanjenje ekspresije *MMP12* nije bilo statistički značajno, trend je uočen i nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,26$ i $p = 0,06$) (Slika 61). Nakon 3 i 5 dana inkubacije, tretman spojem SB525334 u koncentracijama 5 μM ($p = 0,003$ i $p = 0,02$) i 1 μM (oba $p < 0,001$) povećao je ekspresiju gena *MMP12* u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGF β (Slika 61). Prerezi tretirani nintedanibom nisu imali utjecaja na ekspresiju gena *MMP12* u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGF β (Slika 61).

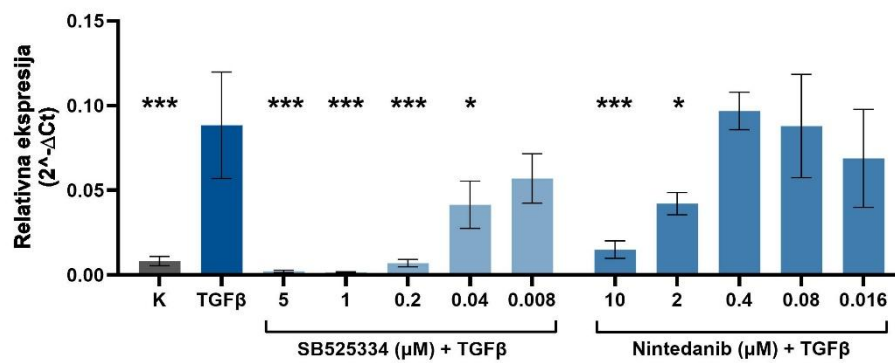
Ekspresija gena *TIMP1* bila je povećana nakon 3 dana ($p = 0,004$) i 5 dana ($p = 0,01$) stimulacije *ex vivo* s TGF β (Slika 62). Tretman nintedanibom u 10 μM koncentraciji ($p = 0,001$) smanjio je ekspresiju *TIMP1* nakon 3 dana inkubacije, dok nakon 5 dana inkubacije nije imao utjecaja na ekspresiju *TIMP1* niti pri jednoj od testiranih koncentracija (Slika 62). Nakon 3 dana inkubacije, tretman spojem SB525334 smanjio je ekspresiju *TIMP1* u svim testiranim koncentracijama od 5 μM ($p < 0,001$), 1 μM ($p < 0,001$), 0,2 μM ($p = 0,03$), 0,04 μM ($p = 0,02$) i 0,08 μM ($p = 0,002$) (Slika 62A). Nakon 5 dana inkubacije, tretman spojem SB525334 smanjio je ekspresiju *TIMP1* samo u koncentraciji od 1 μM ($p = 0,006$), dok u ostalim testiranim koncentracijama nije imao utjecaja na ekspresiju *TIMP1* (Slika 62B).

Ekspresija gena *PAIL* bila je povećana nakon 3 dana ($p < 0,001$) i 5 dana ($p = 0,002$) stimulacije prereza s TGF β (Slika 63). Tretman spojem SB525334 smanjio je ekspresiju *PAIL* u koncentracijama 5 μM ($p < 0,001$) i 1 μM ($p = 0,008$) nakon 3 dana inkubacije, te u 5 μM ($p = 0,002$), 1 μM ($p = 0,001$) i 0,2 μM ($p = 0,003$) nakon 5 dana inkubacije *ex vivo* (Slika 63). Tretman nintedanibom smanjio je ekspresiju *PAIL* samo u koncentraciji 10 μM ($p = 0,01$) nakon 3 dana inkubacije, dok ovo nije primijećeno nakon 5 dana inkubacije *ex vivo*. Tretman nintedanibom u jednoj od srednjih testiranih koncentracija, 0,4 μM , pokazao je povećanje ekspresije *PAIL* u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGF β ($p < 0,001$) nakon 5 dana inkubacije (Slika 63B).

A

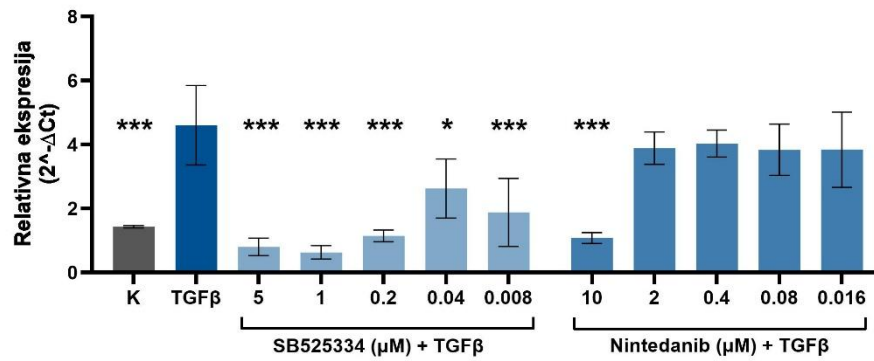


B

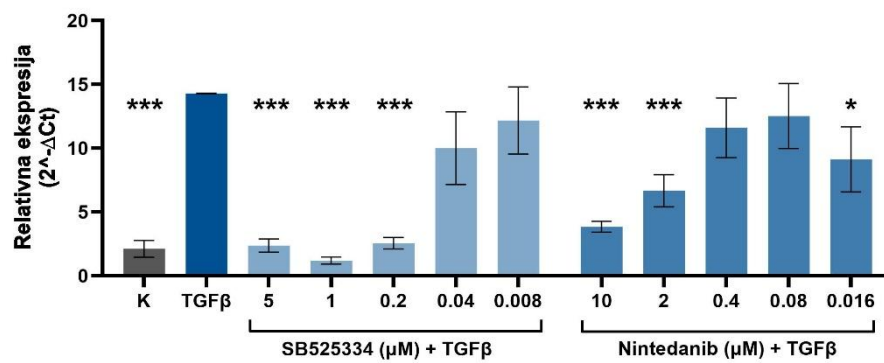


Slika 58. Ekspresija gena *COL1A1* u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 ili nintedanibom te s TGFβ (10 ng/mL). TGFβ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. n=3. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGFβ kontrolu, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A

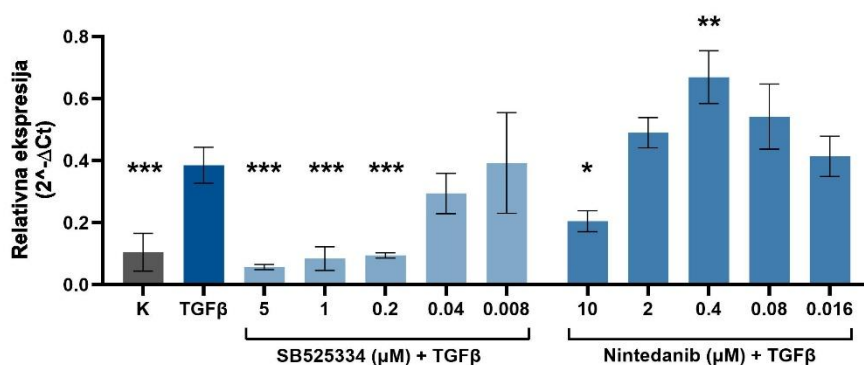


B

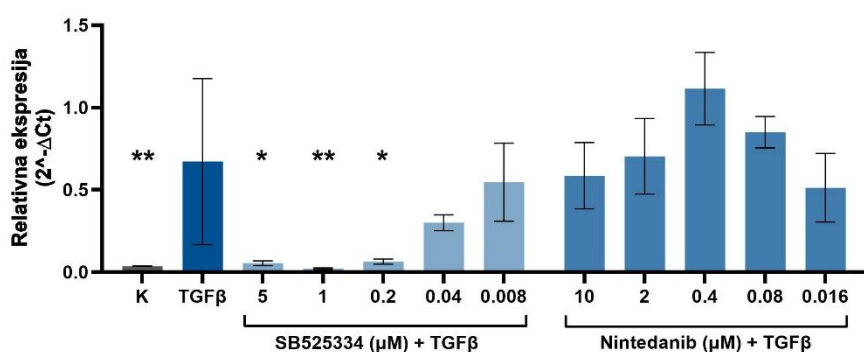


Slika 59. Ekspresija gena *FNI* u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 ili nintedanibom te s TGFβ (10 ng/mL). TGFβ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. n=3. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGFβ kontrolu, *p < 0,05, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

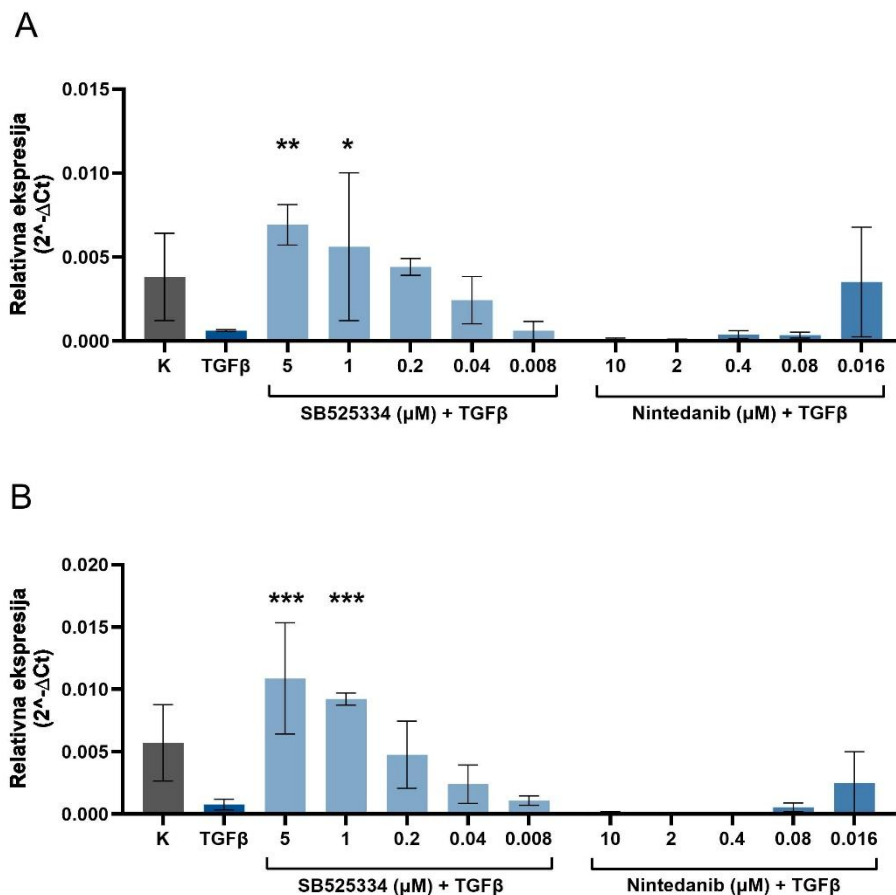
A



B

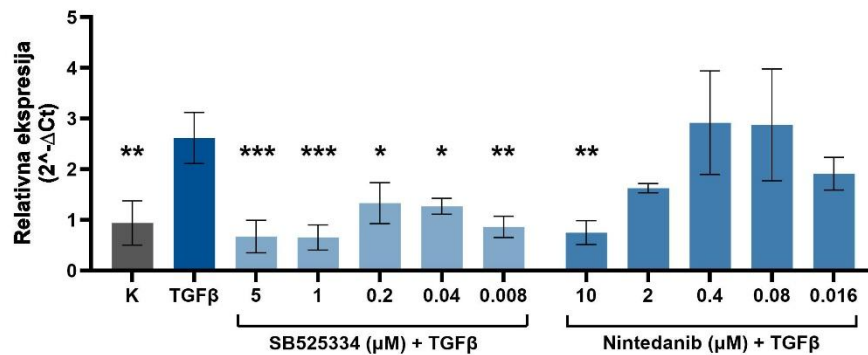


Slika 60. Ekspresija gena *ACTA2* u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 ili nintedanibom te s TGFβ (10 ng/mL). TGFβ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. n=3. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGFβ kontrolu, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

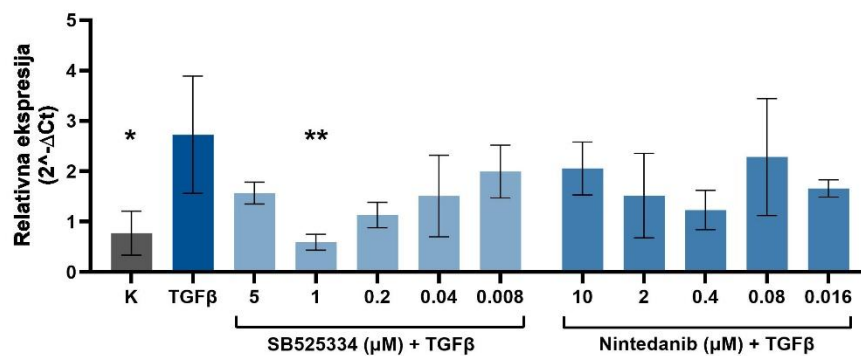


Slika 61. Ekspresija gena *MMP12* u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 ili nintedanibom te s TGFβ (10 ng/mL). TGFβ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=3$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGFβ kontrolu, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A

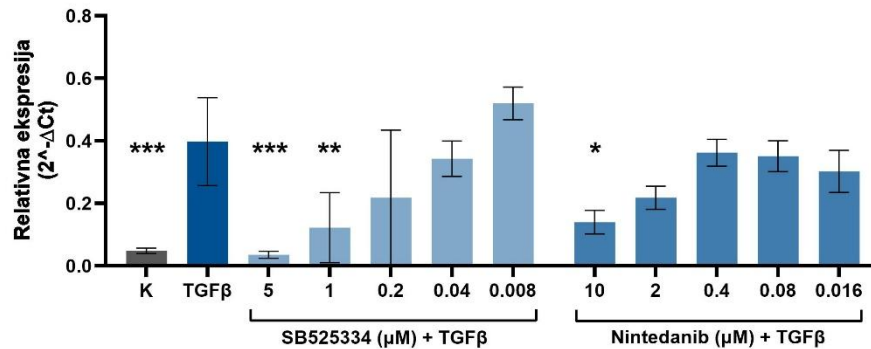


B

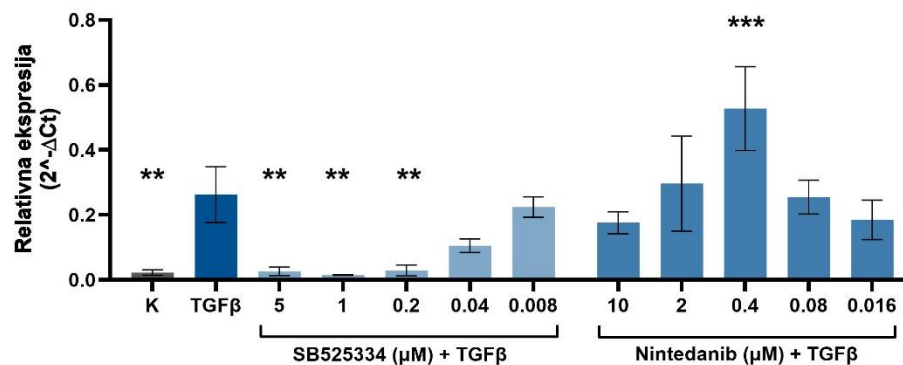


Slika 62. Ekspresija gena *TIMP1* u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 ili nintedanibom te s TGFβ (10 ng/mL). TGFβ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. n=3. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGFβ kontrolu, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

A



B



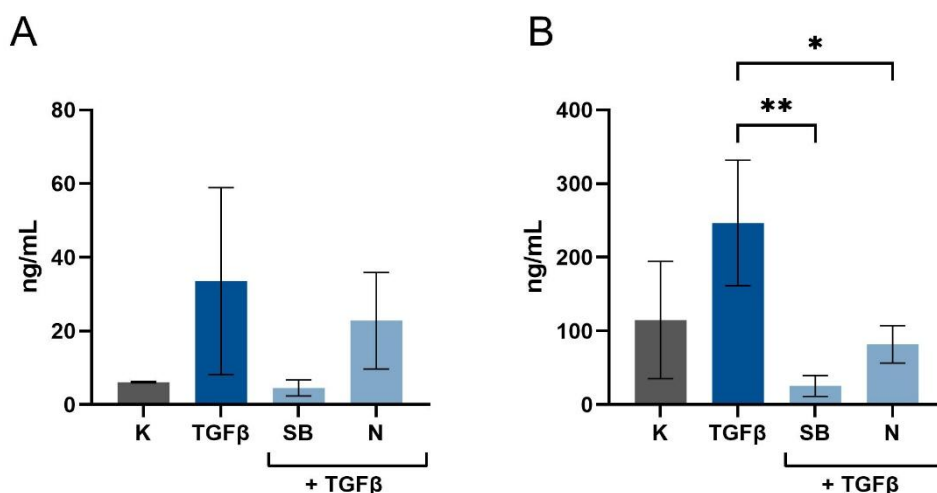
Slika 63. Ekspresija gena *PAIL* u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 ili nintedanibom te s TGFβ (10 ng/mL). TGFβ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. n=3. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGFβ kontrolu, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ.

