



Pomorski Uniwersytet Medyczny
w Szczecinie
Wydział Nauk o Zdrowiu

Monika Adamowicz

Wpływ leków stosowanych w terapii chorób cholestatycznych
wątroby na poziom ekspresji wybranych miRNA.

Effect of drugs used in the treatment of cholestatic liver diseases
on the expression level of selected miRNAs.

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki o zdrowiu

Promotor: *dr hab. n. zdr. Agnieszka Kempieńska-Podhorodecka*
Pracę wykonano w *Zakładzie Biologii Medycznej*

Szczecin, 2022

Poniższa dysertacja oparta jest o cykl trzech artykułów o łącznej liczbie punktów IF=16,5

1. Adamowicz M, Kempinska-Podhorodecka A, Abramczyk J, Banales JM, Milkiewicz P, Milkiewicz M. Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. *Cells*. 2022, Impact Factor: 7.666 (Załącznik 10.1).
2. Adamowicz M, Milkiewicz P, Kempinska-Podhorodecka A. 5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. *J Physiol Pharmacol*. 2021, Impact Factor: 2.589 (Załącznik 10.2).
3. Adamowicz M, Stukan I, Milkiewicz P, Bialek A, Milkiewicz M, Kempinska-Podhorodecka A. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *Int J Mol Sci*. 2022, Impact Factor: 6.208 (Załącznik 10.3).

oraz monografię uzupełnioną o wyniki badań jeszcze nieopublikowanych przez autora (Załącznik 10.4)

Praca realizowana w ramach projektów badawczych Regionalnej Inicjatywy Doskonałości 002/RID/2018/19 oraz Narodowego Centrum Nauki 2020/39/O/NZ4/01732.



Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, **Pani dr hab. Agnieszce Kempińskiej-Podhorodeckiej**, bez której niniejsza praca doktorska nie mogłaby powstać. Promotor to osoba, która podejmuje się roli nadzorowania procesu tworzenia pracy dyplomowej. Jest to denificja niezwykle okrojona, nie uwzględnia bowiem niezliczonych godzin konsultacji, dyskusji oraz nieodzwonnej pomocy w planowaniu doświadczeń. Dziękuję więc za ogrom cierpliwości, wyrozumiałości i pokładanej wiary w moje umiejętności szczególnie w okresie (nieuniknionych) niepowodzeń. Dziękuję za motywację i wsparcie oraz wiedzę przekazaną mi przez te lata.

Szczególne słowa podziękowania kieruję również do **Pani prof. dr hab. Małgorzaty Milkiewicz**. Dziękuję za merytoryczne wsparcie, na które zawsze mogłam liczyć.

Pragnę podziękować też wszystkim **pracownikom Zakładu Biologii Medycznej**, z którymi miałam okazję współpracować, za życzliwość i okazaną pomoc.

Dziękuję wszystkim tym, których wsparcie przyczyniło się do powstania tego sukcesu.

SPIS TREŚCI

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY.....	6
STRESZCZENIE	9
ABSTRACT	10
1. WSTĘP	11
1.1. Autoimmunologiczne cholestazy choroby wątroby.....	11
1.2. Wybrane leki stosowane w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych oraz pierwotnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych	15
1.2.1. Kwas ursodeoksycholowy	15
1.2.2. Kwas 5-aminosalicylowy	20
1.3. mikroRNA	23
1.3.1. Biogeneza mikroRNA	23
1.3.2. Rola mikroRNA w regulacji funkcji immunologicznych	26
1.3.3. Znaczenie mikroRNA w karcynogenezie.....	27
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	32
3. MATERIAŁ I METODY	33
3.1. Linie komórkowe	33
3.1.1. Linia ludzkich cholangiocyty NHC.....	33
3.1.2. Linia ludzkich cholangiocyty H69	33
3.1.3. Linia ludzkich hepatocytów HepG2.....	34
3.1.4. Linia ludzkich enterocytopodobnych komórek Caco-2	34
3.2. Hodowla komórkowa.....	34
3.3. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego	36
3.3.1. Przebieg oznaczenia testu MTT	36
3.3.2. Inkubacja komórek z kwasem ursodeoksycholowym i kwasem 5-aminosalicylowym.....	37
3.4. Analizy mikromacierzy	37

3.5. Przejściowa transfekcja miRNA.....	38
3.6. Izolacja RNA	39
3.7. Reakcja odwrotnej transkrypcji	40
3.7.1. Odwrotna transkrypcja mRNA	40
3.7.2. Odwrotna transkrypcja miRNA.....	41
3.8. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR).....	42
3.9. Analiza statystyczna	44
4. WYNIKI	45
4.1. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w komórkach normalnych ludzkich cholangiocytołów NHC (Na podstawie publikacji <i>Adamowicz i wsp. Suppression of Hepatic PPARα in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022</i> oraz badań dotychczas niepublikowanych).....	45
4.2. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w nienowotworowych, nieśmiertelnych komórkach ludzkich cholangiocytołów H69	47
4.3. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w komórkach raka wątroby HepG2 (Na podstawie publikacji <i>Adamowicz i wsp. Suppression of Hepatic PPARα in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022</i> oraz badań dotychczas niepublikowanych) ...	49
4.4. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w komórkach nabłonka jelitowego Caco-2 (Na podstawie publikacji <i>Adamowicz i wsp. 5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. J Physiol Pharmacol. 2021</i> oraz badań dotychczas niepublikowanych).....	51
4.5. Wpływ indukowanego stanu zapalnego na ekspresję wybranych miRNA w liniach komórkach Caco-2, NHC, H69 i HepG2 (Na podstawie publikacji <i>Adamowicz i wsp. Suppression of Hepatic PPARα in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022, Adamowicz i wsp. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with</i>	

<i>Primary Sclerosing Cholangitis. Int J Mol Sci. 2022</i> oraz badań dotychczas niepublikowanych)	53
4.6. Ocena ekspresji TNF α i ZC3H12A w liniach komórkach Caco-2, NHC, H69 i HepG2.....	55
4.7. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję miR-155 i miR-346 w komórkach NHC z zaindukowanym stanem zapalnym.....	57
4.8. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję miR-155 i miR-506 w komórkach H69 z zaindukowanym stanem zapalnym.....	59
4.9. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję miR-155 i miR-506 w komórkach HepG2 z zaindukowanym stanem zapalnym.....	61
4.10. Przejściowa transfekcja wybranych miRNA w komórkach Caco-2 i HepG2 (Na podstawie publikacji Adamowicz i wsp. <i>5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. J Physiol Pharmacol. 2021</i> oraz Adamowicz i wsp. <i>Suppression of Hepatic PPARα in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022</i>).....	63
5. DYSKUSJA.....	64
6. WNIOSKI.....	79
7. PIŚMIENNICTWO	80
8. SPIS RYCIN.....	92
9. SPIS TABEL	93
10. ZAŁACZNIKI	94

