

**Joanna Wielikdzień, Tomasz Wandtke,  
Joanna Golińska, Renata Herman, Maciej Gawroński**

Studenckie Koło Naukowe Terapii Genowej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medium im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
- opiekun naukowy dr hab. n. med. Piotr Kopiński

## **EKSPRESJA TRANSFORMUJĄCEGO CZYNNIKA WZROSTU- $\beta$ 1 ORAZ JEGO RECEPTORA W DOLNYCH DROGACH ODDECHOWYCH U PACJENTÓW Z WYBRANYMI CHOROBYMI ŚRÓDMIĄŻSZOWYMI PŁUC**

### **Streszczenie**

Transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  jest endogenną substancją uczestniczącą w regulacji wzrostu, a także różnicowania komórek. Cytokina ta wykazuje początkowo działanie prozapalne, później zaś immunosupresyjne. Uznaje się ją za stymulator prawidłowej regeneracji tkanek oraz włóknienia narządów. TGF- $\beta$  oddziałuje za pośrednictwem receptorów typu I i II oraz cząsteczki pomocniczej - CD105. Celem niniejszej pracy była ocena ekspresji TGF- $\beta$  oraz CD105 w dolnych drogach oddechowych w warunkach prawidłowych i w chorobach śródmiąższowych płuc (ang. interstitial lung diseases, ILD). Stężenie izoformy TGF- $\beta$ 1 oznaczano metodą ELISA, wykorzystując materiał z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (ang. bronchoalveolar lavage, BAL), pochodzący od chorych z sarkoidozą (ang. pulmonary sarcoidosis, PS), samoistnym włóknieniem płuc (ang. idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), alergicznym zewnątrzpochnym zapaleniem pęcherzyków płucnych (ang. extrinsic allergic alveolitis, EAA) i w grupie kontrolnej. Ekspresję CD105 zbadano dokonując znakowania immunofluorescencyjnego, połączonego z odczytem cytometrycznym we wszystkich wymienionych grupach. W przypadku chorych z PS i EAA oraz w grupie kontrolnej wykazano zbliżony poziom ekspresji TGF- $\beta$ 1. Znaczący wzrost stężenia TGF- $\beta$ 1 wykazano natomiast w IPF (w porównaniu z grupą kontrolną). Stwierdzono też, w tej jednostce chorobowej, znacząco wyższy odsetek limfocytów BAL CD105+. Zaobserwowano także znacznie obniżoną ekspresję CD105 na limfocytach pęcherzykowych w PS. Podsumowując, TGF- $\beta$  wykryto w całej przebadanej grupie osób. Wzmoczona ekspresja tej cytokiny cechuje chorobę IPF. Cząsteczka CD105 jest powszechnie obecna w dolnych drogach oddechowych na makrofagach, jednocześnie wykazuje niską ekspresję na limfocytach pęcherzykowych. Wyniki badań potwierdzają niekorzystny udział TGF- $\beta$  w procesie włóknienia płuc oraz znaczenie reaktywności komórek zapalnych na tę cytokinę.

## Wstęp

TGF- $\beta$  należy do nadrodziny czynników wzrostu liczącej ponad 40 białek. Wśród nich wyróżnia się białka, takie jak czynnik różnicowania wzrostu (ang. growth differentiation factor, GDF), aktywiny czy białka morfogenetyczne kości (ang. bone morphogenetic protein, BMP). Transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  występuje u człowieka w postaci trzech izoform: TGF $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 oraz TGF- $\beta$ 3. Wszystkie trzy wykazują podobieństwo strukturalne w 64-85% sekwencji aminokwasowej, a masa każdego z nich wynosi 25 kDa. Omawiane białka są homodimerami, w których każda z podjednostek ma długość 112 aminokwasów połączonych ze sobą za pomocą mostków disiarczkowych. Poszczególne izoformy ulegają specyficzno-tkankowej ekspresji przy pomocy swoistych receptorów, aktywujących szlaki ścieżek sygnałowych (Morty i wsp., 2009).