4.7.2. Utjecaj antifibroznih spojeva na koncentracije pro-kolagena 1α1 i fibronektina u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ

Koncentracije pro-kolagena 1α1 i fibronektina određene su metodom ELISA u inkubacijskom mediju prereza ljudskih pluća tretiranih spojevima SB525334 i nintedanibom te stimuliranih s TGFβ. Za analizu je korišten inkubacijski medij istih prereza pluća u kojima je prethodno određena ekspresija gena. Koncentracije proteina izmjerene su u uzorcima tretiranim samo najvišim koncentracijama spojeva SB525334 (5 μM) i nintedaniba (10 μM), kao i u kontrolnim prerezima tretiranim s DMSO, nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*.

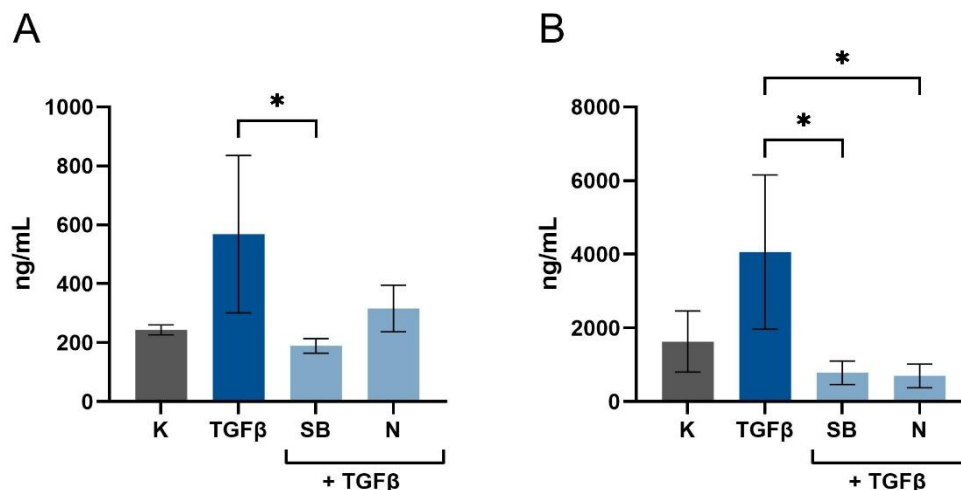
Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji pro-kolagena 1 α 1 u inkubacijskom mediju prereza stimuliranih s TGF β u odnosu na nestimulirane prereze nakon 3 dana ($p = 0,2$) i 5 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,09$), no na oba vremena inkubacije primijećen je trend povećane koncentracije nakon stimulacije s TGF β . Tretman prereza spojem SB525334 pokazao je trend smanjene koncentracije pro-kolagena 1 α 1 nakon 3 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,13$), dok je nakon 5 dana inkubacije značajno smanjio koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 u odnosu na kontrolne prereze stimulirane s TGF β ($p = 0,007$). Tretman nintedanibom također je smanjio koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 nakon 5 dana inkubacije ($p = 0,03$), dok to nije uočeno na ranijem vremenu od 3 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,74$) (Slika 64).

Usporedivi rezultati dobiveni su za koncentraciju fibronektina koja je imala samo trend povećane koncentracije u inkubacijskom mediju prereza stimuliranih s TGF β u odnosu na nestimulirane prereze, no bez značajne razlike nakon 3 dana ($p = 0,12$) i 5 dana inkubacije ($p = 0,1$). Tretman spojem SB525334 smanjio je koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 na oba vremena inkubacije ($p = 0,04$ i $p = 0,02$). Tretman nintedanibom smanjio je koncentraciju pro-kolagena 1 α 1 samo nakon 5 dana inkubacije *ex vivo* ($p = 0,02$), no ne i nakon 3 dana inkubacije ($p = 0,12$) (Slika 65).



Slika 64. Koncentracija pro-kolagena 1 α 1 u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 (5 μ M) ili nintedanibom (10 μ M) te s TGF β (10 ng/mL). TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=3$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGF β kontrolu, * $p < 0,05$, ** p

< 0,01. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.



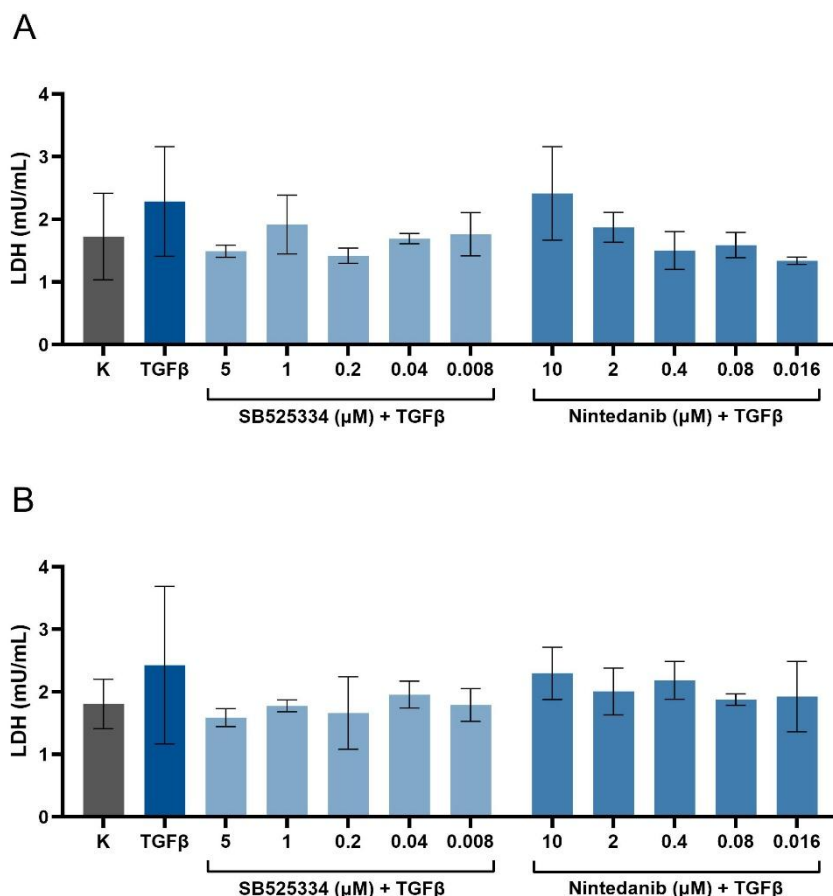
Slika 65. Koncentracija fibronektina u prerezima ljudskih pluća (donor 007) nakon 3 dana (A) i 5 dana (B) inkubacije *ex vivo* sa spojem SB525334 (5 μ M) ili nintedanibom (10 μ M) te s TGF β (10 ng/mL). TGF β stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n=3$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim *post hoc* testom u odnosu na TGF β kontrolu, * $p < 0,05$. K – kontrolni prerezi, TGF β – prerezi tretirani s TGF β , SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

4.7.3. Utjecaj antifibroznih spojeva na vijabilnost prereza ljudskih pluća stimuliranih s TGF β

Otpuštanje enzima LDH u inkubacijski medij prereza ljudskih pluća tretiranih spojevima SB525334 i nintedanibom izmjereno je kako bi se odredio njihov utjecaj na propusnost staničnih membrana i time vijabilnost prereza. Prerezi ljudskih pluća tretirani su spojevima u više koncentracija i stimulirani s TGF β te inkubirani 3 dana i 5 dana. Analiziran je inkubacijski medij istih prereza pluća u kojima je prethodno određen utjecaj na biljege fibroze.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u količini LDH u inkubacijskom mediju prereza tretiranih spojem SB525334 u koncentracijama od 5 μ M do 0,008 μ M u odnosu na kontrolne prereze tretirane s DMSO i stimulirane s TGF β , nakon 3 i 5 dana inkubacije. Također,

prerezi tretirani nintedanibom u koncentracijama od 10 μ M do 0,016 μ M nisu pokazali značajne razlike u količini otpuštenog LDH u inkubacijskom mediju u odnosu na kontrolne prereze niti nakon jednog vremena inkubacije (Slika 66). Ovi rezultati potvrđuju da tretman spojevima SB525334 i nintedanibom nije utjecao na vijabilnost prereza ljudskih pluća nakon 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo*.



Slika 66. Aktivnost LDH u inkubacijskim medijima prereza ljudskih pluća (donor 007) tretiranih *ex vivo* spojem SB525334 i nintedanibom te stimuliranih s TGFβ (10 ng/mL) tijekom 3 dana (A) i 5 dana (B) *ex vivo*. TGFβ stimulirana i nestimulirana kontrola (K) tretirane su s DMSO (0,1 %) umjesto spojevima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. $n = 3$. One-Way ANOVA s Dunnett-ovim post hoc testom. K – kontrolni prerezi, TGFβ – prerezi tretirani s TGFβ, SB – prerezi tretirani spojem SB525334, N – prerezi tretirani nintedanibom.

5. RASPRAVA

5.1 Prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom

Kako bi se istražile mogućnosti korištenja prereza pluća kao modela plućne fibroze *ex vivo*, cilj prvog dijela istraživanja bio je opisati prereze pluća pripremljene iz miševa s plućnom fibrozom izazvanom bleomicinom *in vivo*. Ovaj model plućne fibroze *in vivo*, korišten jer je dobro okarakteriziran i najčešće korišten mišji model *in vivo*, prikazuje neke od najbitnijih karakteristika IPF-a i nezaobilazan je u pretkliničkim ispitivanjima novih antifibroznih spojeva (Jenkins i sur., 2017). Razvoj plućne fibroze *in vivo* nakon primjene bleomicina miševima temelji se na nastanku mnogobrojnih oštećenja i apoptozi stanica u plućima te posljedično aktivacije popravka oštećenja (Moeller i sur., 2008). Smatra se da je fibroza deregulirani proces popravka oštećenja, a plućna fibroza izazvana bleomicinom pokazuje slične karakteristike IPF-u kod ljudi (Cai i sur., 2013; R. Peng i sur., 2013; Sueblinvong i sur., 2012). U ovom istraživanju miševima su uzimana pluća za pripremu prereza 14 dana nakon primjene bleomicina *in vivo* jer je nakon tog vremena, prema literaturi, fibroza već uspostavljena (Della Latta i sur., 2015; Jenkins i sur., 2017). Razvoj fibroze 14 dana nakon primjene bleomicina potvrđen je i u prethodno optimiranom *in vivo* modelu koji je korišten u ovom istraživanju (Anzulović Šanta i sur., 2023). Prerezi mišjih pluća pripremljeni 14 dana nakon primjene bleomicina inkubirani su *ex vivo* tijekom više dana kako bi se najprije ispitala vijabilnost prereza, a zatim i prisutnost te postojanost fibroznih promjena u uvjetima *ex vivo*.

Prerezi su netom nakon pripreme imali jako dobro očuvane alveolarne i bronhijalne strukture s normalnom morfologijom stanica, što je potvrđeno histološkom analizom Crossman trikrom obojanih prereza. Histološka analiza prereza inkubiranih 3 i 5 dana *ex vivo* potvrdila je također da su plućne strukture i dalje bile dobro očuvane slično kao u svježe pripremljenim prerezima. Dobra očuvanost tkiva nakon inkubacije *ex vivo* potvrđena je u prerezima iz zdravih miševa kao i u onima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Dodatne biokemijske metode mjerenja vijabilnosti tkiva korištene su kako bi se nadopunile histološke analize i detaljnije okarakterizirali prerezi pluća tijekom inkubacije *ex vivo*. Osim toga, biokemijske metode mjerenja vijabilnosti tkiva tehnički su manje zahtjevne i brže izvedive nego histološke analize, što je potencijalno važan čimbenik u budućim istraživanjima. U ovom je istraživanju određena metabolička aktivnost prereza pluća mjerenjem sposobnosti redukcije reagensa Alamar Blue, dok je integritet i propusnost staničnih membrana određen mjerenjem aktivnosti enzima LDH u inkubacijskom mediju prereza pluća. Navedene metode spadaju u jedne od najčešće korištenih za opisivanje vijabilnosti stanica i tkiva, a međusobno se nadopunjuju s

obzirom na to da prate različite procese (metaboličku aktivnost i propusnost membrana). Prerezi pluća pripremljeni iz zdravih miševa zadržali su metaboličku aktivnost tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo*, sa sličnom redukcijom reagensa Alamar Blue nakon 1, 3, 5 i 7 dana inkubacije. Metabolička aktivnost prereza iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom također je bila dobro očuvana tijekom svih 7 dana inkubacije *ex vivo*, a blagi pad od otprilike 20 % u odnosu na 1. dan uočen je 3. i 7. dana inkubacije. Li i sur., 2020 također su potvrdili da prerezi pluća iz istog soja miševa koji je korišten u ovom istraživanju (C57BL/6N), zadržavaju metaboličku aktivnost tijekom dugotrajne inkubacije u uvjetima *ex vivo*, čak do 12 dana, uz pad metaboličke aktivnosti od 40 % u odnosu na prvi dan. Nadalje, rezultati mjerenja aktivnosti enzima LDH u ovom istraživanju nisu pokazali porast u propusnosti staničnih membrana tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo*, što je u skladu s rezultatima metaboličke aktivnosti i histološke analize ovih prereza pluća. Najveća aktivnost enzima LDH izmjerena je nakon svega jednog dana inkubacije, i kod prereza iz zdravih miševa kao i onih dobivenih od miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Moguće je da je povećana aktivnost LDH u 1. danu posljedica oštećenja stanica uslijed rezanja tkiva tijekom pripreme prereza, kao što su primijetili i Nußbaum i sur., 2022. Zaključno, sve provedene analize upućuju na dobro očuvanu vijabilnost prereza mišjih pluća tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo* jer nije uočen trend koji bi upućivao na značajan gubitak ukupne vijabilnosti u testiranom vremenu. Ovi rezultati su ključni jer omogućuju korištenje ovako pripremljenih prereza mišjih pluća u daljnjim pokusima istraživanja fibroznih procesa koji uključuju inkubacije u uvjetima *ex vivo* do 7 dana.

