

Mukowiscydoza to choroba genetyczna dziedziczona autosomalnie recesywnie związana z upośledzeniem funkcji kanału chlorkowego w błonach komórkowych. Jest to jedna z najczęstszych chorób genetycznych występujących u ludzi. Zapadalność na nią wynosi 1 na 2500 urodzeń, a chorzy w Polsce dożywają średnio 35 roku życia. Dzięki wdrożeniu badań przesiewowych wśród noworodków możliwe jest wczesne zdiagnozowanie mukowiscydozy. Wraz z upływem czasu u pacjentów pojawia się dysfunkcja wielu narządów w tym: trzustki, przewodu pokarmowego, układu rozrodczego i płuc (głównie w związku z odkładaniem się gęstego śluzu). Co więcej, u chorych obserwuje się tzw. zaostrzenia, czyli nawracające pogorszenie funkcji dróg oddechowych w wyniku pojawiania się stanu zapalnego i często współwystępujących infekcji. Z zaostrzeniami wiąże się stopniowa utrata sprawności płuc, co w ostateczności prowadzi do przedwczesnej śmierci pacjentów.

Opublikowane badania wskazują na szereg cząsteczek genetycznych wpływających na przebieg mukowiscydozy. Niektóre z nich przenoszone są między komórkami nabłonka dróg oddechowych za pośrednictwem eksosomów, czyli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających w swoim wnętrzu bioaktywne cząsteczki (np. microRNA, czy circRNA). Tego typu transport aktywnych biologicznie molekuł jest wskazywany jako jedna z możliwych dróg szerzenia się zapalenia w drogach oddechowych. Na chwilę obecną opublikowane badania dotyczą między innymi transportu microRNA (miRNA), czyli krótkich niekodujących RNA zdolnych do inhibicji ekspresji genów i aktywnego wpływania na przebieg chorób m.in. mukowiscydozy.

Nasz zespół postanowił przeanalizować profil ekspresji circRNA, czyli długich RNA o zamkniętej, kolistej strukturze. Te cząsteczki obecne są we wszystkich komórkach eukariotycznych, a dzięki swojej charakterystycznej budowie wyróżniają się większą odpornością na działanie egzonukleaz, co potencjalnie czyni z nich dobrych kandydatów do pełnienia roli biomarkerów. Główną cechą funkcjonalną, z której znane są circRNA jest zdolność do komplementarnego wiązania miRNA i hamowania ich aktywności (tzw. „gąbki miRNA”), alternatywnie circRNA mogą działać jako rezerwuary miRNA chroniąc je przed degradującym działaniem specyficznych białek.

Do tej pory nie zostały zidentyfikowane circRNA powiązane z mukowiscydozą, dlatego postanowiliśmy zbadać ekspresję tychże cząsteczek w próbkach surowicy pochodzących od pacjentów oraz zestawzić je z profilem ekspresji u osób zdrowych. Do naszego badania zrekrutowaliśmy pacjentów pediatrycznych leczonych w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej w Poznaniu. Wszelkie badania jak i materiał były pobierane w miarę możliwości zarówno w fazie zaostrzenia jak i remisji choroby. Przed rekrutacją zostały szczegółowo opracowane kryteria włączenia i wyłączenia z badania (dla wyłączenia np. wiek poniżej 6 r. ż., choroby autoimmunologiczne).

Badanie rozpocznie się od procedury izolacji eksosomalnego circRNA złożonej z szeregu reakcji. Następnie otrzymany materiał zostanie poddany Sekwencjonowaniu Nowej Generacji, nowoczesnej technice umożliwiającej jednoczesne zbadanie sekwencji wielu cząsteczek w więcej niż jednej próbce. Dokładna analiza bioinformatyczna wskaże obecność których circRNA odróżnia materiał pacjenta od materiału kontrolnego. Dalsze badania przy zastosowaniu reakcji qPCR, zostaną poszerzone o materiał z płwociny (materiał odkształczony produkowany tylko przez osoby chore) i posłużą do weryfikacji otrzymanych wyników sekwencjonowania. Co więcej sprawdzone zostanie czy któreś z odkrytych circRNA różnią się ekspresją między stanem stabilnym a zaostrzeniem w surowicy i w płwocinie. Taki schemat badań umożliwi ocenę ekspresji circRNA zarówno obwodowo we krwi jak i miejscowo w drogach oddechowych. Jako etap końcowy planowane jest sprawdzenie czy cząsteczki istotnie różniące się ekspresją u chorych skutecznie wylapują specyficzne miRNA. Do weryfikacji tego założenia przeprowadzony zostanie eksperyment z wykorzystaniem hodowli odpowiednio zmodyfikowanych ludzkich komórek nabłonka oskrzeli.

Spodziewamy się, że w ramach naszego projektu zostaną zidentyfikowane circRNA ulegające specyficznej ekspresji w mukowiscydozie. Dzięki temu możliwa będzie w przyszłości dokładna analiza funkcjonalna tychże cząsteczek, a zatem ocena ich rzeczywistego wpływu na przebieg choroby. Ponadto, liczymy, że wykryjemy circRNA, które poprzez oddziaływania na miRNA, mogą przyczyniać się do występowania zaostrzeń u pacjentów z mukowiscydozą. Stanowiłyby to wstęp do opracowywania potencjalnych metod terapeutycznych mogących spowolnić progresję choroby i przyczynić się w przyszłości do poprawy jakości życia i zwiększenia przeżywalności chorych.