TGF- $\beta$ 1 jest wydzielany przez komórki epitelialne, endotelialne, a także mięśniowe, poza tym przez fibroblasty oraz niemal wszystkie komórki układu immunologicznego. Ekspresja TGF- $\beta$ 2 zauważalna jest natomiast głównie w neuronach i komórkach epitelialnych, podczas gdy TGF- $\beta$ 3 ulega ekspresji w komórkach mezenchymalnych (Takenoshita i wsp., 2002).

Na podstawie doniesień naukowych można stwierdzić, że każda z przedstawionych izoform bierze udział w mechanizmach chorób układu oddechowego. Brak ekspresji TGF- $\beta$ 1 powoduje między innymi wzmożoną reakcję zapalną organizmu, zaś mutacja w TGF- $\beta$ 2 skutkuje przerostem płuc. W przypadku mutacji TGF- $\beta$ 3 dochodzi natomiast do opóźnionego rozwoju płuc (Shi, Warburton 2009).

Jednakże niniejsza praca zwróci szczególną uwagę na izoformę TGF- $\beta$ 1, a więc cytokinę związaną z procesem włóknienia płuc. Jest to proces chorobowy, dla którego charakterystyczne jest nadmierne gromadzenie komórek macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM). Poprzez zaburzenie integralności pęcherzyków płucnych oraz śródbłonna naczyń krwionośnych dochodzi do aktywacji szeregu procesów immunologicznych. Zaliczyć do nich można uwalnianie nadmiernej ilości monocytów i limfocytów, które z kolei indukują wydzielanie cytokin. W ten sposób w świetle pęcherzyków płucnych dochodzi do rozwoju procesu zapalnego, a w konsekwencji do włóknienia płuc.

Powszechnie wiadomo, że transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  należy do głównych czynników, które zapoczątkowują odczyn zapalny, pobudzając działanie monocytów, makrofagów oraz granulocytów, a także indukując wydzielanie szeregu cytokin prozapalnych, takich jak IL-12 i Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Jednak z drugiej strony działa on immunosupresyjnie poprzez hamowanie proliferacji limfocytów T i komórek NK (ang. natural killers) oraz blokowanie cytokin, takich jak IL-6 czy czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (ang. tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) (Całkosiński i wsp., 2009). Proces włóknienia płuc jest ściśle związany z produkcją TGF- $\beta$  w szczególności poprzez komórki nabłonka oraz

fibroblasty. Te ostatnie w odpowiedzi na wysokie stężenie omawianej cytokiny produkują elastynę, kolagen typu I i III, fibronektynę oraz proteoglikany. W efekcie dochodzi do rozwinięcia procesu zapalnego w pęcherzykach płucnych.

Publikacje naukowe potwierdzają wysoką ekspresję TGF- $\beta$ 1 zarówno w hodowlach *in vitro* z eksperymentalnie wywołanym włóknieniem płuc, jak i w płynie, pochodzącym z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (ang. bronchoalveolar lavage, BAL), pobranego od chorych z patologicznym włóknieniem płuc (Kapoun i wsp., 2006).

Pierwsze doniesienia o TGF- $\beta$  sugerowały, iż może on przyczynić się do hamowania rozwoju procesu karcynogenezy poprzez supresję wzrostu komórek nowotworowych oraz indukcję apoptozy. Kolejne badania uściśliły jednak tę hipotezę, że jest to możliwe jedynie we wczesnych stadiach procesu progresji nowotworu, gdyż w późniejszych etapach cytokina ta pobudza procesy neoangiogenezy, a ponadto pośredniczy w tworzeniu przerzutów.

Transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  jest nieaktywnym biologicznie białkiem, które może ulegać aktywacji przy udziale enzymów z grupy proteaz. Zaktywowany działa za pośrednictwem receptorów: typu I i II. Ulegają one ekspresji w większości ludzkich komórek. Pierwszym etapem reakcji jest przyłączenie TGF- $\beta$  do receptora typu II, a następnie do receptora typu I. Konsekwencją wiązania ze swoistymi receptorami jest aktywacja szlaku przekazywania sygnału z membranowego kompleksu receptorowego do jądra komórkowego z udziałem wewnątrzkomórkowych przekaźników – białek Smad. Receptorem pomocniczym dla TGF- $\beta$ 1 jest cząsteczka CD105, znana również jako endoglina. Jej podwyższoną ekspresję obserwuje się u chorych z nowotworami, podczas stanu zapalnego oraz w przypadku regeneracji tkanek (Dallas i wsp., 2008).