S obzirom na to da su metodom Crossman trikrom obojane i niti kolagena, moguće ju je koristiti i za praćenje fibroznih promjena u tkivu. Neposredno nakon pripreme, prerezi dobiveni od miševa s plućnom fibrozom izazvanom bleomicinom očekivano su imali povećane količine kolagena i zadebljane alveolarne stijenke, što je jasno vidljivo na slikama histoloških prereza te u usporedbi s prerezima pripremljenim iz zdravih miševa. Povećane količine kolagena uz infiltrirane imunosne stanice bile su organizirane u fibrozna žarišta, što je jedna od karakteristika samog modela fibroze izazvane bleomicinom *in vivo*, ali i jedna od glavnih patofizioloških karakteristika u IPF-u. Nadalje, navedene su fibrozne promjene bile prisutne i u prerezima koji su bili inkubirani u uvjetima *ex vivo* tijekom 3 i 5 dana. Isto je potvrđeno konfokalnom mikroskopijom imunofluorescencijskim obilježavanjem kolagena 1 i fibronektina. Nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, količina kolagena 1 i fibronektina bila je znatno veća u prerezima pripremljenim iz pluća miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u usporedbi s prerezima pripremljenim iz zdravih miševa. Ovi rezultati potvrđuju da i tijekom

inkubacije *ex vivo* prerezi pripremljeni iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom zadržavaju promijenjenu strukturu tkiva uz vidljivo nakupljanje kolagena 1 i fibronektina.

Nadalje je ispitana ekspresija više različitih biljega fibroze i remodeliranja tkiva, a kako bi se opisala postojanost fibroznih procesa u prerezima pluća. Ovo je istraživanje bilo usmjereno na ograničen set biljega fibroze, ali koji su bili izabrani na način da praćenje njihove ekspresije omogući pouzdane informacije o različitim procesima bitnim za fibrozu, a to su aktivacija miofibroblasta, proizvodnja sastavnica izvanstaničnog matriksa i čimbenika koji utječu na remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Za karakterizaciju prereza pluća kao modela fibroze nužno je razumjeti nastavljaju li se fibrozni procesi koji su započeli tijekom *in vivo* faze i u prerezima *ex vivo*, što je omogućeno analizom ekspresije gena. Praćena je ekspresija gena *COL1A1* i *FNI* koji kodiraju glavne sastavnice izvanstaničnog matriksa – kolagen i fibronektin, a za koje je poznato da su prekomjerno eksprimirani i nakupljaju se u plućima u mišjem modelu fibroze izazvane bleomicinom, kao i kod bolesnika s IPF-om (Della Latta i sur., 2015; Jenkins i sur., 2017; Tian i sur., 2019). Praćena je ekspresija gena *ACTA2*, koji kodira protein α SMA, glavni biljeg miofibroblasta odgovornih za prekomjernu proizvodnju sastavnica izvanstaničnog matriksa u fibrozi (King i sur., 2001). Nadalje, praćena je ekspresija gena *MMP12* (matriksna metaloproteinaza 12), *TIMP1* (inhibitor matriksnih metaloproteinaza 1) i *PAII* (inhibitor plazminogenorskog aktivatora 1) čiji se produkti smatraju ključnim biljezima remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Poremećena ravnoteža u ekspresiji ovih biljega dovodi do smanjene razgradnje prekomjerno sintetiziranih sastavnica izvanstaničnog matriksa. Na dan pripreme prereza pluća, ekspresija gotovo svih izmjerenih gena bila je povećana u prerezima iz miševa tretiranih bleomicinom u usporedbi s prerezima dobivenih iz zdravih miševa. Najveći porast ekspresije uočen je za gene *COL1A1* i *FNI*, zatim *MMP12*, *PAII* te naposljetku *TIMP1*. Jedino ekspresija gena *ACTA2* nije bila značajno povećana u prerezima iz miševa tretiranih bleomicinom, iako je i za ovaj gen uočen trend povećane ekspresije. Porast ekspresije gena *COL1A1*, *FNI*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAII* u prerezima pluća dobivenih iz miševa tretiranih bleomicinom u skladu je sa studijama koje su pokazale da je njihova ekspresija povećana u modelu plućne fibroze izazvane bleomicinom *in vivo* (Q. Wang i sur., 2023). Povećane ekspresije navedenih gena upućuju na prekomjernu proizvodnju sastavnica izvanstaničnog matriksa do 14 dana nakon administracije bleomicina kada su pluća uzeta za pripremu prereza. Aktivacija fibroblasta u miofibroblaste koji eksprimiraju α SMA jedan je od početnih događaja u razvoju plućne fibroze izazvane bleomicinom, a uglavnom započinje oko 7 dana nakon primjene bleomicina (Della Latta i sur., 2015; Jenkins i sur., 2017). Moguće je stoga, da je

uočeni trend porasta ekspresije gena *ACTA2*, ali bez statističke značajnosti, u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom posljedica prolaska vrhunca procesa diferencijacije u miofibroblaste koji bi trebao biti oko 10 dana nakon administracije bleomicina (Strunz i sur., 2020). Analizom ekspresije ovih biljega na dan pripreme prereza definiran je početni fibrozni profil prereza pluća, što je omogućilo daljnje praćenje njihove ekspresije tijekom inkubacije *ex vivo*. Ekspresija gena *COL1A1*, *FNI*, *MMP12* i *TIMP1* nakon 1, 3 i 5 dana inkubacije *ex vivo* ostala je povećana u prerezima dobivenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom u odnosu na prereze iz zdravih miševa, što je usporedivo s rezultatima dobivenima na dan pripreme prereza. Uočen je trend smanjenja relativne ekspresija gena *FNI*, *MMP12* i *TIMP1* tijekom inkubacije *ex vivo*, s obzirom na to da je nešto niža nakon 5 dana u odnosu na ranija vremena inkubacije. To je moguća indikacija da fibrozni procesi u prerezima pluća nakon 5 dana polako slabe. U prerezima pluća iz miševa tretiranih bleomicinom utvrđene su povećane količine kolagena 1 i fibronektina u izvanstaničnom matriksu nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Dodatne analize medija u kojem su prerezi pluća bili inkubirani tijekom 3 dana potvrđuju da je došlo do *de novo* sinteze proteina biljega fibroze. Koncentracija pro-kolagena 1 α 1, odnosno N- i C-terminalnih propeptida na novosintetiziranim, još neprocesiranim molekulama kolagena 1, je bila značajno povećana u prerezima pluća iz miševa tretiranih bleomicinom u usporedbi s prerezima iz zdravih miševa, jednako kao i koncentracija fibronektina. Isti su rezultati dobiveni za koncentracije MMP12 i TIMP1, što upućuje na aktivno remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Ovi rezultati skupno potvrđuju hipotezu da procesi fibroze ostaju aktivni tijekom barem 3 dana inkubacije prereza *ex vivo*.

Iz dobivenih rezultata, u daljnjim pokusima u ovom istraživanju korišteno je vrijeme od 3 dana inkubacije *ex vivo* kako bi se ispitao učinak spojeva s poznatim antifibroznim djelovanjem i na taj način istražio potencijal korištenja prereza pluća za testiranje novih spojeva. Ispitan je utjecaj nintedaniba, odobrenog lijeka za IPF, te spoja SB525334 koji je inhibitor receptora TGF β tipa I (ALK5). TGF β je jedan od ključnih profibroznih čimbenika, a inhibicija njegove aktivnosti kod IPF pacijenata već je pokazala uspješnost u kliničkim istraživanjima (Peng i sur., 2022; Shi i sur., 2022). Nintedanib je uspješno inhibirao ekspresiju gena *COL1A1*, *FNI* i *MMP12* u prerezima pluća iz miševa tretiranih bleomicinom nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*. Značajna inhibicijska aktivnost nintedaniba na ekspresiju navedenih gena izmjerena je u širokom rasponu koncentracija počevši od 10 μ M. Usporedive rezultate dobili su Lehmann i sur., 2018 koji su pokazali da je nintedanib u koncentracijama od 10 μ M i 1 μ M inhibirao ekspresiju gena *COL1A1* i *FNI* nakon 2 dana inkubacije s prerezima iz miševa

tretiranih bleomicinom. Inhibitor ALK5, spoj SB525334, također je smanjio ekspresiju većine gena čiji su proteinski produkti biljezi fibroze, odnosno gena *COL1A1*, *FNI*, *TIMP1*, pa čak i gena *ACTA2* za koji nije bilo statistički značajne razlike između kontrolnih prereza iz zdravih i miševa tretiranih bleomicinom. Uz navedeno, uočen je i trend inhibicije ekspresije gena *MMP12*. Izmjerena aktivnost inhibitora ALK5 na smanjenje biljega fibroze u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom upućuje na to da je signalni put TGFβ aktiviran u ovim prerezima te da sudjeluje u povećavanju mjerenih biljega fibroze, premda u ovom istraživanju nije mjerena količina TGFβ za potvrdu. Primijećeno je također da je relativna ekspresija gena *COL1A1*, *FNI* i *ACTA2* u prerezima tretiranim spojem SB525334 pri najvišoj koncentraciji od 5 μM bila ispod razine relativne ekspresije u prerezima iz zdravih miševa. Ovaj rezultat, zajedno sa samom činjenicom da SB525334 inhibira i ekspresiju gena *ACTA2* koja se nije razlikovala između zdravih i miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, može značiti da je u određenoj mjeri signalni put TGFβ bio bazalno aktiviran u svim prerezima, uključujući i onima iz zdravih miševa. Ova pretpostavka mogla bi se potvrditi u daljnjim istraživanjima testiranjem inhibitora ALK5 u prerezima iz zdravih miševa. Postoji mogućnost da je sama priprema prereza rezanjem tkiva dovela do određene razine aktivacije signalnog puta TGFβ.

Inhibicijski učinak nintedaniba i inhibitora ALK5 na genskoj razini, očitovao se i na proteinskoj razini, odnosno smanjenoj koncentraciji pro-kolagena 1α1, fibronektina, MMP12 i TIMP, što dodatno potvrđuje njihov antifibrozni utjecaj u prerezima pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Primijećeno je da rezultati mjerenja koncentracija navedenih proteina metodom ELISA imaju veće standardne devijacije nego rezultati mjerenja ekspresije gena. Razlog tome je vjerojatno manjak normalizacije izmjerenih koncentracija proteina u inkubacijskom mediju, što je bitno kod modela *ex vivo* jer se sastav stanica može razlikovati među pojedinim prerezima.

Rezultati testiranja spojeva u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom važni su jer potvrđuju da je moguće inhibirati fibrozne procese u prerezima pluća *ex vivo*, čime se otvara put njihovoj upotrebi u testiranju novih spojeva s potencijalno antifibroznim djelovanjem te predstavlja prvo takvo istraživanje. Ovaj model prereza pluća *ex vivo* za testiranje novih spojeva također ima potencijal nadopuniti *in vivo* pokuse na miševima kao relevantni model za probir spojeva prije testiranja u modelima *in vivo*, čime bi se moglo pridonijeti smanjenju ukupnog broja životinja potrebnih za istraživanje, u skladu s 3R načelima kojima je cilj zamijeniti, smanjiti i poboljšati upotrebu životinja u istraživanjima.

5.2 Prerezi mišjih pluća stimulirani s TGFβ

Cilj drugog dijela istraživanja bio je proučiti mogućnost aktivacije fibroznih procesa u prerezima mišjih pluća stimulacijom *ex vivo*, bez prvotnog izazivanja plućne fibroze *in vivo*. Karakterizacija prereza mišjih pluća stimuliranih *ex vivo* bitan je translacijski korak prema prerezima ljudskih pluća za koje je također korištena stimulacija fibroznih procesa *ex vivo*, a zbog ograničene dostupnosti i uznapredovane fibroze pluća bolesnika s IPF-om. Prerezi su pripremani iz pluća netretiranih, zdravih miševa, a za stimulaciju fibroze *ex vivo* korišten je TGFβ, jedan od ključnih profibroznih čimbenika u IPF-u (Derynck i Zhang, 2003; Fernandez i Eickelberg, 2012). TGFβ se često koristi za stimulaciju fibroznih promjena u *in vitro* modelima 2D staničnih kultura (Hostettler i sur., 2014; Lehtonen i sur., 2016), a Liu i sur., 2025 su razvili model prereza pluća *ex vivo* pripremljenih iz transgeničnih miševa koji pojačano eksprimiraju TGFβ.

U ovom istraživanju su nakon stimulacije prereza mišjih pluća s TGFβ praćeni isti biljezi fibroze kao u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Stimulacija *ex vivo* prereza mišjih pluća s TGFβ primijenjenim u koncentraciji 10 ng/mL povećala je ekspresiju gena *COL1A1*, *FNI* i *ACTA2* što potvrđuje proizvodnju sastavnica izvanstaničnog matriksa kao odgovor na egzogeni TGFβ. Vremenski profil ekspresije ovih biljega međusobno se razlikovao. Porast ekspresije gena *COL1A1* uočen je već nakon 1 dan stimulacije s TGFβ te se zadržala na usporedivoj razini tijekom 3 dana stimulacije. S druge strane, ekspresija gena *FNI* se povećavala s vremenom stimulacije, a ekspresija gena *ACTA2* je bila najviša nakon 2 dana stimulacije. S obzirom na to da je ekspresija svih navedenih biljega fibroze bila povećana 3 dana nakon stimulacije s TGFβ, ovo vrijeme inkubacije korišteno je nadalje za analizu koncentracije pro-kolagena 1α1 i fibronektina. Utvrđeno je da je njihova koncentracija također bila povećana u inkubacijskom mediju prereza stimuliranih s TGFβ. Povećanje ekspresije gena *TIMPI* i *PAI* nakon stimulacije prereza s TGFβ je bilo izmjereno samo u nekim pokusima što može upućivati da je remodeliranje izvanstaničnog matriksa kao odgovor na stimulaciju s TGFβ manje izraženo. Moguće je da procesi remodeliranja matriksa zahtijevaju duže vrijeme od 3 dana stimulacije s TGFβ.

Spoj SB525334, inhibitor receptora TGFβ tipa I (ALK5), u ovom modelu stimulacije prereza s TGFβ služio je kao kontrola, s obzirom na to da inhibira samu aktivaciju signalnog puta TGFβ. U skladu s time, prerezi tretirani spojem SB525334 imali su smanjenu ekspresiju gena čija ekspresija je bila stimulirana s TGFβ – *COL1A1*, *FNI* i *ACTA2*. SB525334 je dodatno smanjio ekspresiju *PAII* za koju nije utvrđena značajna razlika između prereza stimuliranih s

TGF β i nestimuliranih prereza. Uz to, ekspresija gena *COL1A1* i *FNI* u prerezima tretiranim spojem SB525334 bila je ispod razine ekspresije u nestimuliranim prerezima, što je već primijećeno i tijekom pokusa u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. To dodatno upućuje na zaključak da je signalni put TGF β aktivan i u bazalnim uvjetima u prerezima pluća.

Povećana ekspresija nekih od biljega fibroze, *COL1A1*, *FNI*, te manje izraženi porast uočen za gene *TIMP1* i *PAII*, u prerezima stimuliranim s TGF β u skladu je s rezultatima u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Ovi rezultati upućuju na zaključak da je stimulacija *ex vivo* samo jednim čimbenikom, TGF β , dovoljna da započnu neki od profibrozni procesa u prerezima pluća, nalik fibrozni procesima u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Izazivanje fibroze bleomicinom *in vivo* je kompleksniji sustav gdje se aktivira više profibrozni procesa i signalnih puteva, uključujući TGF β (Moeller i sur., 2008). S obzirom na pleiotropnu ulogu TGF β , može se pretpostaviti da stimulacija prereza *ex vivo* ovim čimbenikom također aktivira i druge signalne puteve uključene u profibrozne procese. U prilog tome govori činjenica da je nintedanib, čija su terapijska meta receptori za trombocitni faktor rasta, faktor rasta fibroblasta i vaskularno endotelni faktor rasta, inhibirao ekspresiju gena *COL1A1* i *FNI*, kao i koncentracije proteinskih produkata ovih gena, prokolagena 1 α 1 i fibronektina u prerezima stimuliranim s TGF β *ex vivo*.

