

mgr inż. Wojciech Langwiński

**Identyfikacja mikroRNA związanych
z alergicznym stanem zapalnym w drogach oddechowych na modelu
zwierzęcym**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Prof. dr hab. Aleksandra Szczepankiewicz

Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2020

Słowa kluczowe:

Astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa, miRNA, sekwencjonowanie nowej generacji, ekspresja genów

Bronchial asthma, allergic rhinitis, miRNA, next-generation sequencing, gene expression

**Rozprawa doktorska została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki,
przyznanych w ramach grantu Preludium, nr 2016/23/N/NZ4/03246 (W. Langwiński)**

*Składam serdeczne podziękowania wszystkim tym,
którzy przyczynili się do powstania tej pracy, a w szczególności:*

*Pani Prof. dr hab. Aleksandrze Szczepankiewicz za cierpliwość, motywację
i nieocenioną pomoc merytoryczną*

*Zespołowi Katedry Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt na
Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu za cenne uwagi merytoryczne
i pomoc w czasie pracy laboratoryjnej*

*Pragnę również podziękować Rodzinie i Przyjaciółom za ciągłą motywację
i wsparcie, bez których napisanie tej pracy nie byłoby możliwe.*

Spis treści

1. SPIS TABEL I RYCIN	7
2. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	10
3. WSTĘP.....	12
3.1. Patogeneza astmy i alergicznego nieżyty nosa.....	12
3.2. Współwystępowanie astmy oskrzelowej i alergicznego nieżyty nosa	16
3.3. Biogeneza małych, niekodujących RNA (miRNA)	18
3.4. Metody identyfikacji i analizy profilu ekspresji miRNA	21
3.5. Rola miRNA w chorobach alergicznych na przykładzie astmy oskrzelowej i alergicznego nieżyty nosa	24
4. CELE PRACY DOKTORSKIEJ	28
5. MATERIAŁY I METODY	29
5.1. Test immunoenzymatyczny ELISA.....	29
5.2. Analiza histologiczna	29
5.4. Odczynniki.....	31
5.5. Jednoczesna izolacja miRNA i RNA.....	34
5.6. Ocena jakościowa i ilościowa wyizolowanego RNA / miRNA	34
5.7. Sekwencjonowanie nowej generacji.....	35
5.8. Analiza ekspresji miRNA z wykorzystaniem reakcji ilościowego PCR.....	38
5.9. Analiza predykcyjna <i>in silico</i> genów docelowych dla miRNA.....	42
5.10. Analiza ontologiczna genów docelowych dla miRNA.....	42
5.11. Analiza statystyczna	43
6. WYNIKI.....	44
6.1. Wyniki analizy walidacji modelu zwierzęcego	44
6.1.1. Analiza stężenia przeciwciał klasy IgE w surowicy szczurów Brown Norway	44
6.1.2. Analiza histologiczna tkanki płuc	45
6.2. Ocena jakościowa próbek RNA	46
6.3. Wyniki oceny jakościowej i ilościowej bibliotek miRNA	46
6.4. Analiza wyników sekwencjonowania	54

6.4.1. Ocena jakości odczytów	54
6.4.2. Analiza bioinformatyczna – charakterystyka bibliotek miRNA	56
6.4.3. Analiza różnicowa ekspresji profilu miRNA	60
6.5. Analiza ekspresji miRNA z wykorzystaniem techniki PCR czasie rzeczywistym.....	60
6.6. Predykcja <i>in silico</i> genów docelowych dla miRNA	62
6.7. Analiza ontologiczna genów docelowych dla miRNA	64
7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW	67
9. WNIOSKI	83
10. STRESZCZENIE.....	84
11. SUMMARY.....	86
12. PIŚMIENNICTWO	88
13. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ	109

1. SPIS TABEL I RYCIN

Spis rycin:

Ryc. 1. Mechanizm uwrażliwienia na alergen.....	14
Ryc. 2. Biogeneza cząsteczek miRNA.....	20
Ryc. 3. Porównanie wzorów strukturalnych klasycznych monomerów wchodzących w skład DNA/RNA z monomerem modyfikowanym w technologii LNA.....	23
Ryc. 4. Krzywa wzorcowa wykorzystana w teście ELISA do oceny stężenia IgE.....	44
Ryc. 5. Stężenie przeciwciał IgE w surowicy szczurów Brown Norway.....	45
Ryc. 6. Analiza histologiczna płuc szczurów uczulonych.....	45
Ryc. 7. Elektroforegram dla próbki RNA wyizolowanej z płuc szczura.....	46
Ryc. 8. Obraz żeli poliakrylamidowych z widocznymi bibliotekami miRNA.....	47
Ryc. 9. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych z płuc szczurów uczulonych.....	49
Ryc. 10. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych z płuc szczurów kontrolnych.....	50
Ryc. 11. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych nabłonka nosa szczurów uczulonych.....	51
Ryc. 12. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych z nabłonka nosa szczurów kontrolnych.....	52
Ryc. 13. Wzór wykorzystany do normalizacji stężenia bibliotek miRNA.....	54
Ryc. 14. Wartość współczynnika Q i odpowiadająca mu liczba odczytów.....	54
Ryc. 15. Wartość współczynnika Q dla pozycji w odczycie.....	55
Ryc. 16. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów w odczycie.....	55
Ryc. 17. Charakterystyka rozkładu długości odczytów w poszczególnych bibliotekach miRNA.....	56
Ryc. 18. Wykres PCA dla logarytmu znormalizowanej liczby odczytów dla bibliotek miRNA otrzymanych z płuc.....	58

Ryc. 19. Wykres PCA dla logarytmu znormalizowanej liczby odczytów bibliotek miRNA otrzymanych z nabłonka nosa.....	58
Ryc. 20. Wykres MA charakteryzujący rozkład liczby odczytów i krotność zmian dla miRNA otrzymanych z płuc.....	59
Ryc. 21. Wykres MA charakteryzujący rozkład liczby odczytów i krotność zmian dla miRNA otrzymanych z nabłonka nosa.....	59
Ryc. 22. Krotność zmiany ekspresji genów miRNA wykazujących istotnie zmienioną ekspresję.....	60
Ryc. 23. Krotność zmian ekspresji mno-miR-223-3p w stosunku do mno-miR-26a.....	61
Ryc. 24. Korelacja rang Spearman dla wartości ekspresji no-miR-223-3p i stężenia IgE w surowicy szczurów grupy badanej.....	61

Spis tabel:

Tabela 1. Odczynniki i materiały wykorzystane w eksperymencie indukcji stanu zapalnego, izolacji RNA, reakcji odwrotnej transkrypcji oraz analizy ekspresji miRNA.....	31
Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej ligacji adaptera 3'.....	36
Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji.....	36
Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej łańcuchowej reakcji polimerazy.....	37
Tabela 5. Profil termiczny łańcuchowej reakcji polimerazy.....	37
Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej poliadenylacji.....	39
Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej ligacji.....	39
Tabela 8. Skład mieszaniny do odwrotnej transkrypcji.....	40
Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji preamplifikacji.....	40
Tabela 10. Sekwencje miRNA i numery katalogowe wykorzystanych zestawów reakcyjnych.....	41
Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	41
Tabela 12. Profil termiczny reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	42
Tabela 13. Stężenia bibliotek miRNA otrzymanych z płuc i nabłonka nosa.....	53

Tabela 14. Szczegółowa charakterystyka otrzymanych bibliotek miRNA.....	57
Tabela 15. Geny docelowe wybrane dla miRNA istotnie zróżnicowanych w reakcji sekwencjonowania.....	62
Tabela 16. Geny docelowe regulowane przez rno-miR-223-3p.....	63
Tabela 17. Analiza szlaków biologicznych regulowanych przez geny docelowe wybrane dla miRNA ulegających istotnie zwiększonej ekspresji w reakcji sekwencjonowania.....	64
Tabela 18. Analiza szlaków biologicznych regulowanych przez geny docelowe wybrane dla miRNA ulegających istotnie obniżonej ekspresji w reakcji sekwencjonowania.....	65
Tabela 19. Analiza szlaków biologicznych regulowanych przez geny docelowe dla rno-miR-223-3p.....	66

2. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

MHC	Główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>Major histocompatibility complex</i>)
HDM	Roztocz kurzu domowego (ang. <i>House dust mite</i>)
APC	Komórka prezentująca antygeny (ang. <i>Antigen-presenting cell</i>)
DC	Komórka dendrytyczna (ang. <i>Dendritic cell</i>)
PRR	Receptor rozpoznający wzorce (ang. <i>Pattern recognition receptor</i>)
CLR	Receptor lektynowy typu C (ang. <i>C-type lectin receptor</i>)
TLR	Receptor Toll – podobny (ang. <i>Toll-like receptor</i>)
MR	Receptor mannozowy (ang. <i>Mannose receptor</i>)
LPS	Lipopolisacharydy (ang. <i>Lipopolysaccharides</i>)
PAR	Receptor aktywowany proteazami (ang. <i>Protease-activated receptor</i>)
TSLP	Limfopoetyna zrębu grasicy (ang. <i>Thymic stromal lymphopoietin</i>)
GM-CSF	Czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (ang. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>).
TGF- α	Transformujący czynnik wzrostu alfa (ang. <i>Transforming growth factor alpha</i>)
VEGF A	Czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>Vascular endothelial growth factor A</i>)
TNF- α	Czynnik martwicy nowotworów (ang. <i>Tumor necrosis factor α</i>)
MMP	Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. <i>Matrix metalloproteinases</i>)

TIMP-1	Tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 (ang. <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>)
PCR	Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>Polymerase chain reaction</i>)
NGS	Sekwencjonowanie nowej generacji (ang. <i>Next Generation Sequencing</i>)

3. WSTĘP

3.1. Patogeneza astmy i alergicznego nieżytu nosa

Astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa są przykładami chorób o potwierdzonym podłożu zapalnym. Głównym patomechanizmem regulującym ich przebieg jest nadreaktywność układu immunologicznego na antygeny środowiskowe – alergeny, głównie białkowe i glikoproteiny [1]. Do najistotniejszych alergenów wziewnych w patogenezie astmy i alergicznego nieżytu nosa należą roztocza kurzu domowego, pyłki traw wiatropylnych i drzew, zarodniki grzybów pleśniowych oraz sierść zwierząt domowych [2], [3]. Pomimo, iż spektrum objawów występujących w odpowiedzi na alergen, jak również miejsce ich występowania jest różne dla astmy i alergicznego nieżytu nosa, choroby te łączy wspólny patomechanizm nadwrażliwości typu 1 według klasyfikacji Gella i Coombsa [4]. Wspomniany patomechanizm polega na skłonności do nadprodukcji przeciwciał klasy IgE i jest wspólny dla wszystkich chorób alergicznych o podłożu IgE – zależnym m.in. dla astmy oskrzelowej, czy alergicznego nieżytu nosa, ale również dla alergicznego zapalenia spojówek, atopowego zapalenia skóry bądź pokrzywki alergicznej [5].

Mechanizm odpowiedzi na alergen jest procesem złożonym, a w jego przebiegu udział biorą różne typy komórek zarówno te pochodzące z układu immunologicznego, jak i strukturalne. Po wnikięciu do organizmu alergen zostaje rozpoznany przez komórki prezentujące antygeny (APC), spośród których kluczową rolę pełnią komórki dendrytyczne (DC). Dzięki ekspresji białek błonowych z rodziny kładyn i okludyn, komórki dendrytyczne tworzą połączenia ścisłe z komórkami nabłonka dróg oddechowych. Dzięki temu DC mogą wychwytywać alergeny ze środowiska zewnętrznego, co indukuje odpowiedź immunologiczną [6].

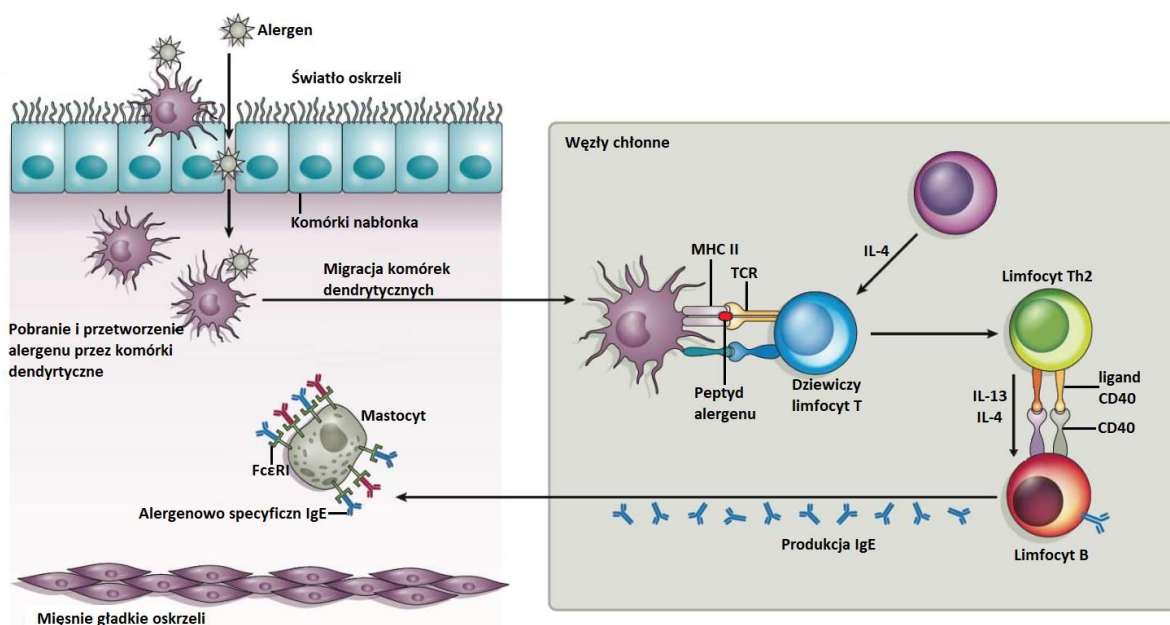
Mechanizm rozpoznawania alergenów jest uzależniony od ich struktury i odpowiadającym im receptorom rozpoznającym wzorce (PRR), obecnym na powierzchni komórek dendrytycznych. Najistotniejszymi z punktu widzenia odpowiedzi na alergen są receptory lektynowe typu C (CLR) oraz receptory Toll – podobne (TLR) [7]. Do tych pierwszych należą receptory mannozowe (MR) oraz receptory DC-SIGN rozpoznające reszty cukrowe (mannozy/fruktozy) wchodzące w skład wielu alergenów, takich jak roztocza kurzu domowego, czy sierść zwierząt domowych [8], [9]. Z kolei TLR są odpowiedzialne głównie za rozpoznawanie lipopolisacharydów (LPS), stanowiących element strukturalny ściany komórkowej wielu bakterii Gram ujemnych [10]. Oprócz receptorów obecnych na powierzchni komórek dendrytycznych, istotną rolę w odpowiedzi na alergen odgrywają również komórki nabłonka dróg oddechowych. Na ich powierzchni znajdują się receptory Toll-podobne oraz receptory aktywowane proteazami (PAR). Do aktywacji tych ostatnich dochodzi na skutek proteolitycznego cięcia ich N-terminalnej domeny przez niektóre alergeny

o właściwościach enzymatycznych. Należy do nich między innymi białko Der p1, będące proteazą cysteinową i głównym alergenem roztoczy kurzu domowego z gatunku *Dermatophagoides pteronyssinus* [11]–[13].

W patogenezie zapalenia alergicznego komórki nabłonka dróg oddechowych są źródłem licznych cytokin i chemokin prozapalnych, takich jak TSLP, IL-25, IL-33, IL-1 β oraz czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Głównym zadaniem tych substancji jest aktywacja komórek układu immunologicznego, jak również ich rekrutacja do miejsca objętego zapaleniem [14], [15]. Aktywność proteolityczna niektórych alergenów skutkuje również degradacją białek (klaudyn, okludyn) wchodzących w skład połączeń ścisłych pomiędzy komórkami nabłonka dróg oddechowych. Zwiększa to ich przepuszczalność i umożliwia wnikanie alergenów do tkanek leżących pod nabłonkiem dróg oddechowych, aktywując komórki dendrytyczne obecne w błonie śluzowej i podśluzowej [6], [16]. Aktywowana komórka dendrytyczna migruje następnie do węzłów chłonnych w obrębie układu limfatycznego, gdzie alergen zostaje przetworzony enzymatycznie do pojedynczych peptydów. Kluczową rolę w tym procesie odgrywiają katepsyny – enzymy wewnątrzkomórkowe o właściwościach proteolitycznych. Pofragmentowane peptydy w kompleksie z białkami głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II) zostają zaprezentowane na powierzchni komórek dendrytycznych [17], [18]. Powstały kompleks MHC II – antygen wiąże się następnie do receptorów TCR na powierzchni dziewiczych limfocytów T CD4⁺ (ang. *naïve T cells*). Dzięki temu limfocyty dziewicze różnicują w limfocyty T pomocnicze o fenotypie Th1, Th2 lub Th17 [19]–[21]. Alternatywnie, może dojść do aktywacji limfocytów regulatorowych T (Treg) i wyciszenia odpowiedzi dzięki indukcji tolerancji immunologicznej [22].

Mechanizm wyboru odpowiedzi na alergen jest ściśle uzależniony od typu antygeny prezentowanego limfocytom T, jak również od środowiska cytokin regulujących ten proces. W przypadku chorób przebiegających zgodnie z mechanizmem nadreaktywności typu 1, dziewicze limfocyty T pod wpływem IL-4 różnicują w kierunku komórek o fenotypie Th2. Aktywowane limfocyty Th2 migrują następnie do dróg oddechowych, gdzie są źródłem cytokin prozapalnych takich jak IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 czy GM-CSF [23]–[25]. Dodatkowo, limfocyty Th2, a w szczególności syntetyzowana przez nie IL-5 oraz IL-6, aktywują limfocyty B do różnicowania w komórki plazmatyczne, odpowiedzialne za produkcję przeciwciał specyficznych dla danego alergenu [26]. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa mechanizm przełączenia klas syntetyzowanych przeciwciał. Na skutek stymulacji IL-4 oraz IL-13 dochodzi do rearanżacji części stałej łańcucha ciężkiego, w wyniku czego następuje przesunięcie syntezy przeciwciał w kierunku klasy IgE. Istotną rolę w tym procesie odgrywiają również białka błonowe obecne na powierzchni

limfocytów B (CD40 i CD80/86) oraz limfocytów Th2 (ligand CD40 i CD28), biorące udział w specyficznym wiązaniu wspomnianych populacji limfocytów. Przeciwciała IgE przedostają się następnie z układu limfatycznego do krwiobiegu. Krążące we krwi IgE łączą się z receptorami wysokiego powinowactwa do IgE (FcεRI) obecnymi na powierzchni obecnych w tkankach bazofilów i mastocytów (komórek tucznych). Proces ten określany jest jako uczulenie lub uwrażliwienie, a jego przebieg przedstawiono na rycinie 1 [27], [28].



Ryc. 1. Mechanizm uwrażliwienia na alergen. Zmodyfikowano na podstawie [27].

Przy kolejnym kontakcie organizmu z tym samym antygenem, reakcja ze strony układu immunologicznego przebiega w sposób zdecydowanie szybszy. Przy ponownym kontakcie alergen zostaje związany przez swoiste przeciwciała IgE, zakotwiczone na powierzchni mastocytów i bazofilów. Efektem tych procesów jest aktywacja tych komórek i natychmiastowe (w ciągu kilku minut) uwolnienie licznych mediatorów stanu zapalnego, obecnych w ich cytoplazmie [29]. Substancje te podzielić można na mediatory preformowane (histamina, tryptaza, chymaza, heparyna) – zmagazynowane w ziarnistościach cytoplazmatycznych oraz generowane (leukotrieny, prostaglantyny - głównie PGD2, tromboksany) [28], [30]. Aktywowane mastocyty i bazofile są również źródłem cytokin oraz chemokin prozapalnych (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13), a także czynników wzrostu (TNF-α, VEGFA). Substancje wydzielane przez aktywowane mastocyty i bazofile indukują nadprodukcję śluzu (IL-13, histamina, tryptaza, TNF-α), zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych (histamina, VEGFA, leukotrieny), wykazują działanie wazodylatacyjne (histamina, PGD2, leukotrieny) oraz rekrutują komórki układu immunologicznego do miejsca objętego zapaleniem (TNF-α, PGD2, LTB-4, IL-8, CCL2) [27],

[31], [32]. Ze względu na szybki mechanizm działania bezpośrednie następstwa degranulacji mastocytów i bazofilów, określane są terminem fazy wczesnej reakcji alergicznej. Istotną rolę w tym procesie odgrywa histamina, uwalniana z ziarnistości obecnych w mastocytach i bazofilach do tkanek sąsiadujących. Histamina poprzez wiązanie się do receptorów w drogach oddechowych indukuje szereg objawów charakterystycznych zarówno dla astmy, jak i alergicznego nieżytu nosa. W przypadku astmy oskrzelowej histamina indukuje skurcz mięśni gładkich, który manifestuje się zwężeniem oskrzeli i ograniczeniem przepływu powietrza. Poza zwężeniem światła oskrzeli histamina prowadzi do stymulacji zakończeń włókien nerwowych, aktywujących układ cholinergiczny [33], [34]. Zwężenie oskrzeli powoduje szereg objawów ze strony układu oddechowego m.in. świszczący oddech, kaszel, duszność, a w skrajnych przypadkach może doprowadzić do zatrzymania oddychania i śmierci chorego. Wszystkie te objawy występują spontanicznie (często podczas godzin nocnych lub wczesno porannych) lub są prowokowane przez czynniki specyficzne (ekspozycja na alergen) lub niespecyficzne (wysiłek fizyczny, dym papierosowy, zimne powietrze, czynniki chemiczne i drażniące). W przypadku alergicznego nieżytu nosa objawy fazy wczesnej manifestują się jako wodnisty katar, świąd i przekrwienie błony śluzowej nosa [1], [35].

Po kilku godzinach (od 2 do 6 godzin) od momentu ustąpienia fazy wczesnej dochodzi do ponownego pojawienia się objawów reakcji alergicznej, określanej terminem fazy późnej. W tym przypadku odpowiedź organizmu jest ściśle związana z udziałem komórek układu immunologicznego: neutrofilów, monocytów, eozynofilów, bazofilów oraz limfocytów T. Komórki te, aktywowane w fazie wczesnej, w wyniku chemotaksji migrują do tkanek objętych zapaleniem. Czasowe opóźnienie w wystąpieniu objawów fazy późnej wynika również z samej kinetyki działania mediatorów generowanych i cytokin prozapalnych, uwalnianych w fazie wczesnej przez mastocyty i bazofile. Substancje te, w odróżnieniu od mediatorów preformowanych, osiągają swoją najwyższą efektywność dopiero po kilku godzinach od momentu ich uwolnienia z cytoplazmy komórkowej [36].

Kluczową rolę w przebiegu fazy późnej odgrywają produkowane przez limfocyty Th2 cytokiny prozapalne, z których najistotniejszymi z punktu widzenia odpowiedzi na alergen są IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 oraz IL-1 β . Stymulują one dojrzewanie i aktywację eozynofilów – komórek niezbędnych dla rozwoju zapalenia alergicznego w obrębie górnych i dolnych dróg oddechowych. Ponadto, wspomniane cytokiny zwiększają ekspresję selektywny E i L – cząsteczek adhezyjnych, odpowiedzialnych za wychwytywanie krążących w krwiobiegu eozynofilów oraz ich chemotaksję do tkanek objętych zapaleniem w procesie diapedezy. Przenikanie komórek układu immunologicznego do miejsca zapalenia indukuje też histamina i inne mediatory uwalniane

podczas fazy wczesnej reakcji alergicznej, które zwiększają przepuszczalność śródbłona naczyniowego. Zwiększona infiltracja eozynofilów jest również efektem nadprodukcji elastazy – enzymu aktywującego metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs). Te ostatnie biorą udział w degradacji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, ułatwiając chemotaksję komórek zapalnych [27]. Dodatkowo, aktywowane eozynofile po dotarciu do tkanek objętych zapaleniem, syntetyzują i wydzielają ziarnistości zawierające związki bioaktywne takie jak: białka kationowe, zasadowe, peroksydazy eozynofilowe, czy reaktywne formy tlenu. Nadprodukcja tych związków skutkuje uszkodzeniem i złuszczeniem komórek nabłonka dróg oddechowych, powodując odsłonięcie tkanek leżących pod nabłonkiem dróg oddechowych [37], [38].

Komórki układu immunologicznego mają również swój udział w przebudowie dróg oddechowych. Istotną rolę w tym procesie odgrywa przekształcenie komórek nabłonka dróg oddechowych w komórki mezenchymy (fibroblasty). W warunkach fizjologicznych, proces ten jest w pełni odwracalny i pełni kluczową rolę w naprawie uszkodzonego nabłonka oddechowego [39]. W warunkach patologicznych, związki syntetyzowane i wydzielane przez komórki zapalne (takie jak TGF- β) indukują proliferację fibroblastów, hamując tym samym ich różnicowanie w komórki nabłonka. Fibroblasty są źródłem licznych białek (kolageny, fibronektyna, tenascyny, proteoglikany), wchodzących w skład macierzy zewnątrzkomórkowej. W warunkach fizjologicznych nadmierne ilości białka macierzy podlegają degradacji przez enzymy z grupy metaloproteinaz (MMP), a proces ten jest regulowany przez inhibitor metaloproteinaz-1 (TIMP-1). W warunkach patologicznych dochodzi do zwiększonej ekspresji TIMP-1, czego efektem jest spadek aktywności MMP. Skutkuje to nadprodukcją i nadmiernym odkładaniem się białek macierzy w tkankach leżących pod nabłonkiem dróg oddechowych, co określane jest jako włóknienie podnabłonkowe. W następstwie tych procesów dochodzi do pogrubienia i usztywnienia ścian oskrzeli, zwężenia ich światła, czego efektem jest ograniczenie przepływu powietrza. Mniejsza elastyczność ścian oskrzeli przekłada się również na słabą odwracalność obturacji. Co więcej usztywnienie ścian oskrzeli jest również efektem zwiększonej liczby i masy mięśni gładkich. Ogół zmian prowadzących do przebudowy dróg oddechowych określa się terminem remodeling [40]–[42].

3.2. Współwystępowanie astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa

Według informacji publikowanych przez Global Asthma Network, liczba chorych cierpiących na astmę w populacji ogólnej sięga blisko 300 milionów, a do roku 2025 wartość ta może wzrosnąć nawet o kolejne 100 milionów [43]. Problem dotyczy głównie krajów rozwiniętych

i rozwijających się, gdzie zapadalność na astmę szacowana jest w szerokim zakresie od 1% do nawet 18%. Uważa się, że za ogólny wzrost liczby zachorowań odpowiada zachodni tryb życia i nadmierna eliminacja ze środowiska czynników infekcyjnych (bakterie, pasożyty). Skutkuje to ograniczeniem odpowiedzi Th1, co sprzyja przetrwaniu fenotypu płodowego – odpowiedzi Th2 i rozwinięciu reakcji alergicznej [44]. Obserwacje te były podstawą sformułowania hipotezy higienicznej [45]. Do czynników warunkujących rozwój chorób alergicznych należy indywidualna podatność genetyczna (w tym obciążenie rodzinne) oraz ekspozycja na środowiskowe czynniki ryzyka (alergeny, infekcje wirusowe, zanieczyszczenia powietrza, dym tytoniowy) [46]. Ponadto, osobniczym czynnikiem ryzyka są również wiek i płeć. Zapadalność na astmę alergiczną jest najwyższa u dzieci (w populacji polskiej wynosi około 11 %) [47], [48], u chłopców we wczesnym dzieciństwie [49] oraz dziewczynek w okresie dojrzewania płciowego [50]. Czyni to astmę alergiczną najczęstszą chorobą przewlekłą dróg oddechowych wieku dziecięcego.

Na chwilę obecną wiadomo, że astma współwystępuje często z innymi chorobami alergicznymi - najczęściej z alergicznym nieżytem nosa, który dotyczy nawet 20 -30% populacji ogólnej [51]. W jednym z pierwszych badań potwierdzających współwystępowanie wspomnianych chorób przeprowadzonym w 1998 roku przez Greisner i wsp. [52] wykazano, że w przebadanej populacji jedynie 14,3% pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową nie miało objawów alergicznego nieżytu nosa. Z kolei inne badanie przeprowadzone przez Simons i wsp. [53] z wykorzystaniem bardziej precyzyjnych protokołów wywiadu lekarskiego sugerowały, że liczba osób cierpiących na obie choroby sięgać może nawet 98,9% spośród wszystkich przebadanych. Obecnie, szacuje się, że ponad połowa pacjentów ze zdiagnozowanym alergicznym nieżytem nosa choruje również na astmę, podczas gdy 80% pacjentów z astmą wykazuje objawy alergicznego nieżytu nosa [54]–[56]. Ta współzachorowalność jest przyczyną zwiększonej absencji w szkole lub pracy, i utrudnia skuteczne leczenie [57].

Pomimo udokumentowanego współwystępowania astmy i alergicznego nieżytu nosa, przyczyna wspomnianej zależności nie została w pełni poznana. Kluczową rolę w badaniach nad patomechanizmem współwystępowania obu chorób odgrywa wspólne podłoże nadwrażliwości typu pierwszego. Sugeruje się, że anatomiczna budowa dróg oddechowych przekłada się na ciągłość procesów zachodzących w górnych i dolnych drogach oddechowych. W związku z tym procesy patologiczne, zachodzące w górnym odcinku dróg oddechowych mogą indukować podobne zmiany w dolnych drogach oddechowych, co w literaturze anglojęzycznej naukowej określa się terminem "*one airway - one disease*" lub "*unified airway disease*" [58]–[60]. Co więcej, wspólne podłoże molekularne pozwala przypuszczać, że możliwa będzie identyfikacja genów zaangażowanych w regulację zapalenia alergicznego zarówno w górnych, jak i dolnych drogach oddechowych [61],

[62]. Należy przypuszczać, iż produkty wspomnianych genów (białka / związki niskocząsteczkowe) stymulują sąsiadujące komórki do odpowiedzi zapalnej. Skutkiem tych procesów jest rozprzestrzenianie się zapalenia alergicznego w obrębie całego układu oddechowego. Przypuszcza się, że decydującą rolę w wyżej wspomnianym procesie mogą odgrywać małe niekodujące RNA (miRNA), cząsteczki umożliwiające skoordynowaną regulację ekspresji wielu genów. Udział miRNA w patologicznej regulacji ekspresji genów potwierdzono między innymi w procesach nowotworzenia [63]–[65], chorobach autoimmunologicznych [66], [67], czy zapalnych o podłożu alergicznym [68], [69]. Ponadto, miRNA stanowią obiecujący kierunek badań pod kątem ich wykorzystania jako biomarkerów czy nowych celów terapii wielu chorób, w tym również astmy i alergicznego nieżytu nosa.

3.3. Biogeneza małych, niekodujących RNA (miRNA)

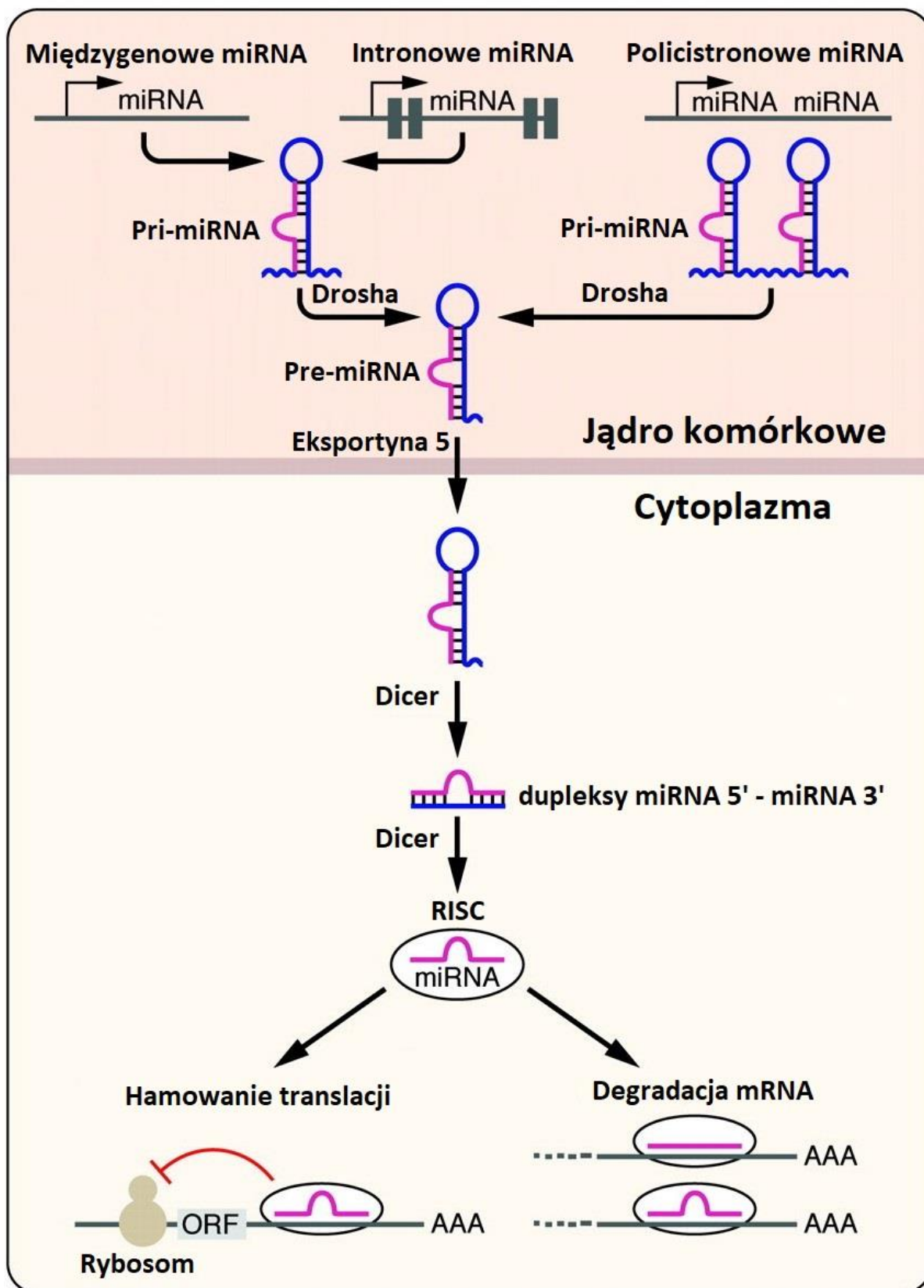
MikroRNA (miRNA) stanowią grupę krótkich (19-23 nukleotydy długości), jednoniciowych, niekodujących RNA, odpowiedzialnych za potranskrypcyjną regulację ekspresji genów kodujących białka. Cząsteczki te zidentyfikowano w komórkach roślinnych i zwierzęcych, w których regulują ekspresję nawet 1/3 wszystkich genów. Biogeneza miRNA rozpoczyna się w jądrze komórkowym, a jej dokładny przebieg jest uzależniony od lokalizacji genomowej ich sekwencji. MiRNA mogą być zlokalizowane zarówno w intronach, jak i w eksonach innych genów kodujących białka. Alternatywnie geny miRNA mogą funkcjonować jako niezależne jednostki transkrypcyjne, podlegając regulacji własnych promotorów. Co ciekawe część z wyżej opisanych sekwencji miRNA występuje w skupiskach określanych jako klastry (ang. *clusters*), wspólnie regulowanych i transkrybowanych jako jednostki policistronowe [70], [71].