Niniejsza praca zwróci zaś szczególną uwagę na określenie zmian ekspresji TGF- $\beta$ 1 oraz receptora pomocniczego – cząsteczki CD105 w dolnych drogach oddechowych u chorych z chorobami śródmiąższowymi płuc (ang. interstitial lung diseases, ILD), porównując je do osób zdrowych.

ILD to grupa ponad stu chorób dolnych dróg oddechowych. Wszystkie je łączą podobne objawy kliniczne w obrębie płuc, takie jak duszność wysiłkowa, zapalenie i włóknienie śródmiąższu płuc, zmiany rozsiane (widoczne w radiologicznym obrazie klatki piersiowej), czy zaburzenie wentylacji płuc. Skutkiem wymienionych zmian patologicznych w obrębie dróg oddechowych jest niszczenie struktury pęcherzyków płucnych oraz śródmiąższu, które w następstwie powodują zaburzenie funkcjonowania płuc (GołECKI, Jankowska 2005).

Jedną z najbardziej znanych chorób, zaliczanych do ILD jest sarkoidoza (ang. pulmonary sarcoidosis, PS). Jednak pomimo dość powszechnego występowania, jej etiologia nadal pozostaje niezidentyfikowana. Ta przewlekła choroba ziarniniakowa objawia się rozsianymi zmianami, najczęściej w płucach, w postaci komórek nabłonkowych, a jej rozpoznanie odbywa się za pomocą badania histopatologicznego

oraz radiologicznego obrazu klatki piersiowej. Mimo, że 95% przypadków dotyczy zmian w obrębie płuc, choroba może zaatakować organizm pod postacią zapalenia stawów, rumienia i gorączki. Ziarniniaki sarkoidozy związane są z nagromadzeniem makrofagów oraz limfocytów Th, czego następstwem jest odpowiedź immunologiczna w postaci granulocytów, fibroblastów i ekspresji cytokin reakcji zapalnej (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL-12). W konsekwencji dochodzi do zapalenia pęcherzyków płucnych, a czasem do procesu włóknienia płuc. Związane jest to z profibrogennym działaniem makrofagów, indukujących ekspresję płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. platelet-derived growth factor, PDGF), czynnika wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor, FGF) oraz TGF- $\beta$  (Jankiewicz-Ziobro i wsp., 2005).

Kolejną wartą uwagi chorobą jest samoistne włóknienie płuc (ang. idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), które jest najczęściej występującą postacią samoistnego śródmiąższowego zapalenia płuc (ang. interstitial idiopathic pneumonia, IIP). Najbardziej charakterystycznym objawem klinicznym choroby jest postępujące włóknienie tkanki płucnej. Podobnie jak w przypadku sarkoidozy, etiologia choroby nie została poznana. Do ogólnie występujących objawów można zaliczyć również duszność, suchy kaszel, osłabienie oraz zaburzenia wentylacji płuc. Podczas rozwoju choroby dochodzi do produkcji szeregu czynników chemo-taktycznych poprzez uszkodzone komórki nabłonkowe oraz do ekspresji TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, a także insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. insulin-like growth factor, IGF). W efekcie dochodzi do aktywacji i proliferacji fibroblastów oraz tworzenia charakterystycznych, dla tej jednostki chorobowej, ognisk fibroblastycznych. Powstają złoża kolagenu, ECM, czego skutkiem jest zmniejszenie powierzchni wymiany gazowej (Harari, Caminati 2010).

Ostatnią, istotną z punktu widzenia niniejszej pracy, chorobąILD jest zewnątrzpochodne zapalenie pęcherzyków płucnych (ang. extrinsic allergic alveolitis, EAA). W przeciwieństwie do wyżej opisanych chorób, czynnik wywołujący EAA został dobrze poznany. Są to antygeny, najczęściej pochodzenia organicznego, które wiążą się ze środowiskiem życia pacjentów. Choroba ta dotyczy najczęściej rolników i hodowców, gdyż czynnikiem chorobotwórczym są np. białka występujące w surowicy gołębi czy odchodach kurczaków. W wyniku ekspozycji na takie cząstki, antygeny dostają się do dróg oddechowych osób na nie uczulonych. W efekcie dochodzi do nadprodukcji przeciwciał klasy IgM oraz IgG, a następnie do tworzenia się kompleksów antygen-przeciwciało, charakterystycznych dla nadwrażliwości typu III. W efekcie końcowym aktywowany zostaje układ dopełniacza, a kompleksy immunologiczne doprowadzają do aktywacji enzymów lizosomalnych, które uszkadzają komórki pęcherzyków płucnych. Taka kaskada następujących po sobie procesów z udziałem układu odpornościowego została nazwana zewnątrzpochodnym zapaleniem pęcherzyków płucnych (Wiatr i wsp., 2004).

