

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wydział Lekarski

lek. med. Małgorzata Aurelia Pietrusińska

Rozprawa Doktorska

***„Ekspresja wybranych microRNA w osoczu u
pacjentów z astmą – hsa-miRNA-224, hsa-
miRNA-339-5p, hsa-miRNA-382”***

Promotor:

Prof. nadzw. dr hab. n. med. Tadeusz Pietras

Łódź 2020

Streszczenie

Streszczenie w języku polskim

Astma definiowana jest jako przewlekła choroba układu oddechowego charakteryzująca się odwracalną obturacją oskrzeli której podłożem jest stan zapalny. W jej patogenezie wyróżnić można wiele czynników, a wśród nich także czynniki genetyczne i epigenetyczne.^{1, 2}

W układzie immunologicznym dochodzi do inicjalizacji szeregu procesów prowadzących do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego. Aktywowane są limfocyty T, następuje wzmożona produkcja cytokin prozapalnych, jak IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Procesy te podlegają regulacji już na poziomie transkrypcji genów.^{1, 3}

Micro-RNA (miRNA) to około 22-nukleotydomowe, jednoniciowe fragmenty niekodującego RNA, które biorą udział w regulacji ekspresji genów na etapie post-transkrypcji poprzez degradację mRNA lub hamowanie translacji mRNA.⁴

Celem pracy jest identyfikacja różnic w ekspresji 3 microRNA - hsa-miR-224, hsa-miR-339-5p oraz hsa-miR-382 w osoczu pacjentów chorujących na astmę w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych.

Powyższe micro-RNA zostały wybrane na podstawie badania wstępnego, w którym analizie poddano osocze pobrane od trzech pacjentów chorujących na astmę i trzy osoby zdrowe, stanowiące grupę kontrolną. Przy użyciu zestawów płytek TaqMan® Human MicroRNA Array A (ThermoFisher, USA), wyodrębniono 3 microRNA, których ekspresja znacząco różniła się pomiędzy grupami badanymi. Były to hsa-miR-224, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-382.

W kolejnym etapie analizie poddano 30 pacjentów chorujących na astmę i 20 osób w grupie kontrolnej. Na tym etapie oznaczona została ekspresja tylko wybranych poprzednio 3 microRNA, stosując TaqMan Universal MasterMix (Thermo Fisher, USA), zestaw sond TaqMan do wykrywania hsa-miR-224, hsa-miR-339-5p i hsa-miR-382(Thermo Fisher, USA) oraz hsa-miR-39 jako gen referencyjny.

Wykazano istotną statystycznie różnicę w ekspresji hsa-miR-224, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-382 w osoczu u pacjentów chorujących na astmę w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych. W grupie badanej ekspresja wszystkich trzech badanych microRNA była wyższa niż w grupie kontrolnej.

W następnym kroku analizowano różnice w ekspresji powyższych microRNA w osoczu pacjentów chorujących na astmę w zależności od

1. Ciężkości obturacji mierzonej FEV 1
2. Stopnia kontroli astmy mierzonej w teście ACQ
3. Wielkości dawki przyjmowanych glikokortykosteroidów wziewnych.

Stwierdzono ujemną, istotną statystycznie korelację między stopniem ekspresji hsa-miR-382 a FEV1.

Wykazano ujemną, istotną statystycznie korelację między stopniem ekspresji hsa-miR-382 a stopniem kontroli astmy w teście ACQ.

Wykazano brak korelacji badanych microRNA z wielkością przyjmowanej dawki wziewnych glikokortykosteroidów.

Abstract

Asthma is defined as a chronic respiratory disease characterized by reversible bronchial obstruction, which is caused by inflammation. In its pathogenesis there can be lot of factors distinguished, including genetic and epigenetic factors.

In the immune system, a number of processes are initiated that lead to the development of chronic inflammation. T lymphocytes are activated, there is an increased production of proinflammatory cytokines like IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. These processes are regulated at the gene transcription level.

MicroRNA (miRNA) are small, about 22-nucleotide, single-stranded, non-coding RNA, which are involved in gene expression at the post-transcription stage by degrading mRNA or inhibiting mRNA translation.

The aim of the study is to identify differences in three microRNA expression – has-miR-224, has-miR-339-5p and has-miR-382 in asthmatic patients' serum in a contrast to healthy control group.

Those three microRNA were chosen based on preliminary study, which analysed serum from three patients with asthma and three healthy patients, which were a control group. Using TaqMan® Human MicroRNA Array A (Thermo Fisher, USA), three microRNA, whose expression was significantly different between groups. There were: has-miR-224, has-miR-339-5p, has-miR-382.

In next step 30 patients with asthma and 20 healthy people were analysed. On this stage only three microRNA were analysed, using TaqMan Universal MasterMix (Thermo Fisher, USA) and set o TaqMan probes, detecting miR-224, miR-339-5p, miR-382 (Thermo Fisher, USA) and has -miR-39 as a reference gene.

Statistically significant differences in miR-224, miR-339-5p and miR-382 expression between both groups was demonstrated. In the group of patients with asthma, the expression of all three microRNAs was increased.

In the next step, the differences in the expression of those three microRNAs in plasma of patients suffering from asthma were analysed, depending on:

1. Severity of the obstruction measured by FEV1
2. Asthma control measured in the ACQ test
3. Size of the daily dose of ICSs.

A negative, statistically significant correlation was found between the expression level of has-miR-382 and FEV1.

A negative, statistically significant correlation was found between the expression level of has-miR-382 and asthma control measured in the ACQ test.

There was no significant correlation between the expression of any of these microRNAs and daily ICSs dose.