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

Skrót	Rozwinięcie skrótu	Opis w języku polskim
PBC	<i>Primary biliary cholangitis</i>	Pierwotne zapalenie dróg żółciowych
PSC	<i>Primary sclerosing cholangitis</i>	Pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych
AIH	<i>Autoimmune hepatitis</i>	Autoimmunologiczne zapalenie wątroby
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	Rak wątrobowokomórkowy
ALP	<i>Alanine phosphatase</i>	Fosfataza zasadowa
AMA	<i>Anti-mitochondrial antibodies</i>	Przeciwciała przeciwmitochondrialne
GGTP	<i>Gamma-glutamyl transpeptidase</i>	Gamma-glutamylotranspeptydaza
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i>	Aminotransferaza alaninowa
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i>	Aminotransferaza asparaginianowa
ANA	<i>Anti-nuclear antibodies</i>	Przeciwciała przeciwjądrowe
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>	Europejskie Towarzystwo Badań Wątroby
pANCA	<i>Perinuclear-anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>	Przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych
SMA	<i>Smooth muscle antibodies</i>	Przeciwciała przeciw mięśniom gładkim
CCA	<i>Cholangiocarcinoma</i>	Rak dróg żółciowych
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>	Nieswoiste zapalenie jelit
UC	<i>Ulcerative colitis</i>	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego
CRC	<i>Colorectal cancer</i>	Rak jelita grubego
BA	<i>Bile acids</i>	Kwasy żółciowe
UDCA	<i>Ursodeoxycholic acid</i>	Kwas ursodeoksycholowy

CDCA	<i>Chenodeoxycholic acid</i>	Kwas chenodeoksycholowy
LCA	<i>Lithocholic acid</i>	Kwas litocholowy
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	Lipopolisacharyd
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor</i>	Czynnik martwicy nowotworów α
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>	Receptor glukokortykoidowy
AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>	Amerykańskie Towarzystwo Badań Chorób Wątroby
5-ASA	<i>5-aminosalicylic acid</i>	Kwas 5-aminosalicylowy
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>	Transformujący czynnika wzrostu β
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Reaktywne formy tlenu
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>	Mieloperoksydaza
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>	Syntaza tlenku azotu
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>	Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów
miRNA, miR	<i>MicroRNA</i>	MikroRNA
pri-miRNA	<i>Primary miRNA</i>	Pierwotny transkrypt RNA
pre-miRNA	<i>Precursor miRNA</i>	Prekursorowy miRNA
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>	Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
Ts-miRNA	<i>Tumor-suppressive miRNA</i>	MikroRNA supresorowe
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>	Przejście epitelialno-mezenchymalne
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>	Czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1,</i>	Metylotransferaza DNA1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych
NHC	<i>Normal human cholangiocyte</i>	Pierwotna linia cholangiocytołów

ZBM PUM		Zakład Biologii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR,</i>	Reakcja PCR w czasie rzeczywistym
TLR	<i>Toll-like receptor</i>	Receptor Toll-podobny
HSC	<i>Hepatic stellate cells</i>	Komórki gwiazdźdźiste wątroby.
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>	Receptor witaminy D
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>	Supresor sygnalizacji cytokin 1
AE2	<i>Anion exchange protein 2</i>	Białko wymiany anionowej 2
HRQoL	<i>Health related quality of life</i>	Kwestionariusz oceny jakości życia
CAC	<i>Colitis-associated colorectal cancer</i>	Nowotwory jelita grubego związane ze stanem zapalnym
STAT-3	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	Przebieżnik sygnału i aktywator transkrypcji 3
MMR	<i>Mismatch repair</i>	System naprawy niesparowanych zasad

STRESZCZENIE

Pierwotne zapalenie dróg żółciowych (*primary biliary cholangitis*, PBC) i pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (*primary sclerosing cholangitis*, PSC) są rzadkimi cholestatycznymi chorobami wątroby. W obu schorzeniach przewlekły stan zapalny odgrywa główną rolę w niszczeniu komórek nabłonka dróg żółciowych w obrębie wątroby, co może następnie skutkować postępującym włóknieniem i niewydolnością całego narządu. PBC występuje częściej u kobiet w średnim wieku, a PSC dotyka głównie mężczyzn pomiędzy 30 a 40 rokiem życia. Pacjenci chorzy na PSC mają często współistniejące wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC) i podwyższone ryzyko nowotworzenia. Pomimo iż etiologia tych schorzeń pozostaje nadal nieznaną, coraz więcej dowodów podkreśla istotną rolę czynników epigenetycznych, w tym udział mikroRNA (krótkie, niekodujące, jednoniciowe cząsteczki RNA, miRNA) w patogenezie i przebiegu tych chorób. Wiele czynników może wpływać na ekspresję miRNA, w tym leki. W związku z tym, że pacjenci chorzy na PBC są rutynowo leczeni kwasem ursodeoksycholowym (UDCA) a pacjenci chorzy na PSC otrzymują dodatkowo kwas 5-aminosalicylowy (5-ASA) celem głównym niniejszych badań była ocena ekspresji: miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506 pod wpływem działania ww. leków. Ponadto, przeprowadzono analizę oddziaływań wybranych miRNA z docelowymi transkryptami mRNA dla potwierdzenia ich regulacyjnych funkcji w kontekście patogenezy autoimmunologicznych cholestatycznych chorób wątroby.

Analizy funkcjonalne *in vitro* były prowadzone w niestymulowanych oraz z zainicjowanym stanem zapalnym komórkach cholangiocytoz (NHC, H69), hepatocytów (HepG2) i komórkach jelitowych (Caco-2). Ekspresja genów była badana za pomocą sond TaqMan i urządzenia do real-time PCR po transfekcji (miRNA mimik/ inhibitor) oraz ekspozycji na UDCA i/lub 5-ASA.