## Material i metoda

W prezentowanej pracy wykorzystano materiał pochodzący z płukania oskrzelowopęcherzykowego. Jest to metoda diagnostyczna, która umożliwia analizę komórek z oskrzelików i pęcherzyków płucnych pod kątem cytologicznym, biochemicznym, a także immunologicznym.

Pierwszą grupę stanowili chorzy na sarkoidozę, a uzyskany materiał pochodził od 16 pacjentów. W przypadku samoistnego włóknienia płuc treść BAL pobrano od 9 chorych, zaś alergiczne zewnątrzpochodne zapalenie pęcherzyków płucnych posiadało 5 osób. Siedmiu zdrowych pacjentów – ochotników stanowiło natomiast grupę kontrolną.

Żywotność komórek oznaczano poprzez barwienie w roztworze 0,2% błękitu trypanu oraz liczenie w komorze Bürkera. Do uzyskania preparatów wykorzystano  $5-20 \times 10^4$  komórek, które następnie wirowano przez 5 min przy prędkości 80 g. Kolejnym etapem było barwienie preparatów przy użyciu technik Giemsy oraz hematoksylina-eozyna, a także późniejsza obserwacja i analiza w mikroskopie świetlnym.

W celu oznaczenia stężeń TGF- $\beta$ 1 wykorzystano immunoenzymatyczny test ELISA (ang. enzyme linked immunosorbent assai). Technika ta charakteryzuje się zarówno wysoką czułością, jak i swoistością. Metoda polega na rozpoznaniu i związaniu danego antygeny przez przeciwciała skoniugowane z enzymem. Kolejnym etapem jest odpłukanie nadmiaru niezwiązanych przeciwciał. Podczas reakcji z substratem dochodzi do powstania produktu o określonej barwie. Do niniejszej pracy użyto zestawu Quantikine (R&D, numer katalogowy DHG00) oraz płytki 96-dołkowej z przeciwciałem monoklonalnym przeciwko TGF- $\beta$ 1 (R&D, numer katalogowy 893003). Pierwszym etapem reakcji było dodanie do każdej studzienki rozpuszczalnika o nazwie RD1-21 (numer katalogowy 895215). W dalszym etapie do wszystkich studzienek dodano po 50  $\mu$ l odpowiedniego materiału BAL. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej dokonano trzykrotnego płukania każdej studzienki w postaci dodania każdorazowo po 400  $\mu$ l buforu płuczącego. Po usunięciu buforu dodano 100  $\mu$ l poliklonalnego przeciwciała anti-TGF- $\beta$ 1 sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Powtórnie dokonano inkubacji oraz trzykrotnego płukania, po czym dodano 100  $\mu$ l roztworu substratu. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 30 minut przy braku dostępu do światła. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie do każdej studzienki po 100  $\mu$ l 2M roztworu  $H_2SO_4$  (numer katalogowy 895032). Wyniki odczytano przy długości fali 450 nm, po czym sporządzono krzywą kalibracyjną.