Mając na uwadze lokalizację genomową sekwencji miRNA, wyróżnić można ścieżkę kanoniczną i alternatywną (niekanoniczną) ich biosyntezy. Pierwsza z wymienionych (droga kanoniczna) dominuje u większości miRNA i jest dedykowana dla genów występujących jako niezależne jednostki transkrypcyjne. Pierwszym jej etapem jest powstanie pierwotnego transkryptu pri-miRNA (ang. *primary miRNA*) o strukturze szpilki do włosów i długości sięgającej nawet kilku tysięcy par zasad. Ścieżka niekanoniczna biosyntezy dotyczy z kolei sekwencji miRNA zlokalizowanych w intronach innych genów kodujących białka. W tym przypadku biosynteza pri-miRNA przebiega przy okazji procesu wycinania intronów (splicing) z sekwencji mRNA, podczas gdy pozostałe etapy biosyntezy są identyczne, jak w przypadku ścieżki kanonicznej [72].

Struktury pri-miRNA w jądrze komórkowym są następnie rozpoznawane przez tak zwany kompleks mikroprocesorowy, złożony z dwóch białek eukariotycznych - DGCR8 (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) oraz rybonukleazy III Drosha. Pierwszy z wymienionych rozpoznaje określone sekwencje w obrębie pierwotnego transkryptu, regulując tym samym jego cięcie rybonukleazą III Drosha. W następstwie tych procesów powstają struktury o długości 60 -100 nukleotydów, określane jako prekursorowi miRNA (pre-miRNA). Są one transportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy. Proces ten regulowany jest przez eksportynę 5 – białko transportowe, które do funkcjonowania wykorzystuje energię powstałą z rozpadu trójfosforanów 5' guanozyny (GTP) [73], [74].

Pre-miRNA w cytoplazmie podlega następnie obróbce przez kolejną rybonukleazę III – enzym Dicer. Regiony tworzące pętlę zostają usunięte, a cała struktura przycięta do dwuniciowego RNA, w którym wyróżnić można dwie nici oznaczone jako 5' i 3', co odpowiada ich wcześniejszemu ułożeniu w strukturze pre-miRNA. Następnie, jedna z nici podlega degradacji, podczas gdy druga zostaje wbudowana w kompleks RISC (ang. *microRNA induced silencing complex*). Ten ostatni zbudowany jest z białek oraz RNA i służy do potranskrypcyjnej regulacji ekspresji mRNA. To, która nić ulega wbudowaniu w kompleks RISC, a która podlega degradacji jest zjawiskiem zmiennym, zależnym od wielu czynników, takich jak rodzaj komórki, czy jej status biologiczny. Na tej podstawie nić służąca do regulacji ekspresji genów nazywana jest często nicią wiodącą (zwyczajowo 5p), podczas gdy ta druga określana jest sekwencją pasażerską (zwyczajowo 3p) [75], [76].

Negatywna regulacja ekspresji mRNA odbywa się poprzez związanie regionu 3'UTR danego transkryptu przez dojrzałe cząsteczki miRNA (będącej częścią kompleksu RISC) na zasadzie komplementarności zasad azotowych. Wspomniana komplementarność nie obejmuje pełnej sekwencji miRNA, a jedynie 7 nukleotydów, określanych w literaturze angielskiej terminem „*seed sequence*”, która odpowiada za selektywny wybór transkryptów przeznaczonych do regulacji. Negatywna regulacja związanego mRNA może przebiegać poprzez degradację mRNA (częściej u roślin) lub przez związanie transkryptu i blokowanie jego dalszej translacji (dominuje u zwierząt) [77], [78]. Biogeneza miRNA została przedstawiona na rycinie 2.



Ryc. 2. Biogeneza cząsteczek miRNA z uwzględnieniem genomowej lokalizacji ich sekwencji. Zmodyfikowano na podstawie [79].

3.4. Metody identyfikacji i analizy profilu ekspresji miRNA

Odkrycie nowej klasy niekodujących RNA i ich udziału w regulacji ekspresji genów zapoczątkowało intensywne badania nad rolą miRNA w patogenezie chorób człowieka. Niezwykle pomocnym okazał się rozwój nowych, wysokoprzepustowych technik, pozwalających na jednoczesną analizę ekspresji wielu sekwencji miRNA z małej ilości materiału biologicznego.

Techniką, która zyskała niewątpliwą popularność w oznaczaniu ekspresji puli cząsteczek miRNA są mikromacierze. W literaturze naukowej opisano wiele różnych metod, a różnice dotyczą głównie: rodzaju sondy specyficznej do sekwencji miRNA, metody znakowania, czy sposobu wykrywania sygnału. W protokole opisanym przez Liu i wsp. [80] wykorzystuje się 40-nukleotydowe sondy, specyficznie rozpoznające sekwencje w obu ramionach struktury spinki do włosów (pre-miRNA). Pozwala to na późniejszą detekcję zarówno dojrzałych cząsteczek miRNA jak i ich prekursorów. Alternatywnie, sonda może być komplementarna jedynie do wybranej sekwencji miRNA w obrębie nici wiodącej lub pasażerskiej. W celu efektywnego związania sondy z powierzchnią macierzy, te pierwsze podlegają modyfikacji na przykład poprzez wzbogacenie ich 5' końca o ligandy aminowe. Wyizolowany materiał RNA (zawierający frakcję miRNA) jest następnie przepisywany na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Jako startery do reakcji wykorzystywane są oligonukleotydy o długości 8 nukleotydów (ang. *random octamer primer*), znakowane na końcu 5' biotyną. Produkt reakcji odwrotnej transkrypcji jest następnie nakładany na mikromacierz, gdzie hybryduje z sondami, specyficznymi do wybranych sekwencji miRNA. Następnie na mikromacierz dodawany jest barwnik fluorescencyjny, skoniugowany z białkiem streptawidyną. Wiązanie tego ostatniego (streptawidyny) z biotyną (obecną w strukturze starterów wykorzystanych do reakcji odwrotnej transkrypcji) jest jednym z najsilniejszych wiązań niekowalencyjnych [81] i jest powszechnie wykorzystywany w biologii molekularnej [82]. Alternatywnym rozwiązaniem jest zastosowanie nukleotydów znakowanych cyjaniną, wbudowywanych do cDNA podczas ligacji [83] lub wykorzystaniu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) [84]. Niezależnie od wybranej metody znakowania, powierzchnia mikromacierzy jest następnie naświetlana skoncentrowaną wiązką lasera, czego efektem jest wzbudzenie fluorescencji w zastosowanym fluorochromie. Intensywność sygnału świetlnego, proporcjonalna do ekspresji danego miRNA, jest następnie odczytywana z każdego fragmentu mikromacierzy i analizowana z wykorzystaniem narzędzi analizy bioinformatycznej.

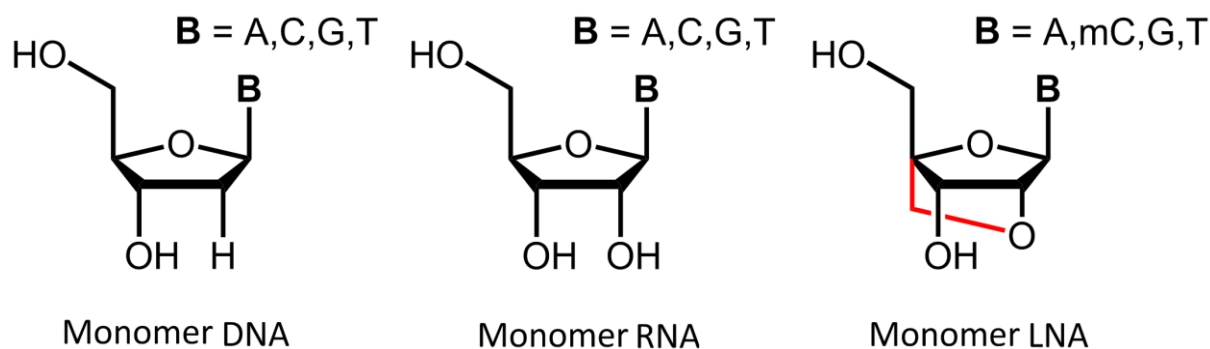
Przełomem w profilowaniu ekspresji miRNA było wykorzystanie do tego celu sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS). Dokładny przebieg reakcji NGS, jak również późniejsza analiza bioinformatyczna otrzymanych wyników jest

uzależniona od dostępnego komercyjnie zestawu do sekwencjonowania oraz od rodzaju samego sekwenatora. W większości przypadków metoda ta oparta jest o wykorzystanie krótkich, syntetycznych adapterów dodawanych do końca 3' i 5' cząsteczek miRNA. Celem wspomnianej ligacji jest wydłużenie sekwencji miRNA i wykorzystanie jej w reakcji odwrotnej transkrypcji [85]. Następnie powstały produkt jest amplifikowany i oczyszczany na żelu poliakrylamidowym. Otrzymana biblioteka jest rozcieńczana, a następnie przenoszona na płytkę reakcyjną (ang. *flow cell*), do powierzchni, której przytwierdzono fabrycznie syntetyczne oligonukleotydy. Są one komplementarne do jednego z adapterów, wchodzącego w skład biblioteki. Następnie każda cząsteczka jest powielana w procesie amplifikacji, czego efektem jest powstanie skupisk (ang. *cluster*), zawierających identyczne kopie danej biblioteki. Sekwencjonowanie jest przeprowadzane z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie nukleotydów, których przyłączenie do biblioteki rejestrowane jest przez kamerę z układem światłoczułym CCD (ang. *charge-coupled device*). Dane otrzymane z każdego cyklu sekwencjonowania są następnie przyrównywane i przypisywane do poszczególnych rekordów zapisanych w formacie FASTQ. Analizę wyników sekwencjonowania poprzedza ich wstępna obróbka bioinformatyczna, która obejmuje usunięcie adapterów i sekwencji o niskiej jakości. Główną zaletą wykorzystania techniki NGS do analizy miRNA, podobnie jak w przypadku mikromacierzy, jest możliwość profilowania ekspresji wielu genów jednocześnie. W odróżnieniu od mikromacierzy, NGS pozwala również na identyfikację nowych, dotąd nieopisanych sekwencji miRNA, specyficznych dla danej tkanki, a nawet stanu fizjologicznego komórki [86]. Dodatkowo, przyrównywanie otrzymanych odczytów do dojrzałych miRNA zdeponowanych w bazach referencyjnych (np. miRBase) pozwala na analizę ewentualnych wariantów genetycznych, powstałych na skutek mutacji. Niewątpliwą zaletą sekwencjonowania NGS jest również możliwość identyfikacji miRNA ulegających niskiej ekspresji w danym materiale [87]. Wyższa liniowość reakcji NGS, w porównaniu do mikromacierzy, pozwala również na precyzyjną dyskryminację genów miRNA o zróżnicowanej ekspresji.

Niezależnie od wybranej metody profilowania miRNA, otrzymane wyniki wymagają późniejszej walidacji z wykorzystaniem powtarzalnych technik takich jak PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) czy digital PCR (dla miRNA ulegających niskiej ekspresji). Niestety, długość cząsteczek miRNA (średnio 19-23 nukleotydów) sprawia, że analiza ich ekspresji bywa problematyczna i często wymaga niestandardowych rozwiązań. Na chwilę obecną zdecydowana większość komercyjnie dostępnych zestawów oparta jest o ligację krótkich ogonów poli(A) do dojrzałych cząsteczek miRNA, celem wydłużenia ich sekwencji. Powstały produkt jest następnie przepisywany na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem startera komplementarnego do użytych wcześniej adapterów. Z kolei dokładny przebieg amplifikacji jest ściśle uzależniony od dostępnej technologii, oferowanej przez danego producenta. Przykładowo,

w zestawach oferowanych przez Sigma-Aldrich, cDNA jest amplifikowany z wykorzystaniem dwóch starterów. Pierwszy z nich jest komplementarny do sekwencji adaptera (dodanego podczas syntezy cDNA), a przez to uniwersalny dla wszystkich miRNA. Drugi starter jest z kolei zaprojektowany dla wybranej cząsteczki miRNA, co zapewnia specyficzną amplifikację jedynie wybranego genu. Powstały w reakcji PCR produkt jest następnie wykrywany z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego, interkalującego dwuniciowy DNA - SYBR - Green I [88]. W przypadku zestawów oferowanych przez Thermo Fisher Scientific, oprócz starterów komplementarnych do sekwencji danego miRNA stosuje się również sondę typu TaqMan, co zapewnia większą specyficzną podczas reakcji ilościowego PCR [89], [90].

Niezwykle popularne w analizie ekspresji miRNA jest wykorzystanie technologii zablokowanych kwasów nukleinowych – LNA (ang. *locked nucleic acid*). Technika ta wykorzystuje nukleotydy, w których pierścień rybozy został wzbogacony o dodatkowe wiązanie pomiędzy tlenem w pozycji 2-giej, a węglem w pozycji 4-tej (Ryc.3). Zmodyfikowane nukleotydy wprowadzane są do sekwencji sondy (RNA lub DNA), co znacząco zwiększa jej termostabilność i specyficzną podczas hybrydyzacji do sekwencji docelowej. Dodatkowo sonda jest w stanie rozpoznawać regiony różniące się jednym nukleotydem, co znalazło swoje zastosowanie w analizie wariantów genetycznych miRNA [91]. Co ciekawe, nukleotydy LNA znalazły również zastosowanie w sondach wykorzystywanych do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), gdzie rozróżnienie sygnału badanego od tła jest szczególnie problematyczne [92].



Ryc. 3. Porównanie wzorów strukturalnych klasycznych monomerów wchodzących w skład DNA/RNA z monomerem modyfikowanym w technologii LNA. Zmodyfikowano na podstawie [93].

Odkrycie mechanizmu biosyntezy miRNA oraz ich udziału w zjawisku interferencji mRNA umożliwiło opracowanie technik służących do kontrolowanej regulacji ekspresji genów [94]. Dobrym przykładem jest zastosowanie syntetycznych, dwuniciowych sekwencji RNA, określanych jako syntetyczne analogi miRNA (ang. *miRNA mimics*). Cząsteczki te posiadają sekwencję

identyczną z wybranym endogennym miRNA, dzięki czemu po wprowadzeniu do komórki (głównie metodami transfekcji) podlegają wbudowaniu w kompleks RISC. Skutkuje to wzrostem ilości danego miRNA w komórce, co z kolei przekłada się na spadek ekspresji genów przez nie regulowanych [95]. Zastosowanie jednoniciowych oligonukleotydów RNA komplementarnych do wybranych sekwencji miRNA (ang. *antagomir*) pozwala z kolei blokować potranskrypcyjną regulację wybranego miRNA. Zastosowanie antagomira skutkować będzie więc odblokowaniem ekspresji genów regulowanych przez związany z antagomirem miRNA.

Odkrycie mechanizmu biosyntezy miRNA oraz ich roli w regulacji licznych procesów komórkowych stanowiło ważny krok dla współczesnej nauki. Niezwykle istotnym jest również fakt, iż miRNA stanowią skuteczne i przystępne narzędzie do badania regulacji ekspresji genów co w przyszłości może przyczynić się do opracowania nowych metod terapeutycznych [96].

3.5. Rola miRNA w chorobach alergicznych na przykładzie astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa

Rozwój wysokoprzepustowych technik, takich jak mikromacierze, czy sekwencjonowanie nowej generacji, znacząco przyspieszył badania nad rolą miRNA w patogenezie wielu chorób człowieka, w tym astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa. Badania z wykorzystaniem tych metod umożliwiły identyfikację kilku miRNA istotnych w patogenezie alergicznego stanu zapalnego i astmy m.in. miRNA-221, miRNA-21 czy miRNA-126.

Przykładem takich badań są prace przeprowadzone przez Liu i wsp. [97] u dzieci z astmą oskrzelową. Analiza profilowania miRNA z krwi z wykorzystaniem mikromacierzy wykazała, że 83 geny miRNA ulegają istotnie zmienionej ekspresji w grupie pacjentów z astmą w porównaniu do grupy kontrolnej. W celu walidacji istotnie zmienionych miRNA w tkance płuc, ci sami autorzy wykorzystali mysim model indukowanej astmy oskrzelowej. Wykazano, że miRNA-221 oraz miRNA-485-3p ulegają podwyższonej ekspresji zarówno w płucach zwierząt uczulonych, jak i we krwi dzieci z potwierdzoną astmą oskrzelową. Analiza predykcyjna z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych wytypowała *SPRED2* jako gen potencjalnie regulowany przez miRNA-221 oraz miRNA-485-3p. Co ciekawe, ekspresja białka *SPRED2* była istotnie obniżona w płucach zwierząt uczulonych, co potwierdza, że podlega on regulacji przez oba analizowane miRNA. Pomimo, iż dokładna rola *SPRED2* w kontekście astmy nie jest znana, wcześniejsze badania na mysim modelu wykazały, że białka z tej rodziny mogą być odpowiedzialne za hamowanie alergicznego zapalenia w drogach oddechowych oraz nadreaktywności oskrzeli [98].

Podwyższoną ekspresję miRNA-221 w płucach myszy z indukowaną astmą potwierdziły również badania przeprowadzone przez Zhou i wsp. [99]. Autorzy wykazali, że do zwiększenia ekspresji miRNA-221 dochodzi w hodowli *in vitro* mysich mastocytów traktowanych roztworem lipopolisacharydów. Co ciekawe, transfekcja komórek wektorem lentiwirusowym indukującym nadekspresję miRNA-221 zwiększała syntezę i sekrecję IL-4. Zastosowanie sekwencji antysensownej w celu zablokowania miRNA-221 prowadziło do zmniejszenia stężenia IL-4. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna, a następnie walidacja z wykorzystaniem testu lucyferazowego pozwoliły wytypować *PTEN* jako gen docelowy regulowany przez miRNA-221. Wpływ nadekspresji miRNA-221 na mysie mastocyty został również wykazany w pracy Mayoral i wsp. [100], którzy zaobserwowali, że nadekspresja miR-221 indukowała degranulację, migrację, adhezję mastocytów oraz zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych.

Oprócz miRNA-221, istotną rolę w patogenezie zapalenia alergicznego odgrywa również miRNA-21. Liczne badania wykazały, że ulegał podwyższonej ekspresji we krwi pacjentów z astmą alergiczną w porównaniu do osób zdrowych [101], [102]. Z badań przeprowadzonych przez Elbehidy i wsp. [102] wynika, że ekspresja miRNA-21 wykazała ujemną korelację z parametrem natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (FEV1) oraz stężeniem IL-12 w surowicy krwi. Zmniejszenie FEV1 oznacza ograniczenie przepływu powietrza przez drogi oddechowe, a sam wskaźnik wykorzystuje się do oceny stopnia ciężkości obturacji. Z kolei IL-12 odpowiada za różnicowanie limfocytów T w kierunku populacji o fenotypie Th1, hamując odpowiedź Th2. Ci sami autorzy wykazali również, że ekspresja miRNA-21 korelowała z liczbą eozynofiliów we krwi i płwocinie pacjentów z astmą [102]. Z kolei Lu i wsp. udowodnili, że do zwiększenia ekspresji miRNA-21 dochodzi również w płucach myszy transgeniczných z indukowaną nadekspresją IL-4 lub IL-13 [103]. Zwiększoną ekspresję miRNA-21 zaobserwowano również w dwóch innych modelach indukowanej astmy oskrzelowej - na skutek podawania myszom albuminy jaja kurzego lub ekspozycji i roztworem alergenu z *Aspergillus fumigatus*. Wykorzystując narzędzia analizy bioinformatycznej, a następnie test lucyferazowy, autorzy potwierdzili, że genem regulowanym przez miRNA-21 jest IL-12, której zmniejszoną ekspresję obserwowano we wszystkich analizowanych modelach zwierzęcych astmy. Dalsze badania funkcjonalne przeprowadzone przez tych samych autorów wykazały również, że usunięcie (ang. *knock-out*) genu miRNA-21 istotnie redukowało liczbę eozynofiliów w płucach myszy transgeniczných z indukowaną astmą [104].

Z kolei Wu i wsp. [105] wykorzystując komórki nabłonkowe pobrane z dróg oddechowych pacjentów chorujących na astmę, wykazali, że ekspresja miRNA-126 była podwyższona w materiale pobranym od pacjentów w porównaniu do osób zdrowych. Co ciekawe, istotnie

podwyższonej ekspresji w grupie badanej ulegał również miRNA-21, a poziom tych dwóch miRNA był najwyższy u tych pacjentów, u których nie zastosowano leczenia wziewnymi glikokortykoidami. Ponadto, Wu i wsp. [105] zbadali ekspresję miRNA-21 i miRNA-126 w hodowli *in vitro* komórek nabłonka oddechowego traktowanych IL-13. Autorzy wykazali, że ze wzrostem stężenia IL-13 rosła ekspresja obu miRNA.

Istotnymi miRNA w patogenezie chorób alergicznych okazały się również miRNA-155 oraz miRNA-146a. Malmahall i wsp. [106] zaobserwowali zmniejszoną ekspresję miRNA-155 w supernatancie płwociny od pacjentów z astmą w porównaniu do osób zdrowych. Co ciekawe, stymulacja receptorów TCR w hodowli *in vitro* komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) zwiększała ekspresję miRNA-155, a zmniejszała ekspresję miRNA-146a w pożywce hodowlanej. Przedstawiony kierunek zmian ekspresji miRNA-155 oraz miRNA-146a potwierdzono również w materiale komórkowym z hodowli. Dodatkowo, w pożywce z hodowli PBMC stymulowanych TCR zauważono zwiększoną syntezę cytokin prozapalnych takich jak IL-4, IL-5, czy IL-6.

Inne badania przeprowadzone przez Shaoqing i wsp. [107] skupiły się na wykorzystaniu mikromacierzy do analizy profilu ekspresji miRNA w nabłonku nosa chorych na alergiczny nieżyt nosa w porównaniu do osób zdrowych. Autorzy wykazali, że hsa-miR-7 ulegał istotnie podwyższonej ekspresji, natomiast 7 genów miRNA (hsa-miR-498, hsa-miR-187, hsa-miR-874, hsa-miR143, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-224, oraz hsa-miR-767-5p) ulegało istotnie obniżonej ekspresji w próbkach badanych od osób chorujących na alergiczny nieżyt nosa w porównaniu do osób zdrowych. W celu weryfikacji danych z mikromacierzy Shaoqing i wsp. zbadali ekspresję miRNA z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym, która potwierdziła istotnie obniżoną ekspresję miR-224, miR-187 oraz miR-143 u pacjentów chorych na alergiczny nieżyt nosa.

Istotne wydają się także badania Suojalehto i wsp. [108], którzy oznaczyli ekspresję profilu miRNA w nabłonku osób chorujących na nieżyt nosa o podłożu alergicznym oraz niealergicznym. Co istotne, materiał do badań pobrano również od osób chorujących jednocześnie na alergiczny nieżyt nosa i astmę. Kontrolę w niniejszym badaniu stanowiły próbki nabłonka od osób zdrowych. Wykorzystując reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym wykazano istotnie podwyższoną ekspresję miR-205, miR-155, oraz miR-498 w nabłonku nosa pacjentów z alergicznym nieżytem nosa w porównaniu do osób zdrowych. Co ciekawe, ekspresja tych miRNA była również podwyższona w zaostrzeniu choroby w stosunku do osób z nieżytem nosa bez potwierdzonego podłoża alergicznego. Natomiast w czasie remisji objawów nie wykazano istotnych zmian ekspresji wspomnianych miRNA (miR-205, miR-155 i miR-498). Z kolei istotnie obniżoną

ekspresję w nabłonku nosa chorych na astmę i alergiczny nieżyt nosa w porównaniu do osób zdrowych zaobserwowano dla let-7e. Ekspresja ta była również obniżona u chorych z nieżytem nosa bez potwierdzonego podłoża alergicznego. Co ciekawe ekspresja let-7e była istotnie obniżona jedynie u tych pacjentów, u których objawy astmy i alergicznego nieżytu były ustabilizowane. W celu sprawdzenia związku pomiędzy analizowanymi genami miRNA, a podłożem alergicznym, Suojalehto i wsp. porównali ich ekspresję z wynikami testów skórnych. Wykazano, iż ekspresja miR-155 oraz miR-205 jest istotnie podwyższona, a let-7e istotnie obniżona u pacjentów z pozytywnym wynikiem testu skórniego w porównaniu do osób z negatywnym wynikiem testu skórniego, co sugeruje bezpośredni związek z zapaleniem alergicznym.

Przedstawione powyżej dane literaturowe sugerują, iż miRNA pełnią istotną rolę w patogenezie astmy i alergicznego nieżytu nosa. Pomimo tego, dokładna funkcja miRNA w przebiegu obu chorób ciągle pozostaje nieznana. Wysoka integralność górnych i dolnych dróg oddechowych oraz wspólny patomechanizm astmy i alergicznego nieżytu nosa sugerują z kolei możliwość identyfikacji genów miRNA zaangażowanych w jednoczesną regulację przebiegu obu chorób. Dotychczasowe badania przeprowadzane w tematyce roli miRNA w chorobach alergicznych skupiały się głównie na materiale pochodzącym z górnych lub dolnych dróg oddechowych. W niniejszej pracy do oceny ekspresji miRNA wykorzystano natomiast materiał pochodzący zarówno z płuc, jak i nabłonka nosa pobrany od szczurzego modelu zapalenia alergicznego. Wykorzystanie materiału pobranego z dwóch oddzielnych rejonów dróg oddechowych pozwoli na bardziej precyzyjne i specyficzne profilowanie ekspresji miRNA. Dodatkowo, identyfikacja genów miRNA wykazujących podobne zmiany ekspresji w górnych i dolnych drogach oddechowych przyczyni się do lepszego poznania patomechanizmu astmy i alergicznego nieżytu nosa, co w przyszłości pozwoli na opracowanie skutecznych biomarkerów oraz nowych terapeutyków.

4. CELE PRACY DOKTORSKIEJ

1. Identyfikacja genów miRNA wykazujących zmiany w ekspresji w górnych (nabłonek nosa) i dolnych (płuca) drogach oddechowych pod wpływem alergicznego stanu zapalnego na modelu zwierzęcym.
2. Identyfikacja wspólnych miRNA zmienionych w obu tkankach (płuca i nabłonek nosa) pod wpływem zapalenia alergicznego.
3. Analiza funkcjonalna szlaków i procesów biologicznych, w których uczestniczą potencjalne geny docelowe podlegające regulacji przez miRNA wykazujące zmiany ekspresji w drogach oddechowych w czasie alergicznego stanu zapalnego.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Test immunoenzymatyczny ELISA

Do pomiaru całkowitego stężenia przeciwciał klasy IgE w surowicy szczurów Brown Norway wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA (ang. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) dostępny komercyjnie (Elabscience). W pierwszym etapie reakcji do każdego dołka na płytce dodawano odpowiednio rozcieńczone próbki surowicy szczura lub standardy o znanym stężeniu. Te ostatnie składają się z seryjnych rozcieńczeń syntetycznego przeciwciała IgE i służą do określenia jego stężenia w próbach badanych. Następnie płytkę inkubuje się przez 90 min. w temperaturze 37°C, w celu związania przeciwciał IgE obecnych w surowicy i standardzie z powierzchnią płytki. Po inkubacji surowice i standardy są usuwane, a do każdego dołka dodawany jest roztwór biotynylowanego przeciwciała, które wiąże IgE związane z powierzchnią płytki. Po kilkukrotnym przepłukaniu dołków, w celu usunięcia niespecyficznych wiązań, na płytkę dodawany jest koniugat składający się z kowalencyjnie związanego białka awidyny i peroksydazy chrzanowej –HRP (ang. *horseradish peroxidase*). Kluczową rolę odgrywają tutaj właściwości biotyny i awidyny do tworzenia silnego wiązania o charakterze niekowalencyjnym. W następnym etapie do reakcji dodawany jest TMB, przetwarzany przez HRP do formy barwnej, której intensywność zależy od ilości IgE związanego z powierzchnią płytki. Odczytu gęstości optycznej dokonano przy długości fali świetlnej 450 nm. z wykorzystaniem aparatu Asys UVM 340 Microplate Reader (Biogenet).

5.2. Analiza histologiczna

Do analizy histologicznej wykorzystano dolny fragment płuca, zabezpieczony w roztworze Bouina, który stanowi mieszaninę kwasu octowego, pikrynowego i formaliny. Tkanki utrwalano przez 24 – 48 godzin, po czym opłukano wodą. W celu odwodnienia tkanek przeprowadzono płukanie z wykorzystaniem szeregu alkoholu etylowego (70%, 80%, 95%, 100%), inkubując każdorazowo tkankę przez jedną godzinę. Następnie odwodnione tkanki zalano parafiną (58-60°C) i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Blok parafinowy pocięto na skrawki o grubości 5 μ m, które następnie przeniesiono na szkiełka podstawowe i pozostawiono do wyschnięcia. W celu usunięcia parafiny preparaty inkubowano trzykrotnie (každorazowo przez 10 min) w roztworze ksylenu, po czym nawadniano w malejącym szeregu alkoholu etylowego (100%, 95%, 80%). W celu usunięcia resztek alkoholu, preparaty przepłukano dokładnie pod bieżącą wodą. Barwienie przeprowadzono inkubując preparaty przez 5 min. w roztworze hematoxyliny,

a następnie eozyny. Nadmiar barwnika spłukano pod bieżącą wodą, a preparaty pozostawiono do wyschnięcia. Do oceny jakościowej przygotowanych preparatów wykorzystano mikroskop świetlny odwrócony Eclipse Ti-U (Nikon) oraz powiększenie 100x.

5.3. Zwierzęcy model zapalenia alergicznego dróg oddechowych

Do eksperymentu indukcji stanu zapalnego w górnych i dolnych drogach oddechowych wybrany został szczur szczepu Brown Norway, który ze względu na genetyczną predyspozycję do nadprodukcji IgE stanowi sprawdzony model w badaniach nad zapaleniem alergicznym [109]. Wykazano, iż na skutek ekspozycji wziewnej roztworem alergenu, szczur szczepu Brown Norway rozwija silną odpowiedź zapalną, manifestującą się między innymi podwyższonym stężeniem przeciwciał klasy IgE w surowicy krwi oraz zwiększoną infiltracją komórek zapalnych (zwłaszcza eozynofików) do płuc. Do eksperymentu wybrano samce szczura Brown Norway w wieku 6 tygodni i wadze w zakresie 80-150 gramów. Po odbyciu dwutygodniowej aklimatyzacji w Zwierzętarńi Katedry Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu zwierzęta zostały przydzielone losowo do grupy badanej (n=10) i kontrolnej (n=10). Do indukcji stanu zapalnego wykorzystany został komercyjnie dostępny ekstrakt roztoczy kurzu domowego otrzymany z gatunku *Dermatophagoides pteronyssinus* (Citeqbiologics). Głównym składnikiem ekstraktu jest białko Der p1 o potwierdzonych właściwościach alergennych [110], [111].

Eksperyment indukcji stanu zapalnego przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszej fazie zwierzęta grupy badanej otrzymywały podskórną w fałd grzbietowy 45 µg białka Der p1, zawieszonego w roztworze adjuwantu (wodorotlenku glinu). Grupa kontrolna otrzymywała podskórną jedynie rozwór adjuwantu. Zastrzyki powtarzano raz w tygodniu przez okres 3 tygodni. Celem fazy pierwszej eksperymentu było uwrażliwienie zwierząt na alergen roztoczy kurzu domowego - Der p1. W celu indukcji uczulenia alergicznego i objawów ze strony układu oddechowego zwierzętom podawano donosowo 120 µg alergenu Der p1, zawieszonego w 20 µl soli fizjologicznej – faza druga eksperymentu uczulenia. Grupa kontrolna otrzymywała donosowo rozwór soli fizjologicznej. Podanie donosowe powtarzano 3 razy w tygodniu przez okres 3 tygodni.

Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta zostały uśmiercone poprzez dekapitację. Płuca zostały wycięte i podzielone na porcje. Dolny fragment lewego płata płuca przeniesiono do roztworu Bouina i przeznaczono do analizy histochemicznej. Fragmenty płuca przeznaczone do analizy molekularnej zamrożono w temperaturze -80°C w celu zabezpieczenia materiału do dalszych analiz. Do pobrania komórek nabłonka nosa wykorzystano szczoteczki wymazowe

CytoBrush. Pobrane komórki zostały przeniesione do probówki 5 ml zawierającej sterylny PBS, zwirowane (2000 g, 4°C, 10 min.), a po usunięciu supernatantu osad komórkowy zamrożono w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

5.4. Odczynniki

Tabela 1. Odczynniki i materiały wykorzystane w eksperymencie indukcji stanu zapalnego, izolacji RNA, reakcji odwrotnej transkrypcji oraz analizy ekspresji miRNA.

Procedura	Odczynnik	Producent
Indukcja zapalenia alergicznego	Roztwór wodorotlenku glinu - adiuwant (Imject AlumAdjuvant)	Thermo Fisher
	Ekstrakt roztoczy kurzu domowego <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Citeq biologics
	Szczoteczki do wymazu z nosa (Cyto Brush)	Meds. Medical
Analiza histologiczna	Szkiełka podstawowe (Super Frost Plus)	Thermo Fisher
	Noże mikrotomowe (MX 35 Ultra Low)	Thermo Fisher
	Parafina histologiczna (Leica-Paraplast PLUS)	Leica
	Hematoksylina	Sigma
	Eozyna	Sigma
	Alkohol etylowy do analizy histologicznej (Patomorfanol A)	VeVex
Izolacja RNA	Zestaw do izolacji miRNA / RNA (Extract MemiRNA Kit)	Blirt
	Etanol	Sigma

Procedura	Odczynnik	Producent
	2-Merkaptoetanol	Sigma
Pomiar fluorymetryczny	Zestaw do pomiaru stężenia miRNA (Qubit microRNA Assay Kit)	ThermoFisherScientific
	Zestaw do pomiaru stężenia DNA (QuantiFluor dsDNA System)	Promega
Automatyczna elektroforeza kapilarna	Zestaw do oceny integralności DNA (High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay)	Agilent Technologies
	Zestaw do oceny integralności RNA (RNA ScreenTapeAssay)	
Sekwencjonowanie nowej generacji	Zestaw do przygotowania biblioteki miRNA (Small RNA Library Prepkits- Set A)	Illumina
	Kaseta reakcyjna (MiniSeq High Output reagent kit 75-cycles)	
	Biblioteka kontrolna(10 nM PhiX Stock)	
	Ligaza RNA (T4 RNA Ligase 2 Deletion Mutant)	Lucigen
	Odwrotna transkryptaza (SuperScript II Reverse Transcriptase)	Thermo Fisher Scientific
	Żel do elektroforezy poliakrylamidowej (Novex TBE 6% gels)	
	Bufor do prowadzenia elektroforezy poliakrylamidowej (Novex TBE running buffer 5X)	

Procedura	Odczynnik	Producent
	Bufor obciążający (Novex Hi-Density TBE Sample Buffer)	
	Bromek etydyny (Ultra pure ethidium bromide)	
	Octan sodu	
	Glikogen	
	Probówki do fragmentacji żelu poliakrylamidowego (Gel breaker tube)	IST Engineering
	Kolumny z 5 µm filtrem	
	Żyłki do wycinania produktów z żelu poliakrylamidowego (Smart Slicer)	Sigma
	Roztwór Tris-HCl	TEKNOVA
Analiza ekspresji miRNA metodą ilościowego PCR	Zestaw do odwrotnej transkrypcji miRNA (TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit)	Thermo Fisher Scientific
	Master Mix do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (TaqMan Fast Advanced Master Mix)	
	Sondy miRNA do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (TaqMan Advanced miRNA Assay)	

5.5. Jednoczesna izolacja miRNA i RNA

Do izolacji miRNA i RNA z płuc i nabłonka nosa szczurów Brown Norway użyty został komercyjnie dostępny zestaw Extract Me miRNA kit (Blirt). Zestaw ten wykorzystuje właściwości złoża krzemionkowych, które w określonych warunkach wiążą specyficznie poszczególne frakcje kwasów nukleinowych różniących się długością i/lub ładunkiem elektrycznym [112]. Umożliwia to separację frakcji małych RNA (zawierającej miRNA i piRNA) od długich transkryptów mRNA (>200 nt). Pierwszym etapem izolacji jest homogenizacja badanego materiału z wykorzystaniem buforu lizującego MiRLys, który suplementuje się dodatkowo β -merkaptetanolem do końcowego stężenia 1%. W przypadku materiału pobranego z płuc szczurów, tkanki zhomogenizowano z wykorzystaniem ciekłego azotu. Otrzymany materiał (23-26 mg) przeniesiono następnie do probówki 2 ml i dodano 400 μ l buforu MiRLys. W przypadku komórek pobranych z nabłonka nosa, bufor MiRLys dodano bezpośrednio do probówki 5 ml, w której zabezpieczono materiał. Próby (płuca i nabłonek nosa) intensywnie mieszano przez 1 minutę, po czym zwirowano (20 000 g, 4°C, 2 min.) w celu usunięcia fragmentów komórkowych. Supernatant przeniesiono następnie na kolumnę wiążącą DNA i zwirowano (20 000 g, 4°C, 2 min.), a przesącz wytrącano 100% etanolem w objętości równej połowie objętości otrzymanego przesączu. Powstałą mieszaninę przeniesiono na kolumnę wiążącą RNA, a następnie zwirowano (20 000 g, 4°C, 2 min.). Przesącz zebrano, po czym dodano do niego 100% etanol w objętości równej z objętością otrzymanego przesączu. Powstałą mieszaninę przeniesiono na kolumnę wiążącą miRNA i zwirowano (15 000 g, 4°C, 2 min.). Do wymycia zanieczyszczeń związanych niespecyficznie z powierzchnią kolumny wykonano trzykrotnie płukanie buforem miRW. W celu usunięcia resztek buforu płuczącego oraz wysuszenia złoża krzemionkowego, kolumny wirowano przez 3 min. (20 000 g, 4°C). Do wypłukania związanego z kolumną (osobno miRNA i RNA) na środek kolumnienek dodano 50 μ l (płuca) lub 40 μ l (nabłonek nosa) sterylnej wody wolnej od RNaz, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min. i zwirowano (10 000 g, 4°C, 2 min.). Otrzymany kwas nukleinowy zabezpieczono w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

5.6. Ocena jakościowa i ilościowa wyizolowanego RNA / miRNA

Do oceny ilościowej i jakościowej frakcji RNA wykorzystano właściwości kwasów nukleinowych do absorpcji światła o określonej długości fali. W tym celu przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny z wykorzystaniem aparatu NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Do

oceny stężenia RNA pomiar wykonano przy długości fali świetlnej wynoszącej 260 nm., co odpowiada maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych. Do oceny zanieczyszczenia RNA białkami lub związkami nieorganicznymi wykorzystano ocenę absorpcji przy długości fali świetlnej wnoszącej odpowiednio 280 nm. ($A_{260/280}$) i 230 nm. ($A_{260/230}$).

Pomiar parametru RIN (ang. *RNA integrity number*) z wykorzystaniem aparatu do automatycznej elektroforezy kapilarnej przeprowadzono w celu oceny integralności wyizolowanej próbki RNA. W tym celu mieszało 5 μ l buforu reakcyjnego z 1 μ l wyizolowanego RNA lub 1 μ l markera wielkości. Probówki intensywnie mieszało (2000 rpm, 1 min.), denaturowało (72°C, 3 min.) po czym schłodzono na lodzie. Rozdziału elektroforetycznego dokonano w aparacie Tape Station 2200 (Agilent Technologies).

Do pomiaru stężenia frakcji miRNA wykorzystano zestaw Qubit microRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Zestaw ten wykorzystuje barwnik fluorescencyjny, który specyficznie wiąże niskocząsteczkowe RNA (<200 nt). Do pomiaru stężenia miRNA wykorzystano 1 μ l wyizolowywanego miRNA, który mieszało z 200 μ l buforu reakcyjnego. Do pomiaru wykorzystano fluorometr Quantus Fluorimeter (Promega).

5.7. Sekwencjonowanie nowej generacji

Do przygotowania bibliotek miRNA do sekwencjonowania nowej generacji wykorzystano zestaw TruSeq Small RNA Preparation Kit (Illumina). Do analizy użyto materiału wyizolowanego z płuc i nabłonka nosa od 3 szczurów z grupy badanej i kontrolnej (całościowo 12 próbek). Do reakcji wykorzystano 50 ng oczyszczonej frakcji miRNA (w objętości 5 μ l) wyizolowanej z tkanek płuc i nabłonka nosa. Do próbek dodano 1 μ l adaptera 3'(RA3), delikatnie zwirowano, a następnie inkubowano przez 2 min. w temperaturze 70°C. Do przeprowadzenia ligacji wykorzystano ligazę RNA T4, bufor HML oraz inhibitor RNaz w ilościach zestawionych w tabeli 2

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej ligacji adaptera 3' w przeliczeniu na jedną próbę.

Składnik	Ilość [μl]	Całkowita objętość reakcji [μl]
HML	2	10
Rnase Inhibitor	1	
T4 RNA Ligase 2, Deletion Mutant	1	
miRNA z adapterem RA3	6	

Powstałą mieszaninę inkubowano następnie przez 1 godzinę w temperaturze 28°C. W celu zatrzymania ligacji do probówek dodano 1 μl buforu STP, a następnie inkubowano przez kolejne 15 min. w temperaturze 28°C. W celu wydłużenia cząsteczek na końcu 5' do probówek dodano 1 μl (zdenaturowanego wcześniej) adaptera 5' (RA5), 10 mM ATP oraz ligazę T4 RNA. Powstałą mieszaninę inkubowano następnie przez 1 godzinę w temperaturze 28°C. Następnie przystąpiono do reakcji odwrotnej transkrypcji w której pierwszym etapem było dodanie do probówek 1 μl startera reakcyjnego (RNA RT Primer). Probówki inkubowano następnie przez 2 minuty w temperaturze 70°C, po czym do każdej z nich dodano mieszaninę reakcyjną w ilościach zestawionych w tabeli 3.

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji w przeliczeniu na jedną próbę.

Składnik	Ilość [μl]	Całkowita objętość reakcji [μl]
5x First Strand Buffer	2	12,5
12 mM dNTP Mix	0,5	
100 mM DTT	1	
RNase Inhibitor	1	
SuperScript II Reverse Transcriptase	1	
Biblioteka RNA	7	

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono inkubując probówki przez 1 godzinę w temperaturze 50°C. Kolejnym było namnożenie powstałego produktu w reakcji łańcuchowej reakcji polimerazy, której skład mieszaniny i profil termiczny przedstawiono odpowiednio w tabeli 4 i 5. Na tym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodawano indeksy – krótkie 6-nukleotydowe

oligonukleotydy, dzięki którym możliwe jest połączenie próbek w kasecie reakcyjnej i ich późniejsza identyfikacja po reakcji sekwencjonowania.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej łańcuchowej reakcji polimerazy w przeliczeniu na jedną próbę.

Składnik	Ilość [μ l]	Całkowita objętość reakcji [μ l]
PML	25	50
RPI	2	
RPIX - indeksy (RPI 1 - 6 płuca, RPI 7-12 nabłonek nosa)	1	
Woda	8,5	
BibliotekamiRNA	12,5	

Tabela 5. Profil termiczny łańcuchowej reakcji polimerazy.

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba powtórzeń
Wstępna inkubacja	98°C	30 sek.	1
Denaturacja	98°C	10 sek.	11
Annealing	60°C	30 sek.	
Amplifikacja	72°C	15 sek.	
Końcowa elongacja	72°C	10 min.	1

W celu oczyszczenia otrzymanej biblioteki zastosowano rozdział elektroforetyczny na 6% żelu poliakrylamidowym (145 V, 1 godzina). Żele przeniesiono następnie do kuwety wypełnionej roztworem bromku etydy i wybarwiano przez 5 minut. Pod transluminatorem wycięto prążki o długości 145 – 160 pz, co zgodnie z protokołem producenta odpowiada długości powstałej biblioteki miRNA. Fragmenty żelu przeniesiono następnie na filtr kolumny i zwirowano (20 000g, 2 min.). Do otrzymanych po wirowaniu fragmentów żelu poliakrylamidowego dodano 300 μ l wody i wytrząsano przez noc na termomikserze (550 rpm, 21°C), co pozwoliło na wymycie cząsteczek

DNA biblioteki z żelu. Do otrzymanego eluatu dodano 2 μ l glikogenu, 30 μ l octanu sodu (3M) i 975 μ l 100% etanolu po czym całą mieszaninę zwirowano (20 000g, 4 st.C, 20 min.). Supernatant usunięto, a do osadu dodano 500 μ l 70% etanolu i ponownie zwirowano (20 000 g, 2 min.). Osad suszono przez 7 minut w temperaturze 37°C po czym rozpuszczono w 12 μ l roztworu Tris-HCl (pH 8.5, 10 mM). W celu weryfikacji wielkości biblioteki użyto systemu do automatycznej elektroforezy kapilarnej i zestawu High SensitivityD1000 (Agilent Technologies). Do oceny stężenia biblioteki wykorzystano zestaw QuantiFluor dsDNA Dye (Promega) oparty na barwniku fluorescencyjnym specyficznie wiążącym dwuniciowy DNA. Powstałe biblioteki miRNA rozcieńczono do stężenia 1 nM z wykorzystaniem 10 nM Tris-HCl a następnie w nowej próbówce połączono po 5 μ l każdej nich (osobno biblioteki z płuc i nosa). Mieszaninę bibliotek denaturowano następnie 0,1 N NaOH po czym ponownie rozcieńczono 200 mM Tris-HCl oraz buforem HT1 do końcowego stężenia 1,8 pM. Do nowych próbek przeniesiono następnie 500 μ l powstałej mieszaniny i dodano 50 μ l biblioteki kontrolnej (PhiX). Całość przeniesiono do kasety reakcyjnej - MiniSeq High Output reagent kit (75 pz). Sekwencjonowanie przeprowadzono na aparacie MiniSeq System przy ustawieniach odczytu danych z jednego końca nici (ang. *single end*). Analizę bioinformatyczną przeprowadzono programie BaseSpace (Illumina), z wykorzystaniem aplikacji Small RNA App.

5.8. Analiza ekspresji miRNA z wykorzystaniem reakcji ilościowego PCR

Do reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano 1 ng oczyszczonej frakcji miRNA i komercyjnie dostępny zestaw TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit. Zestaw ten dzięki zastosowanej technologii Advanced pozwala na uzyskanie puli cDNA ze wszystkich dojrzałych miRNA. Dzięki temu możliwa jest ich późniejsza amplifikacja z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym. Do reakcji wykorzystano materiał wyizolowany z płuc i nabłonka nosa od 10 szczurów z grupy badanej i 10 z kontrolnej.

Pierwszym etapem reakcji było wydłużenie cząsteczek dojrzałych miRNA poprzez ligację do ich końca 3' krótkiego ogona zbudowanego wyłącznie z nukleotydów adeninowych (poliA) z użyciem polimerazy poli (A). Poliadenylację prowadzono, przez 45 minut w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymano, podgrzewając próbki do temperatury 65°C przez 10 minut. Następnie do mieszaniny wraz z ligazą RNA dodawano syntetyczny adapter, którego celem było wydłużenie cząsteczki miRNA na końcu 5' (reakcja ligacji). Po godzinnej inkubacji w temperaturze 16°C powstały produkt wykorzystano do reakcji odwrotnej transkrypcji. Istotną rolę odgrywa tutaj starter

zbudowany z nukleotydów tyminowych (oligo-dT), komplementarny do ogona poli-A na końcu 3'. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono inkubując mieszaninę w temperaturze 42°C przez 15 minut, po czym ją zatrzymano podgrzewając probówki przez 5 minut w temperaturze 85°C. W celu detekcji genów miRNA o niskiej ekspresji otrzymany cDNA poddano wstępnej amplifikacji w reakcji preamplifikacji (mir-Amp). Profil termiczny obejmuje 5 minutową aktywację polimerazy w temperaturze 95°C, a następnie 14 cykli naprzemiennej denaturacji, przyłączania starterów i syntezy. W celu zatrzymania reakcji mieszaninę podgrzewa się do 99°C przez 10 min. Skład mieszanin reakcyjnych dla poliadenylacji, ligacji, odwrotnej transkrypcji i reakcji preamplifikacji przedstawiono w tabelach 6-9.

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej poliadenylacji w przeliczeniu na jedną próbę.

Składnik	Ilość [μl]	Całkowita objętość reakcji [μl]
10x Poly(A) Buffer	0,5	5,0
ATP	0,5	
Poly(A) Enzyme	0,3	
Woda wolna od nukleaz	1,7	
1 ng miRNA	2,0	

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej ligacji w przeliczeniu na jedną próbę.

Składnik	Ilość [μl]	Całkowita objętość reakcji [μl]
5X DNA Ligase Buffer	3,0	15,0
50% PEG 8000	4,5	
25X Ligation Adaptor	0,6	
RNA Ligase	1,5	
Woda wolna od nukleaz	0,4	
Produkt reakcji poliadenylacji	5,0	

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji w przeliczeniu na jedną próbę.

Składnik	Ilość [μ l]	Całkowita objętość reakcji [μ l]
5X RT Buffer	6,0	30,0
dNTP Mix (25 mM)	1,2	
20X Universal RT Primer	1,5	
10X RT Enzyme Mix	1,5	
Woda wolna od nukleaz	3,3	
Produkt reakcji ligacji	15,0	

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji preamplifikacji w przeliczeniu na jedną próbę.

Składnik	Ilość [μ l]	Całkowita objętość reakcji [μ l]
2X miR-Amp Master Mix	25	50,0
20X miR-Amp Primer Mix	2,5	
Woda wolna od nukleaz	17,5	
Produkt reakcji odwrotnej transkrypcji	5,0	

Otrzymany cDNA jest matrycą reakcji real-time PCR, w skład której wchodzi specyficzny dla danego miRNA komplet starterów i sondy (ang. *TaqMan Assay*). Wspomniany zestaw zawiera startery do specyficznej amplifikacji sekwencji cDNA i sondę typu TaqMan znakowaną fluorescencyjnie barwnikiem FAM. Numery katalogowe poszczególnych zestawów reakcyjnych TaqMan, wykorzystanych w niniejszej pracy oraz sekwencje walidowanych miRNA przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Sekwencje miRNA i numery katalogowe wykorzystanych zestawów reakcyjnych.

Nazwa genu miRNA	Sekwencja dojrzałej cząsteczki miRNA	Numer katalogowy
rno-mir-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	rno481284_mir
rno-miR-100-5p	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	rno478224_mir
rno-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC	rno481007_mir
rno-miR-186-5p	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	rno480966_mir
rno-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	rno481013_mir
rno-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGU	rno480962_mir

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym dla miRNA przeprowadzono w aparacie do detekcji kwasów nukleinowych ABI PRISM 7900HT (Thermo Fisher Scientific) z możliwością pomiaru przyrostu fluorescencji w czasie rzeczywistym w trakcie reakcji. Do analizy ekspresji miRNA użyto programu DataAssistv.3.01 i metody komparatywnej ($\Delta\Delta C_t$). Jako kontrolę endogenną wykorzystano rno-miR-26a. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Pracowni Badań Komórkowych i Molekularnych wykazały, że gen ten ulega stałej, konstytutywnej ekspresji w nabłonku dróg oddechowych szczurów szczepu Brown Norway. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne reakcji PCR w czasie rzeczywistym przedstawiono odpowiednio w tabeli 11 i 12.

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Składnik	Ilość [μ l]	Całkowita objętość reakcji [μ l]
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X)	10	20
Woda wolna od nukleaz	4	
TaqMan Advanced miRNA Assay (20X)	1	
Matryca (cDNA)	5	

Tabela 12. Profil termiczny reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba powtórzeń
Wstępna inkubacja	95°C	2 min.	1
Denaturacja	95°C	1sek.	40
Amplifikacja	60°C	20 sek.	

5.9. Analiza predykcyjna *in silico* genów docelowych dla miRNA

W celu identyfikacji genów docelowych (ang. *target genes*) podlegających regulacji przez wybrane miRNA, przeprowadzono analizę predykcyjną w oparciu o ogólnodostępną bazę *mirGate* (dostępną pod adresem: <http://mirgate.bioinfo.cnio.es/miRGate/>) oraz *miRTarBase* (dostępną pod adresem: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>). Predykcję przeprowadzono w oparciu o potwierdzone regiony UTR.

5.10. Analiza ontologiczna genów docelowych dla miRNA

Analizę szlaków biologicznych dla wybranych genów potencjalnie regulowanych przez miRNA przeprowadzono z wykorzystaniem ogólnodostępnej bazy danych DAVID w wersji 6.8 (dostępną pod adresem: <https://david.ncifcrf.gov/>). Analiza funkcjonalna wykonana została dla wszystkich genów docelowych przewidzianych przez bazę miRTarBase oraz mirGate. W wyborze szlaków biologicznych istotnie nadreprezentowanych kierowano się wartością krotności wzbogacenia (ang. *Fold Enrichment*) $> 2,0$ oraz wynikiem zmodyfikowanego dokładnego testu Fishera (ang. *Modified Fisher Exact test*) na poziomie istotności $p < 0,05$.

5.11. Analiza statystyczna

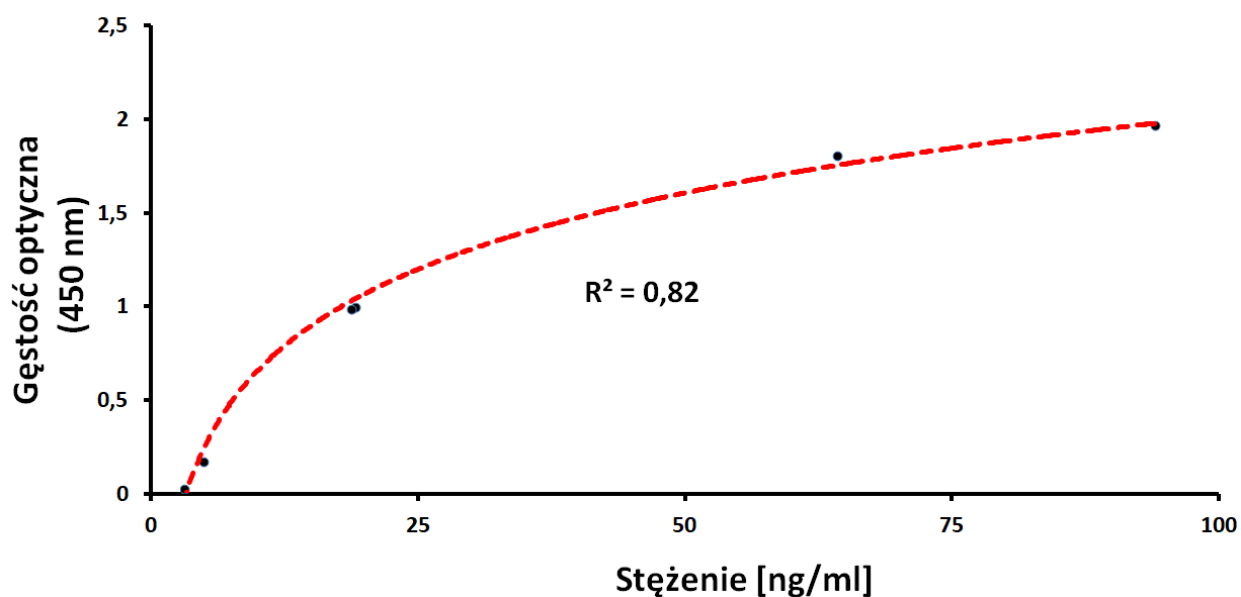
Do oceny istotności statystycznej stężenia IgE w surowicy szczurów grupy badanej i kontrolnej wykorzystano nieparametryczny test U Mann-Whitney. Analizę korelacji przeprowadzono w oparciu o współczynnik rang Spearmana. Wszystkie przeprowadzone analizy statystyczne wykonano w programie Statistica v.13.

6. WYNIKI

6.1. Wyniki analizy walidacji modelu zwierzęcego

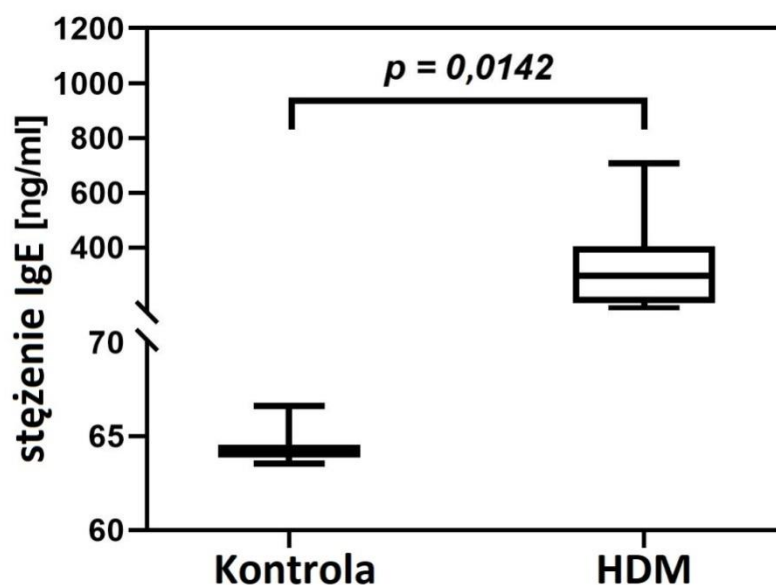
6.1.1. Analiza stężenia przeciwciał klasy IgE w surowicy szczurów Brown Norway

Do oceny stężenia przeciwciał klasy IgE w surowicy szczurów Brown Norway wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA. Krzywą wzorcową przygotowaną w oparciu o seryjne rozcieńczenia syntetycznych IgE przedstawiono na rycinie 4.



Ryc. 4. Krzywa wzorcową wykorzystaną w teście ELISA do oceny stężenia IgE w surowicy szczurów uczulonych i kontrolnych.

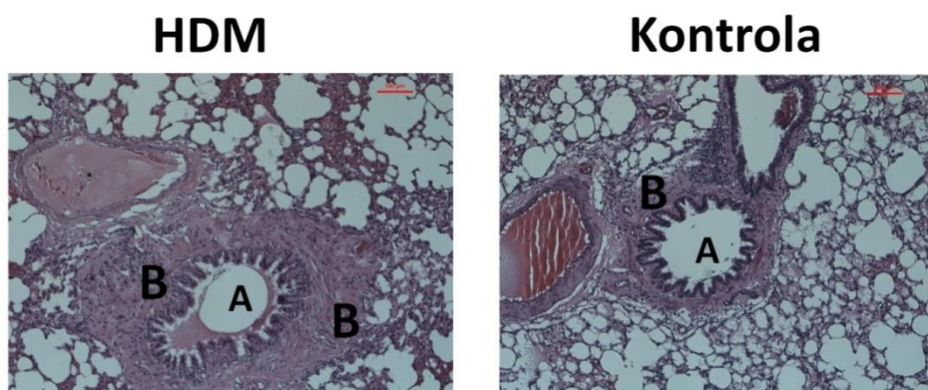
Analiza wykazała, że stężenie IgE było istotnie podwyższone ($p=0,014$) w surowicy szczurów uczulonych roztworem HDM w porównaniu do zwierząt kontrolnych (ryc. 5).



Ryc. 5. Stężenie przeciwciał IgE w surowicy szczurów uczulonych (HDM) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Kontrola). Wyniki przedstawiono na wykresie ramka – wąsy z zaznaczoną średnią, błędem (ramka) i odchyleniem standardowym (wąsy).

6.1.2. Analiza histologiczna tkanki płuc

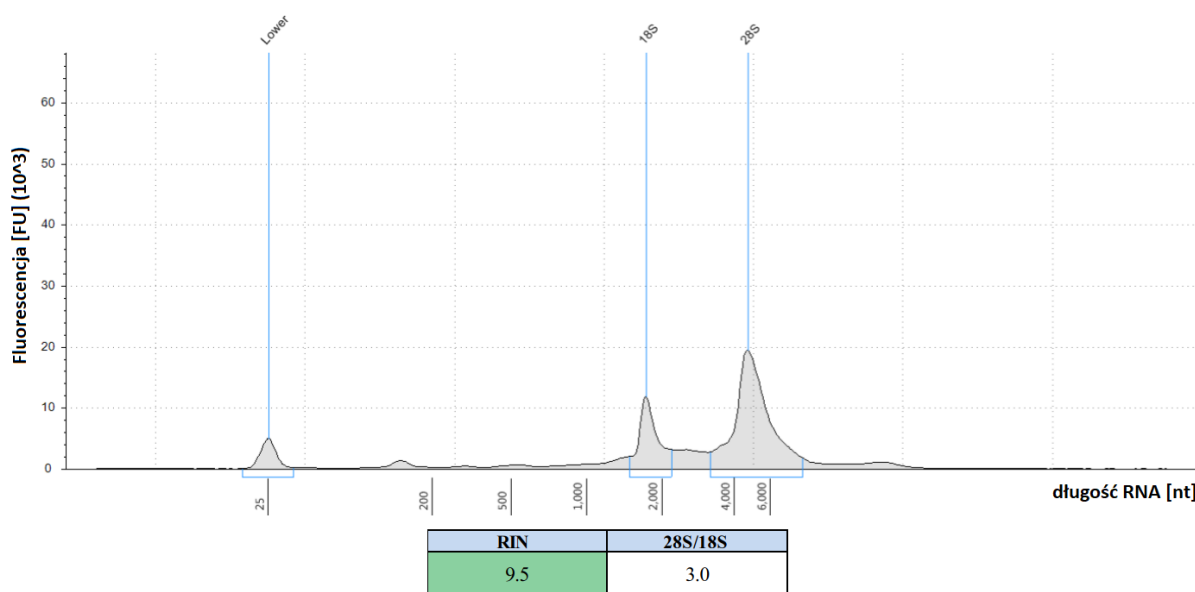
W celu oceny zmian powstałych w płucach szczurów uczulonych przeprowadzono barwienie przeglądowe z wykorzystaniem roztworu hematoksyliny i eozyny. Wykazano, że płuca szczurów inhalowanych roztworem roztoczy kurzu domowego cechowała zwężona struktura oskrzeli oraz nacieki komórek zapalnych w porównaniu do szczurów kontrolnych (ryc. 6).



Ryc.6. Analiza histologiczna płuc szczurów uczulonych (HDM) w porównaniu do szczurów kontrolnych (kontrola). A – przekrój poprzeczny przez oskrzele, B – naciek komórek zapalnych.

6.2. Ocena jakościowa próbek RNA

Do utworzenia biblioteki miRNA wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw TruSeq Small RNA Library Preparation Kit oraz tkankę płuc i nabłonka nosa od 3 szczurów z najwyższym stężeniem przeciwciał IgE surowicy w grupie badanej. Kontrolę stanowiły 3 szczury z najniższym stężeniem przeciwciał IgE. Średnie wartości parametru RIN dla RNA wyizolowanego płuc i nosa wynosiły odpowiednio 9,5 oraz 5,0. Przykładowy elektroforegram otrzymany dla RNA z płuc przedstawiono na rycinie 7.

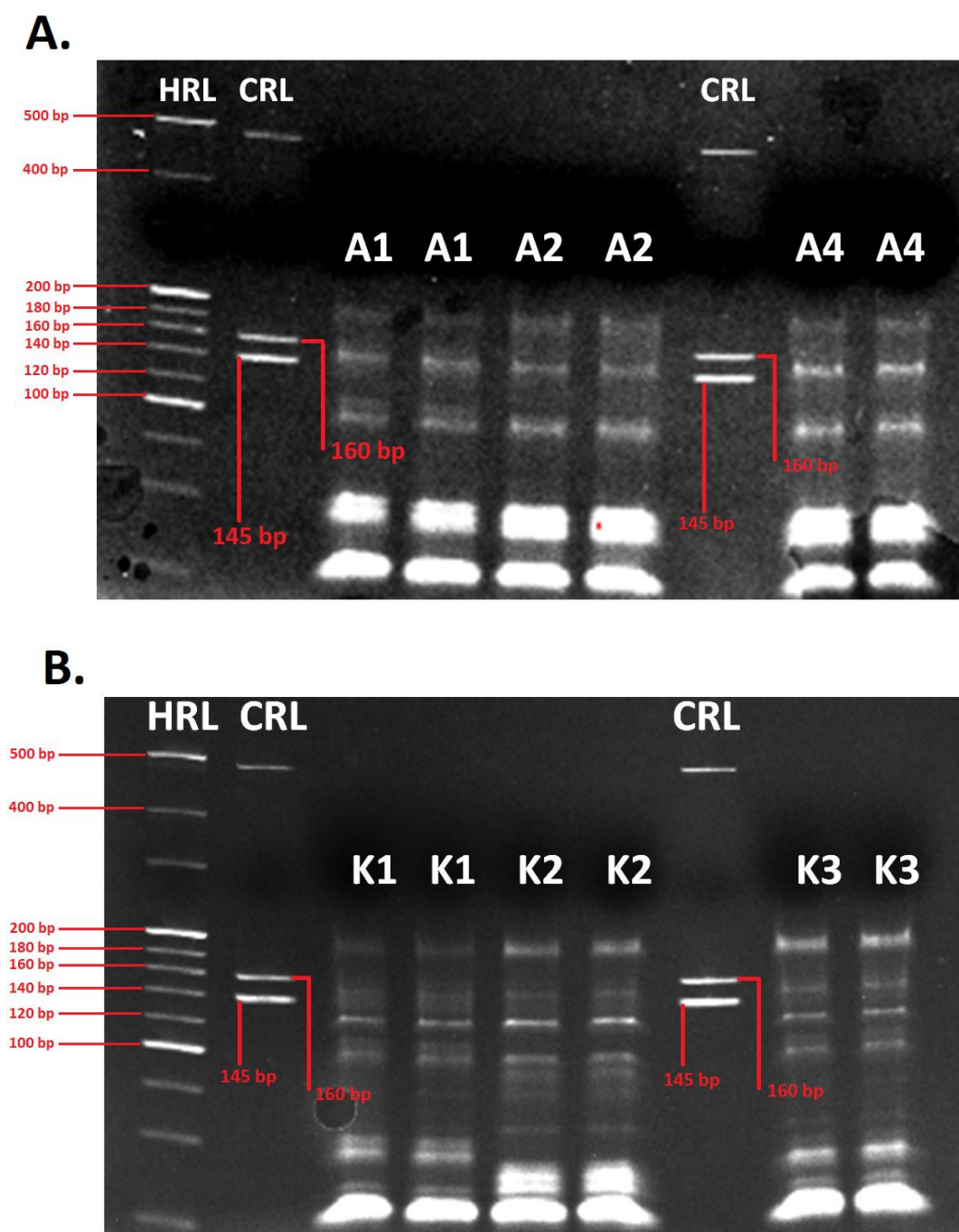


Ryc. 7. Elektroforegram dla próbki RNA wyizolowanej z płuc szczura. Zaznaczono piki odpowiadające frakcji 18S i 28S rybosomalnego RNA. O dobrej integralności i jakości RNA i miRNA świadczą wysokie wartości parametru RIN (powyżej 7) oraz stosunek frakcji 28S/18S powyżej wartości 2.

