

1. Cel prowadzonych badań/hipoteza badawcza

Astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa są przykład chorób układu oddechowych, stanowiących poważny problem natury medycznej i socjoekonomicznej. Liczne badania podkreślają częste współwystępowanie, co wskazuje na podobny patomechanizm obu chorób. Sugeruje to, że górne i dolne drogi oddechowe mogą mieć podobny mechanizm regulacji procesów zapalnych, będących pod kontrolą wspólnych genów. Pomimo wieloletnich badań, obecnie stosowane metody diagnostyczne cechuje wiele niedoskonałości takich jak niska specyficzność czy duża inwazyjność. Dlatego też potrzebne są nowe, nieinwazyjne testy, pozwalające na szybką i precyzyjną diagnostykę, jak również monitorowanie efektów leczenia. Do tego celu mogą posłużyć małe, niekodujące cząsteczki RNA (miRNA). Ze względu na trudny dostęp do materiału klinicznego w niniejszym projekcie wykorzystany zostanie szczurzy model indukowanej astmy oskrzelowej i alergicznego nieżyty nosa. Hipotezę badawczą stanowi założenie, że w trakcie zapalenia alergicznego w górnych (nos) i dolnych (płuca) drogach oddechowych dochodzi do zmian w ekspresji miRNA. Dodatkowo, zmiany mogą być obecne we krwi obwodowej uczulonych zwierząt, za pośrednictwem mechanizmu międzykomórkowego i międzytkankowego transportu miRNA z wykorzystaniem pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych. Celem naukowym niniejszego projektu jest identyfikacja genów miRNA wykazujących podobny profil ekspresji u szczurów uczulonych zarówno w drogach oddechowych jak i krwi. Modyfikacja ekspresji tych genów miRNA *in vivo* (planowana jako kontynuacja niniejszych badań) pozwoli na opracowanie nowych leków hamujących alergiczny stan zapalny.

2. Zastosowana metoda badawcza/metodyka

Do przeprowadzenia niniejszego eksperymentu wykorzystany zostanie szczur szczepu Brown Norway, który uważany jest za jeden z najlepszych modeli *in vivo* dla indukcji stanu zapalnego w drogach oddechowych. Zwierzęta (20 sztuk) zostaną zakupione u certyfikowanego producenta i poddane 3-tygodniowemu procesowi sensytyzacji z wykorzystaniem ekstraktu roztoczu kurzu domowego (grupa badana, n=10) lub równolegle roztworu soli fizjologicznej (grupa kontrolna, n=10). Po tym okresie zwierzętom zostanie pobrana krew w celu oznaczenia stężenia przeciwciał anti-HDM, IL-4, oraz INF- γ . Po potwierdzeniu zapalenia zwierzęta zostaną uśmiercone. Od każdego szczura pobrane zostaną tkanki z płuc, nosa oraz krew obwodowa do izolacji RNA. Na tkankach pobranych z nosa i płuc wykonane zostaną barwienia w celu potwierdzenia zmian zapalnych. Na materiale cDNA (tkanki z płuca i nosa) przeprowadzone zostanie profilowanie dla 384 genów miRNA. Kontrolą dla eksperymentu będą szczury bez potwierdzonego uczulenia. Dla wybranych genów miRNA wykazujących zmieniony profil ekspresji w tkankach zwierząt uczulonych, przeprowadzona zostanie walidacja z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym. Na tym etapie analizowana będzie dodatkowo krew zwierząt uczulonych i kontrolnych. Dla wybranych miRNA, wykazujących podobny profil ekspresji we wszystkich trzech tkankach, przeprowadzone zostanie barwienie immunohistochemiczne z wykorzystaniem sond znakowanych fluorescencyjnie, co pozwoli na półilościową ocenę ekspresji bezpośrednio w tkankach zwierząt. Dla wybranych miRNA przeprowadzona zostanie analiza *in silico*, w celu wytypowania genów docelowych regulowanych przez te miRNA a ich analiza stanowić będzie kontynuację niniejszego projektu.

3. Wpływ spodziewanych rezultatów na rozwój nauki, cywilizacji, społeczeństwa

Osiągnięcie założonych w projekcie celów pozwoli na lepsze poznanie mechanizmów leżących u podstawy zapalenia alergicznego w górnych i dolnych drogach oddechowych. Niniejsze badania będą wstępem do analizy funkcjonalnej na modelu zwierzęcym oraz analizy klinicznej planowanych jako kontynuacja niniejszego projektu. W przyszłości niniejsze badania mogą okazać się użyteczne do wyznaczenia nowych celów dla terapii astmy oskrzelowej i alergicznego nieżyty nosa.