Zewnątrzkomórkowa ekspresja receptora CD105 była oznaczana metodą immunofluorescencji bezpośredniej (ang. direct immunofluorescence, DIF). Do odpowiednio podpisanych probówek dodano po 100 tysięcy komórek BAL z wybranych choróbILD oraz grupy kontrolnej. Badany materiał BAL inkubowano

z 2,5  $\mu$ l swoistego przeciwciała przeciwko cząsteczce CD105, wyznakowanego fluorochromem. Komórki BAL wraz z przeciwciałem inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie dodano 2 ml roztworu PBS z 0,1% azydkiem sodu i wirowano przez 8 minut przy prędkości 300 g. Otrzymane nadsącze zlewano, a osad zawieszano w 250  $\mu$ l roztworu PBS z 2% formaldehydem. Tak przygotowane próbki analizowano przy pomocy cytometru przepływowego. Cytometria przepływowa (ang. flow cytometry, FCM) umożliwia określenie fenotypu i ilościowej analizy komórek w danej próbce. Należy zapewnić ich liniowy przepływ przez urządzenie pomiarowe. Wówczas każda komórka zostanie naświetlona przez wiązkę lasera. Takie działanie powoduje rozproszenie przez nie światła i następczą jego emisję przez związane z nimi fluorochromy. Emisja światła jest następnie przetwarzana na impulsy elektryczne, a ostateczny fenotyp komórek analizowany jest przy pomocy komputera.

W niniejszej pracy wykorzystano cytometr przepływowy FACScan, rejestrujący emisję światła w trzech kanałach o następujących długościach: 530 nm (izotiocyanian fluoresceiny, FITC, emitujący światło o barwie zielonej), 575 nm (fikoerytryna, PE, emitująca światło o barwie czerwonej) oraz 610 nm (fikoerytryna modyfikowana cysteiną 5, PeCy5, emitująca światło o barwie ciemnoczerwonej).

Wszystkie wyniki analizowano przy pomocy testu U Manna-Whitney'a. Za znamienne statystycznie uznano wyniki dla  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Immunoenzymatyczny test ELISA umożliwił określenie stężeń TGF- $\beta$ 1 w wybranych chorobach śródmiąższowych płuc. Tabela 1. przedstawia uzyskane wyniki.

**Tab. 1.** Stężenie TGF- $\beta$ 1 [pg/ml]

CHOROBA	MEDIANA $\pm$ SEM
PS	22,6 $\pm$ 1,0
IPF	33,9 $\pm$ 5 *
EAA	23,5 $\pm$ 1,3
GRUPA KONTROLNA	23,3 $\pm$ 1,4

\* $p < 0,05$

We wszystkich badanych chorobach wykryto ekspresję TGF- $\beta$ 1. Jednak za znamienne statystycznie uznano jedynie chorych z samoistnym włóknieniem płuc.

Stężenie TGF- $\beta$ 1 dla sarkoidozy i zewnątrzpochodnego alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych były zbliżone do wyników uzyskanych w grupie kontrolnej.

Ekspresję receptora pomocniczego dla TGF- $\beta$ 1 stwierdzono zarówno na makrofagach, jak i na limfocytach pęcherzykowych.

**Tab. 2.** Stężenie CD105 na makrofagach i limfocytach pęcherzykowych [%]

CHOROBA	CD105 NA MAKROFAGACH MEDIANA ± SEM	CD105 NA LIMFOCYTACH MEDIANA ± SEM
PS	59 ± 6,3	7,2 ± 0,6 *
IPF	75 ± 4,4	23,9 ± 5,8 *
EAA	62 ± 7	10,1 ± 2,5
GRUPA KONTROLNA	36 ± 9,1	13 ± 3,4

\*p&lt;0,05

Wszyscy chorzy wykazali wzrost ekspresji cząsteczki CD105 na makrofagach pęcherzykowych w porównaniu z grupą kontrolną. Największą różnicę odnotowano w przypadku IPF, jednak wynik ten, podobnie jak pozostałe, nie był znamienno statystycznie.

W przypadku limfocytów pęcherzykowych odnotowano znamienno statystycznie spadek stężenia molekuly CD105 w grupie chorych z sarkoidozą. Podobne wyniki uzyskano dla EAA, jednak brakowało tu znamienności statystycznych. Prawdopodobną przyczyną była zbyt mała liczebność grupy z zewnątrzpochodnym alergicznym zapaleniem pęcherzyków płucnych. Za znamienne statystycznie uznano natomiast wyniki chorych z IPF, gdzie odnotowano znaczny wzrost ekspresji receptora pomocniczego dla TGF-β1 na limfocytach pęcherzykowych BAL. Informacje dotyczące ekspresji cząsteczki CD105 podsumowano w tabeli 2.