6.3. Wyniki oceny jakościowej i ilościowej bibliotek miRNA

Rozdział elektroforetyczny otrzymanych po łańcuchowej reakcji PCR bibliotek miRNA przeprowadzono na 6% żelu poliakrylamidowym. Dla każdej biblioteki przygotowanej z tkanek płuc i nosa otrzymano produkt o wielkości 145-160 nt, co odpowiada długości biblioteki miRNA. Przykładowe obrazy żeli poliakrylamidowych otrzymanych dla próbek z płuc szczurów grupy

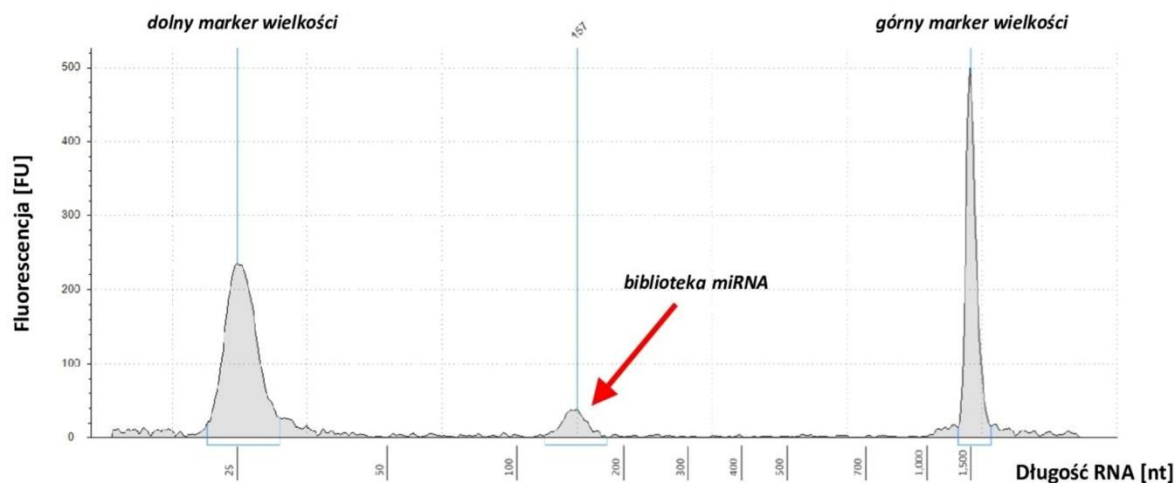
badanej (A1, A2, A4) oraz nosa grupy kontrolnej (K1, K2, K3) przedstawiono na odpowiednio na rycinie 8. A oraz 8. B.



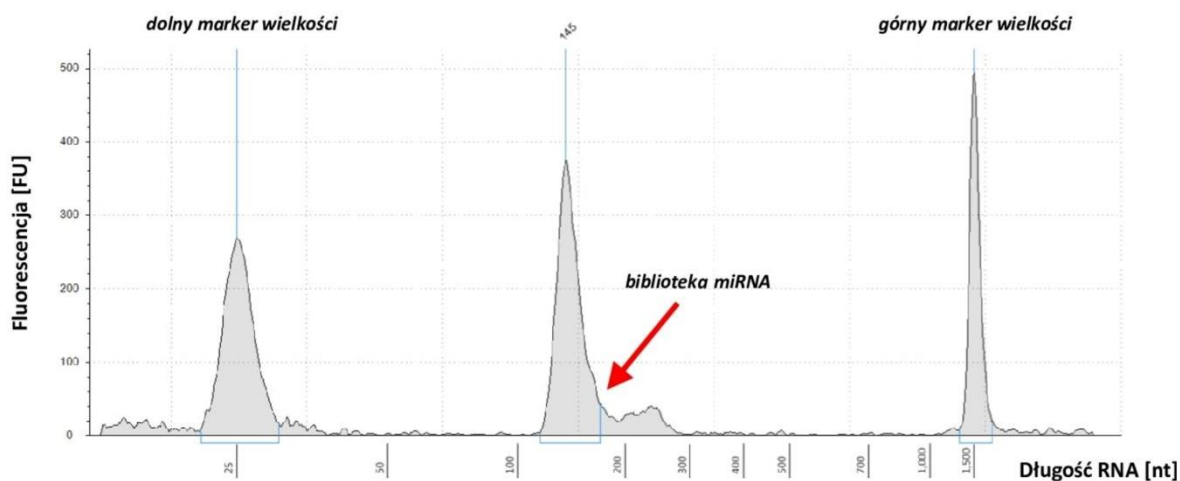
Ryc. 8. Obraz żeli poliakrylamidowych z widocznymi bibliotekami miRNA. Jako kontroli wielkości rozdzielanych na żelu fragmentów użyto markera HRL (ang. *High Resolution Ladder*) oraz CRL (ang. *Custom RNA Ladder*) o odpowiednio wysokiej i niskiej rozdzielczości. Prążek o długości 145-160 nt. odpowiada bibliotece miRNA. A – próby wyizolowane z płuc, B – próby wyizolowane z nabłonka nosa.

Do oceny specyficzności oczyszczonych po elektroforezie bibliotek miRNA wykorzystano ponownie aparat do automatycznej elektroforezy kapilarnej. Dla każdej biblioteki przygotowanej z płuc i nabłonka nosa otrzymano pik z maksimum przypadającym na około 150 nt, co pokrywa się z wytycznymi producenta odnośnie długości bibliotek. Elektroforegramy otrzymanych bibliotek miRNA przedstawiono na rycinach 9 - 12.

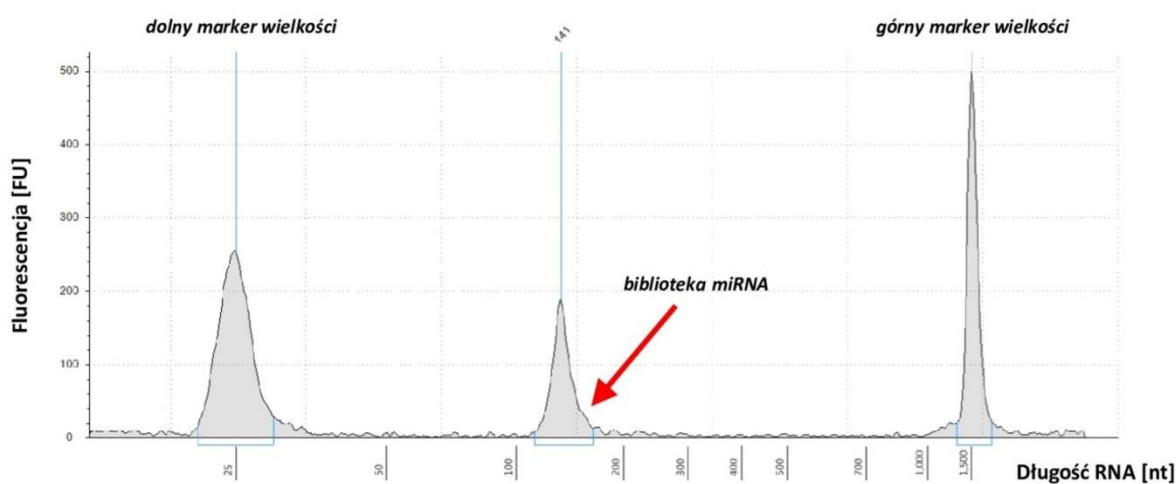
Biblioteka 1 (płuca)



Biblioteka 2 (płuca)

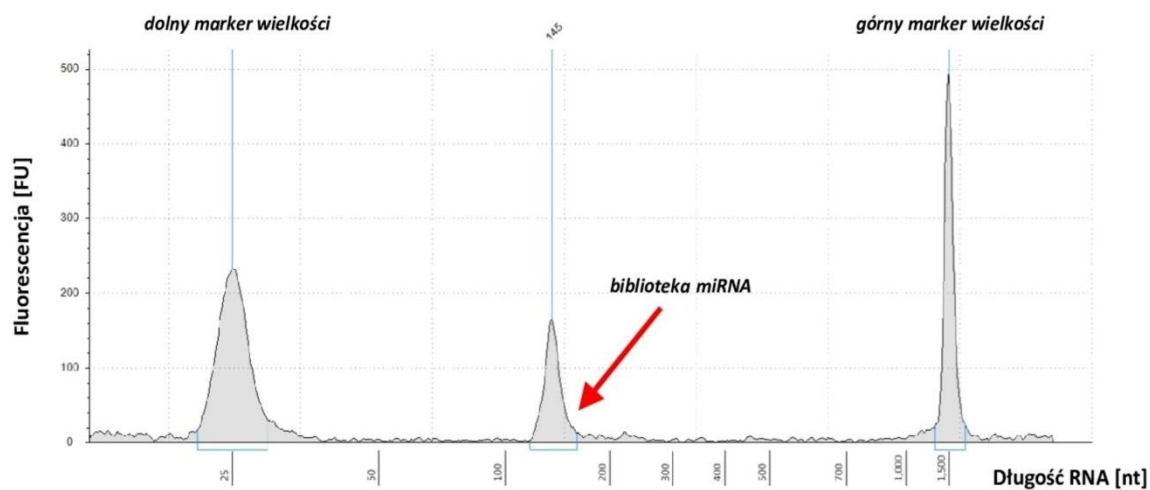


Biblioteka 3 (płuca)

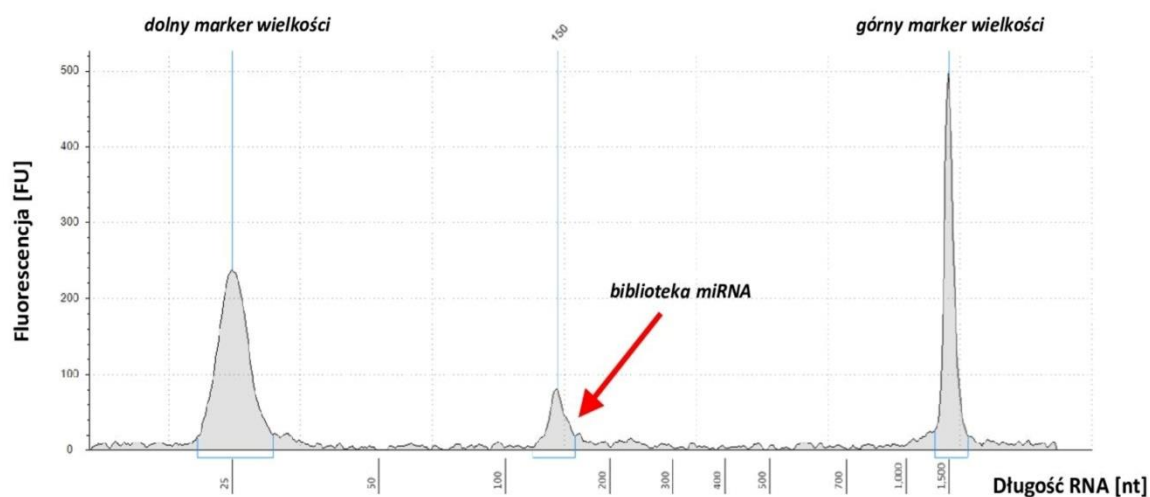


Ryc. 9. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych z płuc szczurów uczulonych roztworem HDM.

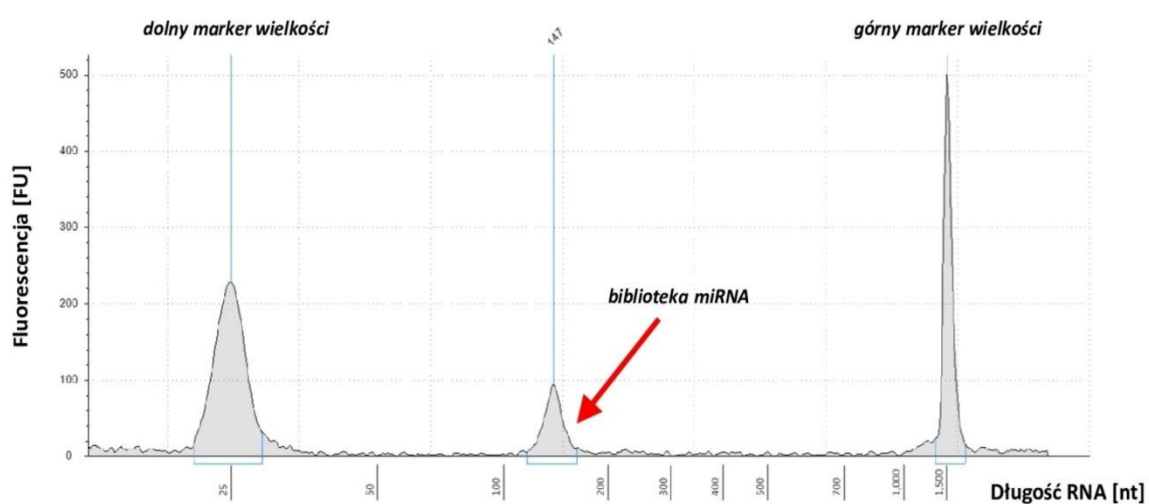
Biblioteka 4 (płuca)



Biblioteka 5 (płuca)

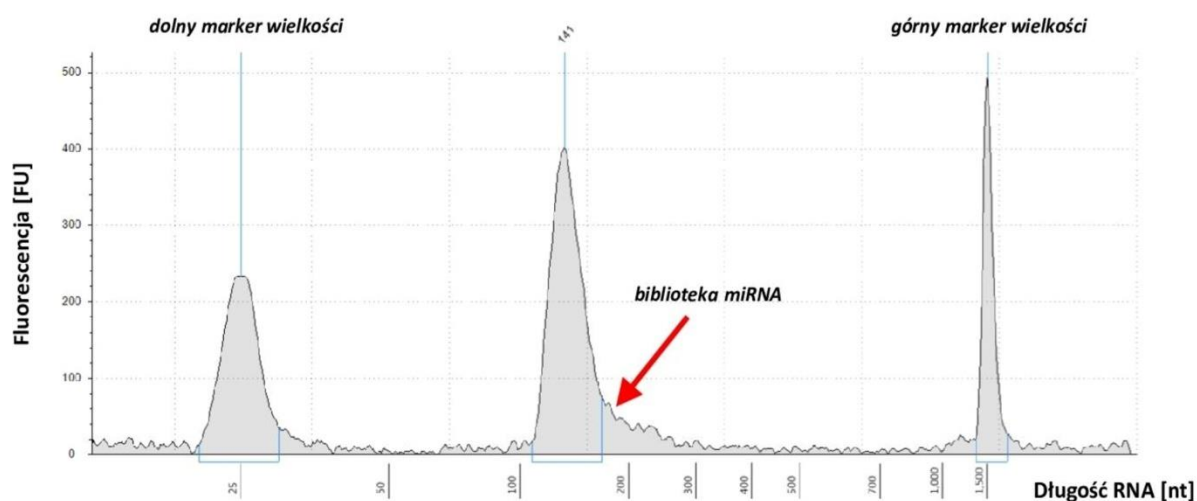


Biblioteka 6 (płuca)

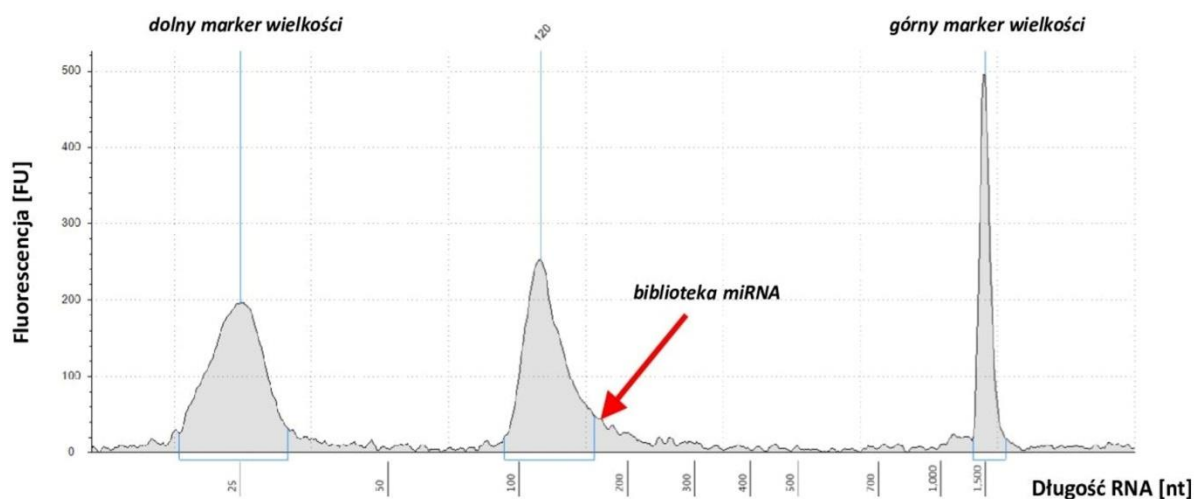


Ryc. 10. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych z płuc szczurów kontrolnych.

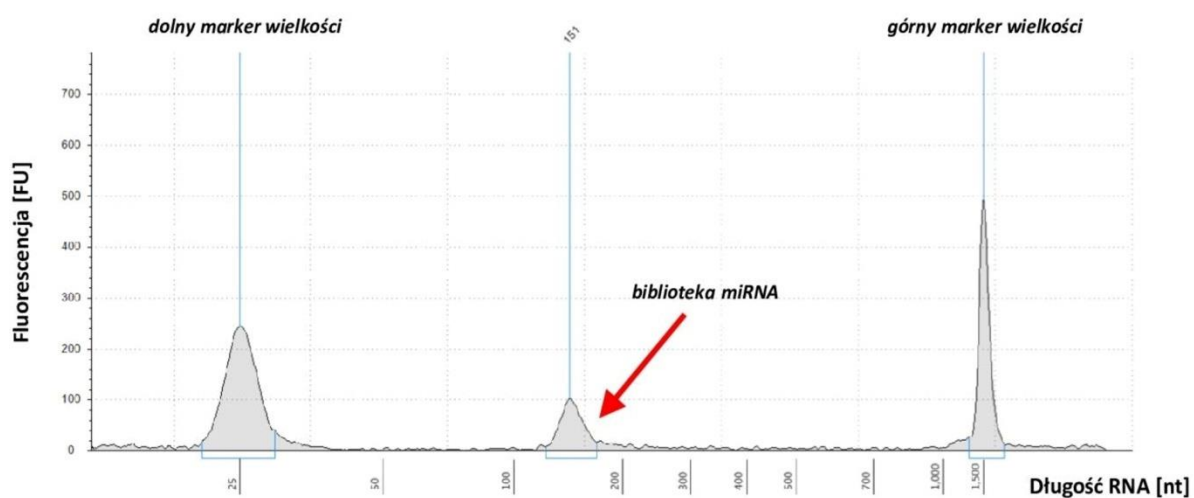
Biblioteka 7 (nabłonek nosa)



Biblioteka 8 (nabłonek nosa)

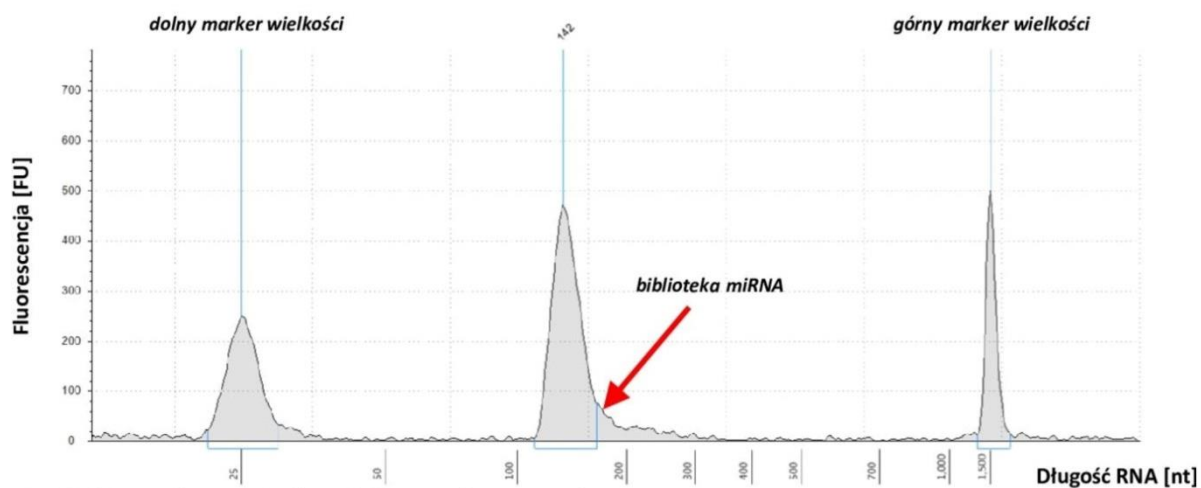


Biblioteka 9 (nabłonek nosa)

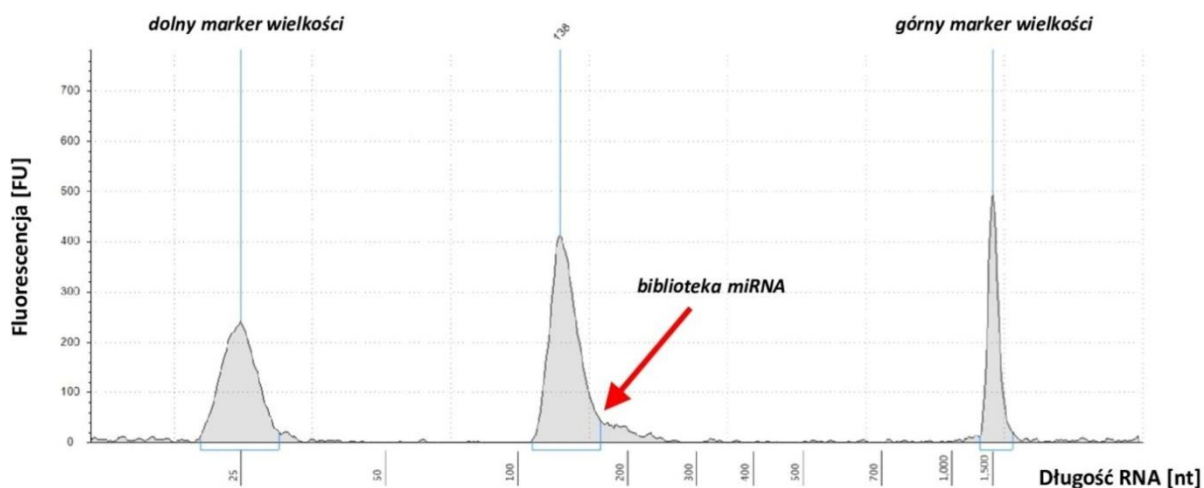


Ryc. 11. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych nabłonka nosa szczurów uczulonych roztworem HDM.

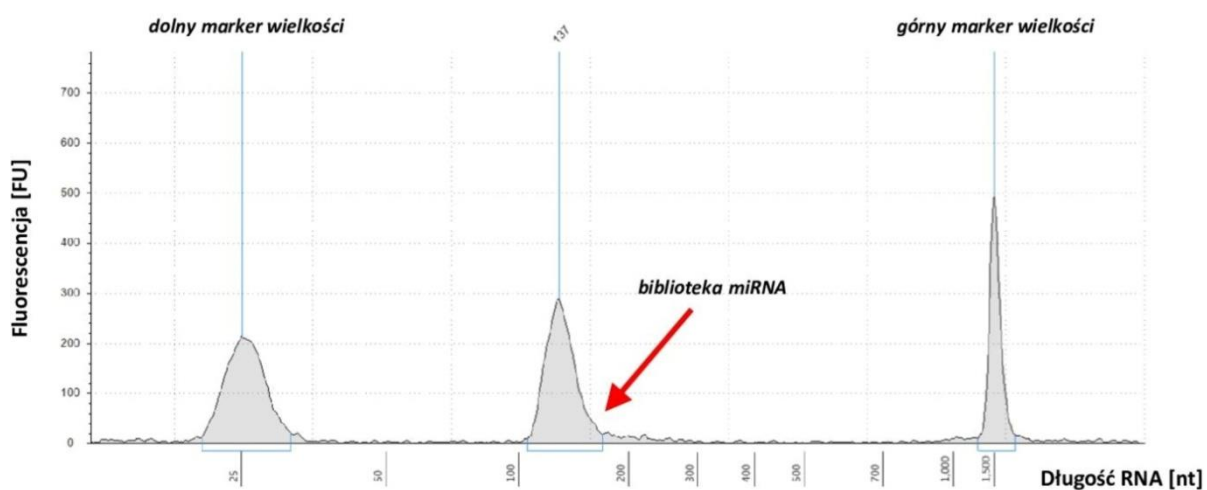
Biblioteka 10 (nabłonek nosa)



Biblioteka 11 (nabłonek nosa)



Biblioteka 12 (nabłonek nosa)



Ryc. 12. Elektroforegramy bibliotek miRNA otrzymanych z nabłonka nosa szczurów kontrolnych.

Do pomiaru stężenia biblioteki miRNA użyto zestawu Quanti Fluors DNA System opartego o barwnik fluorescencyjny specyficznie wiążący dwuniciowy DNA. Wartości stężeń dla poszczególnych bibliotek miRNA przedstawiono w tabeli 13. Do obliczenia stężenia nanomolarnego próbek z płuc i nabłonka z nosa przyjęto średnią długość biblioteki miRNA równą 150 pz i masę molową pojedynczej pary zasad wynoszącą 660 g/mol. Opierając się na powyższych wartościach obliczona średnia masa molowa bibliotek miRNA wynosiła 99 000 g/mol.

Tabela 13. Stężenia bibliotek miRNA otrzymanych z płuc i nabłonka nosa.

Material	Nazwa próby	Stężenie biblioteki [ng/ul]	Stężenie biblioteki [nM]
Pluca	K1	0,23	2,27
	K2	0,54	5,42
	K3	0,22	2,25
	A1	0,12	1,23
	A2	0,14	1,42
	A4	0,17	1,76
Nabłonek nosa	K1	0,55	5,56
	K2	0,53	5,37
	K3	0,27	2,68
	A1	0,55	5,51
	A2	0,45	4,59
	A4	0,17	1,76

Każdą z bibliotek rozcieńczono następnie do stężenia 1 nM. W tym celu w nowych probówkach połączono 7 μ l z każdej biblioteki oraz odpowiednią ilość 10 mM Tris-HCl. Do obliczenia wymaganej ilości 10 mM Tris-HCl, niezbędnego do rozcieńczenia bibliotek do stężenia 1 nM, wykorzystano wzór przedstawiony na rycinie 13.

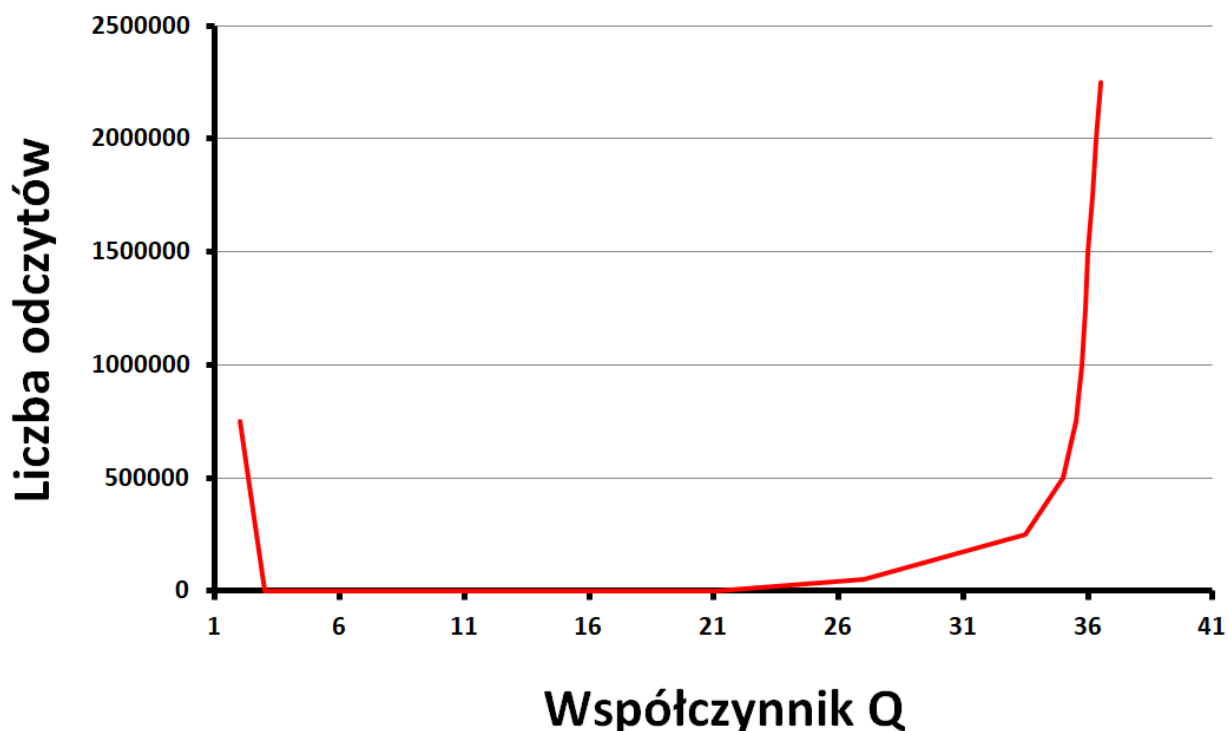
$$x [\mu l] = \frac{7 \mu l * y [nM]}{1 nM} - 7 \mu l$$

Ryc. 13. Wzór wykorzystany do normalizacji stężenia bibliotek miRNA. x – ilość mikrolitrów 10 mM Tris-HCl konieczna do normalizacji każdej z bibliotek, y – stężenie nanomolarne biblioteki.

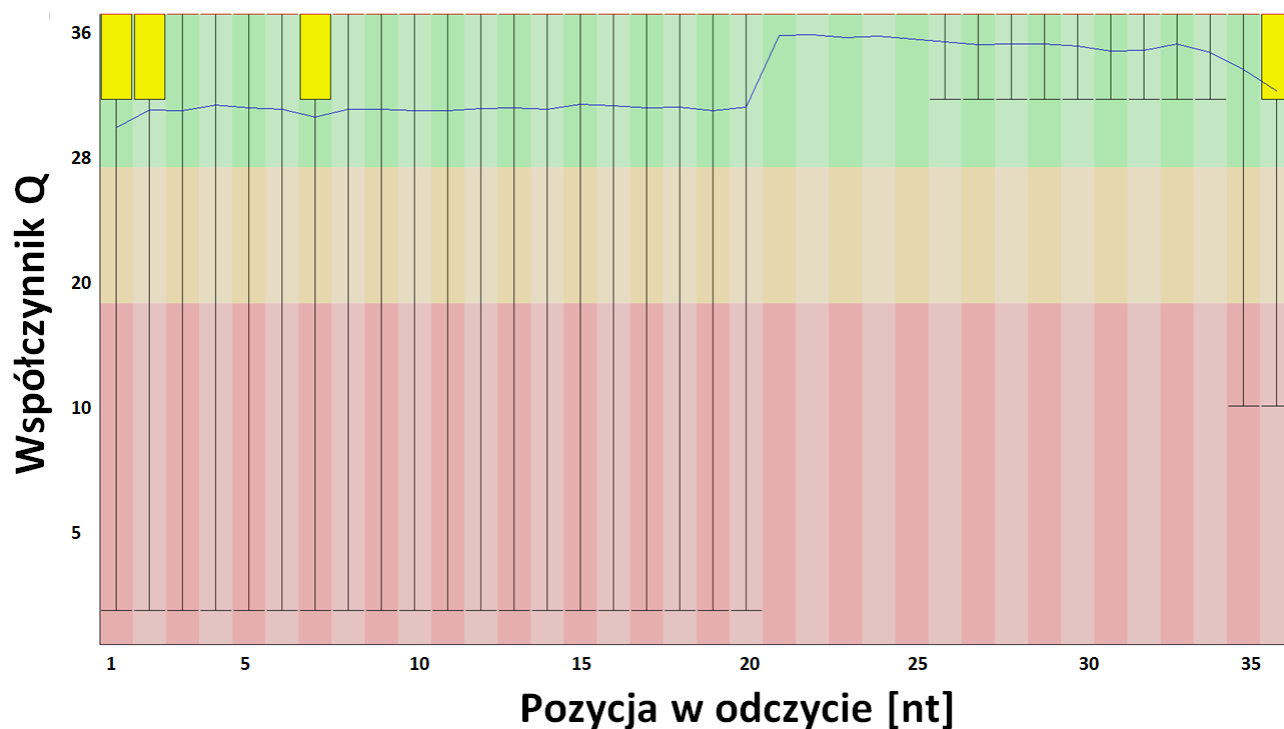
6.4. Analiza wyników sekwencjonowania

6.4.1. Ocena jakości odczytów

Do oceny jakości odczytów otrzymanych po sekwencjonowaniu wykorzystano współczynnik Q (ang. *Phred Quality Score*). Dla próbek z płuc i nabłonka nosa średnia wartość współczynnika Q wynosiła 35, co świadczy o wysokiej jakości odczytów. Wartość współczynnika Q dla liczby odczytów oraz pozycji w odczycie dla przykładowej próbki z płuc przedstawiono odpowiednio na rycinie 14 i 15.