W cholangiocytoz linii H69, UDCA obniżył poziom ekspresji miR-346 i miR-506, podczas gdy w linii komórkowej NHC dodatkowo hamował ekspresję miR-155. W komórkach wątrobowych linii HepG2, związek hamował ekspresję badanych miRNA, ale nie zaobserwowano zmian w profilu tych cząsteczek w linii komórek nabłonka jelitowego Caco-2. UDCA wpływał również na miRNA podczas zaindukowanego eksperymentalnie zapalenia, obniżając ekspresję miR-346 w NHC i miR-125b w HepG2, a także miR-155 w obu liniach cholangiocytoz i hepatocytów. Ponadto, wykazano, że w komórkach HepG2, w których doszło do obniżenia poziomu miR-155 przez UDCA, związek zwiększył poziom ekspresji docelowego transkryptu - PPAR α . Natomiast 5-ASA obniża ekspresję wszystkich badanych miRNA w komórkach Caco-2.

Niniejsze badania wskazały modulujący wpływ leków powszechnie stosowanych w terapii PBC i PSC na ekspresję miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506. Potwierdzono przeciwzapalne i chemoprotekcyjne działanie stosowanego leczenia UDCA i 5-ASA oraz pokazano nowe spektrum działania ww. leków przez regulację ścieżki sygnałowej miR-155.

ABSTRACT

Primary biliary cirrhosis (PBC) and primary sclerosing cholangitis (PSC) are rare cholestatic liver diseases. In both disorders, a chronic inflammation plays a major role in the destruction of biliary epithelial cells within the liver, which may subsequently result in progressive fibrosis and liver failure. PBC occurs more frequently in middle-age women, and PSC mainly affects men between the ages of 30 and 40 years. PSC patients have commonly co-occurrence of inflammatory bowel disease, mostly represented by ulcerative colitis (UC) and an increased risk of tumorigenesis. Although the aetiology of these conditions is still unknown, a growing body of evidence underline the important role of epigenetic factors such as microRNA (short, single-stranded RNA molecules) in the pathogenesis and the course of these diseases. Many factors, including drugs, can affect their expression. Due to the fact that PBC patients are routinely treated with UDCA, while PSC patients receive additionally 5-ASA, the main purpose of this doctoral dissertation was to evaluate the expression of miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 and miR-506 after exposure to UDCA and/or 5-ASA. In addition, the interaction of the studied miRNAs with putative mRNA targets were assessed to confirm their regulatory functions in the context of the pathogenesis of autoimmune cholestatic liver diseases.

In vitro functional analyses were carried out in unstimulated and inflammation- induced cholangiocyte (NHC, H69), hepatocyte (HepG2) and intestinal (Caco-2) cells. Genes expression were measured using TaqMan probes and a device for real-time PCR after transfection (miRNA mimic/inhibitor) and exposure to UDCA and/or 5-ASA.

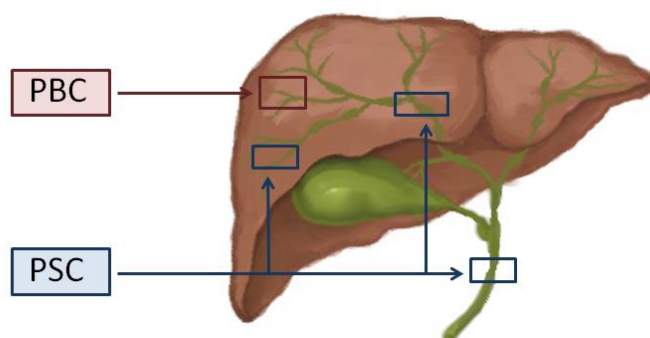
In cholangiocytes H69 cells line, UDCA decreased the expression levels of miR-346 and miR-506, while in the NHC cell line it additionally inhibited the expression of miR-155. In hepatic HepG2 cell line, UDCA inhibited the expression of the studied miRNAs, but no changes were observed in the profile of these molecules in the intestinal epithelial cell line Caco-2. UDCA also modulated miRNAs during experimentally induced inflammation, reducing the expression of miR-346 in NHC and miR-125b in HepG2, as well as miR-155 in both cholangiocyte and hepatocyte lines. In addition, it was shown that in HepG2 with downregulated miR-155 by UDCA, the increased expression level of its target transcript-PPAR α was observed. 5-ASA downregulated the expression of all miRNAs tested in Caco-2 cells.

The results obtained in the study indicated the modulating effect of drugs commonly used in the treatment of PBC and PSC on the expression of miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 and miR-506. The anti-inflammatory and chemopreventive effects of UDCA and 5-ASA therapy in cholestatic liver diseases were confirmed and demonstrated a new spectrum of action of these drugs via regulation of the miR-155 signaling pathway.

1. WSTĘP

1.1. Autoimmunologiczne cholestazyjne choroby wątroby

Wśród autoimmunologicznych chorób wątroby, w patogenezie których dochodzi do niszczenia dróg żółciowych (Rycina 1), wymienia się pierwotne zapalenie dróg żółciowych (*primary biliary cholangitis*; PBC), zwane dawniej pierwotną marskością żółciową wątroby, oraz pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (*primary sclerosing cholangitis*; PSC). Obie choroby mają charakter przewlekły [1], w których postępujące uszkodzenie epitelium przewodów drzewa żółciowego, skutkuje zastojem i upośledzeniem wydzielania żółci [2]. Stan ten określa się mianem cholestazy. Akumulacja żółci o właściwościach detergentowych wraz z toczącym się zapaleniem prowadzą w konsekwencji do uszkodzenia hepatocytów. Równoległe zachodzące procesy naprawcze przyczyniają się do zaawansowanego włóknienia tkanek, a w schyłkowym stadium mogą prowadzić do marskości wątroby i niewydolności całego narządu [1].



Rycina 1. Lokalizacja zmian zapalnych dróg żółciowych w przebiegu PBC i PSC [3]

Zarówno PBC jak i PSC zaliczane są do rzadkich schorzeń wątroby. Roczna częstość występowania PBC w krajach zachodnich wynosi 1,9-40,2/100 tys. osób rocznie, a zachorowalność waha się od 0,3 do 5,3 przypadków na 100 tys. mieszkańców [4]. W ostatnich latach zwraca się uwagę na znaczne różnice regionalne oraz obserwowaną tendencję wzrostową zachorowań na tę chorobę. Badania epidemiologiczne wskazują, że częstość występowania PBC w Europie w latach 1971-1980 wynosiła 3,2/100 tys. osób, a w latach 2011-2020 już 17,3/100 tys. przypadków. Według najnowszych doniesień, współczynnik chorobowości

PSC w populacji ogólnej wynosi 11,2/100 tys. osób, przy wskaźniku zachorowalności 0,7/100 tys. osób [5].