Jedna od uočenih razlika između prereza mišjih pluća stimuliranih *ex vivo* s TGF β i prereza iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom bila je u ekspresiji gena *MMP12*. Dok je njegova ekspresija bila povišena u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, to nije uočeno nakon stimulacije prereza s TGF β . Kako su alveolarni makrofagi jedne od glavnih stanica koje proizvode elastazu MMP12 (Chuliá-Peris i sur., 2022), moguće je da povećana ekspresija u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom potječe od povećane količine infiltriranih makrofaga, što se odvija tijekom imunosnog odgovora na *in vivo* tretman bleomicinom (Moeller i sur., 2008).

Zaključno, stimulacija prereza mišjih pluća s TGF β tijekom 3 dana *ex vivo* potaknula je fibrozne promjene, praćene aktivacijom miofibroblasta i povećanom proizvodnjom sastavnica izvanstaničnog matriksa, slično prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. U slučaju stimulacije s TGF β tijekom 3 dana utvrđen je manje izražen odgovor na dodatne procese remodeliranja izvanstaničnog matriksa, praćene ekspresijom gena *MMP12*, *TIMP1* i *PAII*.

5.3 Prerezi ljudskih pluća stimulirani s TGFβ

Prerezi pripremljeni iz ljudskih pluća vrijedan su model *ex vivo* jer omogućuju istraživanje procesa fibroze kao i farmakološka ispitivanja izravno na ljudskom materijalu. Velik broj novih spojeva koji su pokazali antifibrozu aktivnost u pretkliničkim ispitivanjima na mišjim modelima nisu bili aktivni u kliničkim studijama na bolesnicima, što upućuje na potrebu za razvojem novih ljudskih modela bolesti *in vitro* i *ex vivo* (Sundarakrishnan i sur., 2018). Prerezi pluća mogu se pripremati iz tkiva pacijenata s IPF-om, što je opisano u literaturi i pokazalo se kao koristan model za identificiranje novih terapijskih meta (Belli i sur., 2023); Mercer i sur., 2016; Decaris i sur., 2021). Međutim, radi ograničene dostupnosti tkiva pluća bolesnika s IPF-om, kao i činjenice da se takvo tkivo dobiva uglavnom od bolesnika u odmaklom stadiju bolesti, pozornost se usmjerava na razvoj modela prereza zdravih (ne fibroznih) pluća u kojima se nastanak fibroznih promjena izaziva tretmanima *ex vivo*, kao što je već opisano u nekim studijama (Alsafadi i sur., 2017; Lehmann i sur., 2018). Cilj ovog dijela istraživanja bio je okarakterizirati fibrozne promjene u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ. U ovom istraživanju je stoga omogućena usporedba između prereza iz miševa s plućnom fibrozom izazvanom bleomicinom, prereza iz mišjih te iz ljudskih pluća stimuliranih s TGFβ, što je bitno za translaciju iz mišjih modela prema ljudskom modelu plućne fibroze *ex vivo* i prvo je takvo cjelokupno istraživanje.

Najprije je određena vijabilnost prereza ljudskih pluća tijekom inkubacije *ex vivo*, kao što je opisano i za mišje prereze. Histološka karakterizacija prereza ljudskih pluća na dan pripreme te tijekom 7 dana inkubacije *ex vivo* omogućila je praćenje vijabilnosti i morfoloških promjena stanica u tkivu prereza. Rezultati histološke karakterizacije prereza iz više donora pluća potvrdili su dobro očuvanu morfologiju bronhijalnog i alveolarnog epitela do otprilike 4 i 5 dana inkubacije *ex vivo*, nakon čega su se počele pojavljivati morfološke promjene stanica, kao što su vakuolarna degeneracija i displazija staničnih jezgri. Uz to je zamijećena i proliferacija stanica, što je mogući odgovor na nastale promjene. Fluorescencijska karakterizacija vijabilnosti živih stanica kalceinom te mrtvih stanica etidij homodimerom u prerezima ljudskih pluća bila je u skladu s histološkom karakterizacijom. Na dan pripreme prereza te do otprilike 5 dana inkubacije *ex vivo*, u prerezima je detektiran velik broj živih stanica uz prisutnost manjeg broja mrtvih stanica. Nakon 7 dana inkubacije *ex vivo* i dalje je bio vidljiv velik broj živih stanica, no uz povećan broj mrtvih stanica grupiranih u određenim područjima intersticija.

Metabolička aktivnost prereza ljudskih pluća praćena je metodom redukcije reagensa Alamar Blue, koja je pokazala blagi porast metaboličke aktivnosti kroz 7 dana inkubacije *ex vivo*, što može biti rezultat proliferacije stanica primijećene tijekom histološke karakterizacije. Vijabilnost prereza određena je i mjerenjem propusnosti staničnih membrana metodom mjerenja aktivnosti LDH u inkubacijskom mediju prereza. Otpuštanje LDH u inkubacijski medij bilo je povećano počevši od otprilike 4 i . dana pa sve do 7 dana inkubacije *ex vivo*, kada je bilo zadnje mjereno vrijeme. Ovi rezultati zajedno s histološkom karakterizacijom i fluorescencijskim obilježavanjem stanica potvrđuju da je vijabilnost prereza ljudskih pluća dobro očuvana tijekom otprilike 4 do 5 dana inkubacije *ex vivo* i nalikuje svježim pripremljenim prerezima, što je kod prereza mišjih pluća bilo dovoljno vremena za stimulaciju fibroznih promjena. Proliferacija stanica i porast metaboličke aktivnosti istovremeno s povećanim otpuštanjem LDH u inkubacijski medij može značiti da se gubitak dijela oštećenih stanica pokušava nadomjestiti proliferacijom neoštećenih stanica, no to bi trebalo provjeriti dodatnim istraživanjima. Druge studije potvrdile su također dobro očuvanu vijabilnost prereza ljudskih pluća (metodama kao što su bojanje hematoksilin-eozinom i histološkom analizom, bojanjem živih i mrtvih stanica, mjerenjem metaboličke aktivnosti metodom MTS) tijekom 5 ili 7 dana inkubacije *ex vivo* u kojem vremenu su rađena ispitivanja (Roach i sur., 2018; Uhl i sur., 2015), dok su dugotrajne inkubacije prereza ljudskih pluća provedene čak do 14 i 28 dana *ex vivo* s i dalje očuvanom vijabilnosti prereza (Preuß i sur., 2022; Temann i sur., 2017). Međutim, bitno je naglasiti da postoje razlike u uvjetima inkubacije *ex vivo* među studijama, primjerice u hranjivom mediju korištenom za inkubaciju, kao i veličini i debljini pripremljenih prereza.

Nadalje je ispitana mogućnost stimulacije fibroznih promjena u prerezima ljudskih pluća, koristeći vrijeme inkubacije *ex vivo* do 5 dana s obzirom na to da je u tom vremenu vijabilnost bila dobro očuvana. Kao i u prerezima mišjih pluća, TGFβ korišten je za stimulaciju prereza ljudskih pluća, a mjerena je ekspresija različitih gena povezanih s fibrozom, *COL1A1*, *FNI*, *ACTA2*, *MMP12*, *TIMP1* i *PAIL*. Ekspresija većine mjerenih gena, *COL1A1*, *FNI*, *ACTA2*, *TIMP1* i *PAIL*, bila je značajno povećana ili je pokazala trend povećanja nakon 3 i 5 dana stimulacije s TGFβ koncentracije 10 ng/mL, što je potvrđeno u prerezima pripremljenim iz dva donora tkiva pluća. U ranijim vremenima, odnosno 1 i 2 dana stimulacije s TGFβ uglavnom još nije došlo do porasta ekspresije mjerenih gena. Stoga je ispitan produljeni učinak više različitih koncentracija TGFβ na ekspresiju odabranih gena, odnosno uzorci su stimulirani *ex vivo* 3 i 5 dana, a kako bi se odredila optimalna koncentracija TGFβ za stimulaciju. Stimulacija s TGFβ u koncentracijama 20 ng/mL, 10 ng/mL i 5 ng/mL značajno je povećala ekspresiju gena

COL1A1, *FNI* i *PAIL* dok je ekspresija gena *ACTA2* i *TIMP1* bila statistički značajno povećana samo s 20 ng/mL TGFβ. Ipak, važno je napomenuti da je trend povećanja ekspresije ovih gena bio uočen i pri nižim koncentracijama TGFβ, ali promjene nisu bile statistički značajne. Aktivacija ekspresije biljega fibroze s TGFβ potvrđena je i na proteinskoj razini, odnosno utvrđeno je povećanje koncentracija pro-kolagena 1α1 i fibronektina nakon stimulacije s TGFβ u koncentracijama od 20 ng/mL i 10 ng/mL. S obzirom na to da je ekspresija većine mjerenih biljega bila usporediva kada je TGFβ je bio primijenjen u koncentracijama od 20 ng/mL i 10 ng/mL koncentracije TGFβ korištene za stimulaciju u daljnjim pokusima stimulacije i testiranja antifibroznih spojeva izabrana je niža koncentracija od 10 ng/mL. Ovi rezultati skupno potvrđuju da je stimulacija s TGFβ aktivirala profibrozne procese u prerezima ljudskih pluća već nakon 3 dana inkubacije, i to prvenstveno aktivaciju miofibroblasta te proizvodnju sastavnica i remodeliranje izvanstaničnog matriksa. Reproducibilnost odgovora na stimulaciju s TGFβ potvrđena je u prerezima iz više donora tkiva. Poznato je da TGFβ kao jedan od glavnih profibroznih čimbenika utječe na navedene procese, a rezultati ovog istraživanja u skladu su sa sličnim istraživanjima u kojima je korištena stimulacija prereza ljudskih pluća s TGFβ (Machahua i sur., 2025; Roach i sur., 2021).

Kao i u prethodnim pokusima na prerezima mišjih pluća, tretman nintedanibom korišten je kako bi se ispitala mogućnost inhibicije fibroznih promjena u prerezima pluća relevantnim, klinički odobrenim lijekom, dok je spoj SB525334 koji je inhibitor receptora TGFβ tipa I (ALK5) korišten kao kontrola za inhibiciju same aktivacije signalnog puta TGFβ. Tretman inhibitorom ALK5 očekivano je inhibirao stimulaciju s TGFβ s obzirom na to da je ekspresija svih mjerenih biljega, na genskoj razini (*COL1A1*, *FNI*, *ACTA2*, *TIMP1*, *PAI*) kao i na proteinskoj razini (koncentracija pro-kolagena 1α1 i fibronektina) bila inhibirana. Tretman nintedanibom u nekim je od testiranih koncentracija smanjio ekspresiju svih mjerenih biljega fibroze koji su bili povećani kao odgovor na stimulaciju s TGFβ, odnosno inhibirao je ekspresiju gena *COL1A1*, *FNI*, *ACTA2*, *TIMP1* i *PAIL*. Ovi rezultati aktivnosti nintedaniba u uvjetima stimulacije TGFβ su usporedivi s rezultatima dobivenim u prerezima mišjih pluća stimuliranih na isti način. S obzirom na to da nintedanib nije izravni inhibitor signalnog puta TGFβ, ovi rezultati dodatno potvrđuju da je stimulacija samo jednim čimbenikom, TGFβ, u ovako kompleksnom sustavu koji sadrži različite tipova stanica, dovoljna da se pokrene kaskada aktivacije i drugih signalnih puteva. Osim toga, ovi su rezultati važni jer pokazuju da je moguće koristiti prereze mišjih i ljudskih pluća stimulirane s TGFβ za testiranje učinka spojeva s

različitim terapijskim metama, a kako bi se procijenilo njihovo potencijalno antifibrozno djelovanje.

Stimulacija s TGF β smanjila je ekspresiju gena *MMP12* u svim pokusima. Specifičnost ovog efekta dodatno je potvrđena tretmanom inhibitorom ALK5 koji je inhibirao smanjenje ekspresije gena *MMP12* tijekom stimulacije s TGF β ljudskih prereza pluća. MMP12 razgrađuje kolagen IV i elastin te sudjeluje u pojačavanju upalnog odgovora i privlačenju neutrofila (Néan i sur., 2005), a u IPF-u je njegova aktivnost deregulirana te stoga pridonosi dodatnim oštećenjima bazalne membrane i alveolarnog epitela (Pardo i Selman, 2006). Aktivacija signalnog puta TGF β inhibira proupalni fenotip alveolarnih makrofaga koji je karakteriziran ekspresijom proteina MMP12, a što onda posljedično dovodi do smanjenja njegove ekspresije (Feinberg i sur., 2000).

Rezultati mjerenja ekspresije gena *MMP12* u prerezima mišjih i ljudskih pluća stimuliranim s TGF β u suprotnosti su od rezultata ekspresije u prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom gdje je ekspresija gena *MMP12* bila povećana. Ovi rezultati upućuju na važnu razliku između ovih modela, a to je uloga upalne faze u razvoju plućne fibroze izazvane bleomicinom. Naime, aktivacija upalnog odgovora i infiltracija imunskih stanica su prvi stadij u razvoju plućne fibroze izazvane bleomicinom, s vrhuncem oko 7 dana nakon primjene bleomicina (Moeller i sur., 2008). Ekspresija MMP12 je povećana u početnoj fazi razvoja fibroze u ovom mišjem modelu *in vivo* (Swaigood i sur., 2000). S obzirom na to da je u ovom istraživanju ekspresija gena *MMP12* bila povećana u prerezima pripremljenim 14 dana nakon administracije bleomicina *in vivo*, za pretpostaviti je da je dio upalnog odgovora i dalje bio prisutan i u prerezima *ex vivo*. Mjerenje koncentracije nekih od upalnih biljega, kao što su TNF α i IL-6, u postojećim uzorcima bi bilo korisno kako bi se provjerila prisutnosti upalne komponente. Za razliku od plućne fibroze izazvane bleomicinom, stimulacija s TGF β može odmah pokrenuti proces fibroznog remodeliranja (Roach i sur., 2018).

