

Pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC) jest przewlekłą chorobą o złożonej etiologii, która charakteryzuje się postępującym niszczeniem dróg żółciowych, a w konsekwencji wątroby, poprzez mechanizmy autoimmunizacji i cholestazy. U około 70–80% pacjentów z PSC diagnozowane jest także wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC). PSC ze współistniejącym UC stanowi odrębny fenotyp choroby PSC, który 4-10 krotnie zwiększa ryzyko zachorowania na raka jelita grubego (CRC), i to w znacznie młodszym wieku niż u pacjentów z samym UC. **Kwestia czynników łączących chorobę PSC i UC jest powszechnie badana, ale dotąd nie są znane skuteczne metody leczenia.**

Ostatnie badania wskazują, że modyfikacje epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, związana z metylotransferazą DNA (DNMT) i ekspresja genów modulowana przez miRNA, wpływają na rozwój wielu chorób. MikroRNA (małe niekodujące cząsteczki RNA) odgrywają kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, a ich ekspresja jest rozregulowana w różnych typach nowotworów. MiR-155 jest znany jako wielofunkcyjny regulator odporności nieswoitej i adaptacyjnej. Nasze badania pilotażowe wykazały, że miRNA-155 i jego geny docelowe (*sphingosine-1-phosphate receptor 1* - S1PR1 oraz *suppressor of cytokine signaling* - SOCS1) mają zupełnie inną ekspresję w jelicie grubym pacjentów z PSC ze współistniejącym UC (PSC-UC), w porównaniu do chorych na UC. Ponadto, zaobserwowaliśmy rozregulowanie ekspresji DNMT1 w okężnicy pacjentów z PSC. **Może to sugerować różnice w patogenezie zapalenia i CRC u chorych na PSC ze współistniejącym UC (PSC-UC) w porównaniu z pacjentami z samym UC.**

Aby udowodnić naszą hipotezę, że miR-155 może odgrywać ważną rolę w etiologii i rozwoju nowotworów jelita grubego i / lub zapalenia w PSC-UC, przeprowadzimy następujące eksperymenty:

Po pierwsze, chcemy zbadać, czy zaobserwowane zmiany w naszym badaniu pilotażowym (n = 10) potwierdzą się w badaniu walidacyjnym. Dla zapewnienia odpowiedniej mocy statystycznej, zamierzamy powiększyć każdą z badanych grup (PSC-UC, PSC, UC) o 20 pacjentów. Ponadto, aby uzyskać szerszy obraz ekspresji miR-155 w całym spektrum choroby PSC, planujemy włączyć do badań próbki od pacjentów z PSC-UC i nowotworem jelita grubego (n = 20). W tkankach pobranych z dwóch części jelita grubego, tj. wstępnicy i esicy zbadamy ekspresję miR-155, S1PR1, SOCS1, interleukinę 17A (IL17A), *forkhead box P3* (FOXP3) *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), oraz enzymów zaangażowanych w metabolizm sfingozyno-1-fosforanu (S1P), w tym: kinazę sfingozyny (SPHK1) i ligazę sfingozyny (SPL).

Po drugie, biorąc pod uwagę, że metylacja DNA odgrywa kluczową rolę w wyciszaniu ekspresji genów w nowotworzeniu - określimy poziom metylacji promotora genu *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) w badanych tkankach okężnicy (współpraca z Uniwersytetem w Pampelunie, Hiszpania).

Po trzecie, wiemy, że miRNA są obecne i bardzo stabilne w biofluidach, takich jak osocze. Dlatego mając dostęp do dużej, dobrze scharakteryzowanej grupy PSC (n = 300), pacjentów z PSC-UC (n = 300) oraz odpowiednio dobranej pod względem płci i wieku kontroli (n = 300) - planujemy ocenić ekspresję miRNA w próbkach surowicy od tych pacjentów oraz zbadać związek między poziomem ekspresji miR-155 a zapaleniem okężnicy i / lub występowaniem CRC u tych pacjentów. Zbadamy również związek między ekspresją miR-155 w surowicy a cechami klinicznymi i laboratoryjnymi w analizowanej kohorcie. Dodatkowo w oparciu o naszą obserwację *in vitro* - indukcja ekspresji miR-155 w odpowiedzi na leczenie kwasem 5-aminosalicylowym (5-ASA; lek stosowany w leczeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego) - planujemy przeanalizować działanie tego leku w kolejnej grupie pacjentów z PSC (n = 30).

Po czwarte, naszym celem jest zbadanie możliwych mechanizmów działania miR-155, które mogą prowadzić do zaburzenia układu odpornościowego lub nowotworzenia. Planujemy badania funkcjonalne na liniach komórek nabłonka ludzkiego jelita, (i) w celu zbadania, czy hamowanie lub indukcja miR-155 może modulować ekspresję STAT3/S1P oraz stosunek Th17/Treg; (ii) analizy poziomu miR-155 i jego genów docelowych w komórkach traktowanych lipopolisacharydem (LPS), który indukuje odpowiedź prozapalną; (iii) w celu uzyskania wglądu w działanie leków podczas trwającego zapalenia jelita, ekspresja miR-155 i jego genów docelowych będzie mierzona po ekspozycji na leki w liniach komórkowych stymulowanych LPS.

Badania zostaną przeprowadzone na próbkach tkanek jelita grubego i surowicy w grupie pacjentów PSC, PSC-UC, UC, PSC z nowotworem jelita grubego oraz zdrowej kontroli. Analizy funkcjonalne *in vitro* będą prowadzone w liniach komórkowych: Caco-2, HT29, and NCM460. Ekspresja genów będzie badana za pomocą sond TaqMan i urządzenia PCR w czasie rzeczywistym, a poziomy ekspresji białek będą oceniane przy zastosowaniu Immunoblotting. Wizualizacja cząsteczek miRNA w zamrożonych i utrwalonych w formalinie skrawkach tkankowych zatopionych w parafinie zostanie przeprowadzona przy użyciu hybrydyzacji *in situ*.

Uważamy, że poznanie roli miR-155 w badaniach funkcjonalnych komórek i procesach patologicznych okężnicy pacjentów z PSC, może stworzyć podstawę molekularną do opracowania nowych terapii opartych właśnie na tym miRNA.