Etiologia autoimmunologicznych cholestatycznych chorób wątroby pozostaje nadal nieznana. Dotychczas powstało kilka teorii dotyczących etiopatogenezy niszczenia dróg żółciowych, które są najprawdopodobniej wynikiem współdziałania wielu czynników, w tym genetycznych, środowiskowych, autoimmunologicznych, czy infekcyjnych [6,7]. Pomimo cech wspólnych, PBC i PSC reprezentują różne typy zaburzeń cholestatycznych. Zdecydowaną większość chorych na PBC stanowią kobiety, głównie w wieku 40-60 lat. Zaledwie 7-11% pacjentów, to mężczyźni, którzy chorują ciężiej i cechują się gorszym rokowaniem [8]. Początkowe stadium choroby przebiega bezobjawowo lub towarzyszy mu przewlekłe zmęczenie z charakterystycznym, stałym nasileniem bez względu na podejmowaną aktywność fizyczną czy odpoczynek. Objaw ten występuje u 30-80% chorych na PBC. Drugim, równie częstym objawem jest świąd skóry. Oba symptomy znacząco pogarszają jakość życia pacjentów i negatywnie wpływają na ich aktywność życiową [9,10]. Rzadziej obserwuje się suchość błon śluzowych, czy żółtaczkę wynikającą z zaawansowania procesu chorobowego. Z PBC często współwystępują inne schorzenia o podłożu autoimmunologicznym, takie jak: zespół Sjögrena, autoimmunologiczne zapalenie wątroby (*autoimmune hepatitis*; AIH), reumatoidalne zapalenie stawów i autoimmunologiczne zapalenie tarczycy [11]. Pacjenci są również narażeni na zwiększone ryzyko rozwoju raka wątrobowokomórkowego (*hepatocellular carcinoma*, HCC). Jak wskazują wyniki ostatnich badań, u mężczyzn z PBC istnieje większe niż u kobiet ryzyko rozwoju tego nowotworu. Wyniki metaanaliz przeglądu aktualnego piśmiennictwa, wykazały, że łączna częstość występowania HCC u chorych na PBC wyniosła 9,82 na 1000 osobo-lat u mężczyzn i 3,82 na 1000 osobo-lat u kobiet [12].

Charakterystyczną cechą PBC jest podwyższona aktywność enzymów cholestatycznych, głównie fosfatazy zasadowej (*alanine phosphatase*; ALP), z obecnością we krwi przeciwciał przeciwmitochondrialnych (*anti-mitochondrial antibodies*; AMA) w mianie >1:40 [13]. Przeciwciała te skierowane są przeciwko komponentowi E2 kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej i występują u około 95% wszystkich chorych [6]. Obecność tych czynników upoważnia do rozpoznania PBC, natomiast w kwestii spornej konieczne jest wykonanie dodatkowo biopsji wątroby [13]. W PBC, w przeciwieństwie do PSC, nie dochodzi do poszerzenia przewodów żółciowych. W obrazie histopatologicznym obserwuje się stan zapalny

z przeważającym naciekiem limfocytarnym i akumulacją mniejszego stopnia komórek plazmatycznych, makrofagów, czy komórek polimorfonuklearnych. Formujące się ziarniniaki, mogą ogniskowo prowadzić do zamknięcia światła międzyzrazikowych i przegrodowych przewodów żółciowych [14]. Dodatkowymi wskaźnikami przydatnymi w rozpoznaniu PBC są podwyższone poziomy gamma-glutamylotranspeptydazy (*gamma-glutamyl transpeptidase*, GGTP) oraz wysokie stężenie immunoglobuliny IgM w surowicy. Aktywność aminotransferaz: alaninowej (*alanine aminotransferase*; ALT) i asparaginianowej (*aspartate aminotransferase*; AST) jest zazwyczaj nieznacznie zwiększona. Ponadto, u około 25-30% chorych wykrywa się we krwi niewysokie miana nieswoistych przeciwciał przeciwjądrowych (*anti-nuclear antibodies*; ANA), spośród których największą swoistość dla pierwotnego zapalenia dróg żółciowych (>95%) mają przeciwciała anty-Sp100 i anty-gp210 [13,15]. Są one szczególnie korzystne w diagnostyce pacjentów tzw. AMA ujemnych, u których w przeciwieństwie do pacjentów AMA dodatnich, nie uzyskano pozytywnego wyniku testu na obecność przeciwciał przeciwmitochondrialnych [13].

W odróżnieniu od pozostałych autoimmunologicznych cholestazycznych chorób wątroby, w PSC zdecydowaną większość chorych stanowią mężczyźni (65-70%), głównie w średnim wieku (30-40 r.ż) [16]. W przypadku, gdy stan zapalny ogranicza się jedynie do wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych, objawy mogą wystąpić późno lub w niewielkim nasileniu [17]. Pomimo utajonego przebiegu schorzenia (15-44% pacjentów) [17], większość chorych doświadcza progresji choroby [18]. Pacjenci z wieloletnim PSC manifestują podobne do PBC objawy takie jak osłabienie (>65%) i uciążliwy świąd skóry (25-59%) [17,19]. Objawy kliniczne, są więc często niecharakterystyczne i wykazują zdolność tymczasowej remisji, co utrudnia diagnostykę [13].

Według wytycznych Europejskiego Towarzystwa Badań Wątroby (*European Association for the Study of the Liver*; EASL) rozpoznanie PSC opiera się na spełnieniu trzech kryteriów laboratoryjnych: (a) zwiększonej aktywności enzymów ALP i GGTP, (b) stwierdzeniu zniekształceń konturu dróg żółciowych, na podstawie badań obrazowych oraz (c) wykluczeniu innych przyczyn, w których dochodzi do deformacji drzewa żółciowego. Dodatkowym wskaźnikiem jest obecność autoprzeciwciał we krwi [13]. Szacuje się, że u 26-94% chorych występują przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych typu około jądrowego (*perinuclear-anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*; pANCA), a w mniejszym procencie, przeciwciała

przeciwwądrowe ANA i przeciw mięśniom gładkim (*smooth muscle antibodies*; SMA) [20]. Biopsja wątroby jest metodą uzupełniającą badania diagnostyczne w kierunku potwierdzenia wewnątrzwątrobowego PSC. W obrazie histopatologicznym widoczny jest naciek zapalny, zwężone i zniekształcone przewody żółciowe, wokół których obserwuje się znaczne zwłóknienie. Badanie można również wykonać w celu oceny współistniejących chorób autoimmunologicznych (zespoły nakładania z AIH i PBC) lub przy podejrzeniu rozwoju marskości [17].