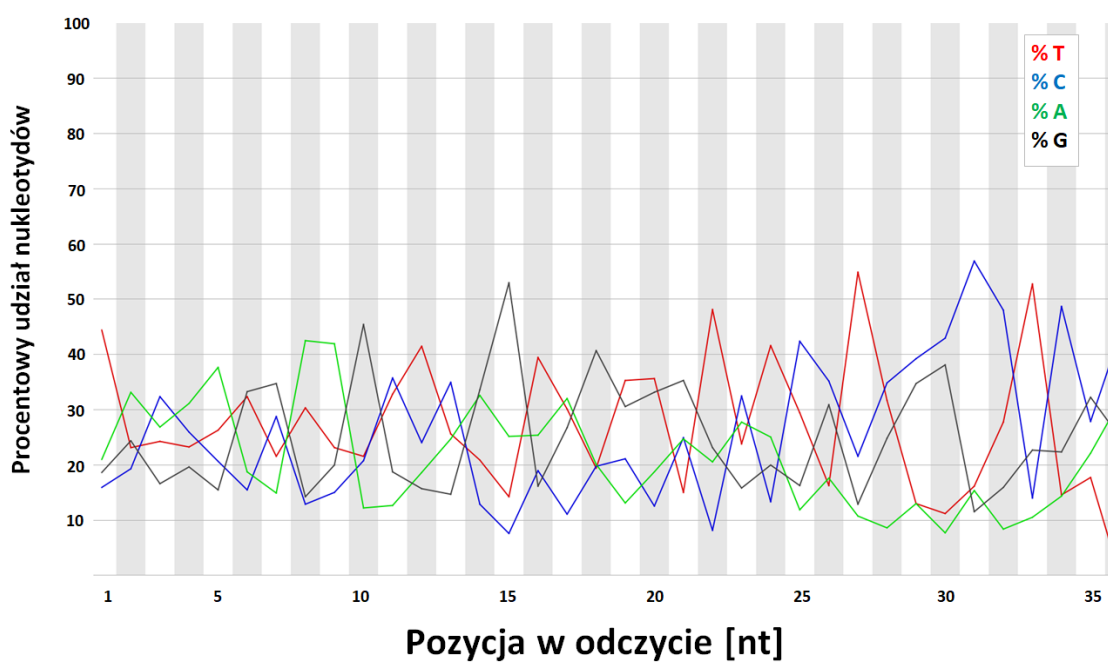


Ryc. 14. Wartość współczynnika Q i odpowiadając mu liczba odczytów.



Ryc. 15. Wartość współczynnika Q dla pozycji w odczycie, niebieska linia – średnia wartość parametru Q, żółta ramka – przedział kwartylny (25-75% percentyl), wąsy – przedział 10-90% percentyl.

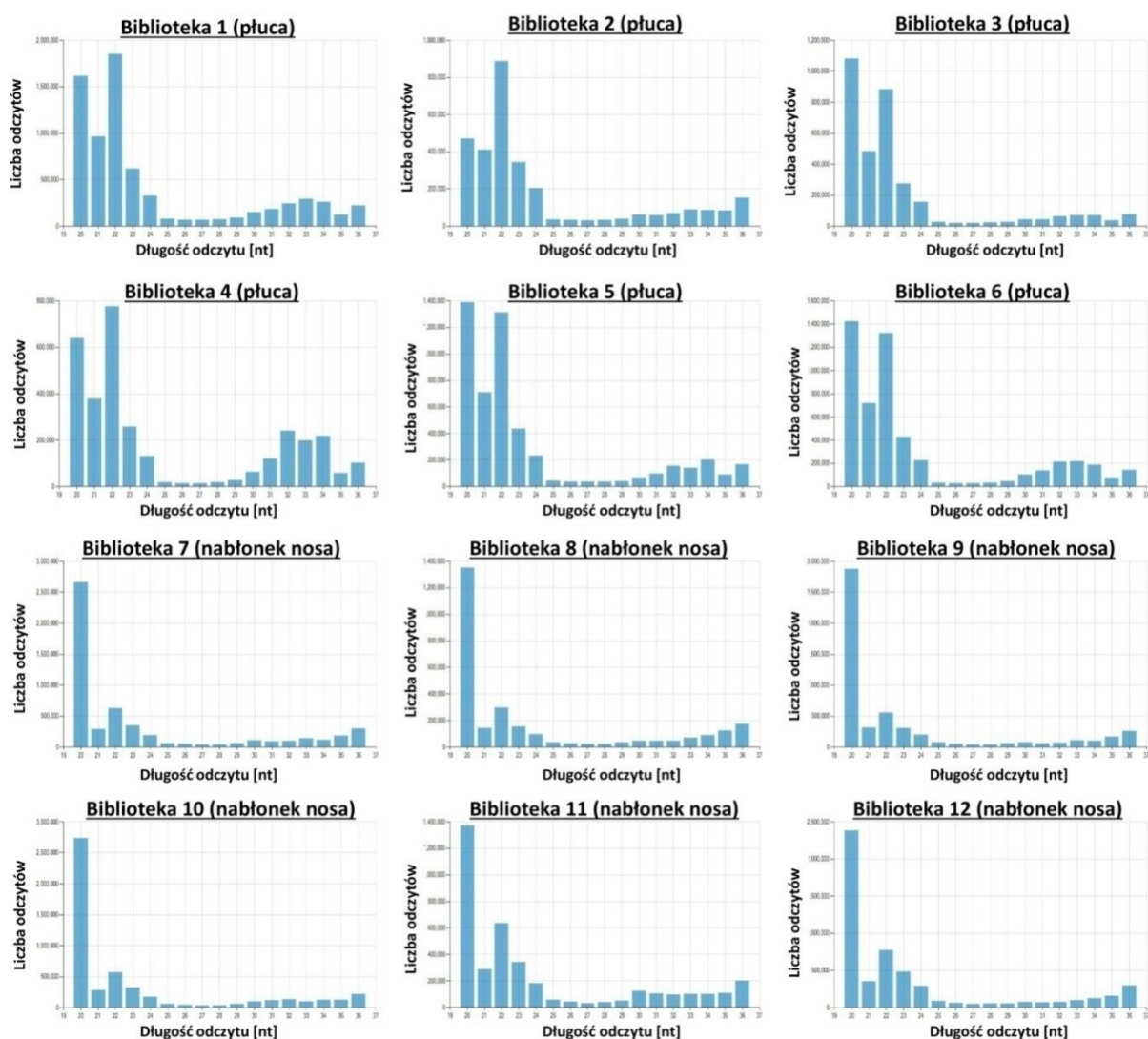
Procentowy udział poszczególnych nukleotydów w odczycie po sekwencjonowaniu mieścił się w przedziale 10 - 55% (ryc. 16).



Ryc. 16. Procentowy udział poszczególnych nukleotydów w odczycie.

6.4.2. Analiza bioinformatyczna – charakterystyka bibliotek miRNA

Analiza bioinformatyczna przeprowadzona została z wykorzystaniem platformy BaseSpace (Illumina) oraz aplikacji Small RNA. Odczyty poddano standardowej obróbce – usuwanie adapterów (ang. *adapter trimming*) i filtrowaniu odczytów niskiej jakości (ang. *quality filtering*). Długość odczytów otrzymanych po sekwencjonowaniu mieściła się w zakresie od 20 – 36 nt z wyraźną nadreprezentacją odczytów o długości od 20–24 nt, co odpowiada frakcji miRNA (Ryc 17). Drugi pik obserwowano przy odczytach o długości od 27 – 31 nt. przypada na inną frakcję niekodujących RNA – piRNA. Szczegółowy rozkład długości odczytów otrzymanych po sekwencjonowaniu oraz charakterystykę poszczególnych bibliotek przedstawiono odpowiednio na rycinie 17 oraz w tabeli 14.

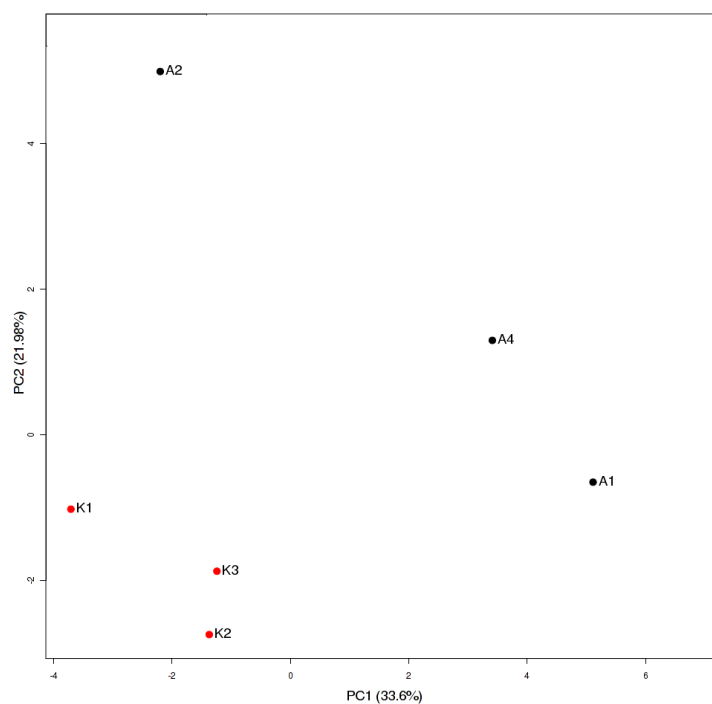


Ryc. 17. Charakterystyka rozkładu długości odczytów w poszczególnych bibliotekach miRNA.

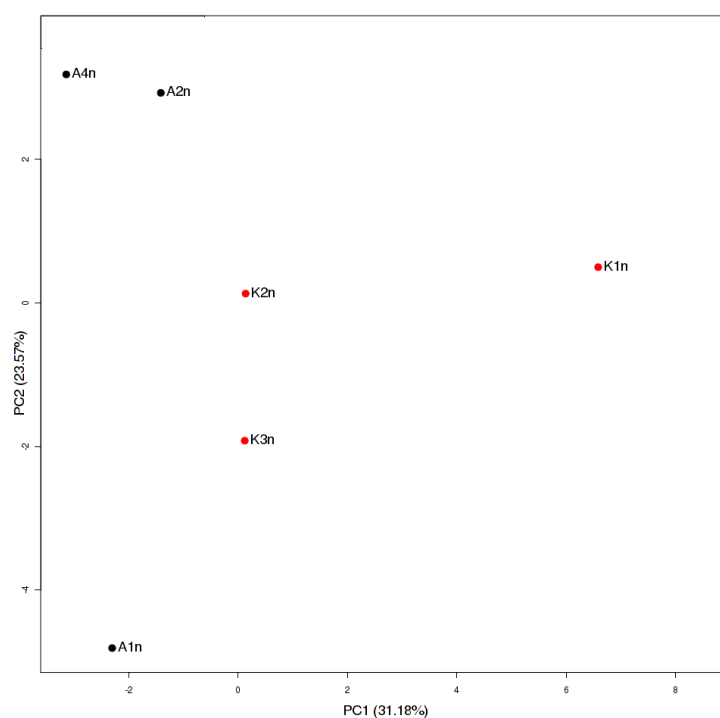
Tabela 14. Szczegółowa charakterystyka otrzymanych bibliotek miRNA.

Material	Identyfikator szczura	Nazwa biblioteki	Liczba odczytów po filtrowaniu	Procent odczytów zmapowanych do miRNA
Płuca	Szczur A1	Biblioteka 1	7227438	48,02
	Szczur A2	Biblioteka 2	3089066	55,0
	Szczur A4	Biblioteka 3	3398841	50,16
	Szczur K1	Biblioteka 4	3264095	44,84
	Szczur K2	Biblioteka 5	5181375	48,49
	Szczur K3	Biblioteka 6	5340136	48,93
Nabłonek nosa	Szczur A1	Biblioteka 7	5414854	22,84
	Szczur A2	Biblioteka 8	2784356	19,96
	Szczur A4	Biblioteka 9	5348980	21,96
	Szczur K1	Biblioteka 10	5230335	20,64
	Szczur K2	Biblioteka 11	3886179	32,53
	Szczur K3	Biblioteka 12	5494145	29,48

Analiza składowych głównych (PCA - ang. *Principal Component Analysis*) przeprowadzona dla zlogarytmowanej wartości liczby odczytów otrzymanych po normalizacji wykazała, że próbki grupy kontrolnej i badanej segregują oddzielenie zarówno w przypadku tkanek pobranych z płuc jak i nosa. Pierwsze dwa komponenty (PC1 oraz PC2) odpowiadają za 55,58% oraz 54,75 % zmienności odpowiednio w płucach (ryc. 18) oraz nabłonku nosa (ryc. 19).

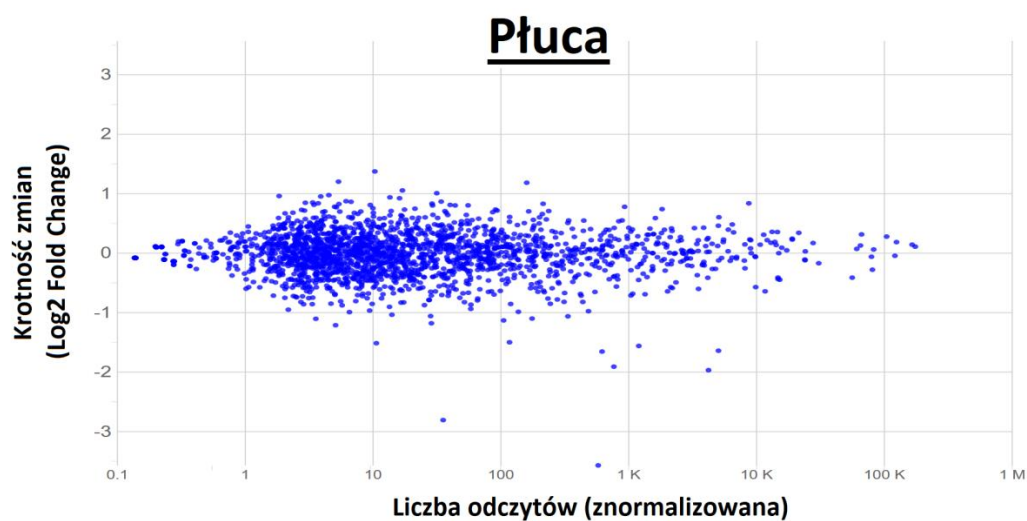


Ryc. 18. Wykres PCA dla logarytmu znormalizowanej liczby odczytów dla bibliotek miRNA otrzymanych z płuc. Próbkki opisane jako K1-K3 pochodzą od szczurów kontrolnych z kolei próbki A1, A2, A4 pochodzą od szczurów uczulonych roztworem HDM

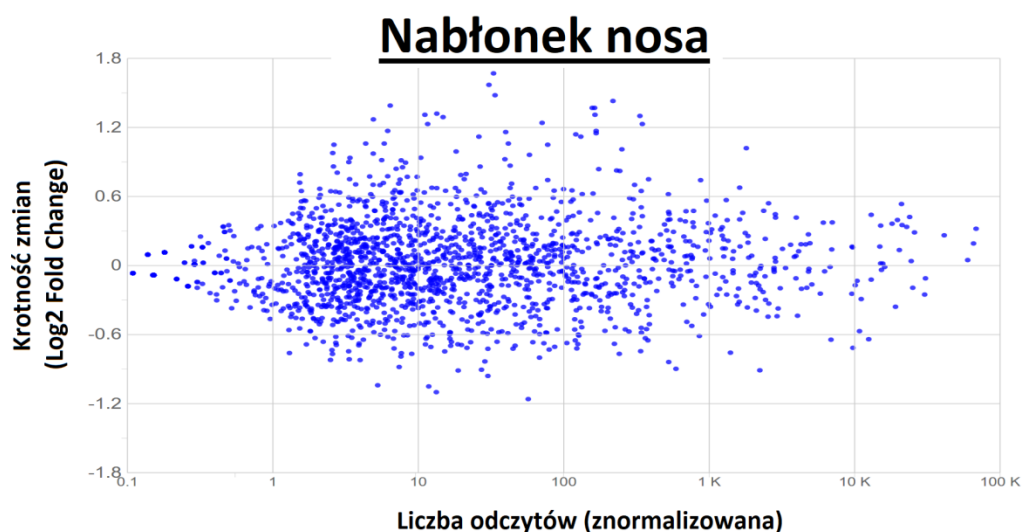


Ryc. 19. Wykres PCA dla logarytmu znormalizowanej liczby odczytów bibliotek miRNA otrzymanych z nabłonka nosa. Próbkki opisane jako K1-K3 pochodzą od szczurów kontrolnych z kolei próbki A1, A2, A4 pochodzą od szczurów uczulonych roztworem HDM.

Otrzymane w wyniku sekwencjonowania dojrzałe miRNA znacząco różniły się liczbą odczytów jak i krotnością zmian zarówno w przypadku próbek z płuc (ryc. 20) jak również nabłonka nosa (ryc. 21).



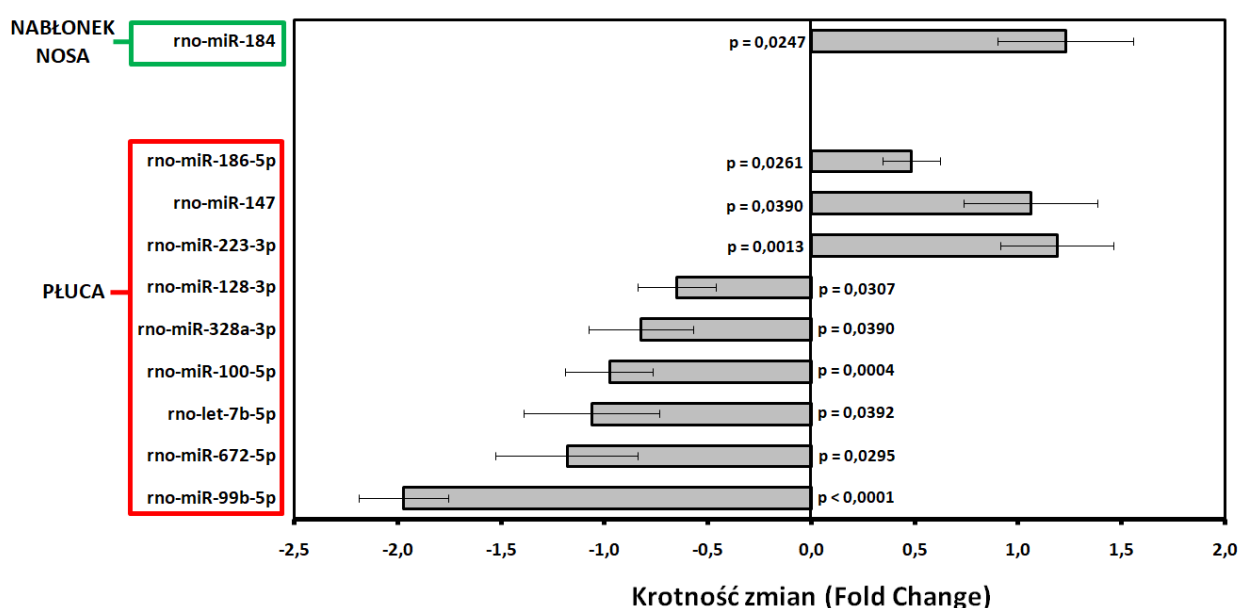
Ryc. 20. Wykres MA charakteryzujący rozkład liczby odczytów i krotność zmian dla miRNA otrzymanych z płuc.



Ryc. 21. Wykres MA charakteryzujący rozkład liczby odczytów i krotność zmian dla miRNA otrzymanych z nabłonka nosa.

6.4.3. Analiza różnicowa ekspresji profilu miRNA

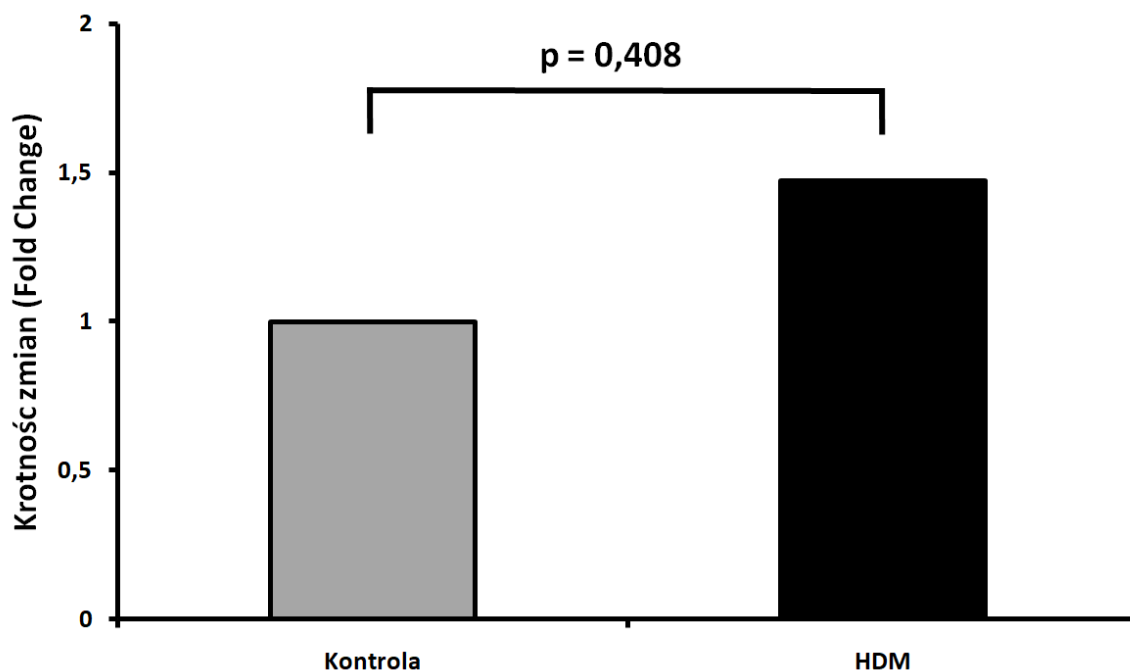
W celu przeprowadzenia analizy różnicowej, odczyty dla każdej biblioteki znormalizowano do miliona – RPM (ang. *reads per milion*). Analizę różnicową przeprowadzono grupami osobno dla bibliotek otrzymanych z płuc i nabłonka nosa. W przypadku płuc, następujące geny miRNA ulegały istotnie zmienionej ekspresji: rno-miR-99b-5p, rno-miR-672-5p, rno-miR-672-5p, rno-miR-100-5p, rno-miR-328a-3p, rno-miR-128-3p, rno-miR-223-3p, rno-miR-147, oraz rno-miR-186-5p. W przypadku nabłonka nosa tylko jeden gen miRNA (rno-miR-184) ulegał istotnie zmienionej ekspresji. Krotność zmian dla poszczególnych genów miRNA oraz odpowiadające im poziomy istotności przedstawiono na rycinie 22.



Ryc. 22. Krotność zmiany ekspresji genów miRNA wykazujących istotnie zmienioną ekspresję (p skorygowano FDR).

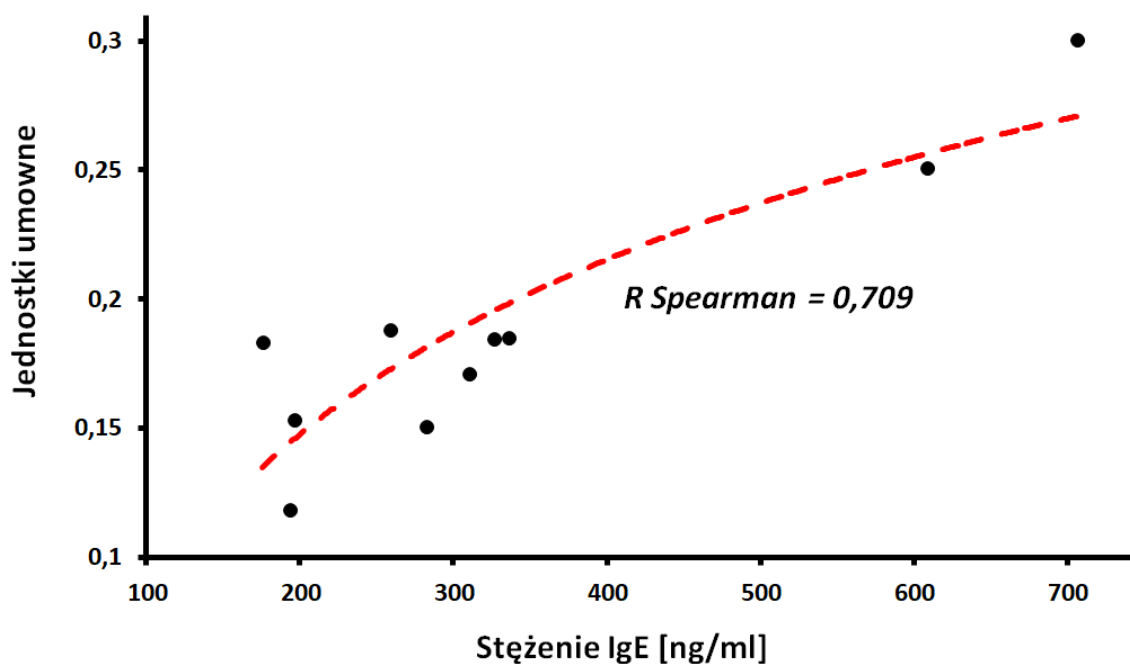
6.5. Analiza ekspresji miRNA z wykorzystaniem techniki PCR czasie rzeczywistym

Do walidacji ekspresji miRNAz wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym wybrano 6 genów, które w płucach cechowały największe zmiany w ekspresji w odniesieniu do grupy kontrolnej (najniższa wartość p). W przypadku nabłonka nosa do analizy włączono tylko jeden gen ulegający istotnie zmienionej ekspresji – rno-miR-184. Walidacja z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym wykazała, że jedynie ekspresja rno-miR-223-3p ulegała istotnie podwyższonej ekspresji (ryc. 23).



Ryc. 23. Krotność zmian ekspresji rno-miR-223-3p w stosunku do rno-miR-26a (kontrola endogenna) w płucach szczurów uczulonych (HDM) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Kontrola).

Ekspresja rno-miR-223-3p korelowała ze stężeniem IgE w surowicy szczurów z grupy badanej ($p = 0,021$). Zależność monotoniczną jak również otrzymane współczynniki korelacji rang Spearmana dla grupy badanej przedstawiono odpowiednio na rycinie 24.



Ryc. 24. Korelacja rang Spearmana dla ekspresji (jednostki umowne – $2^{-\Delta\Delta C_t}$) rno-miR-223-3p i stężenia IgE w surowicy szczurów grupy badanej.

6.6. Predykcja *in silico* genów docelowych dla miRNA

Do predykcji *in silico* genów regulowanych przez miRNA istotnie zmienionych w reakcji sekwencjonowania wykorzystano ogólnodostępną bazę miRTarBase oraz miRBase. W przypadku pierwszej z wymienionych do analizy włączono wszystkie geny docelowe, których potencjalną regulację przez miRNA potwierdzały wyniki eksperymentalne. Predykcję genów docelowych z wykorzystaniem bazy miRGate przeprowadzono grupami, osobno dla miRNA ulegających istotnie podwyższonej i obniżonej ekspresji. Dla obu grup wybrano po 20 genów docelowych charakteryzujących się najwyższymi wartościami wskaźnika zgodności (ang. *agreement score*). Geny docelowe wybrane dla miRNA wykazujących istotnie zróżnicowaną ekspresję w reakcji NGS przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Geny docelowe wybrane dla miRNA istotnie zróżnicowanych w reakcji sekwencjonowania. Geny zaznaczone kolorem czerwonym zostały wybrane w oparciu o wyniki eksperymentalne (baza danych miRTarBase). Geny zaznaczone kolorem czarnym zostały wybrane w oparciu o algorytmy obliczeniowe (baza danych miRGate).

miRNA o obniżonej ekspresji w reakcji sekwencjonowania NGS					
rno-miR-99b-5p	rno-miR-672-5p	rno-miR-7b-5p	rno-miR-100-5p	rno-miR-328a-3p	rno-miR-128-3p
<i>Aqp4</i>	<i>Fndc1</i>	<i>Vim</i>	<i>Aqp4</i>	<i>Sept3</i>	<i>Snap25</i>
<i>Npat</i>	<i>Tufsf10</i>	<i>Tagln</i>		<i>Cav1</i>	<i>Bmi1</i>
	<i>Myl7</i>	<i>Pric285</i>		<i>Igf1</i>	<i>Aff4</i>
	<i>Scn1a</i>	<i>Rgd1564937</i>		<i>Lmx1a</i>	<i>Usp30</i>
	<i>Oasl</i>	<i>Cyp4v3</i>		<i>Mtnr3</i>	
	<i>Mtnr11T</i>	<i>Gga3</i>		<i>Hnf1a</i>	
	<i>Fam214b</i>	<i>Ift57</i>		<i>Coro1c</i>	
				<i>Camkk1</i>	
				<i>Tmx4</i>	
				<i>Spert</i>	
miRNA o podwyższonej ekspresji w reakcji sekwencjonowania NGS					
rno-miR-147	rno-miR-186-5p	rno-miR-184	rno-miR-223-3p		
<i>Akt1s1</i>	<i>Stt3a</i>	<i>Plpp3</i>	<i>Vim</i>		
<i>Rnd1</i>	<i>Ahcyl1</i>		<i>Scn3a</i>		
<i>Txnrd1</i>	<i>More1</i>		<i>Aqp4</i>		
	<i>Rbm25</i>		<i>Cntn4</i>		
	<i>Glg1</i>		<i>Kcnd2</i>		
	<i>Serinc3</i>		<i>Slc25a30</i>		
	<i>Prkaa2</i>		<i>Grip2</i>		
	<i>Trip4</i>		<i>Gdap1</i>		
	<i>Fcar</i>				
	<i>Atg9a</i>				
	<i>Akt1s1</i>				
	<i>Chm</i>				
	<i>Erlin1</i>				
	<i>Lypla1</i>				

W przypadku rno-miR-223-3p do dalszej analizy funkcjonalnej włączono jedynie geny zwalidowane eksperymentalnie z wykorzystaniem bazy miRTarBase (tabela 16).

Tabela 16. Geny docelowe regulowane przez rno-miR-223-3p.

Numer identyfikacyjny genu w bazie NCBI	Oficjalna nazwa genu w bazie NCBI	Nazwa genu	Funkcja
81818	<i>Vim</i>	Wimentyna (ang. <i>vimentin</i>)	element strukturalny (filament) cytoszkieletu
497770	<i>Scn3a</i>	Podjednostka 3 kanału sodowego alfa bramkowanego napięciem (ang. <i>sodiumvoltage-gated channel alphasubunit 3</i>)	regulacja przez błonowego transportu jonów sodowych
25293	<i>Aqp4</i>	Akwaporyna 4 (ang. <i>aquaporin 4</i>)	białko błonowe odpowiedzialne za przez błonowy transport wody w komórce
116658	<i>Cntn4</i>	Kontaktyna 4 (ang. <i>contactin 4</i>)	białko adhezyjne odpowiedzialne za tworzenie połączeń pomiędzy aksonami
65180	<i>Kcnd2</i>	Kanał potasowy 2 podrodziny D bramkowany napięciem (ang. <i>potassium voltage-gated channel subfamily D member 2</i>)	białko błonowe biorące udział w transporcie jonów potasu

6.7. Analiza ontologiczna genów docelowych dla miRNA

Do przeprowadzenia analizy szlaków biologicznych dla genów docelowych regulowanych przez miRNA istotnie zmienione w reakcji NGS wykorzystano ogólnodostępną bazę danych DAVID w wersji 6.8. Do analizy włączono wszystkie geny docelowe wytypowane w analizie predykcyjnej. Analizę przeprowadzono osobno dla genów miRNA wykazujących istotnie podwyższoną i ekspresję w reakcji sekwencjonowania NGS włączając geny docelowe zwalidowane eksperymentalnie oraz te wyznaczone metodami obliczeniowymi *in silico*. Wyniki analizy funkcjonalnej dla miRNA ulegających istotnie podwyższonej lub obniżonej ekspresji przedstawiono odpowiednio w tabeli 17 oraz 18.

Tabela 17. Analiza szlaków biologicznych regulowanych przez geny docelowe wybrane dla miRNA ulegających istotnie zwiększonej ekspresji w reakcji sekwencjonowania.