Prerezi mišjih i ljudskih pluća općenito govoreći jesu pokazali usporediv odgovor na stimulaciju s TGF β , sa značajno povećanom ekspresijom sastavnica izvanstaničnog matriksa, kolagena i fibronektina na genskoj i proteinskoj razini. U prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGF β bila je povećana i ekspresija gena koji kodira α -SMA, biljeg aktiviranih miofibroblasta, te gena koji kodiraju za biljege remodeliranja izvanstaničnog matriksa, inhibitor matriksnih metaloproteinaza 1 (*TIMP1*) i inhibitor plazminogenog aktivatora 1 (*PAI1*). Istovremeno, u mišjim su prerezima ove promjene bile uočene samo u nekim pokusima, upućujući na to da su ovi procesi izraženiji u prerezima ljudskih pluća. U prerezima pluća iz miševa s fibrozom

izazvanom bleomicinom ekspresija sastavnica izvanstaničnog matriksa, kolagena, fibronektina i inhibitor matriksnih metaloproteinaza 1 na genskoj razini (*COL1A1*, *FNI* i *TIMPI*), je također bila povećana što potvrđuje da je glavno obilježje fibroze – prekomjerno nakupljanje i proizvodnja izvanstaničnog matriksa, bio prisutan u sva tri ispitivana modela prereza pluća. Ovi rezultati stimulacije mišjih i ljudskih prereza s TGFβ skupno pokazuju da je u prerezima pluća moguće izazvati fibrozne procese tretmanom samo jednim čimbenikom, u potpunosti u uvjetima *ex vivo*, s obzirom na to da su usporedivi s rezultatima fibroznog remodeliranja opaženim u prerezima pripremljenim iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom. Aktivnost nintedaniba upućuje na to da su u mišjim i ljudskim prerezima stimuliranim s TGFβ uz ovaj, posljedično aktivirani i drugi signalni putevi. Antifibrozni učinak nintedaniba kao odobrenog lijeka za IPF potvrđen je u sva tri modela prereza pluća, što sugerira da se ovi modeli mogu koristiti u prekliničkim ispitivanjima novih lijekova. Prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom potencijalno bi se mogli koristiti za probir spojeva s antifibroznim učinkom prije testiranja u modelu *in vivo*, što može smanjiti potreban broj životinja u skladu s 3R načelima. Nadalje, usporedba antifibroznog učinka spojeva u prerezima ljudskih pluća stimuliranim s TGFβ može pridonijeti boljoj translaciji iz prekliničkih u klinička ispitivanja. Jedna od glavnih razlika između ovih modela prereza jest u upalnoj komponenti koja ima ulogu u razvoju fibroze izazvane bleomicinom u modelu *in vivo* te je potencijalno i dalje u određenoj mjeri prisutna i u prerezima pluća iz ovog modela. U daljnjim bi se istraživanjima, u uspostavljenim modelima prereza pluća, mogao usporediti antifibrozni učinak većeg broja spojeva, prvenstveno drugih odobrenih lijekova za IPF, pirfenidona i nerandomilasta.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Inkubacija prereza mišjih i ljudskih pluća tijekom 5 dana inkubacije *ex vivo*, ne utječe na vijabilnost, s obzirom na očuvane plućne strukture i normalnu morfologiju većine stanica te očuvanu metaboličku aktivnost
- 2) Prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom zadržavaju fibrozne promjene modela *in vivo* iz kojeg su pripremljeni, uz povećanu ekspresiju gena *COL1A1*, *FNI*, *MMP12* i *TIMP1*, kao i *de novo* sintezu proteinskih produkata ovih gena tijekom 3 dana inkubacije *ex vivo*
- 3) Prerezi pluća iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom su vrijedan model za ispitivanje antifibroznog učinka novih spojeva i probir prije testiranja u modelu *in vivo* s ciljem smanjenja broja životinja potrebnog u pretkliničkim istraživanjima, što je potvrđeno inhibitornim učinkom nintedaniba i inhibitora ALK5 na biljege fibroze
- 4) U prerezima mišjih i ljudskih pluća, tretmanom TGFβ moguće je izazvati međusobno usporedive fibrozne promjene već nakon 3 dana inkubacije *ex vivo*, uz povećanu proizvodnju i remodeliranje izvanstaničnog matriksa
- 5) Fibrozne promjene i aktivnost nintedaniba u mišjim i ljudskim prerezima pluća stimuliranim s TGFβ *ex vivo* usporedivi su s prerezima iz miševa s fibrozom izazvanom bleomicinom, pa se stoga mogu koristiti kao model za određivanje antifibroznog učinka spojeva
- 6) Sva tri uspostavljena modela prereza pluća mogu se koristiti za usporedbu učinka antifibroznih spojeva, što omogućuje bolju translaciju rezultata iz pretkliničkih u klinička ispitivanja

7. POPIS LITERATURE

- Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R., i Metz, C. N. (2001). Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(12), 7556–7562. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.12.7556>
- Agostini, C., i Gurrieri, C. (2006). Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 357–363. <https://doi.org/10.1513/pats.200601-010TK>
- Alder, J. K., Barkauskas, C. E., Limjunyawong, N., Stanley, S. E., Kembou, F., Tuder, R. M., Hogan, B. L. M., Mitzner, W., i Armanios, M. (2015). Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(16), 5099–5104. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1504780112/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Allawzi, A., Elajaili, H., Redente, E. F., i Nozik-Grayck, E. (2018). Oxidative Toxicology of Bleomycin: Role of the Extracellular Redox Environment. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 68. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2018.08.001>
- Almuntashiri, S., Alhumaid, A., Zhu, Y., Han, Y., Dutta, S., Khilji, O., Zhang, D., i Wang, X. (2023). TIMP-1 and its potential diagnostic and prognostic value in pulmonary diseases. *Chinese Medical Journal Pulmonary and Critical Care Medicine*, 1(2), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.pccm.2023.05.002>
- Alsafadi, H. N., Staab-Weijnitz, C. A., Lehmann, M., Lindner, M., Peschel, B., Königshoff, M., i Wagner, D. E. (2017). An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(6), L896–L902. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2017>
- Andersson-Sjöland, A., de Alba, C. G., Nihlberg, K., Becerril, C., Ramírez, R., Pardo, A., Westergren-Thorsson, G., i Selman, M. (2008). Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(10), 2129–2140. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.02.012>
- Annes, J. P., Munger, J. S., i Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 2), 217–224. <https://doi.org/10.1242/jcs.00229>
- Anzulović Šanta, Ognjenović, A., Antolić, M., Čužić, S., Glojnarić, I., Hrvačić, B., i Božić, F.

- (2023). Retrospective assessment of nintedanib in the mice model of pulmonary fibrosis: alignment with patient outcomes in idiopathic pulmonary fibrosis. *Veterinarska Stanica*, 54(4), 395–406. <https://doi.org/10.46419/vs.54.4.4>
- Asmani, M., Velumani, S., Li, Y., Wawrzyniak, N., Hsia, I., Chen, Z., Hinz, B., i Zhao, R. (2018). Fibrotic microtissue array to predict anti-fibrosis drug efficacy. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 2066-. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04336-z>
- Aumiller, V., Balsara, N., Wilhelm, J., Günther, A., i Königshoff, M. (2013). WNT/ β -Catenin Signaling Induces IL-1 β Expression by Alveolar Epithelial Cells in Pulmonary Fibrosis. *Https://Doi.Org/10.1165/Rcmb.2012-0524OC*, 49(1), 96–104. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2012-0524OC>
- Azevedo, M. F., Faucz, F. R., Bimpaki, E., Horvath, A., Levy, I., De Alexandre, R. B., Ahmad, F., Manganiello, V., i Stratakis, C. A. (2014). Clinical and Molecular Genetics of the Phosphodiesterases (PDEs). *Endocrine Reviews*. 35(2). <https://doi.org/10.1210/er.2013-1053>
- Baarsma, H. A., i Königshoff, M. (2017). “WNT-er is coming”: WNT signalling in chronic lung diseases. In *Thorax* (Vol. 72, Issue 8, pp. 746–759). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209753>
- Bargagli, E., Piccioli, C., Rosi, E., Torricelli, E., Turi, L., Piccioli, E., Pistolesi, M., Ferrari, K., i Voltolini, L. (2019). Pirfenidone and Nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis: Real-life experience in an Italian referral centre. *Pulmonology*, 25(3), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2018.06.003>
- Barkauskas, C. E., Crouce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., Randell, S. H., Noble, P. W., i Hogan, B. L. M. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 3025–3036. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
- Belli, C., Repetto, M., Anand, S., Porta, C., Subbiah, V., i Curigliano, G. (2023). The emerging role of PI3K inhibitors for solid tumour treatment and beyond. *British Journal of Cancer* 2023 128:12, 128(12), 2150–2162. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02221-1>
- Bertolotto, M., de Toter, D., Giannoni, P., Barisione, E., Grosso, M., Nano, E., Fiocca, R., Pigozzi, S., Tedone, E., Valle, L., Moriero, M., Verzola, D., Montecucco, F., i Carbone, F. (2026). Fibroblast-driven MMP-9/TIMP-1 imbalance in bronchoalveolar lavage reflects

- fibrotic progression in interstitial lung disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 56(1). <https://doi.org/10.1111/eci.70162>
- Betensley, A., Sharif, R., i Karamichos, D. (2016). A Systematic Review of the Role of Dysfunctional Wound Healing in the Pathogenesis and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Clinical Medicine* 2017, Vol. 6, Page 2, 6(1), 2. <https://doi.org/10.3390/JCM6010002>
- Bonner, J. C. (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(4), 255–273. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.006>
- Booth, A. J., Hadley, R., Cornett, A. M., Dreffs, A. A., Matthes, S. A., Tsui, J. L., Weiss, K., Horowitz, J. C., Fiore, V. F., Barker, T. H., Moore, B. B., Martinez, F. J., Niklason, L. E., i White, E. S. (2012). Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(9), 866–876. <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0754OC>
- Bourke, J. E., Bai, Y., Donovan, C., Esposito, J. G., Tan, X., i Sanderson, M. J. (2014). Novel Small Airway Bronchodilator Responses to Rosiglitazone in Mouse Lung Slices. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(4), 748–756. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0247OC>
- Brann, K. R., Fullerton, M. S., Onyilagha, F. I., Prince, A. A., Kurten, R. C., Rom, J. S., Blevins, J. S., Smeltzer, M. S., i Voth, D. E. (2019). Infection of Primary Human Alveolar Macrophages Alters Staphylococcus aureus Toxin Production and Activity. *Infection and Immunity*, 87(7), e00167-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00167-19>
- Cai, Y., Zhu, L., Zhang, F., Niu, G., Lee, S., Kimura, S., i Chen, X. (2013). Noninvasive Monitoring of Pulmonary Fibrosis by Targeting Matrix Metalloproteinases (MMPs). *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2237–2247. <https://doi.org/10.1021/MP300613X>
- Castelino, F. V., i Varga, J. (2010). Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management. *Arthritis Research i Therapy*, 12(4). <https://doi.org/10.1186/AR3097>
- Chambers, R. C., i Mercer, P. F. (2015). Mechanisms of alveolar epithelial injury, repair, and fibrosis. *Annals of the American Thoracic Society*, 12, S16–S20. <https://doi.org/10.1513/ANNALSATS.201410-448MG>

- Chen, L., Brenner, D. A., i Kisseleva, T. (2018). Combatting Fibrosis: Exosome-Based Therapies in the Regression of Liver Fibrosis. *Hepatology Communications*, 3(2), 180–192. <https://doi.org/10.1002/HEP4.1290>
- Chow, Y. H., López-Martínez, C., Liles, W. C., Altemeier, W. A., Gharib, S. A., i Hung, C. F. (2023). Toll-interacting protein inhibits transforming growth factor beta signaling in mouse lung fibroblasts. *FASEB BioAdvances*, 6(1), 12. <https://doi.org/10.1096/FBA.2023-00054>
- Chuliá-Peris, L., Carreres-Rey, C., Gabasa, M., Alcaraz, J., Carretero, J., i Pereda, J. (2022). Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Pulmonary Fibrosis: EMMPRIN/CD147 Comes into Play. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/ijms23136894>
- Chun Geun Lee, Homer, R. J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliensky, V., Shipley, J. M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R. M., i Elias, J. A. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *The Journal of Experimental Medicine*, 194(6), 809–821. <https://doi.org/10.1084/JEM.194.6.809>
- Clynick, B., Corte, T. J., Jo, H. E., Stewart, I., Glaspole, I. N., Grainge, C., Maher, T. M., Navaratnam, V., Hubbard, R., Hopkins, P. M. A., Reynolds, P. N., Chapman, S., Zappala, C., Keir, G. J., Cooper, W. A., Mahar, A. M., Ellis, S., Goh, N. S., Jong, E. De, ... Moodley, Y. (2022). Biomarker signatures for progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 59(3), 25. <https://doi.org/10.1183/13993003.01181-2021>
- Confalonieri, P., Volpe, M. C., Jacob, J., Maiocchi, S., Salton, F., Ruaro, B., Confalonieri, M., i Braga, L. (2022). Regeneration or Repair? The Role of Alveolar Epithelial Cells in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *Cells*, 11(13). <https://doi.org/10.3390/cells11132095>
- Corbel, M., Belleguic, C., Boichot, E., i Lagente, V. (2002). Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. *Cell Biology and Toxicology*, 18(1), 51–61. <https://doi.org/10.1023/A:1014471213371>
- Cramer, N., Nawrot, M. L., Wege, L., Dorda, M., Sommer, C., Danov, O., Wronski, S., Braun, A., Jonigk, D., Fischer, S., Munder, A., i Tümmeler, B. (2022). Competitive fitness of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in human and murine precision-cut lung slices. *Frontiers*

- in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 992214.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.992214>
- Crosby, L. M., i Waters, C. M. (2010). Epithelial repair mechanisms in the lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298(6), L715.
<https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00361.2009>
- Decaris, M. L., Schaub, J. R., Chen, C., Cha, J., Lee, G. G., Rexhepaj, M., Ho, S. S., Rao, V., Marlow, M. M., Kotak, P., Budi, E. H., Hooi, L., Wu, J., Fridlib, M., Martin, S. P., Huang, S., Chen, M., Muñoz, M., Hom, T. F., ... Turner, S. M. (2021). Dual inhibition of $\alpha\text{v}\beta 6$ and $\alpha\text{v}\beta 1$ reduces fibrogenesis in lung tissue explants from patients with IPF. *Respiratory Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12931-021-01863-0>
- Della Latta, V., Cecchetti, A., Del Ry, S., i Morales, M. A. (2015). Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological Research*, 97, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.04.012>
- Delmotte, P., Ressmeyer, A. R., Bai, Y., i Sanderson, M. J. (2010). Mechanisms of airway smooth muscle relaxation induced by beta2-adrenergic agonists. *Frontiers in Bioscience*, 15(2), 750–764. <https://doi.org/10.2741/3644>
- Deng, Y., Chan, S. S., i Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nature Reviews. Cancer*, 8(6), 450–458.
<https://doi.org/10.1038/NRC2393>
- DePianto, D. J., Chandriani, S., Abbas, A. R., Jia, G., N'Diaye, E. N., Caplazi, P., Kauder, S. E., Biswas, S., Karnik, S. K., Ha, C., Modrusan, Z., Matthay, M. A., Kukreja, J., Collard, H. R., Egen, J. G., Wolters, P. J., i Arron, J. R. (2015). Heterogeneous gene expression signatures correspond to distinct lung pathologies and biomarkers of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 70(1), 48–56. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-204596>
- Derynck, R., i Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958), 577–584. <https://doi.org/10.1038/nature02006>
- Donovan, C., Bailey, S. R., Tran, J., Haitsma, G., Ibrahim, Z. A., Foster, S. R., Tang, M. L. K., Royce, S. G., i Bourke, J. E. (2015). Rosiglitazone elicits in vitro relaxation in airways and precision cut lung slices from a mouse model of chronic allergic airways disease. *Http://Doi.Org/10.1152/Ajplung.00156.2015*, 309(10), L1219–L1228.

