

## **Analiza funkcjonalna mikroRNA na modelu zwierzęcym *ex vivo* zapalenia alergicznego dróg oddechowych**

Alergiczny stan zapalny dróg oddechowych jest cechą charakterystyczną astmy alergicznej, najczęstszej przewlekłej choroby układu oddechowego u dzieci. Alergiczny stan zapalny w drogach oddechowych w astmie wiąże się ze zwężeniem oskrzeli i utrudnionym przepływem powietrza przez drogi oddechowe oraz przebudową ściany oskrzeli. Prowadzi to do nasilenia objawów choroby i gorszej odpowiedzi na leczenie u chorych na astmę. Szczególnie u dzieci, wczesne zapobieganie nie tylko poprawiłoby nasilenie objawów i stan kliniczny pacjenta, ale również pozwoliłoby zahamować nieodwracalne zmiany w układzie oddechowym.

W badaniach funkcjonalnych w ostatnich latach dużą popularność zyskały modele *ex vivo*, w tym również fragmenty (skrawki) płuc (tzw. PCLS), ponieważ zachowują trójwarstwową strukturę płuc oraz otaczające tkanki i mikrośrodowisko, czego brakuje w badaniach na hodowlach komórkowych. Pozwala to na badanie wpływu np. podawanych leków w celu ich skuteczności lub toksyczności. Model *ex vivo* wykorzystano do tej pory w badaniach dotyczących patogenezy zwłóknienia płuc oraz w opracowaniu nowych terapii w nadciśnieniu płucnym. Do tej pory nie prowadzono badań dotyczących alergicznego stanu zapalnego dróg oddechowych ani wpływu modyfikacji cząsteczek mikroRNA na odpowiedź zapalną płuc, a wcześniejsze badania wykazały możliwość zastosowania skrawków płuc do badania mechanizmów alergicznej odpowiedzi zapalnej. Celem projektu jest zbadanie, czy modyfikacja ekspresji wybranych mikroRNA w stanie zapalenia alergicznego dróg oddechowych uczulonych szczurów może modyfikować reakcję zapalną na modelu *ex vivo* tkanki płuc szczura oraz człowieka oraz zidentyfikować potencjalne geny docelowe podlegające regulacji przez analizowane miRNA.

W oparciu o wyniki naszych wcześniejszych badań, które wykazały zmieniony profil ekspresji miRNA w płucach szczurów uczulonych alergenem roztoczy kurzu domowego w porównaniu do szczurów nie uczulonych, postawiliśmy hipotezę, że modyfikacja ekspresji tych miRNA w tkance płuc na modelu *ex vivo* z zastosowaniem precyzyjnie skrojonych skrawków płuc (PCLS) może modyfikować reaktywność dróg oddechowych oraz alergiczna odpowiedź zapalną. Poprzez transfekcję tych skrawków płuc cząsteczkami modyfikującymi ekspresję (inhibitorami lub analogami miRNA) planujemy wykazać, że mogą one modyfikować odpowiedź zapalną, reaktywność dróg oddechowych oraz zmiany w ekspresji genów i białek związanych ze stanem zapalnym. Planujemy również zidentyfikować docelowe białka, które regulują badane miRNA zarówno w skrawkach płuc szczura jak i człowieka.

W pierwszym etapie badań planowane jest przygotowanie skrawków z płuc szczurów szczepu Brown Norway uczulonych alergenem roztoczy kurzu domowego oraz szczurów nie uczulonych stanowiących grupę kontrolną w celu porównania struktury i funkcji skrawków płuc. W następnym etapie planowana jest modyfikacja ekspresji miRNA w skrawkach płuc za pomocą znakowanych fluorescencyjnie inhibitorów lub analogów miRNA, wywołując zmniejszenie ekspresji lub nadekspresję badanych miRNA. Wyniki naszych wstępnych badań wykazały istotne zmiany ekspresji dwóch cząsteczek miRNA w płucach szczurów uczulonych alergenem roztoczy kurzu domowego: rno-miR-223-3p i mir-328a-3p, i te cząsteczki zostały wybrane do analizy. Do oceny efektu cząsteczek modyfikujących ekspresję tych miRNA wykorzystany zostanie test reaktywności oskrzeli oraz ocena ekspresji genów i białek związanych ze stanem zapalnym: mucyn, cytokin wydzielanych przez komórki nabłonka, cytokin produkowanych przez limfocyty Th2, chemokin oraz związanych z eozynofilami. Dla miRNA, który wykaże najsilniejsze właściwości modyfikujące wykonana zostanie ocena ekspresji białka docelowego dla tego miRNA, by zidentyfikować szlak biologiczny, w którego regulację jest zaangażowany badany miRNA. W ostatnim etapie badań planowana jest weryfikacja wyników uzyskanych na płucach szczura na skrawkach płuc człowieka, by ocenić, czy wyniki uzyskane u szczura mają przełożenie na płuca człowieka.

Wyniki projektu mogą dostarczyć nowej wiedzy o roli miRNA w alergicznym stanie zapalnym dróg oddechowych. Jeśli modyfikacja ekspresji miRNA związanych ze stanem zapalnym wykaże efekt przeciwzapalny, ten model *ex vivo* będzie mógł w przyszłości posłużyć jako platforma do oceny skuteczności nowych leków, opartych o modyfikację miRNA do ukierunkowanej terapii przewlekłych chorób układu oddechowego takich jak astma.