Funkcja	Liczba genów	P	Krotność wzbogacenia (Fold Enrichment)	Geny
Różnicowanie komórek glejowych Bergmanna	2	0,015	127,5	<i>Vim, Plpp3</i>
Odpowiedź na jony selenu	2	0,026	73,8	<i>Vim, Txnrd1</i>
Negatywna regulacja ścieżki mTOR	2	0,038	50,1	<i>Akt1s1, Prkaa2</i>
Neuronowy potencjał czynnościowy	2	0,047	40,1	<i>Kcnd2, Scn3a</i>
Wiązanie białek	7	0,015	3,2	<i>Kcnd2, Akt1s1, Scn3a, Vim, Chm, Grip2, Prkaa2</i>
Glikoproteina	7	0,030	2,7	<i>Glg1, Atg9a, Scn3a, Vim, Aqp4, Cntn4, Plpp3</i>
Fosfoproteina	11	0,010	2,3	<i>Glg1, Kcnd2, Atg9a, Scn3a, Vim, Grip2, Aqp4, Ahcyl1, Txnrd1, Prkaa2, Plpp3</i>

Tabela 18. Analiza szlaków biologicznych regulowanych przez geny docelowe wybrane dla miRNA ulegających istotnie obniżonej ekspresji w reakcji sekwencjonowania.

Funkcja	Liczba genów	p	Krotność wzbogacenia (Fold Enrichment)	Geny
Homeostaza wody	2	0,009	217,8	<i>Aqp4, Igf1</i>
Regulacja pofałdowań (ang. <i>regulation of ruffle assembly</i>)	2	0,011	169,4	<i>Coro1c, Cav1</i>
Miotubule	2	0,018	106,5	<i>Mtmr11, Mtmr3</i>
Regulacja zewnętrznej apoptotycznej ścieżki sygnalizacyjnej	2	0,039	47,6	<i>Cav1, Tnfrsf10</i>
Acetylacja histonów	2	0,047	40,1	<i>Bmi1, Hnf1a</i>
Wiązanie GTPazy Rac	2	0,047	39,8	<i>Coro1c, Cav1</i>
Odpowiedź na glukokortykoidy	3	0,012	17,2	<i>Cav1, Aqp4, Igf1</i>
Regulacja ekspresji genów	4	0,003	13,0	<i>Bmi1, Npat, Igf1, Lmx1a</i>
Szlaki sygnalizacyjne regulujące pluripotencję komórek macierzystych	3	0,026	11,1	<i>Bmi1, Hnf1a, Igf1</i>
Cytoskielet	3	0,048	8,2	<i>Coro1c, Sept3, Vim</i>
Fosfoproteina	13	0,000	2,4	<i>Cav1, Scn1a, Sept3, Hnf1a, Vim, Aqp4, Camkk1, Mtmr3, Tagln, Fndc1, Fam214b, Spert, Snap25</i>

Analizę funkcjonalną szlaków biologicznych przeprowadzono również oddzielnie dla rno-miR-223-3p, który jako jedyny z badanych miRNA wykazał istotnie statystyczne zmiany po walidacji z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Dla rno-miR-223-3p wykazano 17 terminów biologicznych, spośród których dominowały te związane z podstawowymi procesami: tubule T, transport, wiązanie białek, fosfoproteina, glikoproteina, błona komórkowa, homodimeryzacja białek, transport jonowy. Dodatkowo wysoką wartość krotności wzbogacenia wykazano dla procesów związane z rozwojem i prawidłowym funkcjonowaniem układu nerwowego (tabela 19).

Tabela 19. Analiza szlaków biologicznych regulowanych przez geny docelowe dla mo-miR-223-3p.

Funkcja	Liczba genów	P	Krotność wzbogacenia (Fold Enrichment)	Geny
Neuronowy potencjał czynnościowy	2	0,008	200,4	<i>Kcnd2, Scn3a</i>
Kanał potasowy zależny od napięcia	2	0,011	141,0	<i>Kcnd2, Scn3a</i>
Odpowiedź na promieniowanie	2	0,012	134,9	<i>Vim, Aqp4</i>
Tubule T	2	0,012	130,0	<i>Kcnd2, Aqp4</i>
Percepcja sensoryczna bólu	2	0,018	87,7	<i>Kcnd2, Scn3a</i>
Domena transportowa jonów	2	0,022	71,8	<i>Kcnd2, Scn3a</i>
Regulacja przez błonowego transportu jonów	2	0,023	70,1	<i>Kcnd2, Scn3a</i>
Bramkowane napięciem kanały	2	0,025	64,5	<i>Kcnd2, Scn3a</i>
Sarkolema	2	0,025	62,8	<i>Kcnd2, Aqp4</i>
Homodimeryzacja białek	2	0,044	36,0	<i>Kcnd2, Aqp4</i>
Rozwój systemu nerwowego	2	0,045	35,2	<i>Scn3a, Cntn4</i>
Transport jonowy	3	0,004	24,2	<i>Kcnd2, Scn3a, Aqp4</i>
Transport	3	0,023	9,2	<i>Kcnd2, Scn3a, Aqp4</i>
Wiązanie białek	3	0,026	7,9	<i>Kcnd2, Scn3a, Vim</i>
Glikoproteina	4	0,004	7,8	<i>Scn3a, Vim, Aqp4, Cntn4</i>
Fosfoproteina	4	0,025	4,1	<i>Kcnd2, Scn3a, Vim, Aqp4</i>
Błona komórkowa	4	0,033	3,7	<i>Kcnd2, Vim, Aqp4, Cntn4</i>

7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. Ekspozycja szczurów szczepu Brown Norway na roztwór roztoczy kurzu domowego (HDM) skutkowała znaczącym wzrostem stężenia IgE w surowicy szczurów uczulonych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Co więcej płuca szczurów uczulonych charakteryzowała infiltracja komórek układu immunologicznego i skurcz oskrzeli.
2. Analiza profilu ekspresji miRNA metodą sekwencjonowania nowej generacji wykazała, że 9 genów miRNA (rno-miR-99b-5p, rno-miR-672-5p, rno-miR-672-5p, rno-miR-100-5p, rno-miR-328a-3p, rno-miR-128-3p, rno-miR-223-3p, rno-miR-147, oraz rno-miR-186-5p) ulegało istotnie zmienionej ekspresji w płucach szczurów uczulonych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. W przypadku nabłonka nosa tylko jeden gen miRNA (rno-miR-184) ulegał istotnie zmienionej ekspresji u zwierząt uczulonych w porównaniu do grupy kontrolnej.
3. Przeprowadzona walidacja wyników sekwencjonowania z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy potwierdziła, że jedynie rno-miR-223-3p ulegał istotnie podwyższonej ekspresji w płucach. Ekspresja rno-miR-223-3p istotnie korelowała ze stężeniem przeciwciał IgE w surowicy szczurów uczulonych i kontrolnych. Ekspresja pozostałych miRNA nie różniła istotnie między szczurami uczulonymi a kontrolnymi w płucach. Również walidacja ekspresji miR-184 w nabłonku nosa nie potwierdziła istotnych różnic między szczurami uczulonymi a kontrolnymi.
4. Analiza funkcjonalna procesów i szlaków biologicznych wskazała, iż geny miRNA wykazujące zróżnicowaną ekspresję w reakcji sekwencjonowania mogą być związane są z negatywną regulacją ścieżki mTOR, regulacją stężenia jonów selenu oraz odpowiedzią na glikokortykosteroidy.
5. Analiza predykcyjna przeprowadzona w oparciu o ogólnodostępną bazę danych miRTarBase wskazała następujące geny docelowe dla rno-miR-223-3p: *Vim*, *Scn3A*, *Aqp4*, *Cntn4* oraz *Kcnd2*.

6. Analiza procesów i szlaków biologicznych przeprowadzona dla rno-miR-223-3p wykazała nadreprezentację procesów związanych z rozwojem i prawidłowym funkcjonowaniem układu nerwowego oraz neuronalnym potencjałem czynnościowym.

8. DYSKUSJA

Astma i alergiczny nieżyt nosa są przykładami chorób cywilizacyjnych, stanowiących poważny problem natury zdrowotnej i socjoekonomicznej. Według informacji Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Klatki Piersiowej (ang. *American Thoracic Society*) coroczne koszty związane z leczeniem astmy oskrzelowej w Stanach Zjednoczonych sięgają blisko 80 miliardów dolarów [113]. Na skutek reakcji anafilaktycznej każdego roku umiera tam ponad 3,5 tysiąca chorych [114], a w populacji ogólnej umiera aż 420 tysięcy osób [115]. W Polsce szacuje się, że na astmę umiera średnio 15 osób na 10 tysięcy chorych, czyli średnio 1500 osób rocznie [116]. Grupą chorych wymagającą szczególnej opieki zdrowotnej są pacjenci z ciężką postacią astmy, jak również ci, u których pomimo zastosowanego leczenia nie obserwuje się widocznej poprawy [117]. Niewątpliwym wyzwaniem jest również diagnozowanie astmy, której najczęstsze objawy (takie jak duszność, czy kaszel) nie są specyficzne wyłącznie dla tej choroby [118]. Niezwykle istotnym aspektem podczas diagnostyki astmy jest również określenie stopnia ciężkości z wykorzystaniem dostępnych badań czynnościowych, takich jak spirometria, czy oscylometria impulsowa. Badania przeprowadzone przez Kavanagh i wsp. [119] sugerują, że problem niedoszacowania stopnia ciężkości choroby dotyczyć może od 19% do nawet 73% wszystkich pacjentów z astmą, co w konsekwencji może prowadzić do śmierci chorego.

Alergiczny nieżyt nosa jest, podobnie jak astma oskrzelowa, chorobą przewlekłą układu oddechowego, która znacząco pogarsza jakość życia chorego. Szacuje się, że choroba ta może dotyczyć nawet 500 milionów osób [120]. Jednak ponieważ alergiczny nieżyt nosa nie zagraża bezpośrednio życiu chorego, choroba jest często bagatelizowana zarówno przez chorych, jak i lekarzy. Nieleczony lub niewłaściwie leczony alergiczny nieżyt nosa skutkuje obniżeniem drożności przewodów nosowych, co bezpośrednio przekłada się na problemy ze snem, zmęczenie w ciągu dnia, a także negatywnie wpływa na stan psychiczny chorego. W skrajnych przypadkach może prowadzić do stanów lękowych, a nawet do zaburzeń o charakterze depresyjnym [121], [122]. Koszty związane z leczeniem alergicznego nieżytu nosa, mimo iż trudne do oszacowania, niewątpliwie rosną z roku na rok. Przykładowo w Stanach Zjednoczonych, w 2000 roku koszty leczenia wyniosły 6,1 miliarda, podczas gdy w 2005 roku wzrosły do 11,2 miliarda dolarów [123].

Wyzwaniem dla współczesnej opieki zdrowotnej są pacjenci chorujący na astmę ze współistniejącym alergicznym nieżytem nosa. Badania przeprowadzone przez Thomas i wsp. [124] w grupie 9522 dzieci chorych na astmę wykazały, że pacjenci chorujący jednocześnie na astmę i alergiczny nieżyt nosa wymagają częstszych wizyt lekarskich i/lub hospitalizacji w porównaniu z osobami chorującymi wyłącznie na astmę. Ponadto, leczenie takich pacjentów wymagało

przyjmowania większych ilości leków, co dodatkowo zwiększało koszty terapii. Według najnowszych wytycznych zarówno astma, jak i alergiczny nieżyt nosa traktowane są jako oddzielne jednostki chorobowe i leczone z wykorzystaniem różnych dawek wziewnych glikokortykosteroidów, agonistów receptorów β_2 -adrenergicznego, czy leków antyhistaminowych. Thomas i wsp. [124] zaproponowali, iż opracowanie ujednoliconych protokołów terapeutycznych (dedykowanych dla obu chorób) mogłoby znacząco zredukować koszty i poprawić wyniki leczenia pacjentów chorych jednocześnie na astmę i alergiczny nieżyt nosa. Nie ulega wątpliwości, że do osiągnięcia tego celu konieczne jest poznanie mechanizmów odpowiadających za współwystępowanie obu chorób. Kluczową rolę odgrywa tutaj wspólny dla obu chorób patomechanizm nadreaktywności typu 1 – zapalenia alergicznego.

Kim i wsp. [1] w badaniach dotyczących astmy i alergicznego nieżytu nosa zasugerowali, iż za współwystępowanie obu chorób odpowiedzialne mogą być leukotrieny cysteinylowe (CysLTs). Są one produktami enzymatycznych przemian kwasu arachidonowego i podczas reakcji alergicznej wydzielane są przez mastocyty, bazofile, eozynofile oraz neutrofile do sąsiadujących tkanek. Efektem ich działania jest zwiększona przepuszczalność naczyń krwionośnych, co z kolei promuje migrację komórek układu immunologicznego do miejsca zapalenia. Zastosowanie przez autorów antagonistów receptorów leukotrienowych okazało się skuteczne w leczeniu pacjentów cierpiących jednocześnie na astmę i alergiczny nieżyt nosa [125], [126]. Jednakże autorzy w swojej pracy nie wyjaśnili, w jaki sposób leukotrieny miałyby pośredniczyć w rozprzestrzenianiu stanu zapalnego w obrębie układu oddechowego.

Z kolei badania przeprowadzone równolegle przez Inman i wsp. [127] oraz Denburgi wsp. [128] sugerują, że kluczową rolę we współwystępowaniu astmy i alergicznego nieżytu nosa mogą odgrywać cytokiny (IL-5 oraz GM-CSF) wydzielane przez komórki układu immunologicznego stymulowane na skutek reakcji uczulenia. Substancje te przedostają się do krwiobiegu, a następnie stymulują komórki progenitorowe, obecne w szpiku kostnym do różnicowania w eozynofile. Te ostatnie na zasadzie chemotaksji migrują do płuc i tym samym rozprzestrzeniają zapalenie alergiczne w obrębie całego układu oddechowego. Przedstawioną hipotezę wydają się potwierdzać również prace Sehmi i wsp. [129] oraz Woodi wsp. [130], w których wykazano, iż po ekspozycji alergenem w komórkach szpiku kostnego dochodzi do zwiększonej produkcji limfocytów T wydzielających IL-5. Ta ostatnia odgrywa istotną rolę w dojrzewaniu i późniejszej migracji eozynofilów do tkanek objętych zapaleniem. Przedstawiony mechanizm nie wyjaśnia jednak współwystępowania obu chorób u tych pacjentów, u których zapalenie alergiczne przebiega w oparciu o fenotyp neutrofilowy. Co więcej, nie tłumaczy również dlaczego astma czy alergiczny nieżyt nosa współwystępują równie często z innymi chorobami alergicznymi (atopowe zapalenie

skóry i alergiczne zapalenie spojówek), przebiegającymi w oparciu o nadwrażliwość typu 1, ale o innej manifestacji narządowej.

Z uwagi na udokumentowaną rolę miRNA w regulacji procesów zapalnych, w niniejszej rozprawie założono, że kluczową rolę w patogenezie obu chorób mogą odgrywać małe, niekodujące cząsteczki RNA – miRNA. Na chwilę obecną wiadomo, że pełnią one istotną rolę w wewnątrzkomórkowej regulacji licznych procesów związanych nie tylko z prawidłowym funkcjonowaniem komórki, takich jak: wzrost, różnicowanie, proliferacja, czy apoptoza [131], ale również z rozwojem odporności wrodzonej oraz nabytej [132]. Ze względu na udział miRNA w jednoczesnej regulacji wielu genów biorących udział w prawidłowym funkcjonowaniu komórki, wszelkie zaburzenia ekspresji miRNA mogą negatywnie wpływać na stan fizjologiczny komórki, tkanki, a nawet całego organizmu. Dotychczas potwierdzono udział miRNA w patogenezie chorób nowotworowych [133], sercowo-naczyniowych [134], neurologicznych [135] oraz zapalnych [136]. Zmiany profilu ekspresji genów miRNA mogą być efektem specyficznej odpowiedzi komórki na bodźce zewnętrzne takie jak czynniki stresowe, uszkodzenie materiału genetycznego, czy infekcja patogenem [137], [138]. W tym przypadku rola miRNA dotyczy przypuszczalnie przenoszenia informacji o zaistniałym zagrożeniu z komórki objętej stanem patologicznym do komórek sąsiadujących. Niewątpliwy udział w tym procesie odgrywają miRNA podlegające sekrecji w pęcherzykach zewnątrzwydzielniczych, a ich obecność potwierdzono w płynach ustrojowych, takich jak surowica, osocze, mocz, czy płwocina [139], [140]. Możliwość oznaczenia w materiale pobranym nieinwazyjnie, jak również wysoka stabilność sprawia, że miRNA są powszechnie badane pod kątem wykorzystania jako biomarkery wielu chorób [141]. Co więcej, wiele cząsteczek miRNA znaleziono w pęcherzykach zewnątrzwydzielniczych (głównie eksosomach) biorących udział w komunikacji międzykomórkowej [142]. Transport miRNA w pęcherzykach zewnątrzwydzielniczych zwiększa ich stabilność oraz ułatwia późniejsze pobranie przez komórki docelowe. Przypuszcza się, iż przedstawiony mechanizm może być odpowiedzialny za skuteczną formę komunikacji międzykomórkowej [143], [144].

W niniejszej pracy doktorskiej założono, że na skutek ekspozycji na alergen i rozwoju zapalenia alergicznego w nabłonku górnych dróg oddechowych dochodzi do zmian profilu ekspresji miRNA regulujących geny związane ze stanem zapalnym. Cząsteczki miRNA są następnie wydzielane poza komórkę nabłonka (np. po upakowaniu w pęcherzyki zewnątrzwydzielnicze np. eksosomy), a potem mogą być pobrane przez komórki sąsiadujące z miejscem zapalenia oraz komórki nabłonka w dolnych drogach oddechowych. Może to przyczyniać się do rozprzestrzeniania stanu zapalnego w obrębie układu oddechowego, co tłumaczyłoby częste współwystępowanie astmy i alergicznego nieżyty nosa.

Szczegółowe zbadanie procesów związanych z regulacją zapalenia alergicznego przez cząsteczki miRNA pociąga za sobą konieczność wykorzystania różnych modeli badawczych astmy i alergicznego nieżytu nosa. Dodatkowe trudności i wyzwania są związane z analizą ewentualnego udziału pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych w wyżej wspomnianej regulacji. Pociąga to za sobą konieczność wykorzystania specjalistycznych rozwiązań, dedykowanych do oczyszczania i śledzenia transportu tych pęcherzyków do tkanek sąsiadujących [145]. Co więcej, w celu potwierdzenia udziału wybranych miRNA w regulacji mechanizmów związanych z zapaleniem alergicznym, konieczna jest walidacja ich ekspresji na materiale klinicznym, pobranym od pacjentów chorych na astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa. Niniejsza rozprawa stanowi pierwszy etap tych analiz, natomiast kolejne badania, w tym analizy funkcjonalne, są planowane jako kontynuacja badań m.in. w ramach projektu Preludium finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Głównym celem niniejszej rozprawy była ocena, czy indukcja alergicznego stanu zapalnego w nabłonku nosa i płucach prowadzi do zmian profilu ekspresji genów miRNA oraz czy są to te same geny miRNA zarówno w nabłonku nosa jak i płucach. Identyfikacja wspólnych genów miRNA pozwoliłaby wnioskować, iż cząsteczki te odpowiadają za regulację zapalenia alergicznego jednocześnie w górnych i dolnych drogach oddechowych.

Analiza różnicowa wyników sekwencjonowania wykazała, że 9 genów miRNA (rno-miR-223-3p, rno-miR-147, rno-miR-186-5p, rno-miR-99b-5p, rno-miR-672-5p, rno-let-7b-5p, rno-miR-100-5p, rno-miR-328a-3p, rno-miR-128-3p) ulegało istotnie zmienionej ekspresji w płucach szczurów uczulonych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Z kolei w nabłonku nosa tylko jeden miRNA (rno-miR-184) ulegał istotnie zmienionej ekspresji. W badaniach nad zapaleniem alergicznym najczęściej badanymi były następujące geny miRNA: miR-223-3p [146], miR-186-5p [147], miR-672-5p [148], let-7b-5p [149] oraz miR-328a-3p [150].

W kontekście otrzymanych wyników na uwagę zasługują badania przeprowadzone przez Kicic i wsp. [151] w nabłonku górnych i dolnych dróg oddechowych u dzieci z potwierdzoną atopią i/lub napadami duszności. Autorzy, wykorzystując technikę NGS, przeprowadzili sekwencjonowanie całego transkryptomu (ang. *RNA-seq*) celem porównania profilu ekspresji w próbkach pobranych z górnych i dolnych dróg oddechowych. Zidentyfikowano 16 720 genów ulegających ekspresji w górnych oraz 16 645 genów w dolnych drogach oddechowych. Co ciekawe, wstępna analiza przeprowadzona bez uwzględnienia podziału na grupy wykazała, że aż 91% wszystkich genów ulega ekspresji w obu tkankach. Porównanie próbek od dzieci z dusznością i/lub atopią do grupy kontrolnej (dzieci zdrowych) wykazało, iż pomiędzy górnymi i dolnymi drogami oddechowymi występują geny o wspólnym profilu ekspresji: *IL1RL1*, *CCL26*, *POSTN*, *CST1*,

CST2, *CST4*, *CLCA1* oraz *NTRK1*. Zdaniem autorów wyniki te potwierdzają związek pomiędzy górnymi i dolnymi drogami oddechowymi. Należy jednak zauważyć, że Kicic i wsp. w swojej analizie skupili się wyłącznie na analizie transkryptomu, pomijając udział miRNA.

Istotne w kontekście wyników niniejszej pracy są również badania porównawcze profilu ekspresji miRNA Panganiban i wsp. [152] w osoczu pacjentów z astmą oskrzelową, alergicznym nieżytem nosa oraz grupy kontrolnej. Zastosowanie w analizie miRNA hierarchicznej analizy klastrow pozwoliło wytypować 3 odrębne profile ekspresji, które pozwalały rozróżnić pacjentów w zależności od rozpoznania. Ponadto, 30 genów miRNA ulegających najbardziej zmienionej ekspresji podzielono na 5 osobnych grup, które istotnie różnicowały pacjentów z astmą od tych z alergicznym nieżytem nosa czy osób zdrowych. Przedstawione przez Panganiban i wsp. badania sugerują, iż analiza zmian ekspresji pojedynczego genu miRNA może być niewystarczająca do wykorzystania go jako użytecznego biomarkera. Powszechnie wiadomo, iż te same miRNA mogą regulować ekspresję różnych genów docelowych i tym samym brać udział w patomechanizmie wielu chorób w obrębie danej tkanki. Badania Panganiban i wsp. sugerują, iż kluczowa może okazać się tutaj analiza ekspresji panelu genów miRNA wspólnie charakteryzujących określony stan patologiczny. Jednakże w tej pracy badano jedynie ekspresję miRNA obwodowo, we krwi, natomiast autorzy nie badali ekspresji miRNA w tkankach objętych zapaleniem tj. górnych i dolnych drogach oddechowych.

Analiza funkcjonalna dla miRNA wykazujących istotne zmiany w ekspresji po reakcji sekwencjonowania została wykonana osobno dla genów ulegających podwyższonej i obniżonej ekspresji. W przypadku miRNA ulegających istotnie podwyższonej ekspresji na uwagę zasługują procesy związane negatywną regulacją kinazy mTOR (geny *Akt1s1* oraz *Prkaa2*). W warunkach fizjologicznych kinaza mTOR reguluje prawidłowy wzrost, różnicowanie i podziały komórkowe [153]. Zaburzone funkcjonowanie szlaku mTOR wykazano z kolei w patogenezie nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy czy miażdżycy naczyń krwionośnych, gdzie kinaza ta reguluje proliferację komórek układu immunologicznego [154]–[156]. Badania Zhang i wsp. [156] wykazały podwyższone stężenie kinazy mTOR w surowicy pacjentów z astmą cierpiących na nawracające napady duszności w porównaniu do pacjentów o stabilnym przebiegu choroby. Ci sami autorzy potwierdzili również podwyższone stężenie kinazy mTOR w surowicy myszy uczulonych roztworem albuminy jaja kurzego. Zastosowanie inhibitorów ścieżki mTOR (LY294002, tricitiribina, rapamycyna) lub wymiennie budezonidu (steroidowy lek przeciwzapalny) znacząco obniżało stężenie kinazy mTOR w surowicy myszy uczulonych i zmniejszało objawy charakterystyczne dla astmy (nadprodukcja śluzu, hiperplazja gruczołów śluzowych, włóknienie podnabłonkowe). W kontekście otrzymanych wyników należy przypuszczać, iż podwyższona ekspresja genów

miRNA redukuje stężenie *Akt1s1* oraz *Prkaa2*, czego efektem jest wzrost aktywności białek wchodzących w skład szlaku mTOR.

Dla miRNA ulegających podwyższonej ekspresji w reakcji sekwencjonowania wysoką nadreprezentację wykazano również dla procesów związanych z odpowiedzią na jony selenu (geny *Vim* oraz *Txnrd1*), które stanowią naturalny antyoksydant, istotny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Norton i wsp. [157] zasugerowali, iż zwiększony stres oksydacyjny wywołany zapaleniem alergicznym, może być związany z obniżonym stężeniem tego pierwiastka we krwi. Przedstawioną hipotezę potwierdzają badania przeprowadzone przez Guo i wsp. [158], które wykazały obniżone stężenie selenu w krwi osób cierpiących na astmę w porównaniu do osób zdrowych. Co więcej, stężenie tego pierwiastka korelowało z gorszą czynnością płuc i obturacją oskrzeli [159]. Selen jest niezbędny do syntezy i prawidłowego działania wielu enzymów antyoksydacyjnych takich jak peroksydazy glutationu czy reduktazy 1 tioredoksyny [160]. Ta ostatnia kodowana jest przez gen *Txnrd1*, który w niniejszej pracy został wybrany jako potencjalny gen docelowy dla genów miRNA ulegających podwyższonej ekspresji w zapaleniu alergicznym. W tym przypadku obniżona ekspresja *Txnrd1* może być związana ze zwiększoną ilością reaktywnych form tlenu i azotu przyczyniających się do stresu oksydacyjnego.

W przypadku analizy funkcjonalnej przeprowadzonej dla miRNA ulegających istotnie obniżonej ekspresji, na uwagę zasługują trzy geny docelowe (*Cav1*, *Aqp4*, *Igf*) związane z odpowiedzią na glikokortykosteroidy. Najistotniejszym z nich jest insulinopodobny czynnik wzrostu (*Igf*), którego podwyższoną ekspresję wykazano w surowicy pacjentów chorych na astmę [161] jak i w płucach myszy uczulonych roztworem albuminy jaja kurzego [162]. Pomimo, iż dokładna rola *Igf* w kontekście zapalenia alergicznego nie jest znana przypuszcza się, iż czynnik ten stymuluje fibroblasty do produkcji i sekrecji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (np. kolagenu), co stymuluje przebudowę dróg oddechowych (ang. *remodeling*) [163]. W kontekście odpowiedzi na glikokortykosteroidy, rola *Igf* jest związana z metabolizmem glukozy i jej transportem do wnętrza komórki. Stosowanie glikokortykosteroidów hamuje ten proces prowadząc do hiperglikemii, obniżonej syntezy glikogenu oraz zwiększonego rozpadu białek [164]. Dokładna rola *Igf* w kontekście odpowiedzi na glikokortykosteroidy w astmie nie została jednak opisana w literaturze, co utrudnia wnioskowanie o roli miRNA zaangażowanych w regulację tego procesu.

Pozostałe szlaki biologiczne otrzymane w analizie funkcjonalnej przeprowadzonych dla miRNA ulegających zwiększonej lub obniżonej ekspresji związane były z mało specyficznymi procesami podstawowymi (np. fosfoproteina, glikoproteina, wiązanie białek, regulacja ekspresji genów).

Przeprowadzona walidacja z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym potwierdziła istotne różnice w ekspresji jedynie w przypadku rno-miR-223-3p, którego ekspresja była istotnie podwyższona w płucach szczurów uczulonych. Dla pozostałych genów miRNA nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji między badanymi grupami. Otrzymane wyniki sugerują, iż na skutek indukcji zapalenia alergicznego w górnych i dolnych drogach oddechowych dochodzi do zmian ekspresji nielicznych cząsteczek miRNA. Przedstawione wyniki nie potwierdzają również postawionej w niniejszej pracy hipotezy badawczej o tych samych genach miRNA regulujących zapalenia alergiczne jednocześnie w górnych i dolnych drogach oddechowych.

Dotychczas prowadzone badania nad rolą rno-miR-223-3p dotyczyły głównie procesów związanych z nowotworzeniem. Luo i wsp. [165] wykazali, że ekspresja miR-223-3p była istotnie obniżona w płucach pobranych od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. W dalszej części badań autorzy wykorzystali dwie komercyjnie dostępne linie komórek nabłonka oddechowego z tkanek płuc objętych nowotworem - SK-MES-1 oraz NCI-H520. Indukowana nadekspresja miR-223-3p, za pomocą syntetycznego analogu miRNA, znacząco zmniejszała żywotność i migrację komórek nowotworowych oraz nasilała procesy apoptozy w hodowli SK-MES-1, oraz NCI-H520. Natomiast wyciszenie ekspresji miR-223-3p znacząco zwiększało żywotność i migrację komórek nowotworowych w obu zastosowanych liniach. Wykorzystując test lucyfer azowy Luo. i wsp. wykazali, że miR-223-3p reguluje potranskrypcyjnie ekspresję genu *p53*, onkogenu, pełniącego funkcję supresora procesów nowotworowych [166]. Skutkiem mutacji genu *p53* może być powstanie nieaktywnej formy białka lub jego patologiczna nadekspresja, obserwowana w wielu nowotworach, w tym nowotworach płuc [167]–[169]. W celu zbadania wpływu miR-223-3p na procesy nowotworowe, zachodzące *in vivo* Luo. i wsp. wykorzystali myszy, którym podskórnie podano komórki pobrane z płuc pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym. Co ciekawe, iniekcja analogu mir-223-3p do powstałego guza znacząco spowolniła jego wzrost w porównaniu do guzów u myszy z grupy kontrolnej. Na uwagę zasługuje również fakt, iż ekspresja miR-223-3p w wyizolowanych guzach nowotworowych wykazywała ujemną korelację z proliferacją komórek nowotworowych. Opisane wyniki sugerują, że miR-223-3p może odgrywać istotną rolę w negatywnej regulacji procesów związanych z nowotworzeniem. Powyższą hipotezę wydają się potwierdzać również badania Gentner i wsp. [170], którzy zbadali ekspresję miR-223-3p w komórkach blastycznych, pobranych z krwi pacjentów chorych na ostrą białaczkę szpikową. Wykazano najwyższą ekspresję miR-223-3p u tych pacjentów, u których rokowanie choroby było korzystne. Niższa ekspresja miR-223-3p była z kolei związana z gorszą prognozą i niższą szansą na całkowitą remisję choroby.

W kontekście astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa, rola miR-223-3p była analizowana w kilku pracach. W badaniu przeprowadzonym przez Maes i wsp. [171] wykazano podwyższoną ekspresję miR-223-3p w płwocinie pacjentów z astmą oskrzelową w porównaniu do osób zdrowych. Walidacja z wykorzystaniem techniki łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym wykazała, że ekspresja miR-223-3p dodatnio korelowała ze stopniem ciężkości choroby, jak również była najwyższa u pacjentów z astmą o fenotypie neutrofilowym. W tym miejscu należy zaznaczyć, iż dokładne określenie fenotypu choroby, jak również stopnia jej ciężkości ma istotne znaczenie w procesie diagnostyki astmy oskrzelowej. Przekłada się to na dobór optymalnego, bardziej spersonalizowanego leczenia. Z kolei Roffel i wsp.[146] wykorzystali sekwencjonowanie nowej generacji do określenia profilu ekspresji miRNA w próbkach biopsyjnych z płuc pacjentów z astmą oskrzelową i od osób zdrowych. Autorzy wykazali podwyższoną ekspresję miR-223-3p w płucach pacjentów z astmą w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto, wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją miR-223-3p, a liczbą eozynofiliów. Co ciekawe Roffel i wsp. wykazali również, że ekspresja miR-223-3p jest podwyższona u pacjentów chorujących na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, w której ekspresja tego miRNA korelowała z liczbą neutrofilów.

Przedstawione dane literaturowe są zgodne z otrzymanymi w niniejszej pracy wynikami wskazującymi na podwyższoną ekspresję rno-miR-223-3p w płucach uczulonych szczurów. Badania Roffel i wsp. [146] oraz Maes i wsp.[171] przedstawione powyżej sugerowały również, iż wyższa ekspresja mir-223-3p dodatnio korelowała z liczbą komórek zapalnych, co bezpośrednio przekładało się na cięższy przebieg choroby. W celu sprawdzenia powyższej zależności wykonano analizę korelacji wartości ekspresji rno-miR-223-3p ze stężeniem IgE w surowicy u badanych zwierząt. Wykazano istotną statystycznie korelację, co potwierdza bezpośredni związek pomiędzy ekspresją rno-miR-223-3p a wykładnikami zapalenia alergicznego takim jak stężenie IgE.

Badania Gentner i wsp. [170] oraz Luo i wsp. [165] wskazały, iż w przypadku nowotworów płuc niższa ekspresja mir-223-3p związana była z gorszym rokowaniem na całkowite wyleczenie oraz niższym współczynnikiem przeżywalności. Z kolei nadekspresja mir-223-3p w hodowli nabłonka dróg oddechowych objętych nowotworem skutkowała wzrostem poziomu apoptozy tych ostatnich. Sugeruje się, iż w kontekście nowotworów płuc mir-223-3p może pełnić funkcję protekcyjną, negatywnie regulując proces nowotworzenia. Jednakże przedstawione dane literaturowe nie pozwalają na jednoznaczne wnioskowanie o roli rno-mir-223-3p w patogenezie zapalenia alergicznego i astmy oskrzelowej.