W przeciwieństwie do PBC, u pacjentów chorych na PSC główną przyczyną śmiertelności jest rak wywodzący się z komórek nabłonka przewodów żółciowych (*cholangiocarcinoma*; CCA). Rozwija się on u 6-20% pacjentów [21]. Mediana przeżycia od momentu rozpoznania CCA wynosi niecałe 2 lata, podczas gdy przeżywalność PSC bez CCA szacuje się na około 12 lat [22]. Potwierdzono również podwyższone ryzyko rozwoju innych nowotworów u chorych na PSC, w tym raka wątrobowokomórkowego, trzustki, czy pęcherzyka żółciowego [23]. Co więcej, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych jest silnie powiązane z chorobami zapalnymi jelit (*inflammatory bowel disease*; IBD), głównie z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (*ulcerative colitis*; UC). Wiele danych potwierdza, że współwystępujące UC w przebiegu PSC (fenotyp PSC-UC) różni się od niepowikłanego zapalenia jelit [24]. Chorzy na PSC są zazwyczaj młodszy w momencie rozpoznania zmian w okrężnicy, w stosunku do pacjentów z samym UC. Ponadto, cechują się oni mniejszą aktywnością choroby podczas ostrych zaostrzeń, szczególnie w ciągu pierwszych 10 lat od rozpoznania. Wymagają także łagodniejszego leczenia [24]. Należy podkreślić, że zmiany chorobowe w niepowikłanym UC zaczynają się w dystalnej części okrężnicy i rozciągają się proksymalnie, podczas gdy zapalenie jelit u pacjentów chorych na PSC jest łagodniejsze, ale przybiera zwykle większy zasięg. Badania endoskopowe i histologiczne potwierdzają znacznie bardziej nasilone zmiany we wstępującej części okrężnicy [25]. Co więcej u chorych na PSC-UC, stan zapalny może objąć końcowy odcinek jelita cienkiego (*backwash ileitis*), przy braku zmian zapalnych w odbytnicy (*rectal sparing*) [26]. Subkliniczny charakter zmian może częściowo wyjaśniać przewagę dysplazji nowotworowej u pacjentów chorych na PSC-UC [25]. Współczynnik ryzyka rozwoju raka jelita grubego (*colorectal cancer*; CRC) u tych chorych jest 4 razy większy niż u pacjentów z samym IBD [27]. Ponadto, u większości pacjentów z omawianym fenotypem PSC-UC, u których rozwinął się rak, guzy nowotworowe zlokalizowane są po prawej stronie okrężnicy, a u pacjentów chorych na UC po lewej stronie okrężnicy. [28].

Współwystępowanie chorób PSC i UC wspiera hipotezę o istnieniu ścisłego związku anatomiczno-fizjologicznego i występującej interakcji pomiędzy jelitem, a wątrobą w progresji stanu zapalnego. Dotychczas zaproponowano różne teorie działania osi jelitowo-wątrobowej, w tym dysbiozę. Liczne badania wykazały bowiem wyraźnie odmienny mikrobiom jelitowy u osób chorych na PSC z lub bez współistniejącej choroby zapalnej jelit, w odniesieniu do grupy osób zdrowych [29,30]. Hipotezę „bakteryjną”, jako przyczynę choroby PSC wyjaśnia się poprzez kilka mechanizmów: (I) przemieszczanie się bakterii oraz ich metabolitów do układu wrotnego wątroby przez nieuszczelną błonę śluzową jelit [31]; (II) modulację przez bakterie składu krążącej puli kwasów żółciowych (*bile acid*, BA), które jako cząsteczki sygnałowe mają istotny wpływ na jelita i wątrobę [32]; (III) aktywację przez mikrobiom limfocytów T, które reagują krzyżowo z antygenami obecnymi w wątrobie [33].

1.2. Wybrane leki stosowane w pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych oraz pierwotnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych

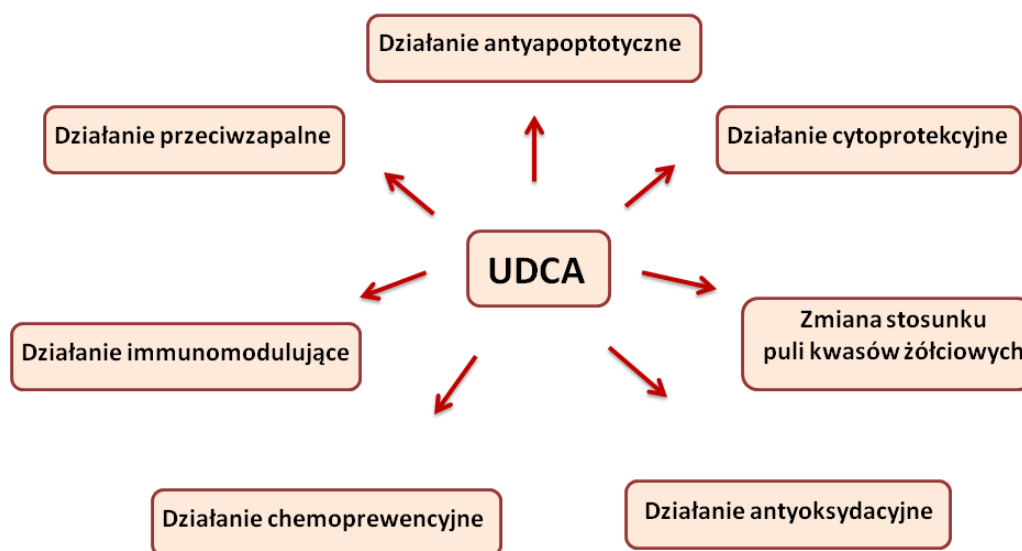
1.2.1. Kwas ursodeoksycholowy

Nazwa kwasu ursodeoksycholowego (*ursodeoxycholic acid*; UDCA) została zaczerpnięta od łacińskiego słowa *ursus* oznaczającego niedźwiedzia. Kwas ten po raz pierwszy odkryto w preparatach leczniczych zawierających sproszkowaną żółć chińskich niedźwiedzi czarnych, która przez setki lat była wykorzystywana w medycynie tradycyjnej, jako lek na liczne choroby wątroby [34]. W hepatocytach niedźwiedzi, UDCA jest syntetyzowany jako pierwszorzędowy kwas żółciowy i stanowi dominujący składnik żółci. U człowieka kwas ursodeoksycholowy jest trzeciorzędowym kwasem żółciowym. Powstaje najprawdopodobniej w okrężnicy podczas bakteryjnej epimeryzacji pierwszorzędowego kwasu chenodeoksycholowego (*chenodeoxycholic acid*; CDCA) i stanowi jedynie od 1% do 3% całkowitej puli BA [35]. Pod względem biochemicznym UDCA jest epimerem CDCA, co oznacza, że różni się od niego jedynie przestrzennym położeniem grupy funkcyjnej -OH w pozycji 7 β [34]. Odmienność w budowie powoduje, że UDCA jest kwasem najbardziej hydrofilnym i najmniej toksycznym wśród wszystkich kwasów żółciowych [36].

Lek UDCA, podany doustnie, jest redukowany w zasadowym środowisku (7,8-8,0 pH) jelita cienkiego [37]. Następnie, jest biernie wchłaniany i wychwytywany

przez hepatocyty dzięki białkom transportowym (NTCP i OATPs.) [38]. Od 50% do 70% [34,39] UDCA jest metabolizowane w trakcie pierwszego przejścia przez wątrobę. W hepatocytach ulega sprzężeniu z glicyną (rzadziej tauryną), i w tej formie jest aktywnie wydzielany do żółci. Dalej, uwalniany jest do jelita cienkiego, gdzie ponawia drogę krążenia jelitowo-wątrobowego wraz z innymi kwasami żółciowymi. Niewchłonięty UDCA ulega konwersji przez różne gatunki komensalnej mikroflory jelitowej do kwasu lithocholowego (*lithocholic acid*, LCA) lub zostaje usunięty z organizmu w formie niezmienionej [34]. Dzięki ciągłej podaży leku, UDCA staje się dominującym kwasem żółciowym [37].

Kwas ursodeoksycholowy wywiera korzystny wpływ w organizmie poprzez zróżnicowane i najprawdopodobniej uzupełniające się mechanizmy, jak pokazano to na rycinie 2.



Rycina 2. Mechanizm działania kwasu ursodeoksycholowego [34]

Kluczową rolą kwasu ursodeoksycholowego jest ochrona cholangiocytołów i sąsiadujących hepatocytów przed niszczącym działaniem hydrofobowych BA. Choć UDCA nie wpływa znacząco na syntezę *de novo* kwasów żółciowych w wątrobie, to w zależności od przyjmowanej dobowej dawki stanowi od 19% do 64% całkowitej żółci [39]. Terapia kwasem ursodeoksycholowym przyczynia się więc do zmiany stosunku BA i skutkuje zwiększeniem hydrofilności krążącej puli kwasów żółciowych poprzez wzbogacenie żółci egzogennym i hydrofilowym UDCA [37]. Po leczeniu, u pacjentów PBC, zmiany proporcji kwasów żółciowych obserwuje się nie tylko w żółci, ale również w surowicy, osoczu i kale. [35,40–42].

Działanie immunomodulujące UDCA przejawia się na wielu płaszczyznach. Podczas cholestazy, na hepatocytach ekspresjonowane są cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej HLA I, a na nabłonku dróg żółciowych cząsteczki HLA II [43,44]. Nadmierna ekspresja tych białek stymuluje limfocyty T cytotoksyczne do rozpoczęcia reakcji zapalnej przeciw komórkom wątroby i przewodów żółciowych. UDCA może wyciszać ekspresję zarówno HLA I jak i HLA II [45], chroniąc komórki przed degradacją na tle immunologicznym. Ponadto, UDCA osłabia chemotaksję i zdolności adhezyjne limfocytów T naciekających wątrobę poprzez hamowanie wytwarzania IFN- γ i chemokiny CX3CL1. Procesy te mogą łagodzić zapalenie dróg żółciowych w PBC [46]. UDCA zmniejsza również wytwarzanie autoprzeciwciał IgM-AMA, najprawdopodobniej przez zmniejszenie aktywacji limfocytów B i hamowanie wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; NF-kB) [47]. UDCA wywiera wpływ immunosupresyjny oddziałując na komórki immunokompetentne i produkcję cytokin. W makrofagach RAW 264 stymulowanych przez lipopolisacharyd (*lipopolysaccharide*; LPS), UDCA hamuje cytokiny prozapalne, w tym: czynnik martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor α* ; TNF- α), IL-1 α , IL-1 β , IL-6, a zwiększa poziom cytokiny przeciwzapalnej IL-10 [48]. Ponadto, opisano, że wydzielanie IL-2, IL-4 oraz IFN- γ z aktywowanych limfocytów T również zostaje zahamowane [49].

Inne korzystne działanie leku UDCA na cholangiocyty jest związane z regulacją wydzielania HCO₃⁻. W warunkach fizjologicznych, powierzchnia cholangiocytów zabezpieczona jest warstwą wodorowęglanów HCO₃⁻ produkowaną i uwalnianą przez komórki. Pozwala to na utrzymanie odpowiedniego pH, które deprotonuje apolarną hydrofobową żółć, utrudniając jednocześnie wnikanie detergentopodobnych BA do wnętrza komórek [50]. Zaburzenie tego procesu powiązane z uszkodzeniem przewodów żółciowych w patogenezie PBC [51]. UDCA aktywuje AE2, główny transporter zaangażowany w przewodową sekrecję HCO₃⁻ przywracając ochronę powierzchniową cholangiocytów [52,53]. Cytoprotekcyjne mechanizmy UDCA odnoszą się również do następujących mechanizmów: stabilizacji błony komórkowej i mitochondriów, indukcji szlaków antyapoptotycznych oraz hamowania apoptozy. UDCA nie stabilizuje błon komórkowych bezpośrednio, ale przyczynia się do zmiany stosunku toksycznych kwasów żółciowych i wykazuje zdolność do ich opłaszczania, tworząc tzw. micele [36]. Zmniejszenie dostępności toksycznych BA zapobiega