<https://doi.org/10.1152/ajplung.00156.2015>

- Donovan, C., Seow, H. J., Bourke, J. E., i Vlahos, R. (2016). Influenza A virus infection and cigarette smoke impair bronchodilator responsiveness to β -adrenoceptor agonists in mouse lung. *Clinical Science*, 130(10), 829–837. <https://doi.org/10.1042/CS20160093>
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., i Miyazono, K. (2001). Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- β Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12477–12480. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100008200>
- Fattman, C. L., Gambelli, F., Hoyle, G., Pitt, B. R., i Ortiz, L. A. (2008). Epithelial expression of TIMP-1 does not alter sensitivity to bleomycin-induced lung injury in C57BL/6 mice. *https://doi.org/10.1152/Ajplung.00291.2007*, 294(3). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00291.2007>
- Feinberg, M. W., Jain, M. K., Werner, F., Sibinga, N. E. S., Wiesel, P., Wang, H., Topper, J. N., Perrella, M. A., i Lee, M. E. (2000). Transforming growth factor- β 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25766–25773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002664200>
- Fernandez, I. E., i Eickelberg, O. (2012). The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 111–116. <https://doi.org/10.1513/PATS.201203-023AW>
- Fingerlin, T. E., Murphy, E., Zhang, W., Peljto, A. L., Brown, K. K., Steele, M. P., Loyd, J. E., Cosgrove, G. P., Lynch, D., Groshong, S., Collard, H. R., Wolters, P. J., Bradford, W. Z., Kossen, K., Seiwert, S. D., Du Bois, R. M., Garcia, C. K., Devine, M. S., Gudmundsson, G., ... Schwartz, D. A. (2013). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nature Genetics*, 45(6), 613. <https://doi.org/10.1038/NG.2609>
- G, R., KJ, A., TE, K., JA, L., i FJ, M. (2012). Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 366(21), 1968–1977. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1113354>
- Gandhi, S., Tonelli, R., Murray, M., Samarelli, A. V., i Spagnolo, P. (2023). Environmental Causes of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16481. <https://doi.org/10.3390/IJMS242216481>

- Ganzleben, I., i Medoff, B. D. (2025). Mechanobiology and the extracellular matrix in pulmonary fibrosis. *IScience*, 28(12), 113993. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.113993>
- Golchin, N., Patel, A., Scheuring, J., Wan, V., Hofer, K., Collet, J. P., Elpers, B., i Lesperance, T. (2025). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic literature review and meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine* 2025 25:1, 25(1), 378-. <https://doi.org/10.1186/S12890-025-03836-1>
- Grotendorst, G. R., i Duncan, M. R. (2005). Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(7), 729–738. <https://doi.org/10.1096/FJ.04-3217COM>
- Guo, J., Yang, Z., Jia, Q., Bo, C., Shao, H., i Zhang, Z. (2019). Pirfenidone inhibits epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis in the rat silicosis model. *Toxicology Letters*, 300, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.019>
- Gurujeyalakshmi, G., Hollinger, M. A., i Giri, S. N. (1999). Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. *The American Journal of Physiology*, 276(2). <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.2.1311>
- Hagimoto, N., Kuwano, K., Inoshima, I., Yoshimi, M., Nakamura, N., Fujita, M., Maeyama, T., i Hara, N. (2002). TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(12), 6470–6478. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.12.6470>
- Han, S. H., i Mallampalli, R. K. (2015). The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Https://Doi.Org/10.1513/AnnalsATS.201411-507FR*, 12(5), 765–774. <https://doi.org/10.1513/ANNALSATS.201411-507FR>
- Hatzelmann, A., Morcillo, E. J., Lungarella, G., Adnot, S., Sanjar, S., Beume, R., Schudt, C., i Tenor, H. (2010). The preclinical pharmacology of roflumilast – A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 23(4), 235–256. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2010.03.011>
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Wrana, J. L., i Falb, D. (1997). The MAD-Related Protein Smad7 Associates with the TGFβ Receptor and Functions as an Antagonist of TGFβ

- Signaling. *Cell*, 89(7), 1165–1173. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80303-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80303-7)
- Herrmann, F. E., Hesslinger, C., Wollin, L., i Nickolaus, P. (2022). BI 1015550 is a PDE4B Inhibitor and a Clinical Drug Candidate for the Oral Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 838449. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.838449>
- Hetzel, M., Bachem, M., Anders, D., Trischler, G., i Faehling, M. (2005). Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*, 183(4), 225–237. <https://doi.org/10.1007/s00408-004-2534-z>
- Heukels, P., Moor, C. C., von der Thüsen, J. H., Wijsenbeek, M. S., i Kool, M. (2019). Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respiratory Medicine*, 147, 79–91. <https://doi.org/10.1016/J.RMED.2018.12.015>
- Hilberg, F., Roth, G. J., Krssak, M., Kautschitsch, S., Sommergruber, W., Tontsch-Grunt, U., Garin-Chesa, P., Bader, G., Zoephel, A., Quant, J., Heckel, A., i Rettig, W. J. (2008). BIBF 1120: triple angiokine inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Research*, 68(12), 4774–4782. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6307>
- Hisatomi, K., Mukae, H., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Kakugawa, T., Hara, S., Fujita, H., Nakamichi, S., Oku, H., Urata, Y., Kubota, H., Nagata, K., i Kohno, S. (2012). Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulmonary Medicine*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-12-24>
- Hong, K. M., Belperio, J. A., Keane, M. P., Burdick, M. D., i Strieter, R. M. (2007). Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor- β and peroxisome proliferator-activated receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22910–22920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703597200>
- Horan, G. S., Wood, S., Ona, V., Dan, J. L., Lukashev, M. E., Weinreb, P. H., Simon, K. J., Hahm, K., Allaire, N. E., Rinaldi, N. J., Goyal, J., Feghali-Bostwick, C. A., Matteson, E. L., O'Hara, C., Lafyatis, R., Davis, G. S., Huang, X., Sheppard, D., i Violette, S. M. (2008). Partial inhibition of integrin α (v) β 6 prevents pulmonary fibrosis without exacerbating inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(1), 56–65. <https://doi.org/10.1164/RCCM.200706-805OC>
- Hostettler, K. E., Zhong, J., Papakonstantinou, E., Karakiulakis, G., Tamm, M., Seidel, P., Sun,

- Q., Mandal, J., Lardinois, D., Lambers, C., i Roth, M. (2014). Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0157-3>
- Hu, L., Lin, X., Lu, H., Chen, B., i Bai, Y. (2015). An Overview of Hedgehog Signaling in Fibrosis. *MOLECULAR PHARMACOLOGY Mol Pharmacol*, 87, 174–182. <https://doi.org/10.1124/mol.114.095141>
- Huang, W. T., Akhter, H., Jiang, C., MacEwen, M., Ding, Q., Antony, V., Thannickal, V. J., i Liu, R. M. (2014). Plasminogen activator inhibitor 1, fibroblast apoptosis resistance, and aging-related susceptibility to lung fibrosis. *Experimental Gerontology*, 61, 62. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.11.018>
- Hung, C. F. (2020). Origin of Myofibroblasts in Lung Fibrosis. *Current Tissue Microenvironment Reports 2020 1:4*, 1(4), 155–162. <https://doi.org/10.1007/S43152-020-00022-9>
- Hung, C., Linn, G., Chow, Y. H., Kobayashi, A., Mittelsteadt, K., Altemeier, W. A., Gharib, S. A., Schnapp, L. M., i Duffield, J. S. (2013). Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(7), 820–830. <https://doi.org/10.1164/RCCM.201212-2297OC>
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
- Ingram, J. L., Rice, A. B., Geisenhoffer, K., Madtes, D. K., i Bonner, J. C. (2004). IL-13 and IL-1beta promote lung fibroblast growth through coordinated up-regulation of PDGF-AA and PDGF-Ralpha. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(10), 1132–1134. <https://doi.org/10.1096/FJ.03-1492FJE>
- Inoue, Y., King, T. E., Barker, E., Daniloff, E., i Newman, L. S. (2002). Basic fibroblast growth factor and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangioleiomyomatosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(5), 765–773. <https://doi.org/10.1164/rccm.2010014>
- Jenkins, R. G., Moore, B. B., Chambers, R. C., Eickelberg, O., Konigshoff, M., Kolb, M., Laurent, G. J., Nanthakumar, C. B., Olman, M. A., Pardo, A., Selman, M., Sheppard, D., Sime, P. J., Tager, A. M., Tatler, A. L., Thannickal, V. J., i White, E. S. (2017). An official

- American thoracic society workshop report: Use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 56(5), 667–679. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0096ST>
- Jiang, C., Liu, G., Cai, L., Deshane, J., Antony, V., Thannickal, V. J., i Liu, R. M. (2021). Divergent Regulation of Alveolar Type 2 Cell and Fibroblast Apoptosis by Plasminogen Activator Inhibitor 1 in Lung Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 191(7), 1227. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.04.003>
- John, A. E., Graves, R. H., Pun, K. T., Vitulli, G., Forty, E. J., Mercer, P. F., Morrell, J. L., Barrett, J. W., Rogers, R. F., Hafeji, M., Bibby, L. I., Gower, E., Morrison, V. S., Man, Y., Roper, J. A., Luckett, J. C., Borthwick, L. A., Barksby, B. S., Burgoyne, R. A., ... Slack, R. J. (2020). Translational pharmacology of an inhaled small molecule $\alpha\beta6$ integrin inhibitor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature Communications*, 11(1), 4659-. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-18397-6>;TECHMETA
- Kalluri, R., i Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., i Wrana, J. L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Molecular Cell*, 6(6), 1365–1375. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00134-9)
- Kawarada, Y., Inoue, Y., Kawasaki, F., Fukuura, K., Sato, K., Tanaka, T., Itoh, Y., i Hayashi, H. (2016). TGF- β induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription OPEN. *Scientific Reports*, 6(1), 35483-. <https://doi.org/10.1038/srep35483>
- Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. M., Sheppard, D., i Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13180–13185. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605669103>
- King, T. E., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Hormel, P., Lancaster, L., Noble, P. W., Sahn, S. A., Szwarcberg, J., Thomeer, M., Valeyre, D., i du Bois, R. M. (2009). Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 374(9685),

222–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60551-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60551-1)

- King, T. E., Bradford, W. Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E. A., Glaspole, I., Glassberg, M. K., Gorina, E., Hopkins, P. M., Kardatzke, D., Lancaster, L., Lederer, D. J., Nathan, S. D., Pereira, C. A., Sahn, S. A., Sussman, R., Swigris, J. J., i Noble, P. W. (2014). A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 370(22), 2083–2092. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1402582>
- King, T. E., Schwarz, M. I., Brown, K., Tooze, J. A., Colby, T. V., Waldron, J. A., Flint, A., Thurlbeck, W., i Cherniack, R. M. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: Relationship between histopathologic features and mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(6), 1025–1032. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.6.2001056>
- Kolanko, E., Cargnoni, A., Papait, A., Silini, A. R., Czekaj, P., i Parolini, O. (2024). The evolution of in vitro models of lung fibrosis: promising prospects for drug discovery. *European Respiratory Review*, 33(171). <https://doi.org/10.1183/16000617.0127-2023>
- Kolb, M., Crestani, B., Maher, T. M., Kolb, M., Crestani, B., i Maher, T. M. (2023). Phosphodiesterase 4B inhibition: a potential novel strategy for treating pulmonary fibrosis. *European Respiratory Review*, 32(167). <https://doi.org/10.1183/16000617.0206-2022>
- Konigsberg, I. R., Borie, R., Walts, A. D., Cardwell, J., Rojas, M., Metzger, F., Hauck, S. M., Fingerlin, T. E., Yang, I. V., i Schwartz, D. A. (2021). Molecular Signatures of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 65(4), 430. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0546OC>
- Königshoff, M., Balsara, N., Pfaff, E. M., Kramer, M., Chrobak, I., Seeger, W., i Eickelberg, O. (2008). Functional Wnt Signaling Is Increased in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE*, 3(5), e2142. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002142>
- Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., Lang, G., Fink, L., Bohle, R. M., Seeger, W., Weaver, T. E., i Guenther, A. (2008). Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(8), 838–846. <https://doi.org/10.1164/RCCM.200802-313OC>
- Koziol-White, C., Gebiski, E., Cao, G., i Panettieri, R. A. (2024). Precision cut lung slices: an integrated ex vivo model for studying lung physiology, pharmacology, disease

- pathogenesis and drug discovery. *Respiratory Research*, 25(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02855-6>
- Kropski, J. A., Lawson, W. E., Young, L. R., i Blackwell, T. S. (2013). Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Disease Models & Mechanisms*, 6(1), 9–17. <https://doi.org/10.1242/DMM.010736>
- Lam, M., Lamanna, E., Organ, L., Donovan, C., i Bourke, J. E. (2023). Perspectives on precision cut lung slices—powerful tools for investigation of mechanisms and therapeutic targets in lung diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1162889. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1162889>
- Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., i Petitfrère, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49(3), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.008>
- Lancaster, L., Cottin, V., Ramaswamy, M., Wuyts, W. A., Jenkins, R. G., Scholand, M. B., Kreuter, M., Valenzuela, C., Ryerson, C. J., Goldin, J., Kim, G. H. J., Jurek, M., Decaris, M., Clark, A., Turner, S., Barnes, C. N., Achneck, H. E., Cosgrove, G. P., Lefebvre, É. A., i Flaherty, K. R. (2024). Bexotegrast in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The INTEGRIS-IPF Clinical Trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 210(4), 424. <https://doi.org/10.1164/RCCM.202403-0636OC>
- Leask, A., i Abraham, D. J. (2006). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 23), 4803–4810. <https://doi.org/10.1242/JCS.03270>
- Leeman, K. T., Pessina, P., Lee, J. H., i Kim, C. F. (2019). Mesenchymal Stem Cells Increase Alveolar Differentiation in Lung Progenitor Organoid Cultures. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 6479-. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42819-1>
- Lehmann, M., Buhl, L., Alsafadi, H. N., Klee, S., Hermann, S., Mutze, K., Ota, C., Lindner, M., Behr, J., Hilgendorff, A., Wagner, D. E., i Konigshoff, M. (2018). Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 19(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0876-y>
- Lehtonen, S. T., Veijola, A., Karvonen, H., Lappi-Blanco, E., Sormunen, R., Korpela, S., Zagai, U., Sköld, M. C., Kaarteenaho, R., Sköld, M. C., i Kaarteenaho, R. (2016). Pirfenidone

- and nintedanib modulate properties of fibroblasts and myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, 17(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0328-5>
- Li, C., Lu, G., Chen, H., Wang, C., Wang, Z., Ming, R., Liu, S., i Huang, L. (2026). A nanosystem targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for continuous spatiotemporal idiopathic pulmonary fibrosis therapy. *Nature Communications*, 17, 1694. <https://doi.org/10.1038/s41467-026-68398-0>
- Li, G., Cohen, J. A., Martines, C., Ram-Mohan, S., Brain, J. D., Krishnan, R., Ai, X., i Bai, Y. (2020). Preserving Airway Smooth Muscle Contraction in Precision-Cut Lung Slices. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63225-y>
- Li, X., Cui, B., i Jiang, L. (2024). Associations between genetic variants of Toll-interacting proteins and interstitial lung diseases: a systematic review and meta-analysis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 19(1), 432. <https://doi.org/10.1186/S13023-024-03410-8>
- Liu, G., Betts, C., Cunoosamy, D. M., Åberg, P. M., Hornberg, J. J., Sivars, K. B., i Cohen, T. S. (2019). Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. In *Respiratory Research* (Vol. 20, Issue 1, pp. 1–14). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1131-x>
- Liu, H., Drew, P., Gaugler, A. C., Cheng, Y., i Visner, G. A. (2005). Pirfenidone inhibits lung allograft fibrosis through L-arginine-arginase pathway. *American Journal of Transplantation*, 5(6), 1256–1263. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00876.x>
- Liu, R., An, L., Liu, G., Li, X., Tang, W., i Chen, X. (2015). Mouse lung slices: An ex vivo model for the evaluation of antiviral and anti-inflammatory agents against influenza viruses. *Antiviral Research*, 120(1), 101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.05.008>
- Liu, Y., Papagianis, P. C., de Kuijper, Z. S. C., Chitty, J. G., Thomas, B., Borghuis, T., Jongman, R. M., Pillay, J., Richards, E. A., Melgert, B. N., Burgess, J. K., i Bourke, J. E. (2025). Generation of a novel lung fibrosis model using precision-cut lung slices from transgenic TGFβ1 mice. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 329(2), C611–C623. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00015.2025>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., i Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>