## Wnioski

Niniejsza praca potwierdziła obecność TGF-β1 w materiale BAL we wszystkich grupach chorych. Ekspresja cytokiny w przypadku sarkoidozy oraz EAA nie różniła się znamienno z grupą kontrolną. W przypadku samoistnego włóknienia płuc stwierdzono wyraźnie podwyższone stężenie TGF-β1. Otrzymane wyniki w pełni korelowały z założeniami – transformujący czynnik wzrostu-β jest silnym czynnikiem profibrogennym, dlatego też w chorobach nieprzebiegających z włóknieniem płuc nie oczekiwano podwyższenia jego ekspresji. Analogicznie, w przypadku IPF, a więc choroby przebiegającej z włóknieniem płuc, jego stężenie było znamienno wyższe.

Obniżoną ekspresję receptora pomocniczego dla TGF-β1 stwierdzono na limfocytach BAL u chorych z sarkoidozą oraz EAA. Możliwe, że limfocyty pęcherzykowe w wyżej wymienionych chorobach przyjmują fenotyp komórek efektorowych o profilu Th1. W przypadku samoistnego włóknienia płuc odnotowano podwyższoną ekspresję cząsteczki CD105, co potwierdza jej współdziałanie z TGF-β1 w chorobach, przebiegających z procesem włóknienia płuc.

Reasumując, powyższe badania potwierdzają niewątpliwie udział TGF-β1 w patogenezie chorób śródmiąższowych wraz z jego pomocniczym receptorem – białkiem CD105. Możliwe, że zablokowanie swoistych receptorów dla omawianej cząsteczki

umożliwi zatrzymanie niekorzystnego włóknienia płuc, co może spowodować opracowanie potencjalnych metod leczenia dla samoistnego włóknienia płuc. Ponadto, cząsteczka CD105 wydaje się być interesującym celem badawczym dla eksperymentalnych metod terapii chorób, przebiegających z włóknieniem płuc.

## Piśmiennictwo

1. Całkosiński I., Dobrzyński M., Całkosińska M., Seweryn E., Bronowicka-Szydelko A., Dzierzba K., Ceremuga I., Gamian A. (2009), Charakterystyka odczynu zapalnego, *Postępy Hig Med Dosw.*, 63: 395-408.
2. Dallas N. A., Samuel S., Xia L., Fan F., Gray M. J., Lim S. J., Ellis L. M. (2008), Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy, *Clin Cancer Res.*, 14 (7): 1931-1937.
3. Gołęcki M., Jankowska R. (2005), Choroby śródmiąższowe płuc – współczesne poglądy na immunopatogenezę, *Adv Clin Exp Med.*, 14 (1): 171-174.
4. Harari S., Caminati A. (2010), IPF: new insight on pathogenesis and treatment, *Allergy*, 65: 537-553.
5. Jankiewicz-Ziobro K., Banaś M., Kotulska A., Kucharz E. J. (2005), Sarkoidoza, *Reumatologia*, 43 (4): 206-210.
6. Kapoun A. M., Gaspar N. J., Wang Y., Damm D., Liu Y. W., O'young G., Quon D., Lam A., Munson K., Tran T. T., Ma J. Y., Murphy A., Dugar S., Chakravarty S., Protter A. A., Wen F. Q., Liu X., Rennard S. I., Higgins L. S. (2006), Transforming growth factor-beta receptor type 1 (TGFbetaRI) kinase activity but not p38 activation is required for TGFbetaRI-induced myofibroblast differentiation and profibrotic gene expression, *Mol Pharmacol.*, 70 (2): 518-531.
7. Morty R. E., Königshoff M., Eickelberg O. (2009), Transforming growth factor-beta signaling across ages: from distorted lung development to chronic obstructive pulmonary disease, *Proc Am Thorac Soc*, 6 (7): 607-613.
8. Shi W., Xu J., Warburton D. (2009), Development, repair and fibrosis: what is common and why it matters, *Respirology*, 14 (5): 656-665.
9. Takenoshita S., Fukushima T., Kumamoto K., Iwadata M. (2002), The role of TGF- $\beta$  in digestive organ disease, *Journal of Gastroenterology*, 37 (12): 991-999.
10. Wiatr E., Radzikowska E., Pawłowski J. (2004), Zwłóknienie płuc u młodych chorych na alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 72: 111-116.