hydrofobowemu rozerwaniu błony [53]. Wykazano, że dwuletnia terapia UDCA zmniejszyła liczbę komórek apoptotycznych w biopsjach wątroby pacjentów chorych na PBC, w porównaniu do grupy placebo [54]. Ograniczenie ilości ciałek apoptotycznych, które mogą być źródłem epitopów zaangażowanych w produkcję autoantygenów w tej chorobie, może świadczyć za korzystnym działaniem leku [53,55]. UDCA, na drodze wewnątrzpochodnej apoptozy, hamuje translokację proapoptotycznego białka Bax, a także zmniejsza depolaryzację oraz tworzenie porów w błonie mitochondriom. Hamuje to uwalnianie cytochromu C i ostatecznie szlaku prowadzącego do apoptozy [56]. Ponadto, drogi żółciowe w PBC wykazują nadekspresję proapoptotycznego receptora śmierci Fas (szlak zewnętrzny apoptozy), którego ekspresję hamuje UDCA w badaniach *in vivo* [57]. Przeciwdziałanie zwiększonej ekspresji proapoptotycznych białek mitochondrialnych przez UDCA powiązано również z obniżeniem poziomu regulatora transkrypcji p53 oraz zapobieganiem aktywacji kaspazy 12 [57].

UDCA niespecyficznie aktywuje receptor glukokortykoidowy (*glucocorticoid receptor*; GR). Wykazano, że GR może zakłócać szlaki sygnałowe, w których pośredniczy NF- κ B. Jest to kluczowy czynnik transkrypcyjny, który reguluje ekspresję genów zaangażowanych w zapalenie, odpowiedź immunologiczną i procesy przeżycia komórek. UDCA aktywując GR, hamuje transkrypcję zależną od NF- κ B poprzez modulację oddziaływania GR z podjednostką p65, i tym samym uczestniczy w antyapoptotycznych szlakach wewnątrz hepatocytu [58]. Innym ochronnym działaniem UDCA jest synteza glutationu przez aktywację szlaku PI3K/AKT/Nrf2 w hepatocytach, co może sugerować jego antyoksydacyjne właściwości [59].

Zarówno Amerykańskie Towarzystwo Badań Chorób Wątroby (*American Association for the Study of Liver Diseases*; AASLD) [60], jak i Europejskie Towarzystwo Badań Wątroby [61], zgodnie rekomendują kwas ursodeoksycholowy jako lek pierwszego wyboru w leczeniu pacjentów chorych na PBC. Zalecana optymalna dawka leku wynosi od 13 do 15 mg/kg/dobę. Lek jest uważany za bezpieczny, gdyż odnotowano niewiele działań niepożądanych [13]. Korzystny efekt kwasu ursodeoksycholowego w terapii pacjentów chorych na PBC wiąże się z polepszeniem wyników enzymów wątrobowych (AST, ALT, ALP, GGTP) oraz bilirubiny [62]. Zaobserwowano również złagodzenie zmian zapalnych przestrzeni wrotnych oraz zmniejszenie histologicznego stopnia zaawansowania choroby [63]. Ponadto, UDCA opóźnia progresję rozwoju marskości wątroby i może wydłużyć czas przeżycia pacjentów bez konieczności przeszczepu tego narządu [64]. Korzystny, długoterminowy efekt

stosowania UDCA występuje głównie u pacjentów we wczesnym stadium choroby i przy pełnej odpowiedzi biochemicznej, ocenionej po roku leczenia [13].

Kwestią kontrowersyjną i nadal szeroko dyskutowaną jest zasadność stosowania UDCA w terapii pacjentów chorych na PSC. Metaanalizy dotyczące użyteczności leku wykazały, że dawki UDCA od 13 do 15 mg/kg/dobę [65] powodują poprawę niektórych wskaźników laboratoryjnych m.in. ALP, AST, bilirubiny, czy albuminy w surowicy. UDCA wykazuje również tendencję do poprawy histologicznych zmian w wątrobie [66], jednak leczenie nie wiąże się z wydłużeniem czasu przeżycia pacjentów i koniecznością przeszczepu [66,67]. W randomizowanym badaniu z udziałem pacjentów chorych na PSC, którzy otrzymywali umiarkowaną dawkę UDCA (17-23 mg/kg/dobę) przez 5 lat, nie zaobserwowano znaczącej różnicy w łagodzeniu objawów, polepszeniu parametrów biochemii wątroby (ALP, ALT), czy zmniejszeniu ryzyka CCA i zgonu, w porównaniu z grupą placebo [68]. Natomiast, badanie nad wysoką dawką UDCA (28–30 mg/kg/dobę) zostało przedwcześnie zakończone, gdyż stwierdzono, że grupa leczonych pacjentów wykazała wyższy odsetek poważnych zdarzeń niepożądanych, a ryzyko rozwoju marskości wątroby i konieczności przeszczepu dla pierwszorzędownego punktu końcowego badania było wyższe w grupie przyjmującej lek [69].

W świetle tych badań Amerykańskie Towarzystwo Hepatologiczne AASLD, nie rekomenduje stosowania UDCA u chorych na PSC. Podobne stanowisko zajmuje europejskie EASL, z zastrzeżeniem, że warto rozważyć tę formę terapii u chorych na PSC z wysokim ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego, ze względu na chemoprewencyjne właściwości UDCA [70]. Obecnie nie ma skutecznego leku hamującego progresję choroby PSC. W późnych stadiach choroby, jedyną opcją terapeutyczną pozostaje ortotopowy przeszczep wątroby, po którym u nawet 20% chorych może dojść do nawrotu choroby PSC [71]. Odsetek ten rośnie w miarę upływu czasu od przeprowadzonej operacji [72]. We wcześniejszych stadiach, leczenie farmakologiczne ma wyłącznie charakter objawowy. Udowodniono, że przerwanie długotrwałego leczenia mniejszymi dawkami UDCA (10-15 mg/kg/day) powoduje u pacjentów znaczne pogorszenie parametrów cholestatycznych, poziomu aminotransferaz, a także wzrost wyniku Mayo Risk Score, stosowanego do oszacowania progresji choroby. Pomimo, że odstawienie UDCA nie wpłynęło znacząco na wskaźniki jakości życia badanych pacjentów, to ponad 40% z nich zgłosiło nawrót nasilonego świądu [42]. W związku z nietoksycznym działaniem leku, brakiem alternatywnych, skutecznych sposobów farmakologicznego