- Lucchini, A. C., Gachanja, N. N., Rossi, A. G., Dorward, D. A., i Lucas, C. D. (2021). Epithelial Cells and Inflammation in Pulmonary Wound Repair. *Cells*, 10(2), 339. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020339>
- Machahua, C., Marti, T. M., Dorn, P., i Funke-Chambour, M. (2025). Fibrosis in PCLS: comparing TGF- β and fibrotic cocktail. *Respiratory Research*, 26(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12931-025-03110-2>
- Maher, T. M., Assassi, S., Azuma, A., Cottin, V., Hoffmann-Vold, A. M., Kreuter, M., Oldham, J. M., Richeldi, L., Valenzuela, C., Wijsenbeek, M. S., Coeck, C., Schlecker, C., Voss, F., Wachtlin, D., i Martinez, F. J. (2023). Design of a phase III, double-blind, randomised, placebo-controlled trial of BI 1015550 in patients with progressive pulmonary fibrosis (FIBRONEER-ILD). *BMJ Open Respiratory Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2022-001580>
- Manoury, B., Caulet-Maugendre, S., Guénon, I., Lagente, V., i Boichot, E. (2006). TIMP-1 is a key factor of fibrogenic response to bleomycin in mouse lung. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 19(3), 471–487. <https://doi.org/10.1177/039463200601900303>
- Martinez, F. J., Collard, H. R., Pardo, A., Raghu, G., Richeldi, L., Selman, M., Swigris, J. J., Taniguchi, H., i Wells, A. U. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.74>
- Marudamuthu, A. S., Shetty, S. K., Bhandary, Y. P., Karandashova, S., Thompson, M., Sathish, V., Florova, G., Hogan, T. B., Pabelick, C. M., Prakash, Y. S., Tsukasaki, Y., Fu, J., Ikebe, M., Idell, S., i Shetty, S. (2015). Plasminogen Activator Inhibitor-1 Suppresses Profibrotic Responses in Fibroblasts from Fibrotic Lungs. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(15), 9428. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.601815>
- Mathai, S. K., Newton, C. A., Schwartz, D. A., i Garcia, C. K. (2016). Pulmonary fibrosis in the era of stratified medicine. *Thorax*, 71(12), 1154. <https://doi.org/10.1136/THORAXJNL-2016-209172>
- Mei, Q., Liu, Z., Zuo, H., Yang, Z., i Qu, J. (2022). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update on Pathogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 12(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.797292>
- Mercer, P. F., Woodcock, H. V., Eley, J. D., Plate, M., Sulikowski, M. G., Durrenberger, P. F.,

- Franklin, L., Nanthakumar, C. B., Man, Y., Genovese, F., McAnulty, R. J., Yang, S., Maher, T. M., Nicholson, A. G., Blanchard, A. D., Marshall, R. P., Lukey, P. T., i Chambers, R. C. (2016). Exploration of a potent PI3 kinase/mTOR inhibitor as a novel anti-fibrotic agent in IPF. *Thorax*, thoraxjnl-2015-207429-. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207429>
- Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., i Kolb, M. (2008). The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(3), 362–382. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.08.011>
- Moeller, A., Gilpin, S. E., Ask, K., Cox, G., Cook, D., Gauldie, J., Margetts, P. J., Farkas, L., Dobranowski, J., Boylan, C., O’Byrne, P. M., Strieter, R. M., i Kolb, M. (2009). Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(7), 588–594. <https://doi.org/10.1164/RCCM.200810-1534OC>
- Molina-Molina, M., Machahua-Huamani, C., Vicens-Zygmunt, V., Llatjós, R., Escobar, I., Sala-Llinas, E., Luburich-Hernaiz, P., Dorca, J., i Montes-Worboys, A. (2018). Anti-fibrotic effects of pirfenidone and rapamycin in primary IPF fibroblasts and human alveolar epithelial cells. *BMC Pulmonary Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0626-4>
- Moore, B. B., i Hogaboam, C. M. (2008). Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(2), 152–160. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00313.2007>
- Moore, B. B., Murray, L., Das, A., Wilke, C. A., Herrygers, A. B., i Toews, G. B. (2006). The Role of CCL12 in the Recruitment of Fibrocytes and Lung Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(2), 175. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2005-0239OC>
- Mora, A. L., Rojas, M., Pardo, A., i Selman, M. (2017). Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(11), 755–772. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.170>
- Morishima, Y., Nomura, A., Uchida, Y., Noguchi, Y., Sakamoto, T., Ishii, Y., Goto, Y., Masuyama, K., Zhang, M. J., Hirano, K., Mochizuki, M., Ohtsuka, M., i Sekizawa, K.

- (2001). Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(1), 1–11. <https://doi.org/10.1165/AJRCMB.24.1.4040>
- Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S. J., Muniswamy, M., i Beers, M. F. (2012). A Surfactant Protein C Precursor Protein BRICHOS Domain Mutation Causes Endoplasmic Reticulum Stress, Proteasome Dysfunction, and Caspase 3 Activation. *Https://Doi.Org/10.1165/Rcmb.2005-0009OC*, 32(6), 521–530. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2005-0009OC>
- Muri, J., Durcová, B., Slivka, R., Vrbenská, A., Makovická, M., Makovický, P., Škarda, J., Delongová, P., Kamarád, V., i Vecanová, J. (2024). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Review of Current Knowledge. *Physiological Research*, 73(4), 487. <https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.935322>
- Naba, A., Clauser, K. R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S. A., i Hynes, R. O. (2011). The matrisome: In silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(4). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>
- Nénan, S., Boichot, E., Lagente, V., i Bertrand, C. P. (2005). Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(suppl 1), 167–172. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900028>
- Nishimura, S. L. (2009). Integrin-mediated transforming growth factor- β activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders. *American Journal of Pathology*, 175(4), 1362–1370. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090393>
- Noble, P. W., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Bois, R. M. D., Fagan, E. A., Fishman, R. S., Glaspole, I., Glassberg, M. K., Lancaster, L., Lederer, D. J., Leff, J. A., Nathan, S. D., Pereira, C. A., Swigris, J. J., Valeyre, D., i King, T. E. (2016). Pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis of pooled data from three multinational phase 3 trials. *The European Respiratory Journal*, 47(1), 243–253. <https://doi.org/10.1183/13993003.00026-2015>
- Noble, P. W., Albera, C., Bradford, W. Z., Costabel, U., Glassberg, M. K., Kardatzke, D., King, T. E., Lancaster, L., Sahn, S. A., Szwarcberg, J., Valeyre, D., i Du Bois, R. M. (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): Two randomised

- trials. *The Lancet*, 377(9779), 1760–1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60405-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60405-4)
- Noth, I., Zhang, Y., Ma, S. F., Flores, C., Barber, M., Huang, Y., Broderick, S. M., Wade, M. S., Hysi, P., Scurba, J., Richards, T. J., Juan-Guardela, B. M., Vij, R., Han, M. L. K., Martinez, F. J., Kossen, K., Seiwert, S. D., Christie, J. D., Nicolae, D., ... Garcia, J. G. N. (2013). Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 1(4), 309–317. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70045-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70045-6)
- Nußbaum, S. M., Krabbe, J., Böll, S., Babendreyer, A., i Martin, C. (2022). Functional changes in long-term incubated rat precision-cut lung slices. *Respiratory Research*, 23(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02169-5>
- Ogura, T., Tsuchiya, A., Minas, T., i Mizuno, S. (2015). Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct. *BMC Research Notes*, 8(1), 644. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1627-5>
- Oku, H., Shimizu, T., Kawabata, T., Nagira, M., Hikita, I., Ueyama, A., Matsushima, S., Torii, M., i Arimura, A. (2008). Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *European Journal of Pharmacology*, 590(1–3), 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.046>
- Olajuyin, A. M., Zhang, X., i Ji, H. L. (2019). Alveolar type 2 progenitor cells for lung injury repair. *Cell Death Discovery 2019 5:1*, 5(1), 63-. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0147-9>
- Pan, L. H., Yamauchi, K., Uzuki, M., Nakanishi, T., Takigawa, M., Inoue, H., i Sawai, T. (2001). Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *The European Respiratory Journal*, 17(6), 1220–1227. <https://doi.org/10.1183/09031936.01.00074101>
- Pardo, A., i Selman, M. (2006). Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 383–388. <https://doi.org/10.1513/pats.200601-012TK>
- Parrish, A. R., Gandolfi, A. J., i Brendel, K. (1995). Precision-cut tissue slices: Applications in pharmacology and toxicology. *Life Sciences*, 57(21), 1887–1901.

[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02176-J](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02176-J)

- Pearson, H., Todd, E. J. A. A., Ahrends, M., Hover, S. E., Whitehouse, A., Stacey, M., Lippiat, J. D., Wilkens, L., Fieguth, H. G., Danov, O., Hesse, C., Barr, J. N., i Mankouri, J. (2020). TMEM16A/ANO1 calcium-activated chloride channel as a novel target for the treatment of human respiratory syncytial virus infection. *Thorax*, 76(1), 64. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215171>
- Peng, D., Fu, M., Wang, M., Wei, Y., i Wei, X. (2022). Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Molecular Cancer* 2022 21:1, 21(1), 104-. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01569-x>
- Peng, R., Sridhar, S., Tyagi, G., Phillips, J. E., Garrido, R., Harris, P., Burns, L., Renteria, L., Woods, J., Chen, L., Allard, J., Ravindran, P., Bitter, H., Liang, Z., Hogaboam, C. M., Kitson, C., Budd, D. C., Fine, J. S., Bauer, C. M. T. T., i Stevenson, C. S. (2013). Bleomycin Induces Molecular Changes Directly Relevant to Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Model for “Active” Disease. *PLoS ONE*, 8(4), e59348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059348>
- Petitfrère, E., Kadri, Z., Boudot, C., Sowa, M. L., Mayeux, P., Haye, B., i Billat, C. (2000). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced erythroid differentiation. *FEBS Letters*, 485(2–3), 117–121. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02210-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02210-9)
- Phillips, R. J., Burdick, M. D., Hong, K., Lutz, M. A., Murray, L. A., Xue, Y. Y., Belperio, J. A., Keane, M. P., i Strieter, R. M. (2004). Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(3), 438–446. <https://doi.org/10.1172/JCI20997>
- Plataki, M., Koutsopoulos, A. V., Darivianaki, K., Delides, G., Siafakas, N. M., i Bouros, D. (2005). Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 127(1), 266–274. <https://doi.org/10.1378/chest.127.1.266>
- Prasad, S., Hogaboam, C. M., i Jarai, G. (2014). Deficient repair response of IPF fibroblasts in a co-culture model of epithelial injury and repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1755-1536-7-7>
- Prasse, A., Pechkovsky, D. V., Toews, G. B., Jungraithmayr, W., Kollert, F., Goldmann, T., Vollmer, E., Müller-Quernheim, J., i Zissel, G. (2006). A vicious circle of alveolar

- macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(7), 781–792. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1518OC>
- Preuß, E. B., Schubert, S., Werlein, C., Stark, H., Braubach, P., Höfer, A., Plucinski, E. K. J., Shah, H. R., Geffers, R., Sewald, K., Braun, A., Jonigk, D. D., i Kühnel, M. P. (2022). The Challenge of Long-Term Cultivation of Human Precision-Cut Lung Slices. *American Journal of Pathology*, 192(2), 239–253. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.10.020>
- Psathakis, K., Mermigkis, D., Papatheodorou, G., Loukides, S., Panagou, P., Polychronopoulos, V., Siafakas, N. M., i Bouros, D. (2006). Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Journal of Clinical Investigation*, 36(5), 362–367. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2362.2006.01636.X>
- Raghu, G., Brown, K. K., Collard, H. R., Cottin, V., Gibson, K. F., Kaner, R. J., Lederer, D. J., Martinez, F. J., Noble, P. W., Song, J. W., Wells, A. U., Whelan, T. P. M., Wuyts, W., Moreau, E., Patterson, S. D., Smith, V., Bayly, S., Chien, J. W., Gong, Q., ... O’Riordan, T. G. (2017). Efficacy of simtuzumab versus placebo in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised, double-blind, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 5(1), 22–32. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30421-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30421-0)
- Raghu, G., Chen, S. Y., Yeh, W. S., Maroni, B., Li, Q., Lee, Y. C., i Collard, H. R. (2014). Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001–11. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(7), 566–572. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70101-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70101-8)
- Ramos, C., Montaña, M., García-Alvarez, J., Ruiz, V., Uhal, B. D., Selman, M., i Pardo, A. (2001). 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.*, 24(5), 591–598. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.5.4333>
- Rana, T., Jiang, C., Banerjee, S., Yi, N., Zmijewski, J. W., Liu, G., i Liu, R. M. (2023). PAI-1 Regulation of p53 Expression and Senescence in Type II Alveolar Epithelial Cells. *Cells*, 12(15), 2008.
- Reamon-Buettner, S. M., Niehof, M., Hirth, N., Danov, O., Obernolte, H., Braun, A., Warnecke, J., Sewald, K., i Wronski, S. (2019). Transcriptomic analysis reveals priming of the host antiviral interferon signaling pathway by bronchobini® resulting in balanced

- immune response to rhinovirus infection in mouse lung tissue slices. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092242>
- Reininger, D., Fundel-Clemens, K., Mayr, C. H., Wollin, L., Laemmle, B., Quast, K., Nickolaus, P., i Herrmann, F. E. (2024). PDE4B inhibition by nerandomilast: Effects on lung fibrosis and transcriptome in fibrotic rats and on biomarkers in human lung epithelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 181(23), 4766–4781. <https://doi.org/10.1111/bph.17303>
- Richeldi, L., Azuma, A., Cottin, V., Hesslinger, C., Stowasser, S., Valenzuela, C., Wijsenbeek, M. S., Zoz, D. F., Voss, F., i Maher, T. M. (2022). Trial of a Preferential Phosphodiesterase 4B Inhibitor for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 386(23), 135. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2201737>
- Richeldi, L., Azuma, A., Cottin, V., Kreuter, M., Maher, T. M., Martinez, F. J., Oldham, J. M., Valenzuela, C., Gordat, M., Liu, Y., Stowasser, S., Zoz, D. F., i Wijsenbeek, M. S. (2023). Design of a phase III, double-blind, randomised, placebo-controlled trial of BI 1015550 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (FIBRONEER-IPF). *BMJ Open Respiratory Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2022-001563>
- Richeldi, L., Collard, H. R., i Jones, M. G. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 389(10082), 1941–1952. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30866-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30866-8)
- Richeldi, L., Davies, H. R. H. R., Spagnolo, P., i Luppi, F. (2003). Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002880>
- Richeldi, L., du Bois, R. M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K. K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K. R., Hansell, D. M., Inoue, Y., Kim, D. S., Kolb, M., Nicholson, A. G., Noble, P. W., Selman, M., Taniguchi, H., Brun, M., Le Maulf, F., Girard, M., ... Collard, H. R. (2014). Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 370(22), 2071–2082. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1402584>
- Roach, K. M., Castells, E., Dixon, K., Mason, S., Elliott, G., Marshall, H., Poblocka, M. A., Macip, S., Richardson, M., Khalfaoui, L., i Bradding, P. (2021). Evaluation of Pirfenidone and Nintedanib in a Human Lung Model of Fibrogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 12(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.679388>
- Roach, K. M., Sutcliffe, A., Matthews, L., Elliott, G., Newby, C., Amrani, Y., i Bradding, P.