Mając to na uwadze, w niniejszej pracy zdecydowano się na przeprowadzenie predykcji genów docelowych, regulowanych przez rno-miR-223-3p. Z uwagi na niską skuteczność metod *in*

silico analizę przeprowadzono w oparciu o znane regiony UTR, a w wynikach uwzględniono wyłącznie geny potwierdzone eksperymentalnie jako cele [172], [173]. Przyjmując powyższe kryteria wykazano, że geny *Vim*, *Scn3a*, *Aqp4*, *Cntn4* oraz *Kcnd2* podlegają regulacji przez rno-miR-223-3p.

Pierwszy z wymienionych genów (*Vim*) koduje białko wimentynę stanowiącą element strukturalny cytoszkieletu komórkowego. Wzrost ekspresji wimentyny połączony ze spadkiem E-kadheryny stanowi ważny biomarker informujący o rozpoczęciu procesu przemiany komórek nabłonkowych w komórki mezenchymy (ang. *epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) [174], [175]. Proces ten polega na odróżnicowaniu komórek nabłonka w komórki mezenchymy (fibroblasty), których zwiększona liczba związana jest z przebudową dróg oddechowych [176]. W literaturze naukowej podwyższoną ekspresję wimentyny opisano w płucach myszy inhalowanych roztworem albuminy jaja kurzego [177] jak i roztoczy kurzu domowego [178]. Hackett i wsp. [179] wykazali, iż do zwiększonej ekspresji wimentyny dochodzi również w hodowli na granicy faz (ang. *air-liquid interphase*, ALI) komórek nabłonka dróg oddechowych traktowanych roztworem transformującego czynnika wzrostu β 1 (TGF- β 1). Ekspresja tego ostatniego jest podwyższona zarówno w płucach i soku surowicy pobranej od pacjentów chorych na astmę, u których stymuluje przebudowę dróg oddechowych prowadząc do remodelingu. [180], [181]. Wzrost ekspresji wimentyny na skutek ekspozycji TGF- β 1 potwierdziły również badania Johnson i wsp. [182] przeprowadzone na komórkach pobranych od pacjentów cierpiących na astmę i hodowanych *in vitro* w monowarstwie. Co ciekawe, najwyższy wzrost ekspresji wimentyny po stymulacji TGF- β 1 zaobserwowano w hodowli komórek pobranych od pacjentów z ciężką astmą w porównaniu do pacjentów z astmą umiarkowaną oraz osób zdrowych. W tym miejscu należy przytoczyć wspomniane wcześniej badania przeprowadzone przez Maes i wsp. [171], gdzie wykazano podwyższoną ekspresję mir-223-3p w płwocinie pobranej od pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową. Maes i wsp. zaobserwowali również, iż transfekcja ludzkich komórek nabłonka dróg oddechowych (HBECS) analogiem mir-223-3p prowadzi do wzrostu ekspresji wimentyny, jak również TGF β R1, będącego błonowym receptorem dla transformującego czynnika wzrostu β [183]. W kontekście wyników opublikowanych przez Maes i wsp., rola rno-miR-223-3p w procesie regulacji wimentyny w komórkach nabłonka dróg oddechowych wydaje się wątpliwa. Oprócz płwociny pobranej od pacjentów z potwierdzoną astmą podwyższoną ekspresję wimentyny wykazano w modelach *in vivo* oraz *in vitro* zapalenia alergicznego. Z drugiej strony badania Luo i wsp. oraz Roffel i wsp. [146], [165] przedstawione powyżej jak również wyniki otrzymane w niniejszej pracy wskazują wyraźnie na podwyższoną ekspresję rno-miR-223-3p w zapaleniu alergicznym. Dane sugerujące udział rno-miR-223-3p w regulacji wimentyny pochodzą z pracy Jeyaseelan i wsp. [184] przeprowadzonej z wykorzystaniem techniki mikromacierzy wykonanej

w próbkach mózgu i krwi modelu indukowanego niedokrwienia mózgu u szczura. Mając to na uwadze, można wysunąć hipotezę iż regulacja wimentyny przez rno-miR-223-3p dotyczy jedynie wybranych tkanek, co w przypadku miRNA jest znanym zjawiskiem opisanym w literaturze naukowej [185]. Przedstawioną hipotezę popiera również fakt, iż Jeyaseelan i wsp. wykazali zmienioną ekspresję rno-miR-223-3p jedynie w mózgu szczurów, podczas gdy we krwi zwierząt ekspresja tego miRNA pozostała niezmienną. Co więcej rno-miR-223-3p nie wykazuje pełnej homologii ze swoim odpowiednikiem w organizmie człowieka, co sugeruje, że jego regulacji podlegają inne geny docelowe.

Drugi z wymienionych genów docelowych (*Scn3a*) jest białkiem błonowym odpowiedzialnym za regulację transportu jonów sodowych, a jego rola w astmie pozostaje nieznana. Ye i wsp. [186] wykorzystując test lucyferazowy wykazali iż *Scn3a* podlega regulacji przez mir-384-5p, a zastosowanie syntetycznego analogu mir-384-5p znacząco obniżało ekspresję *Scn3a* oraz białek o właściwościach prozapalnych takich jak: IL-6, IL-1 β , TNF- α czy COX-2.

Trzeci przewidywany gen docelowy (*Aqp4*) koduje akwaporynę-4, białko błonowe odpowiedzialne za transport wody i wyrównanie potencjału osmotycznego w komórce, czym zapewnia prawidłowe nawodnienie i homeostazę płuc [187]. Ekspresję tego białka potwierdzono w części boczno-podstawnej błony komórek nabłonka zarówno w górnych jak i dolnych drogach oddechowych [188]. W kontekście astmy, akwaporyna-4 była badana przez Jardin i wsp. [189], którzy wykazali podwyższoną ekspresję genu *Aqp4* w komórkach nabłonka dróg oddechowych od pacjentów z astmą w porównaniu do osób zdrowych. Zastosowany przez autorów test lucyferazy wykazał, że akwaporyna podlega regulacji przez miRNA-203, który wykazuje obniżoną ekspresję w płucach pacjentów z astmą. W przeciwieństwie do wyżej wspomnianych wyników, Krane i wsp. [190] wykazali obniżoną ekspresję akwaporyny 4 w płucach myszy inhalowanych roztworem albuminy jaja kurzego w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Co ciekawe, analiza Western blot wykazała, iż stężenie akwaporyny-4 w płucach myszy uczulonych jest podwyższone, co stoi w pewnej sprzeczności względem jej ekspresji na poziomie mRNA. Na uwagę zasługuje również fakt, iż ekspozycja myszy na IL-13, jako inny model indukcji stanu zapalnego, nie skutkowała zmianą ekspresji akwaporyny-4 w płucach zwierząt uczulonych. Pomimo, iż dokładna rola akwaporyny-4 w astmie nie jest znana, sugeruje się, że zaburzona ekspresja białek z tej rodziny zaburza przezbłonowy transport wody, co wraz z toczącym się w drogach oddechowych stanem zapalnym przyczynia się do obrzęku tkanek sąsiadujących [187], [191]. W kontekście otrzymanych wyników rola rno-miR-223-3p może sprowadzać się do negatywnej regulacji akwaporyny-4, IL-1 β i tym samym zapalenia alergicznego. Należy jednak zwrócić uwagę, iż Krane i wsp. [190] nie wykazali zmian ekspresji akwaporyny-4 w płucach myszy

uczulonych IL-13. Wskazuje to iż mechanizm potencjalnej regulacji akwaporyny-4 przez rno-miR-223-3p charakteryzuje wyższa złożoność, a jego dokładne poznanie wymaga dalszych badań.

Kolejny z genów docelowych (*Cntn4*) koduje kontaktynę-4 będącą cząsteczką adhezyjną odpowiedzialną za tworzenie połączeń pomiędzy aksonami i udział w rozwoju oraz prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego. Rola kontaktyny-4 nie była dotychczas badana w kontekście astmy czy zapalenia alergicznego. Badania asocjacyjne całego genomu przeprowadzone przez Chittoor i wsp. [192] wskazują, iż warianty genetyczne w obrębie *Cntn4* wykazują asocjację ze stężeniem kwasu moczowego w surowicy krwi. Podwyższone stężenie tego ostatniego wskazuje na obecność stresu oksydacyjnego związanego z niedotlenieniem tkanek między innymi w patogenezie astmy oskrzelowej [193]. Przedstawione badania nie pozwalają jednak na wnioskowanie o roli kontaktyny-4 w astmie oskrzelowej ani o potencjalnej jej regulacji przez rno-miR-223-3p.

Ostatni z potencjalnych genów docelowych dla rno-miR-223-3p to *Kcnd2*, który koduje białko błonowe biorące udział w błonowym transporcie jonów potasu. Do ekspresji *Kcnd2* dochodzi głównie w układzie nerwowym, w szczególności w mózdzku i korze mózgowej [194]. Przesłanki o regulacji *Kcnd2* przez rno-miR-223-3p pochodzą z badania przeprowadzonego przez Liu i wsp. [195] na modelu zwierzęcym indukowanego ostrego zawału mięśnia sercowego (ang. *acute myocardial infarction*). Podobnie jak w przypadku *Cntn4*, rola *Kcnd2* w astmie oskrzelowej pozostaje nieznana. Pewnych przesłanek odnośnie udziału *Kcnd2* w zapaleniu alergicznym mogą dostarczać badania Kawada i wsp. [196] przeprowadzone na miocytach noworodków szczura traktowanych roztworem czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α). Ten ostatni jest cytokiną o potwierdzonych właściwościach prozapalnych biorącą udział również w patogenezie astmy oskrzelowej [197]. Autorzy wykazali, iż na skutek traktowania TNF- α , w komórkach dochodzi do spadku ekspresji *Kcnd2* jak również obniżenia potencjału czynnościowego podczas fazy 1 repolaryzacji mięśnia sercowego. W kontekście otrzymanych wyników należy przypuszczać iż podwyższona ekspresja rno-miR-223-3p może zmniejszać ekspresję *Kcnd2*, podobnie jak w badaniach Kawada i wsp. [196].

W celu szerszego zbadania roli wybranych genów docelowych w patogenezie astmy przeprowadzono analizę funkcjonalną szlaków biologicznych z wykorzystaniem ogólnodostępnej bazy danych szlaków biologicznych DAVID. Spośród 17 genów nadreprezentowanych, najistotniejsze w kontekście niniejszej pracy wydają się geny związane z rozwojem i funkcjonowaniem układu nerwowego. Pomimo wielu badań, jego rola w patogenezie astmy oskrzelowej nie została w pełni wyjaśniona. Na chwilę obecną wiadomo, iż drogi oddechowe są unerwione głównie przez neurony rzekomojednobiegunowe z włóknami nerwowymi ciągnącymi się wzdłuż nerwu błędnego aż do ośrodkowego układu nerwowego [198]. Co więcej,

niekontrolowany przebieg astmy u pacjentów stosujących wysokie dawki leków steroidowych oraz agonistów receptorów β sugeruje, iż patomechanizm astmy nie obejmuje wyłącznie komórek strukturalnych dróg oddechowych czy komórek układu immunologicznego [199], [200], ale również komórki nerwowe. W warunkach fizjologicznych zakończenia włókien nerwowych pełnią istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu oddechowego. Na skutek ich stymulacji w drogach oddechowych dochodzi w nich do wyzwolenia potencjału czynnościowego, który przenoszony jest do pnia mózgu, gdzie wyzwala fizjologiczny odruch obronny w postaci kaszlu, nadprodukcji śluzu czy skurczu oskrzeli. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają zakończenia nerwowe typu C, zlokalizowane w obrębie nabłonka dróg oddechowych. Ich stymulacja stanowi pierwszą linię obrony układu oddechowego przed czynnikami szkodliwymi takimi jak ciało obce czy toksyczne gazy [201]. W warunkach patologicznych na skutek przewlekłego stanu zapalnego dochodzi do uszkodzenia nabłonka oddechowego przez związki bioaktywne wydzielane głównie przez eozynofile. Powoduje to odsłonięcie leżących poniżej czuciowych włókien nerwowych typu C. Na skutek ich stymulacji dochodzi do lokalnego odruchu aksonalnego, przewodzenia sygnału wzdłuż nerwu czuciowego oraz uwolnienia licznych związków bioaktywnych takich jak substancja P, neurokina A czy peptydu pochodnego genu kalcytoniny (ang. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP). Wykazano, iż substancje te indukują skurcz mięśni gładkich, nadprodukcję śluzu, zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych i stymulują komórki układu immunologicznego [202]. Ogół tych procesów definiuje się jako zapalenie neurogenne [203].

Dowodów na udział układu nerwowego w patogenezie astmy dostarczają badania przeprowadzone przez Tränkner i wsp. [204]. Autorzy wykorzystali toksynę błoniczą do inaktywacji neuronów czuciowych w obrębie dróg oddechowych myszy, wprowadzoną do genomu zwierząt za pomocą wirusowej rekombinazy cry. Ta ostatnia należy do grupy topoizomeras klasy I i jest powszechnie wykorzystywana jako narzędzie biologii molekularnej do edycji struktury genomów [205], [206]. Następnie autorzy poddali myszy zmodyfikowane i niezmodyfikowane ekspozycji wziewnej roztworem albuminy stosowanej jako model zapalenia alergicznego. Wykazano, iż zarówno w grupie myszy zmodyfikowanych jak niezmodyfikowanych, ekspozycja albuminą prowadziła do zwiększonego wytwarzania specyficznych przeciwciał klasy IgE jak również naciekaniem komórek układu immunologicznego do płuc. Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż myszy zmodyfikowane nie rozwinęły nadreaktywności oskrzeli, co sugeruje udział układu nerwowego w regulacji tego procesu.

Z punktu widzenia działania układu nerwowego, najistotniejszymi genami docelowymi wydają się być *Kcnd2* oraz *Scn3a* odpowiedzialne za przezbłonowy transport, odpowiednio, jonów potasu i sodu. Przeprowadzona analiza funkcjonalna szlaków biologicznych wykazała, iż geny te

zaangażowane są przekazywanie informacji w komórkach nerwowych na drodze indukcji potencjału czynnościowego. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa, regulowany przez oba białka, przezbłonowy transport jonów sodu i potasu skutkujący depolaryzacją błony komórkowej neuronu i przekazywaniem informacji w formie impulsu elektrycznego. Wcześniej wspomniane badania prowadzone przez Kawada i wsp. [196] sugerują, iż białka o potwierdzonych właściwościach prozapalnych (takie jak TNF- α) mogą obniżać ekspresję *Kcnd2*, czego efektem był spadek potencjału czynnościowego. W świetle przedstawionych informacji należy przypuszczać, iż podobny efekt wywołuje również zwiększona ekspresja rno-miR-223-3p, obserwowana w niniejszej pracy. Pozostałe geny zostały przypisane do procesów o niskiej specyficzności (np. transport, fosfoproteina, glikoproteina, błona komórkowa). Wyjaśnienie ich dokładnej roli w zapaleniu alergicznym wymaga dalszych badań funkcjonalnych, na przykład z wykorzystaniem testu lucyferazowego lub większej ilości genów docelowych do analizy szlaków biologicznych.

Wśród ograniczeń niniejszej pracy należy wspomnieć o różnej jakości próbek RNA wyizolowanego z płuc i nabłonka nosa. W przypadku płuc, RNA charakteryzował się wysoką czystością i integralnością, ze średnią wartością parametru RIN wynoszącą 9,5. Biblioteki miRNA z płuc cechowały się wysoką liczą odczytów otrzymanych po filtrowaniu (średnia dla prób wynosiła 4 583 491 odczytów), jak również wysokim odsetkiem zmapowania do dojrzałych miRNA (średnia dla prób wynosiła 49,2%). Z kolei w przypadku materiału wyizolowanego z nabłonka nosa, parametr RIN wynosił średnio 5,0, co świadczy o niższej jakości próbek RNA z tej tkanki. Jednakże, pomimo niższej jakości, elektroforeza w żelu poliakrylamidowym oraz automatyczna elektroforeza kapilarna potwierdziły obecność specyficznych bibliotek miRNA dla wszystkich próbek wyizolowanych z nabłonka nosa. Liczba odczytów po filtrowaniu wynosiła 4 693 141 i nie różniła się istotnie od tej otrzymanej dla płuc. W tym miejscu należy jednak zaznaczyć, iż średni procent odczytów zmapowanych do dojrzałych sekwencji miRNA w nabłonku nosa wynosił 24,6%, co odpowiada połowie odczytów zmapowanych w przypadku materiału z płuc. Liczba zmapowanych odczytów w przeliczeniu na jedną próbkę wynosiła powyżej 1 miliona, co zgodnie z wytycznymi dla analizy bioinformatycznej sekwencjonowania miRNA pozwala na wykonanie analizy różnicowej [207].

Ograniczeniem w niniejszej pracy jest również różna liczebność grup badanych i kontrolnych w reakcji sekwencjonowania oraz reakcji PCR w czasie rzeczywistym, która podyktowana była wysokimi kosztami wyżej wspomnianych analiz. W tym przypadku, wykorzystanie do sekwencjonowania materiału od mniejszej liczby zwierząt ($n=3$ w każdej grupie) umożliwił dobór zwierząt o homogenym fenotypie (np. zbliżone stężenia IgE w obrębie grup). Natomiast analizę weryfikacji wyników uzyskanych po sekwencjonowaniu w reakcji PCR w czasie

rzeczywistym przeprowadzono dla większej grupy zwierząt (n=10 w każdej grupie), co uwidoczniło różnice osobnicze w fenotypie (np. różnice stężenia IgE w surowicy w obrębie grupy badanej) i może być przyczyną różnic obserwowanych między wynikiem sekwencjonowania z tymi uzyskanymi w reakcji ilościowego PCR. Najkorzystniejszą opcją byłoby wykonanie sekwencjonowania dla wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i badanej, co jednak wiąże się z dużo wyższym kosztem i przekracza budżet projektu, w ramach którego wykonano niniejszą rozprawę doktorską.

Podsumowując rozważania niniejszej rozprawy doktorskiej należy podkreślić, iż na skutek indukcji zapalenia w górnych oraz dolnych drogach oddechowych szczura dochodzi do zmian ekspresji genów miRNA, co sugeruje udział tych cząsteczek w patogenezie zarówno alergicznego nieżyty nosa jak i astmy. Otrzymane wyniki nie wskazują jednak na obecność wspólnych miRNA, istotnie zmienionych w obu wyżej wspomnianych regionach dróg oddechowych. Sugeruje to, iż pomimo integralności układu oddechowego oraz wspólnego patomechanizmu, astma i alergiczny nieżyt nosa przebiegają w oparciu o zmiany ekspresji różnych miRNA. Uzyskane wyniki stwarzają unikatową możliwość identyfikacji tych genów miRNA i procesów biologicznych przez nie regulowanych, różnicujących zapalenie alergiczne w astmie od tego w alergicznym nieżycie nosa. W przyszłości wyniki te mogą stanowić podstawę do opracowania nowych, bardziej efektywnych metod leczenia celowanego zapalenia alergicznego opartego o modyfikację ekspresji miRNA.

9. WNIOSKI

1. Pod wpływem alergicznego stanu zapalnego w górnych i dolnych drogach oddechowych u szczura dochodzi do zmian ekspresji genów miRNA, co sugeruje ich udział w procesie regulacji zapalenia alergicznego w górnych i dolnych drogach oddechowych.
2. Brak wspólnych genów miRNA zmienionych pod wpływem alergicznego stanu zapalnego w płucach i nabłonku nosa sugeruje, że zapalenie alergiczne w górnych i dolnych drogach oddechowych podlega regulacji przez różne geny miRNA.
3. Analiza funkcjonalna przeprowadzona dla miRNA istotnie zmienionych w reakcji sekwencjonowania wykazała nadreprezentację genów zaangażowanych w procesy negatywnej regulacji kinazy mTOR, regulację stężenia jonów seleniu oraz odpowiedzią na glikokortykosteroidy. W przypadku rno-miR-223-3p, wyniki analizy funkcjonalnej sugerują potencjalną rolę tego miRNA w regulacji procesów związanych z zapaleniem neurogennym (np. neuronalnym potencjałem czynnościowym).

10. STRESZCZENIE

Wstęp: Astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa są przykładem chorób o potwierdzonym podłożu alergicznym, przebiegającymi w oparciu o mechanizm nadwrażliwości typu 1. Badania ostatnich lat potwierdzają współwystępowanie obu chorób w populacji ogólnej. Pacjentów chorujących jednocześnie na astmę i alergiczny nieżyt nosa charakteryzuje cięższy przebieg choroby, co bezpośrednio przekłada się na częstsze hospitalizacje i wyższe koszty leczenia. Dokładny mechanizm odpowiedzialny za współwystępowanie astmy i alergicznego nieżytu nosa ciągle pozostaje nieznany. Uważa się, iż istotną rolę może odgrywać wspólny dla obu chorób patomechanizm nadwrażliwości typu 1, jak również integralność anatomiczna i funkcjonalna układu oddechowego. Sugeruje to obecność cząsteczek odpowiedzialnych za rozprowadzanie informacji o stanie zapalnym w obrębie górnych i dolnych dróg oddechowych. Założeniem pracy było, że kluczową rolę tym procesie mogą odgrywać małe niekodujące RNA – miRNA. Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza miRNA, których ekspresja ulega zmianom w przebiegu zapalenia alergicznego w drogach oddechowych oraz identyfikacja wspólnych genów miRNA wykazujących zmiany w ekspresji w górnych (nabłonek nosa) i dolnych (płuca) drogach oddechowych na modelu zapalenia alergicznego u szczura.

Materiały i metody: Jako model *in vivo* zapalenia alergicznego wykorzystano szczura szczepu Brown Norway. W celu indukcji objawów zapalenia alergicznego, zwierzętom podawano podskórnie, a następnie donosowo roztwór roztoczy kurzu domowego (HDM). Do potwierdzenia zapalenia alergicznego wykorzystano pomiar przeciwciał IgE w surowicy i ocenę preparatów histologicznych płuc. Do sekwencjonowania nowej generacji użyto RNA wyizolowanego z płuc i nabłonka nosa szczurów uczulonych z najwyższymi stężeniami przeciwciał IgE w surowicy ($n = 3$). Kontrolę stanowiły zwierzęta nieuczulone z najniższymi stężeniami IgE ($n = 3$). Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono dla płuc i nabłonka nosa wszystkich szczurów grupy badanej ($n = 10$) oraz kontrolnej ($n = 10$). Predykcję *in silico* genów docelowych przeprowadzono w oparciu o bazę danych miRGate oraz miRTarBase dla znanych regionów UTR i genów docelowych potwierdzonych eksperymentalnie. Analizę szlaków biologicznych istotnie nadreprezentowanych przeprowadzono z wykorzystaniem bazy danych DAVID v. 6.8. Do analizy statystycznej otrzymanych wyników wykorzystano program Statistica v.13.

Wyniki: Analiza testem ELISA wykazała, iż szczury uczulone ekstraktem HDM miały istotnie podwyższone stężenie przeciwciał IgE w surowicy krwi. W płucach zwierząt uczulonych obserwowano naciek komórek zapalnych i zmienioną strukturę oskrzeli. Analiza różnicowa wyników sekwencjonowania wykazała, że 9 genów miRNA ulegało istotnie zmienionej ekspresji w płucach oraz 1 jeden gen miRNA w nabłonku nosa u uczulonych zwierząt. Analiza funkcjonalna

tych genów wykazała nadreprezentację dla procesów zaangażowanych w negatywną regulację kinazy mTOR, regulację stężenia jonów seleniu oraz odpowiedzią na glikokortykosteroidy. Weryfikacja wyników sekwencjonowania z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym potwierdziła istotne zmiany dla rno-miR-223-3p, którego podwyższoną ekspresję obserwowano w płucach uczulonych szczurów w porówniu do grupy kontrolnej. W oparciu o bazy danych miRTarBase oraz miRGate wybrano geny docelowe regulowane przez rno-miR-223-3p: *Vim*, *Scn3a*, *Aqp4*, *Cntn4*, *Kcnd2*. Analiza funkcjonalna szlaków biologicznych wykazała, iż wspomniane geny są zaangażowane w regulację podstawowych procesów komórkowych (transport, fosfoproteina, glikoproteiny) oraz potencjału czynnościowego.

Wnioski: Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują na udział miRNA w regulacji procesów związanych z alergicznym stanem zapalnym w drogach oddechowych, natomiast brak jest wspólnych genów miRNA wykazujących podobny profil ekspresji w płucach i nosie szczurów uczulonych w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Sugeruje to, iż zapalenie alergiczne w górnych i dolnych drogach oddechowych przebiega w oparciu o różne miRNA, specyficzne dla obu wymienionych tkanek.

11. SUMMARY

Introduction: Bronchial asthma and allergic rhinitis are type 1 hypersensitivity allergic diseases. Recent studies confirmed their co-occurrence in the general population. Patients suffering from asthma and allergic rhinitis are characterized by a more severe course of the disease, more frequent hospitalization, and their treatment generates higher costs. The exact mechanism responsible for the co-occurrence of asthma and allergic rhinitis still remains unknown. It is postulated, that for this, IgE-dependent type 1 hypersensitivity, and high integrity of the respiratory tract, might be responsible. It is also suggested that small non-coding RNA (miRNA) might be crucial for this process transmitting inflammatory stimuli in the respiratory tract. The aim of this thesis was the analysis of miRNA genes differentially expressed in the airways of the rat model of induced allergic inflammation and the identification of common miRNA in the lungs and nasal epithelium.

Materials and methods: Brown Norway rat was used as an *in vivo* model of induced allergic inflammation. Rats were subcutaneously injected and intranasally exposed to house dust mite (HDM). ELISA and histological staining were performed to confirm the characteristic of allergic inflammation in the blood and lung tissues of allergic animals. Next-generation sequencing was performed for 3 rats with the highest concentration of IgE. As a control, 3 rats with the lower, IgE concentration were used. Reverse transcription and real-time PCR for miRNA were performed for all study (n = 10) and control rats (n = 10). Target prediction was made using validated UTR regions in miRGate and miRTarBase. Enrichment analysis for predicted target genes and statistical analysis were done in DAVID v. 6.8. and Statistica v.13, respectively.

Results: ELISA showed that rats exposed to HDM demonstrated significantly increased concentration of serum IgE. The lungs of allergic rats were characterized by airway obstruction and inflammatory cell recruitment. Differential expression analysis showed that 9 miRNA genes were significantly altered in allergic rats as compared to control animals. Functional analysis demonstrated that these miRNA genes negatively regulate kinase mTOR, selenium ion concentration, and glucocorticoid responses. Real-time PCR validation confirmed that rno-miR-223-3p was upregulated in the lungs of rats exposed to HDM. In silico analysis for rno-miR-223-3p predicted *Vim*, *Scn3a*, *Aqp4*, *Cntn4*, *Kcnd2* as a target genes. Functional annotation analysis demonstrated that predicted target genes regulate elementary processes (e.g., transport, phosphoprotein, glycoprotein), action potential, and development of the nervous system.

Summary: Obtained results showed that miRNA are involved in allergic inflammation; however, there was no common miRNA genes differentially expressed between lungs and nasal epithelium in rats exposed to HDM. It suggests that allergic inflammation in upper and lower airways is regulated by different miRNA genes.

12. PIŚMIENNICTWO

- [1] H. Kim, J. Bouchard, i P. Renzix, „The link between allergic rhinitis and asthma: A role for antileukotrienes?”, *Can. Respir. J. J. Can. Thorac. Soc.*, t. 15, nr 2, s. 91–98, 2008.
- [2] J. A. Woodfolk, S. P. Commins, A. J. Schuyler, E. A. Erwin, i T. A. E. Platts-Mills, „Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses?”, *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.*, t. 64, nr 4, s. 295–303, 2015.
- [3] C. Rusznak i R. J. Davies, „Diagnosing allergy”, *BMJ*, t. 316, nr 7132, s. 686, 1998.
- [4] M. C. Dispenza, „Classification of hypersensitivity reactions”, *Allergy Asthma Proc.*, t. 40, nr 6, s. 470–473, 2019.
- [5] R. Pawliczak „Alergologia - kompendium” Termedia Wydawnictwa Medyczne, Wydanie 1, Poznań 2013.
- [6] F. Salazar i A. M. Ghaemmaghami, „Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells”, *Front. Immunol.*, t. 4, s. 356, 2013.
- [7] H. Hammad i B. N. Lambrecht, „Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma”, *Nat. Rev. Immunol.*, 2008.
- [8] P. R. Taylor, S. Gordon, i L. Martinez-Pomares, „The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition”, *Trends Immunol.*, t. 26, nr 2, s. 104–110, 2005.
- [9] P. Valverde i in., „Molecular Insights into DC-SIGN Binding to Self-Antigens: The Interaction with the Blood Group A/B Antigens”, *ACS Chem. Biol.*, t. 14, nr 7, s. 1660–1671, 2019.
- [10] S. R. El-Zayat, H. Sibaii, i F. A. Mannaa, „Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview”, *Bull. Natl. Res. Cent.*, t. 43, nr 1, s. 187, . 2019.

- [11] N. Asokanathan i in., „House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1”, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950, t. 169, nr 8, s. 4572–4578, 2002.
- [12] D. M. Heuberger i R. A. Schuepbach, „Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases”, *Thromb. J.*, t. 17, nr 1, s. 4, 2019.
- [13] S. Yu i N. Gao, „Compartmentalizing Intestinal Epithelial Cell Toll-like Receptors for Immune Surveillance”, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, t. 72, nr 17, s. 3343–3353, 2015.
- [14] A. Llop-Guevara i in., „A GM-CSF/IL-33 pathway facilitates allergic airway responses to sub-threshold house dust mite exposure”, *PloS One*, t. 9, nr 2, s. e88714, 2014.
- [15] F. Roan, K. Obata-Ninomiya, i S. F. Ziegler, „Epithelial cell-derived cytokines: more than just signaling the alarm”, *J. Clin. Invest.*, t. 129, nr 4, s. 1441–1451, 2019.
- [16] G. A. Rogers, K. Den Beste, C. A. Parkos, A. Nusrat, J. M. Delgaudio, i S. K. Wise, „Epithelial tight junction alterations in nasal polyposis”, *Int. Forum Allergy Rhinol.*, t. 1, nr 1, s. 50–54, 2011.
- [17] P. Humeniuk, P. Dubiela, i K. Hoffmann-Sommergruber, „Dendritic Cells and Their Role in Allergy: Uptake, Proteolytic Processing and Presentation of Allergens”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 18, nr 7, 2017.
- [18] T. Zhang i in., „Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice”, *Immunology*, t. 100, nr 1, s. 13–20, 2000.
- [19] G. E. Kaiko, J. C. Horvat, K. W. Beagley, i P. M. Hansbro, „Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?”, *Immunology*, t. 123, nr 3, s. 326–338, 2008.

- [20] S. B. Drutman i E. S. Trombetta, „Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo”, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950, t. 185, nr 4, s. 2140–2146, 2010.
- [21] F. Dieli, „Dendritic cells and the handling of antigen”, *Clin. Exp. Immunol.*, t. 134, nr 2, s. 178–180, 2003.
- [22] E. Martín-Orozco, M. Norte-Muñoz, i J. Martínez-García, „Regulatory T Cells in Allergy and Asthma”, *Front. Pediatr.*, t. 5, 2017.
- [23] K. Bao i R. L. Reinhardt, „The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 Immunity”, *Cytokine*, t. 75, nr 1, s. 25–37, 2015.
- [24] A. Bush, „Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Future Asthma”, *Front. Pediatr.*, t. 7, 2019.
- [25] H. K. Kandikattu, S. Upparahalli Venkateshaiah, i A. Mishra, „Synergy of Interleukin (IL)-5 and IL-18 in eosinophil mediated pathogenesis of allergic diseases”, *Cytokine Growth Factor Rev.*, t. 47, s. 83–98, 2019.
- [26] T. D. Randall, F. E. Lund, J. W. Brewer, C. Aldridge, R. Wall, i R. B. Corley, „Interleukin-5 (IL-5) and IL-6 define two molecularly distinct pathways of B-cell differentiation.”, *Mol. Cell. Biol.*, t. 13, nr 7, s. 3929–3936, 1993.
- [27] S. J. Galli, M. Tsai, i A. M. Piliponsky, „The development of allergic inflammation”, *Nature*, t. 454, nr 7203, s. 445–454, 2008.
- [28] M. A. M. Willart i H. Hammad, „Alarming dendritic cells for allergic sensitization”, *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.*, t. 59, nr 2, s. 95–103, 2010.
- [29] S. Hall i D. K. Agrawal, „Key Mediators in the Immunopathogenesis of Allergic Asthma”, *Int. Immunopharmacol.*, t. 23, nr 1, s. 316–329, 2014.

- [30] W. M. Abraham i A. Wanner, „Inflammatory mediators of asthma”, *Pediatr. Pulmonol.*, t. 4, nr 4, s. 237–247, 1988.
- [31] F. T. Ishmael, „The Inflammatory Response in the Pathogenesis of Asthma”, *J. Am. Osteopath. Assoc.*, t. 111, nr 11_suppl_7, s. 11–17, 2011.
- [32] M. Kudo, Y. Ishigatsubo, i I. Aoki, „Pathology of asthma”, *Front. Microbiol.*, t. 4, 2013.
- [33] K. Yamauchi i M. Ogasawara, „The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 20, nr 7, 2019.
- [34] R. Gosens i N. Gross, „The mode of action of anticholinergics in asthma”, *Eur. Respir. J.*, t. 52, nr 4, 2018.
- [35] „Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome” <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/combined-allergic-rhinitis-and-asthma-syndrome>, World Allergy Organization, 2015.
- [36] S. T. Holgate, „Pathogenesis of Asthma”, *Clin. Exp. Allergy*, t. 38, nr 6, s. 872–897, 2008.
- [37] C. N. McBrien i A. Menzies-Gow, „The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma”, *Front. Med.*, t. 4, 2017.
- [38] S. S. Possa, E. A. Leick, C. M. Prado, M. A. Martins, i I. F. L. C. Tibério, „Eosinophilic Inflammation in Allergic Asthma”, *Front. Pharmacol.*, t. 4, 2013.
- [39] E. Puchelle, J. M. Zahm, „Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease” *Inserm.* t. 3., s. 726–733, 2006.
- [40] C. Coraux, R. Hajj, P. Lesimple, i E. Puchelle, „In vivo models of human airway epithelium repair and regeneration”, *Eur. Respir. Rev.*, t. 14, nr 97, s. 131–136, 2005.