- (2018). A model of human lung fibrogenesis for the assessment of anti-fibrotic strategies in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scientific Reports*, 8(1), 342. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18555-9>
- Rock, J. R., Barkauskas, C. E., Cronic, M. J., Xue, Y., Harris, J. R., Liang, J., Noble, P. W., i Hogan, B. L. M. (2011). Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1117988108>
- Rodier, F., i Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–556. <https://doi.org/10.1083/JCB.201009094>
- Rosas, I. O., Richards, T. J., Konishi, K., Zhang, Y., Gibson, K., Lokshin, A. E., Lindell, K. O., Cisneros, J., MacDonald, S. D., Pardo, A., Sciurba, F., Dauber, J., Selman, M., Gochuico, B. R., i Kaminski, N. (2008). MMP1 and MMP7 as Potential Peripheral Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Medicine*, 5(4), e93. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050093>
- Rout-Pitt, N., Farrow, N., Parsons, D., i Donnelly, M. (2018). Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology. *Respiratory Research*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12931-018-0834-8>
- Ruwanpura, S. M., Thomas, B. J., i Bardin, P. G. (2020). Pirfenidone: Molecular mechanisms and potential clinical applications in lung disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 62(4), 413–422. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0328TR>
- Saini, G., Porte, J., Weinreb, P. H., Violette, S. M., Wallace, W. A., McKeever, T. M., i Jenkins, G. (2015). $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ integrin may be a potential prognostic biomarker in interstitial lung disease. *The European Respiratory Journal*, 46(2), 486–494. <https://doi.org/10.1183/09031936.00210414>
- Sakai, N., i Tager, A. M. (2013). Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(7), 911–921. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.001>
- Schaefer, C. J., Ruhrmund, D. W., Pan, L., Seiwert, S. D., Kossen, K., Schaefer, C. J., Ruhrmund, D. W., Pan, L., Seiwert, S. D., i Kossen, K. (2011). Antifibrotic activities of

- pirfenidone in animal models. *European Respiratory Review*, 20(120), 85–97.
<https://doi.org/10.1183/09059180.00001111>
- Schaumann, F., Müller, M., Braun, A., Luettig, B., Peden, D. B., Hohlfeld, J. M., i Krug, N. (2008). Endotoxin augments myeloid dendritic cell influx into the airways in patients with allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(12), 1307–1313. <https://doi.org/10.1164/rccm.200706-870OC>
- Schultz, G. S., i Wysocki, A. (2009). *Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing*. 17(2), 153–162. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>
- Seibold, M. A., Wise, A. L., Speer, M. C., Steele, M. P., Brown, K. K., Loyd, J. E., Fingerlin, T. E., Zhang, W., Gudmundsson, G., Groshong, S. D., Evans, C. M., Garantziotis, S., Adler, K. B., Dickey, B. F., du Bois, R. M., Yang, I. V., Herron, A., Kervitsky, D., Talbert, J. L., ... Schwartz, D. A. (2011). A Common MUC5B Promoter Polymorphism and Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 364(16), 1503. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1013660>
- Selman, M., Pardo, A., i Kaminski, N. (2008). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aberrant Recapitulation of Developmental Programs? *PLOS Medicine*, 5(3), e62. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0050062>
- Selman, M., Ruiz, V., Cabrera, S., Segura, L., Barrios, R., i Pardo, A. (2000). TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, 562–574.
- Shakeel, I., Afzal, M., Islam, A., Sohal, S. S., i Hassan, M. I. (2023). Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathophysiology, cellular signaling, diagnostic and therapeutic approaches. *Medicine in Drug Discovery*, 20, 100167. <https://doi.org/10.1016/J.MEDIDD.2023.100167>
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., i Springer, T. A. (2011). Latent TGF- β structure and activation. *Nature*, 474(7351), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature10152>
- Shi, N., Wang, Z., Zhu, H., Liu, W., Zhao, M., Jiang, X., Zhao, J., Ren, C., Zhang, Y., i Luo, L. (2022). Research progress on drugs targeting the TGF - β signaling pathway in fibrotic

- diseases. *Immunologic Research*, 70(3), 276–288. <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09267-y>
- Sillen, M., i Declerck, P. J. (2021). A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2721. <https://doi.org/10.3390/ijms22052721>
- Solovyan, V. T., i Keski-Oja, J. (2006). Proteolytic activation of latent TGF-beta precedes caspase-3 activation and enhances apoptotic death of lung epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 207(2), 445–453. <https://doi.org/10.1002/JCP.20607>
- Song, E., Ouyang, N., Hörbelt, M., Antus, B., Wang, M., i Exton, M. S. (2000). Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular Immunology*, 204(1), 19–28. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1687>
- Steele, M. P., Speer, M. C., Loyd, J. E., Brown, K. K., Herron, A., Slifer, S. H., Burch, L. H., Wahidi, M. M., Phillips, J. A., Sporn, T. A., McAdams, H. P., Schwarz, M. I., i Schwartz, D. A. (2012). Clinical and Pathologic Features of Familial Interstitial Pneumonia. *Https://Doi.Org/10.1164/Rccm.200408-1104OC*, 172(9), 1146–1152. <https://doi.org/10.1164/RCCM.200408-1104OC>
- Stewart, G. A., Hoyne, G. F., Ahmad, S. A., Jarman, E., Wallace, W. A. H., Harrison, D. J., Haslett, C., Lamb, J. R., i Howie, S. E. M. (2003). Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *The Journal of Pathology*, 199(4), 488–495. <https://doi.org/10.1002/PATH.1295>
- Stone, R. C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. I., i Tomic-Canic, M. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 495–506. <https://doi.org/10.1007/S00441-016-2464-0>
- Strunz, M., Simon, L. M., Ansari, M., Kathiriya, J. J., Angelidis, I., Mayr, C. H., Tsidiridis, G., Lange, M., Mattner, L. F., Yee, M., Ogar, P., Sengupta, A., Kukhtevich, I., Schneider, R., Zhao, Z., Voss, C., Stoeger, T., Neumann, J. H. L., Hilgendorff, A., ... Schiller, H. B. (2020). Alveolar regeneration through a Krt8+ transitional stem cell state that persists in human lung fibrosis. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 3559-. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17358-3>

- Sueblinvong, V., Neujahr, D. C., Todd Mills, S., Roser-Page, S., Ritzenthaler, J. D., Guidot, D., Rojas, M., i Roman, J. (2012). Predisposition for Disrepair in the Aged Lung. *The American Journal of the Medical Sciences*, 344(1), 41–51. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0B013E318234C132>
- Sundarakrishnan, A., Chen, Y., Black, L. D., Aldridge, B. B., i Kaplan, D. L. (2018). Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129, 78–94. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2017.12.013>
- Surolia, R., Li, F. J., Wang, Z., Li, H., Liu, G., Zhou, Y., Luckhardt, T., Bae, S., Liu, R. M., Rangarajan, S., de Andrade, J., Thannickal, V. J., i Antony, V. B. (2017). 3D pulmospheres serve as a personalized and predictive multicellular model for assessment of antifibrotic drugs. *JCI Insight*, 2(2). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91377>
- Swaigood, C. M., French, E. L., Noga, C., Simon, R. H., i Ploplis, V. A. (2000). The Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice Deficient for Components of the Fibrinolytic System. *The American Journal of Pathology*, 157(1), 177. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64529-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64529-4)
- Switalla, S., Lauenstein, L., Prenzler, F., Knothe, S., Förster, C., Fieguth, H. G., Pfennig, O., Schaumann, F., Martin, C., Guzman, C. A., Ebensen, T., Müller, M., Hohlfeld, J. M., Krug, N., Braun, A., i Sewald, K. (2010). Natural innate cytokine response to immunomodulators and adjuvants in human precision-cut lung slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 246(3), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.04.010>
- Tanjore, H., Blackwell, T. S., i Lawson, W. E. (2012). Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Https://Doi.Org/10.1152/Ajplung.00410.2011*, 302(8), 721–729. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00410.2011>
- Tashiro, J., Rubio, G. A., Limper, A. H., Williams, K., Elliot, S. J., Ninou, I., Aidinis, V., Tzouveleakis, A., i Glassberg, M. K. (2017). Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Medicine*, 4(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00118>
- Taskar, V. S., i Coultas, D. B. (2006). Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 293–298. <https://doi.org/10.1513/PATS.200512-131TK>

- Tatler, A. L., Goodwin, A. T., Gbolahan, O., Saini, G., Porte, J., John, A. E., Clifford, R. L., Violette, S. M., Weinreb, P. H., Parfrey, H., Wolters, P. J., Gauldie, J., Kolb, M., i Jenkins, G. (2016). Amplification of TGF β Induced ITGB6 Gene Transcription May Promote Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE*, 11(8), e0158047. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0158047>
- Temann, A., Golovina, T., Neuhaus, V., Thompson, C., Chichester, J. A., Braun, A., i Yusibov, V. (2017). Evaluation of inflammatory and immune responses in long-term cultured human precision-cut lung slices. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 13(2), 351–358. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1264794>
- Tian, Y., Li, H., Gao, Y., Liu, C., Qiu, T., Wu, H., Cao, M., Zhang, Y., Ding, H., Chen, J., i Cai, H. (2019). Quantitative proteomic characterization of lung tissue in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical Proteomics* 2019 16:1, 16(1), 6-. <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9226-4>
- Todd, J. L., Vinisko, R., Liu, Y., Neely, M. L., Overton, R., Flaherty, K. R., Noth, I., Newby, L. K., Lasky, J. A., Oltman, M. A., Hesslinger, C., Leonard, T. B., Palmer, S. M., Belperio, J. A., Asi, W., Baker, A., Beegle, S., Condos, R., Cordova, F., ... Whelan, T. P. (2020). Circulating matrix metalloproteinases and tissue metalloproteinase inhibitors in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in the multicenter IPF-PRO Registry cohort. *BMC Pulmonary Medicine* 2020 20:1, 20(1), 64-. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-1103-4>
- Tony-Odigie, A., Wilke, L., Boutin, S., Dalpke, A. H., i Yi, B. (2022). Commensal Bacteria in the Cystic Fibrosis Airway Microbiome Reduce P. aeruginosa Induced Inflammation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 824101. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.824101>
- Uhl, F. E., Vierkotten, S., Wagner, D. E., Burgstaller, G., Costa, R., Koch, I., Lindner, M., Meiners, S., Eickelberg, O., i Königshoff, M. (2015). Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures. *European Respiratory Journal*, 46(4), 1150–1166. <https://doi.org/10.1183/09031936.00183214>
- Vuga, L. J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K. F., Feghali-Bostwick, C., i Kaminski, N. (2012). WNT5A Is a Regulator of Fibroblast Proliferation and Resistance to Apoptosis. *https://Doi.Org/10.1165/Rcmb.2008-0201OC*, 41(5), 583–589. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2008-0201OC>

- Wang, J. F., Jiao, H., Stewart, T. L., Shankowsky, H. A., Scott, P. G., i Tredget, E. E. (2007). Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 15(1), 113–121. <https://doi.org/10.1111/J.1524-475X.2006.00192.X>
- Wang, Q., Goracci, C., Sundar, I. K., i Rahman, I. (2023). Environmental tobacco smoke exposure exaggerates bleomycin- induced collagen overexpression during pulmonary fibrogenesis. *Research Square*, rs.3.rs-3406872. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-3406872/V1>
- Wang, R., Ramos, C., Joshi, I., Zagariya, A., Pardo, A., Selman, M., i Uhal, B. D. (1999). Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *The American Journal of Physiology*, 277(6). <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.1999.277.6.L1158>
- Wilson, M. S., i Wynn, T. A. (2009). Pulmonary fibrosis: Pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunology*, 2(2), 103–121. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.85>
- Wollin, L., Maillet, I., Quesniaux, V., Holweg, A., i Ryffel, B. (2014). Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349(2), 209–220. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208223>
- Wronski, S., Beinke, S., Obernolte, H., Belyaev, N. N., Saunders, K. A., Lennon, M. G., Schaudien, D., Braubach, P., Jonigk, D., Warnecke, G., Zardo, P., Fieguth, H. G., Wilkens, L., Braun, A., Hessel, E. M., i Sewald, K. (2021). Rhinovirus-induced human lung tissue responses mimic chronic obstructive pulmonary disease and asthma gene signatures. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 65(5), 544–554. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0337OC>
- Xia, H., Diebold, D., Nho, R., Perlman, D., Kleidon, J., Kahm, J., Avdulov, S., Peterson, M., Nerva, J., Bitterman, P., i Henke, C. (2008). Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1659. <https://doi.org/10.1084/JEM.20080001>
- Xia, H., Khalil, W., Kahm, J., Jessurun, J., Kleidon, J., i Henke, C. A. (2010). Pathologic

- caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*, 176(6), 2626–2637. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091117>
- Xie, R., Pal, V., Yu, Y., Lu, X., Gao, M., Liang, S., Huang, M., Peng, W., i Ozbolat, I. T. (2023). A comprehensive review on 3D tissue models: Biofabrication technologies and preclinical applications. *Biomaterials*, 304, 1–79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122408>
- Xu, Y., Mizuno, T., Sridharan, A., Du, Y., Guo, M., Tang, J., Wikenheiser-Brokamp, K. A., Perl, A. K. T., Funari, V. A., Gokey, J. J., Stripp, B. R., i Whitsett, J. A. (2016). Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight*, 1(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90558>
- Zepp, J. A., Zacharias, W. J., Frank, D. B., Cavanaugh, C. A., Zhou, S., Morley, M. P., i Morrissey, E. E. (2017). Distinct Mesenchymal Lineages and Niches Promote Epithelial Self-Renewal and Myofibrogenesis in the Lung. *Cell*, 170(6), 1134–1148.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.034>
- Zhang, J., Tian, X. J., i Xing, J. (2016). Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- β , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *Journal of Clinical Medicine* 2016, Vol. 5, 5(4). <https://doi.org/10.3390/JCM5040041>
- Zhang, Z., Ma, X., Bai, J., Xia, S., Han, Q., i Luo, Q. (2023). Characterizing the lavage and serum cytokine profiles of interstitial pneumonia with autoimmune features and their implications for progressive fibrosis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 63(5), 1230. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEAD409>
- Zhou, Y., Ling, T., i Shi, W. (2024). Current state of signaling pathways associated with the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 2024 25:1, 25(1), 245-. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02878-z>
- Zhu, L., Wang, L., Luo, X., Zhang, Y., Ding, Q., Jiang, X., Wang, X., Pan, Y., i Chen, Y. (2012). Tollip, an Intracellular Trafficking Protein, Is a Novel Modulator of the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39653–39663. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.388009>
- Zimniak, M., Kirschner, L., Hilpert, H., Geiger, N., Danov, O., Oberwinkler, H., Steinke, M., Sewald, K., Seibel, J., i Bodem, J. (2021). The serotonin reuptake inhibitor Fluoxetine inhibits SARS-CoV-2 in human lung tissue. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85049-0>

8. ŽIVOTOPIS

Matea Glogoški Cedilak rođena je 1990. godine u Zagrebu. Svoje visoko obrazovanje stekla je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Biološkom odsjeku gdje je od 2009. godine studirala na preddiplomskom studiju biologije, nakon čega je nastavila obrazovanje na diplomskom studiju molekularne biologije te 2015. godine stekla zvanje magistre molekularne biologije. Diplomski rad izradila je na Institutu Ruđer Bošković pod naslovom „Utjecaj ekstrakata biljaka *Moltkia petraea* i *Micromeria croatica* na zaštitu telomera, stanično starenje i proliferaciju stanica MJ90“ pod mentorstvom dr. sc. Ivice Rubelja. Tijekom diplomskog studija, od siječnja do svibnja 2015. godine, boravila je na stručnoj praksi u Laboratoriju za proteomiku na Institutu za Molekularnu Biologiju u Mainzu u Njemačkoj.

Nakon završetka studija, u razdoblju od 2015. do 2022. godine, radila je kao znanstvenica u Odjelu za *in vitro* farmakologiju u Fideli u Zagrebu. Tijekom tog razdoblja njezina je uloga obuhvaćala provođenje *in vitro* i *ex vivo* istraživanja u pretkliničkim i kliničkim studijama. Svoje daljnje profesionalno usavršavanje nastavlja u ulozi voditelja tima unutar istog Odjela za *in vitro* farmakologiju u Selviti u Zagrebu.

Glavni je autor publikacije iz 2019. godine pod naslovom „Precision-cut lung slices from bleomycin treated animals as a model for testing potential therapies for idiopathic pulmonary fibrosis“ te suautorica još dvije publikacije. Sudjelovala je na više međunarodnih kongresa, uključujući „European Respiratory Society“ kongres u Madridu 2019. godine gdje je prezentirala poster „Precision-cut lung slices from bleomycin challenged mice – *ex vivo* model for testing novel therapies for lung fibrosis“ te „American Thoracic Society“ kongres u San Franciscu 2025. godine gdje je prezentirala poster „Viability and epithelial cell dynamics in human precision-cut lung slices during prolonged *ex vivo* incubation“. Članica je društva „American Thoracic Society“.