- [41] H. Fehrenbach, C. Wagner, i M. Wegmann, „Airway remodeling in asthma: what really matters”, *Cell Tissue Res.*, t. 367, nr 3, s. 551–569, 2017.
- [42] C. Bergeron, M. K. Tulic, i Q. Hamid, „Airway remodelling in asthma: From benchside to clinical practice”, *Can. Respir. J. J. Can. Thorac. Soc.*, t. 17, nr 4, s. e85–e93, 2010.
- [43] „The Global Asthma Report 2018”. Global asthma Network
<http://www.globalasthmareport.org>, 2018.
- [44] L. T. Stiemsma, L. A. Reynolds, S. E. Turvey, i B. B. Finlay, „The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies”, *Immunotargets Ther.*, t. 4, s. 143–157, 2015.
- [45] C. Brooks, N. Pearce, i J. Douwes, „The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update”, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, t. 13, nr 1, s. 70–77, 2013.
- [46] E. Toskala i D. W. Kennedy, „Asthma risk factors”, *Int. Forum Allergy Rhinol.*, t. 5 Suppl 1, s. 11-16, 2015.
- [47] R. Krenke, „Astma oskrzelowa. aktualny stan wiedzy”, *Medycyna i pasje*. 2009
- [48] A. likońska, M. Kowalski, M. Chałubiński „Zmiany w zaleceniach Światowej Inicjatywy na Rzecz Zwalczenia Astmy (GINA) 2019 – ważne modyfikacje sposobu leczenia”. *Alergia Astma Immunologia.*, t.3, nr 24, s. 112-118, 2019.
- [49] J. G. Zein i S. C. Erzurum, „Asthma is Different in Women”, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, t. 15, nr 6, s. 28, 2015.
- [50] H. Fuseini i D. C. Newcomb, „Mechanisms driving gender differences in asthma”, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, t. 17, nr 3, s. 19, 2017.
- [51] C. Bergeron i Q. Hamid, „Relationship between Asthma and Rhinitis: Epidemiologic, Pathophysiologic, and Therapeutic Aspects”, *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, t. 1, nr 2, s. 81, 2005.

- [52] W. A. Greisner, R. J. Settipane, i G. A. Settipane, „Co-existence of asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students”, *Allergy Asthma Proc.*, t. 19, nr 4, s. 185–188, 1998.
- [53] F. E. Simons, „Allergic rhinobronchitis: the asthma-allergic rhinitis link”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 104, nr 3 Pt 1, s. 534–540, 1999.
- [54] B. P. Yawn, J. W. Yunginger, P. C. Wollan, C. E. Reed, M. D. Silverstein, i A. G. Harris, „Allergic rhinitis in Rochester, Minnesota residents with asthma: Frequency and impact on health care charges”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 103, nr 1, s. 54–59, 1999.
- [55] A. G. Togias, „Systemic immunologic and inflammatory aspects of allergic rhinitis”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 106, nr 5, s. S247–S250, 2000.
- [56] R. Z. Vinuya, „Upper airway disorders and asthma: a syndrome of airway inflammation”, *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.*, t. 88, nr 4, Supplement, s. 8–15, 2002.
- [57] M. Egan i S. Bunyavanich, „Allergic rhinitis: the “Ghost Diagnosis” in patients with asthma”, *Asthma Res. Pract.*, t. 1, nr 1, s. 8, 2015.
- [58] L. Giovannini-Chami i in., „The “one airway, one disease” concept in light of Th2 inflammation”, *Eur. Respir. J.*, 2018.
- [59] J. Grossman, „One airway, one disease”, *Chest*, t. 111, nr 2 Suppl, s. 11S-16S, 1997.
- [60] L. K. D. Paiva Ferreira, L. A. M. Paiva Ferreira, T. M. Monteiro, G. C. Bezerra, L. R. Bernardo, i M. R. Piuvezam, „Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS)”, *Int. Immunopharmacol.*, t. 74, s. 105718, 2019.
- [61] I. Eguiluz-Gracia i in., „Recent developments and highlights in biomarkers in allergic diseases and asthma”, *Allergy*, t. 73, nr 12, s. 2290–2305, 2018.

- [62] U. M. Zissler, J. Esser-von Bieren, C. A. Jakwerth, A. M. Chaker, i C. B. Schmidt-Weber, „Current and future biomarkers in allergic asthma”, *Allergy*, t. 71, nr 4, s. 475–494, 2016.
- [63] Y. S. Lee i A. Dutta, „MicroRNAs in cancer”, *Annu. Rev. Pathol.*, t. 4, s. 199–227, 2009.
- [64] W. Tan, B. Liu, S. Qu, G. Liang, W. Luo, i C. Gong, „MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy”, *Oncol. Lett.*, t. 15, nr 3, s. 2735–2742, 2018.
- [65] Y. Peng i C. M. Croce, „The role of MicroRNAs in human cancer”, *Signal Transduct. Target. Ther.*, t. 1, nr 1, Art. nr 1, 2016.
- [66] H. Long, X. Wang, Y. Chen, L. Wang, M. Zhao, i Q. Lu, „Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets”, *Cancer Lett.*, t. 428, s. 90–103, 2018.
- [67] Z. Qu, W. Li, i B. Fu, „MicroRNAs in Autoimmune Diseases”, *BioMed Research International*, 2014. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/527895/>
- [68] A. Tahamtan, M. Teymoori-Rad, B. Nakstad, i V. Salimi, „Anti-Inflammatory MicroRNAs and Their Potential for Inflammatory Diseases Treatment”, *Front. Immunol.*, t. 9, 2018.
- [69] H. H. Pua i K. M. Ansel, „MicroRNA regulation of allergic inflammation and asthma”, *Curr. Opin. Immunol.*, t. 36, s. 101–108, 2015.
- [70] A. Grenda, M. Budzyński, A. Filip „Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych”. *Postepy Hig Med Dosw.*, 2013.
- [71] L.-A. MacFarlane i P. R. Murphy, „MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer”, *Curr. Genomics*, t. 11, nr 7, s. 537–561, 2010.
- [72] A. M. Abdelfattah, C. Park, i M. Y. Choi, „Update on non-canonical microRNAs”, *Biomol. Concepts*, t. 5, nr 4, s. 275–287, 2014.

- [73] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, i B. R. Cullen, „Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs”, *Genes Dev.*, t. 17, nr 24, s. 3011–3016, 2003.
- [74] I. Muqbil, B. Bao, A. B. Abou-Samra, R. M. Mohammad, i A. S. Azmi, „Nuclear Export Mediated Regulation of MicroRNAs: Potential Target for Drug Intervention”, *Curr. Drug Targets*, t. 14, nr 10, s. 1094–1100, 2013.
- [75] H. A. Meijer, E. M. Smith, i M. Bushell, „Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?”, *Biochem. Soc. Trans.*, t. 42, nr 4, s. 1135–1140, 2014.
- [76] S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, i A. J. Enright, „miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature”, *Nucleic Acids Res.*, t. 34, nr Database issue, s. D140-144, 2006.
- [77] C. Catalanotto, C. Cogoni, i G. Zardo, „MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 17, nr 10, 2016.
- [78] Y. Cai, X. Yu, S. Hu, i J. Yu, „A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation”, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, t. 7, nr 4, s. 147–154, 2009.
- [79] van Rooij Eva, „The Art of MicroRNA Research”, *Circ. Res.*, t. 108, nr 2, s. 219–234, 2011.
- [80] C.-G. Liu, G. A. Calin, S. Volinia, i C. M. Croce, „MicroRNA expression profiling using microarrays”, *Nat. Protoc.*, t. 3, nr 4, s. 563–578, 2008.
- [81] C. E. Chivers, A. L. Koner, E. D. Lowe, i M. Howarth, „How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer”, *Biochem. J.*, t. 435, nr Pt 1, s. 55–63, 2011..
- [82] A. Jain i K. Cheng, „The Principles and Applications of Avidin-Based Nanoparticles in Drug Delivery and Diagnosis”, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, t. 245, s. 27–40, 2017.

- [83] T. Jm, P. J, P. Cm, i H. Sm, „A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression.”, *Nat. Methods*, t. 1, nr 1.
- [84] J. Lu i in., „MicroRNA expression profiles classify human cancers”, *Nature*, t. 435, nr 7043, s. 834–838, 2005.
- [85] F. Cristiano i P. Veltri, „Methods and Techniques for miRNA Data Analysis”, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, t. 1375, s. 11–23, 2016.
- [86] P. Androvic, L. Valihrach, J. Elling, R. Sjoback, i M. Kubista, „Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification”, *Nucleic Acids Res.*, t. 45, nr 15, s. e144, 2017.
- [87] H. Willenbrock i in., „Quantitative miRNA expression analysis: Comparing microarrays with next-generation sequencing”, *RNA*, t. 15, nr 11, s. 2028–2034, 2009.
- [88] „Quantitative PCR - PCR Technologies Guide”, Sigma-Aldrich.
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr.html>).
- [89] X. Qiu i in., „Advanced microRNA-based cancer diagnostics using amplified time-gated FRET, *Chem. Sci.*, t. 9, nr 42, s. 8046–8055, 2018.
- [90] M. Tajadini, M. Panjehpour, i S. H. Javanmard, „Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes”, *Adv. Biomed. Res.*, t. 3, 2014.
- [91] Q. Mei i in., „A Facile and Specific Assay for Quantifying MicroRNA by an Optimized RT-qPCR Approach”, *PLoS ONE*, t. 7, nr 10, 2012.
- [92] S. Debernardi i A. Dixon-McIver, „MicroRNA detection in bone marrow cells by LNA-FISH”, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, t. 667, s. 33–45, 2010.

- [93] B. Vester i J. Wengel, „LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA †”, *Biochemistry*, t. 43, nr 42, s. 13233–13241, 2004.
- [94] Z. Wang, „The Guideline of the Design and Validation of MiRNA Mimics”, w *MicroRNA and Cancer: Methods and Protocols*, W. Wu, Red. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.
- [95] H. Y. Jin i in., „Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution”, *Front. Genet.*, t. 6, 2015.
- [96] B. Simonson i S. Das, „MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet?”, *Mini Rev. Med. Chem.*, t. 15, nr 6, s. 467–474, 2015.
- [97] F. Liu, H.-B. Qin, B. Xu, H. Zhou, i D.-Y. Zhao, „Profiling of miRNAs in pediatric asthma: upregulation of miRNA-221 and miRNA-485-3p”, *Mol. Med. Rep.*, t. 6, nr 5, s. 1178–1182, 2012.
- [98] H. Inoue i in., „Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness”, *J. Exp. Med.*, t. 201, nr 1, s. 73–82, 2005.
- [99] Y. Zhou i in., „miRNA-221-3p Enhances the Secretion of Interleukin-4 in Mast Cells through the Phosphatase and Tensin Homolog/p38/Nuclear Factor-kappaB Pathway”, *PLoS ONE*, t. 11, nr 2, 2016.
- [100] R. J. Mayoral i in., „MiR-221 influences effector functions and actin cytoskeleton in mast cells”, *PloS One*, t. 6, nr 10 2011.
- [101] D. V. Sawant i in., „Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Allergic Inflammatory Disease in Children”, *MicroRNA Shariqah United Arab Emir.*, t. 4, nr 1, s. 36–40, 2015.
- [102] R. M. Elbehidy i in., „MicroRNA-21 as a novel biomarker in diagnosis and response to therapy in asthmatic children”, *Mol. Immunol.*, t. 71, s. 107–114, 2016.

- [103] T. X. Lu, A. Munitz, i M. E. Rothenberg, „MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression”, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950, t. 182, nr 8, s. 4994–5002, 2009.
- [104] T. X. Lu i in., „MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/interferon gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity”, *J. Immunol. Baltim. Md* 1950, t. 187, nr 6, s. 3362–3373, 2011.
- [105] X.-B. Wu, M.-Y. Wang, H.-Y. Zhu, S.-Q. Tang, Y.-D. You, i Y.-Q. Xie, „Overexpression of microRNA-21 and microRNA-126 in the patients of bronchial asthma”, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, t. 7, nr 5, s. 1307–1312, 2014.
- [106] C. Malmhäll, K. Johansson, C. Winkler, S. Alawieh, L. Ekerljung, i M. Rådinger, „Altered miR-155 Expression in Allergic Asthmatic Airways”, *Scand. J. Immunol.*, t. 85, nr 4, s. 300–307, 2017.
- [107] Y. Shaoqing i in., „Microarray Analysis of Differentially Expressed microRNAs in Allergic Rhinitis”, *Am. J. Rhinol. Allergy*, t. 25, nr 6, s. e242–e246, 2011.
- [108] H. Suojalehto i in., „MicroRNA profiles in nasal mucosa of patients with allergic and nonallergic rhinitis and asthma”, *Int. Forum Allergy Rhinol.*, t. 3, nr 8, s. 612–620, 2013.
- [109] J. Pauluhn i A. Poole, „Brown Norway rat asthma model of diphenylmethane-4,4'-diisocyanate (MDI): determination of the elicitation threshold concentration of after inhalation sensitization”, *Toxicology*, t. 281, nr 1–3, s. 15–24, 2011.
- [110] T. Boonpiyathad i in., „Der p 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy”, *Allergy*, t. 74, nr 5, s. 976–985, 2019.
- [111] T. Boonpiyathad i in., „Role of Der p 1-specific B cells in immune tolerance during 2 years of house dust mite-specific immunotherapy”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 143, nr 3, s. 1077–1086.e10, 2019.

- [112] C. Asencio, A. Chatterjee, i M. W. Hentze, „Silica-based solid-phase extraction of cross-linked nucleic acid-bound proteins”, *Life Sci. Alliance*, t. 1, nr 3, 2018.
- [113] „Asthma costs the US economy more than \$80 billion per year”, *ScienceDaily*. American Thoracic Society, 2018.
- [114] „Asthma FastStats”, Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/asthma.htm>, 2020.
- [115] „The Global Asthma Report 2018”.
<http://www.globalasthmareport.org/burden/mortality.php>
- [116] „W Polsce śmiertelność z powodu astmy jedna z najwyższych w Europie”,
<https://tacyjakja.pl/w-polsce-smiertelnosc-z-powodu-astmy-jedna-z-najwyzszych-w-europie>
- [117] S. L. Kui, C. H. How, i J. Koh, „The ‘problematic’ asthma patient”, *Singapore Med. J.*, t. 56, nr 7, s. 368–372, 2015.
- [118] D. Ukena, L. Fishman, i W.-B. Niebling, „Bronchial Asthma: Diagnosis and Long-Term Treatment in Adults”, *Dtsch. Ärztebl. Int.*, t. 105, nr 21, s. 385–394, 2008.
- [119] J. Kavanagh, D. J. Jackson, i B. D. Kent, „Over- and under-diagnosis in asthma”, *Breathe*, t. 15, nr 1, s. e20–e27, 2019.
- [120] M. Okano, „Mechanisms and clinical implications of glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis”, *Clin. Exp. Immunol.*, t. 158, nr 2, s. 164–173, 2009.
- [121] R. A. Nathan, „The burden of allergic rhinitis”, *Allergy Asthma Proc.*, t. 28, nr 1, s. 3–9, 2007.
- [122] M. Bedolla-Barajas, J. Morales-Romero, N. A. Pulido-Guillén, M. Robles-Figueroa, i B. R. Plascencia-Domínguez, „Rhinitis as an associated factor for anxiety and depression amongst adults”, *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, t. 83, nr 4, s. 432–438, 2017.

- [123] N. Kushnir, MD „In-Depth Review of Allergic Rhinitis” World Allergy Organization. <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/in-depth-review-of-allergic-rhinitis>. 2005.
- [124] M. Thomas, V. S. Kocevar, Q. Zhang, D. D. Yin, i D. Price, „Asthma-related health care resource use among asthmatic children with and without concomitant allergic rhinitis”, *Pediatrics*, t. 115, nr 1, s. 129–134, 2005.
- [125] G. Piatti i in., „Effects of zafirlukast on bronchial asthma and allergic rhinitis”, *Pharmacol. Res.*, t. 47, nr 6, s. 541–547, 2003.
- [126] G. Philip i in., „Montelukast for treating seasonal allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial performed in the spring”, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, t. 32, nr 7, s. 1020–1028, 2002.
- [127] M. D. Inman, „Bone marrow events in animal models of allergic inflammation and hyperresponsiveness”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 106, nr 5, s. S235–S241, 2000.
- [128] J. A. Denburg, „The bone marrow and airway inflammation: evidence for allergy as a systemic disease”, *Clin. Exp. Allergy Rev.*, t. 3, nr 1, s. 23–27, 2003.
- [129] R. Sehmi i in., „Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation”, *J. Clin. Invest.*, t. 100, nr 10, s. 2466–2475, 1997.
- [130] L. J. Wood i in., „Allergen-induced increases in bone marrow T lymphocytes and interleukin-5 expression in subjects with asthma”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, t. 166, nr 6, s. 883–889, 2002.
- [131] L. He i G. J. Hannon, „MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation”, *Nat. Rev. Genet.*, t. 5, nr 7, s. 522–531, 2004.

- [132] T. F. Felix i in., „MicroRNA modulated networks of adaptive and innate immune response in pancreatic ductal adenocarcinoma”, PLOS ONE, t. 14, nr 5, s. e0217421, 2019.
- [133] C. E. Stahlhut Espinosa i F. J. Slack, „The Role of MicroRNAs in Cancer”, Yale J. Biol. Med., t. 79, nr 3–4, s. 131–140, 2006.
- [134] S. Zhou i in., „miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges”, Acta Pharmacol. Sin., t. 39, nr 7, Art. nr 7, 2018.
- [135] W. Wang, E. J. Kwon, i L.-H. Tsai, „MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases”, Learn. Mem., t. 19, nr 9, s. 359–368, 2012,.
- [136] E. Sonkoly i A. Pivarcsi, „microRNAs in inflammation”, Int. Rev. Immunol., t. 28, nr 6, s. 535–561, 2009.
- [137] A. K. L. Leung i P. A. Sharp, „MicroRNA Functions in Stress Responses”, Mol. Cell, t. 40, nr 2, s. 205–215, paź. 2010.
- [138] M. Olejniczak, A. Kotowska-Zimmer, i W. Krzyzosiak, „Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning”, Cell. Mol. Life Sci., t. 75, nr 2, s. 177–191, 2018.
- [139] A. Gallo, M. Tandon, I. Alevizos, i G. G. Illei, „The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes”, PloS One, t. 7, nr 3, s. e30679, 2012.
- [140] J. A. Weber i in., „The microRNA spectrum in 12 body fluids”, Clin. Chem., t. 56, nr 11, s. 1733–1741, 2010.
- [141] A. E. Szafranska i in., „Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling”, J. Mol. Diagn. JMD, t. 10, nr 5, s. 415–423, 2008.

- [142] V. Budnik, C. Ruiz-Cañada, i F. Wendler, „Extracellular vesicles round off communication in the nervous system”, *Nat. Rev. Neurosci.*, t. 17, nr 3, s. 160–172, 2016.
- [143] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, i J. O. Lötvall, „Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells”, *Nat. Cell Biol.*, t. 9, nr 6, Art. nr 6, 2007.
- [144] J. Ratajczak, M. Wysoczynski, F. Hayek, A. Janowska-Wieczorek, i M. Z. Ratajczak, „Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication”, *Leukemia*, t. 20, nr 9, Art. nr 9, 2006.
- [145] L.-M. Shen, L. Quan, i J. Liu, „Tracking Exosomes in Vitro and in Vivo To Elucidate Their Physiological Functions: Implications for Diagnostic and Therapeutic Nanocarriers”, *ACS Appl. Nano Mater.*, t. 1, nr 6, s. 2438–2448, 2018.
- [146] M. P. Roffel i in., „Unraveling the role of miR-223-3p in the regulation of airway inflammation in asthma and COPD”, *ERJ Open Res.*, t. 5, nr suppl 2, 2019.
- [147] A. T. Kho i in., „Circulating MicroRNAs: Association with Lung Function in Asthma”, *PLOS ONE*, t. 11, nr 6, s. e0157998, 2016.
- [148] J. Wang, K. Li, G. Hellermann, R. F. Lockey, S. Mohapatra, i S. Mohapatra, „Regulating the Regulators: microRNA and Asthma”, *World Allergy Organ. J.*, t. 4, nr 6, s. 94–103, 2011.
- [149] S. Polikepahad i in., „Proinflammatory Role for let-7 MicroRNAs in Experimental Asthma”, *J. Biol. Chem.*, t. 285, nr 39, s. 30139–30149, 2010.
- [150] M. J. McGeachie i in., „Asthma remission: Predicting future airways responsiveness using an miRNA network”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 140, nr 2, s. 598-600.e8, sie. 2017.
- [151] A. Kicic i in., „Assessing the unified airway hypothesis in children via transcriptional profiling of the airway epithelium”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 0, nr 0, 2020.

- [152] R. P. Panganiban i in., „Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 137, nr 5, s. 1423–1432, maj 2016.
- [153] G. Thomas, „The S6 kinase Signaling Pathway In The Control of Development and Growth”, *Biol. Res.*, t. 35, nr 2, s. 305–313, 2002..
- [154] R. Zoncu, D. M. Sabatini, i A. Efeyan, „mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, t. 12, nr 1, s. 21–35, 2011.
- [155] S. Wullschleger, R. Loewith, i M. N. Hall, „TOR Signaling in Growth and Metabolism”, *Cell*, t. 124, nr 3, s. 471–484, 2006.
- [156] Y. Zhang i in., „Activation of the mTOR signaling pathway is required for asthma onset”, *Sci. Rep.*, t. 7, 2017.
- [157] R. L. Norton i P. R. Hoffmann, „Selenium and asthma”, *Mol. Aspects Med.*, t. 33, nr 1, s. 98–106, 2012.
- [158] C.-H. Guo, P.-J. Liu, S. Hsia, C.-J. Chuang, i P.-C. Chen, „Role of certain trace minerals in oxidative stress, inflammation, CD4/CD8 lymphocyte ratios and lung function in asthmatic patients”, *Ann. Clin. Biochem.*, t. 48, nr Pt 4, s. 344–351, 2011.
- [159] A. Badyda, A. Gayer, P. O. Czechowski, G. Majewski, i P. Dąbrowiecki, „Pulmonary Function and Incidence of Selected Respiratory Diseases Depending on the Exposure to Ambient PM₁₀”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 17, nr 11, 2016.
- [160] R. Tindell i in., „Selenium supplementation of lung epithelial cells enhances nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) activation following thioredoxin reductase inhibition”, *Redox Biol.*, t. 19, s. 331–338, 2018.
- [161] M. Acat, U. Toru Erbay, S. Sahin, O. Arik, i C. Ayada, „High serum levels of IGF-I and IGFBP3 may increase comorbidity risk for asthmatic patients”, *Bratisl. Lek. Listy*, t. 118, nr 11, s. 691–694, 2017.

- [162] N. Yamashita i in., „Role of insulin-like growth factor-I in allergen-induced airway inflammation and remodeling”, *Cell. Immunol.*, t. 235, nr 2, s. 85–91, 2005.
- [163] K. L. Veraldi i in., „Role of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 in Allergic Airway Remodeling”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, t. 180, nr 7, s. 611–617, 2009.
- [164] A. Bonaventura i F. Montecucco, „Steroid-induced hyperglycemia: An underdiagnosed problem or clinical inertia? A narrative review”, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, t. 139, s. 203–220, 2018.
- [165] P. Luo i in., „MiR-223-3p functions as a tumor suppressor in lung squamous cell carcinoma by miR-223-3p-mutant p53 regulatory feedback loop”, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, t. 38, nr 1, s. 74, 2019.
- [166] T. Soussi i K. G. Wiman, „TP53: an oncogene in disguise”, *Cell Death Differ.*, t. 22, nr 8, s. 1239–1249, 2015.
- [167] D. L. Gibbons, L. A. Byers, i J. M. Kurie, „Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer”, *Mol. Cancer Res. MCR*, t. 12, nr 1, s. 3–13, 2014.
- [168] R. Iggo, K. Gatter, J. Bartek, D. Lane, i A. L. Harris, „Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer”, *Lancet Lond. Engl.*, t. 335, nr 8691, s. 675–679, 1990.
- [169] A. Mogi i H. Kuwano, „TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/583929/?limit=all>.
- [170] B. Gentner i in., „MicroRNA-223 dose levels fine tune proliferation and differentiation in human cord blood progenitors and acute myeloid leukemia”, *Exp. Hematol.*, t. 43, nr 10, s. 858-868.e7, 2015.

- [171] T. Maes i in., „Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 137, nr 5, s. 1433–1446, 2016.
- [172] N. Pinzón i in., „microRNA target prediction programs predict many false positives”, *Genome Res.*, t. 27, nr 2, s. 234–245, 2017.
- [173] T. M. Witkos, E. Koscińska, i W. J. Krzyzosiak, „Practical Aspects of microRNA Target Prediction”, *Curr. Mol. Med.*, t. 11, nr 2, s. 93–109, 2011.
- [174] C. S. Scanlon, E. A. Van Tubergen, R. C. Inglehart, i N. J. D’Silva, „Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma”, *J. Dent. Res.*, t. 92, nr 2, s. 114–121, 2013.
- [175] N.-H. Myong, „Loss of E-cadherin and Acquisition of Vimentin in Epithelial-Mesenchymal Transition are Noble Indicators of Uterine Cervix Cancer Progression”, *Korean J. Pathol.*, t. 46, nr 4, s. 341–348, 2012.
- [176] M. Pain i in., „Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype”, *Eur. Respir. Rev.*, t. 23, nr 131, s. 118–130, 2014.
- [177] X. Zhu i in., „BMS-345541 inhibits airway inflammation and epithelial-mesenchymal transition in airway remodeling of asthmatic mice”, *Int. J. Mol. Med.*, t. 42, nr 4, s. 1998–2008, 2018.
- [178] K. D. Fischer, S. C. Hall, i D. K. Agrawal, „Vitamin D Supplementation Reduces Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Allergen Sensitized and Challenged Mice”, *PloS One*, t. 11, nr 2, s. e0149180, 2016.
- [179] T.-L. Hackett i in., „Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, t. 180, nr 2, s. 122–133, 2009.

- [180] C. A. Ojiaku, E. J. Yoo, i R. A. Panettieri, „Transforming Growth Factor β 1 Function in Airway Remodeling and Hyperresponsiveness. The Missing Link?”, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, t. 56, nr 4, s. 432–442, 2017.
- [181] K. Jiang, H.-B. Chen, Y. Wang, J.-H. Lin, Y. Hu, i Y.-R. Fang, „Changes in interleukin-17 and transforming growth factor beta 1 levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid and their clinical significance among children with asthma”, *Transl. Pediatr.*, t. 2, nr 4, s. 154–159, 2013.
- [182] J. R. Johnson i in., „IL-22 contributes to TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in asthmatic bronchial epithelial cells”, *Respir. Res.*, t. 14, nr 1, s. 118, 2013.
- [183] D. R. Duncan i in., „TGF β R1 inhibition blocks the formation of stenosis in tissue-engineered vascular grafts”, *J. Am. Coll. Cardiol.*, t. 65, nr 5, s. 512–514, 2015.
- [184] K. Jeyaseelan, K. Y. Lim, i A. Armugam, „MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion”, *Stroke*, t. 39, nr 3, s. 959–966, 2008.
- [185] T.H. Tran, M.A. Montano „microRNA - an overview”.
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/microrna>
- [186] G. Ye i in., „miR-384-5p ameliorates neuropathic pain by targeting SCN3A in a rat model of chronic constriction injury”, *Neurol. Res.*, t. 42, nr 4, s. 299–307, 2020.
- [187] A. S. Verkman, „ROLE OF AQUAPORINS IN LUNG LIQUID PHYSIOLOGY”, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, t. 159, nr 3, s. 324–330, 2007.
- [188] S. Nielsen, L. S. King, B. M. Christensen, i P. Agre, „Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat”, *Am. J. Physiol.*, t. 273, nr 5, s. C1549-1561, 1997.

- [189] M. J. Jardim, L. Dailey, R. Silbajoris, i D. Diaz-Sanchez, „Distinct microRNA expression in human airway cells of asthmatic donors identifies a novel asthma-associated gene”, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, t. 47, nr 4, s. 536–542, 2012.
- [190] C. M. Krane i in., „Altered regulation of aquaporin gene expression in allergen and IL-13-induced mouse models of asthma”, *Cytokine*, t. 46, nr 1, s. 111–118, 2009.
- [191] A. S. Verkman, „Knock-Out Models Reveal New Aquaporin Functions”, *Handb. Exp. Pharmacol.*, nr 190, s. 359–381, 2009.
- [192] G. Chittoor i in., „GWAS and transcriptional analysis prioritize ITPR1 and CNTN4 for a serum uric acid 3p26 QTL in Mexican Americans”, *BMC Genomics*, t. 17, s. 276, 2016.
- [193] N. K. Abdalnaby, A. O. Sayed, i N. M. Shalaby, „Predictive value of serum uric acid in hospitalized adolescents and adults with acute asthma”, *Ther. Clin. Risk Manag.*, t. 12, s. 1701–1708, 2016.
- [194] „Tissue expression of KCND2 - Summary - The Human Protein Atlas”.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000184408-KCND2/tissue>.
- [195] X. Liu i in., „MiR-223-3p as a Novel MicroRNA Regulator of Expression of Voltage-Gated K⁺ Channel Kv4.2 in Acute Myocardial Infarction”, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, t. 39, nr 1, s. 102–114, 2016.
- [196] H. Kawada i in., „Tumor necrosis factor- α downregulates the voltage gated outward K⁺ current in cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible cause of electrical remodeling in diseased hearts”, *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.*, t. 70, nr 5, s. 605–609, 2006.
- [197] M. Berry, C. Brightling, I. Pavord, i A. Wardlaw, „TNF- α in asthma”, *Curr. Opin. Pharmacol.*, t. 7, nr 3, s. 279–282, 2007.
- [198] B. J. Undem i M. J. Carr, „The role of nerves in asthma”, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, t. 2, nr 2, s. 159, 2002.

- [199] T. R. Katsumoto i in., „The phosphatase CD148 promotes airway hyperresponsiveness through SRC family kinases”, *J. Clin. Invest.*, t. 123, nr 5, s. 2037–2048, 2013.
- [200] D. Reddy i F. F. Little, „Glucocorticoid-resistant asthma: more than meets the eye”, *J. Asthma Off. J. Assoc. Care Asthma*, t. 50, nr 10, s. 1036–1044, 2013.
- [201] H. M. Coleridge i J. C. Coleridge, „Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense”, *Annu. Rev. Physiol.*, t. 56, s. 69–91, 1994.
- [202] Peter J. Barnes, „ASTHMA AS AN AXON REFLEX”, *The Lancet*, t. 327, nr 8475, s. 242–245, 1986.
- [203] C. A. Butler i L. G. Heaney, „Neurogenic inflammation and asthma”, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, t. 6, nr 2, s. 127–132, 2007.
- [204] D. Tränkner, N. Hahne, K. Sugino, M. A. Hoon, i C. Zuker, „Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 111, nr 31, s. 11515–11520, 2014.
- [205] N. Eroshenko i G. M. Church, „Mutants of Cre recombinase with improved accuracy”, *Nat. Commun.*, t. 4, s. 2509, 2013.
- [206] W. Yang, „Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism”, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, t. 45, nr 6, s. 520–534, 2010.
- [207] J. D. Campbell i in., „Assessment of microRNA differential expression and detection in multiplexed small RNA sequencing data”, *RNA N. Y. N.*, t. 21, nr 2, s. 164–171, 2015.

13. OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ

UCHWAŁA NR 35/2017

z dnia 23.06.2017r.

Lokalne Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Lokalna komisja etyczna, po rozpatrzeniu aneksu do wniosku 47/2016 złożonego przez Pana dr Dawida Szczepankiewicza z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu ul. Wojska Polskiego 28, 6-637 Poznań, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach w dniu 08.06.2017r. a dotyczącego:

przedłużenia realizacji wniosku

w ramach wydanej przez komisję zgody uchwałą nr 47/2016 z dnia 01.07.2016 dotyczącej projektu pt.: „Rola egzosomalnych mikroRNA w komunikacji tkanki tłuszczowej z drogami oddechowymi w astmie – model zwierzęcy” zgłoszonego przez Pana dr Dawida Szczepankiewicza.

WYRAŻA ZGODĘ

na dokonanie zmian w zakresie określonym poniżej.

§ 2

Na przedłużenie realizacji wniosku 47/2016 do 1.11.2021

§ 3

Uzasadnienie:

Opóźnienie finansowania projektu.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

Podpis Przewodniczącego lokalnej komisji etycznej

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 61-846 60 83, tel. 798 641 366

PRZEWODNICZĄCY
Lokalne Komisji Etycznej do Spraw
Doświadczeń na Zwierzętach
w Poznaniu
[Podpis]
dr hab. Katarzyna Szudelska

Otrzymuje Użytkownik

Pouczenie:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie

Zespół ds. dobrostanu