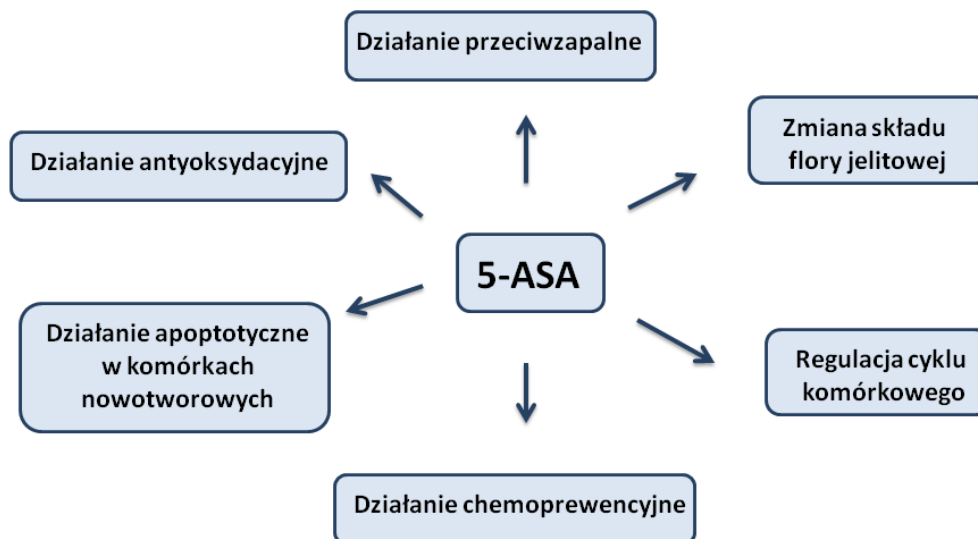
leczenia choroby oraz korzyściami w postaci poprawy wskaźników laboratoryjnych, UDCA jest stosowanym lekiem w praktyce klinicznej [13,71,73].

1.2.2. Kwas 5-aminosalicylowy

W leczeniu łagodnych i umiarkowanych rzutów wrzodziejącego zapalenia jelita grubego oraz w podtrzymaniu remisji choroby u pacjentów chorych na PSC wykorzystuje się m.in. preparaty kwasu 5-aminosalicylowego (*5-aminosalicylic acid*; 5-ASA). O efektywności terapii decyduje stężenie substancji w danym odcinku jelita. W zależności od umiejscowienia i aktywności zmian zapalnych, lek podaje się w różnej dawce i postaci [74]. 5-ASA działa lokalnie, ponieważ jego skuteczność jest silniej skorelowana ze stężeniem leku w tkance jelitowej niż we krwi [75]. U pacjentów z UC ze stanem zapalnym w końcowym odcinku jelita grubego, preferowanym leczeniem pierwszego wyboru jest miejscowo podawana pochodna kwasu 5-aminosalicylowego - mesalazyna [27]. Monoterapia pozwala uzyskać remisję u 67% pacjentów w porównaniu z 7-11% chorych leczonych placebo. Natomiast w lewostronnym lub rozległym fenotypie zapalenia, zaleca się skojarzone leczenie z mesalazyną przyjmowaną doustnie [27]. W przypadku tych preparatów, około 30% substancji czynnej jest wchłanianych w jelicie cienkim. W komórkach nabłonkowych błony śluzowej jelita oraz w wątrobie, 5-ASA podlega intensywnym przemianom metabolicznym poprzez N-acetylację, i tym samym traci aktywność przeciwzapalną [76]. Pozostałe 70% dawki trafia do dalszych odcinków jelita, łagodząc lokalnie stan zapalny. Nierównomierne uwalnianie leku w świetle jelita, znacząco ogranicza jego skuteczność. Stężenie 5-ASA jest istotnie większe w prawej części okrężnicy oraz mniejsze w dolnym odcinku przewodu pokarmowego [77]. W konsekwencji, końcowe stężenie substancji aktywnej może być niedostateczne, aby wywołać porządany efekt terapeutyczny. Połączenie różnych form leku zwiększa jego dostępność i efektywność [27]. Obecnie trwają prace nad stworzeniem nośników, które w sposób bardziej ukierunkowany pozwolą na dostarczenie kwasu 5-aminosalicylowego do jelit [78].

Skuteczność przeciwzapalna preparatów 5-ASA w leczeniu UC jest dobrze udokumentowana. Stężenie kwasu 5-aminosalicylowego w śluzówce jelita jest odwrotnie skorelowane z nasileniem zapalenia okrężnicy, co potwierdzono w badaniach endoskopowych oraz histologicznych [79]. Mesalazyna jest lekiem ogólnie dobrze tolerowanym i rzadko przyczynia się do działań niepożądanych [76]. Preparaty w monoterapii stosuje się w łagodnej postaci choroby, najczęściej w dawce 3-4 g/dobę.

W podtrzymaniu remisji jest to 2 g/dobę [27]. 5-ASA jest kwasem organicznym, który pod względem strukturalnym zaliczany jest do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych [76]. Mechanizm działania nie został w pełni wyjaśniony, ale najprawdopodobniej wynika z wielu równoległe zachodzących procesów i bezpośredniego wpływu związku na komórki jelita grubego (Rycina 3).



Rycina 3. Mechanizm działania kwasu 5-aminosalicylowego [80]

Mesalazyna ogranicza powstawanie mediatorów stanu zapalnego przez wiele procesów. Właściwości przeciwzapalne wykazuje poprzez zdolność blokowania syntezy prostaglandyn i leukotrienów, odpowiednio przez zahamowanie szlaku cyklooksygenazy i lipooksygenazy [76]. 5-ASA moduluje proces zapalny również przez hamowanie szlaków TNF- α i transformującego czynnika wzrostu β (*transforming growth factor β* ; TGF- β), kluczowych regulatorów stanu zapalnego. Ponadto, ogranicza aktywację czynnika jądrowego NF κ B i pośrednio zmniejsza syntezę oraz uwalnianie cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-12 [76,81].

Z powodu nadmiernego stanu zapalnego, we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy generowaniem reaktywnych form tlenu, a antyoksydacyjnymi mechanizmami obronnymi organizmu [82]. Proces ten skutkuje uszkodzeniem błony śluzowej za pośrednictwem oksydantów uwalnianych z infiltrujących komórek: neutrofilów i makrofagów. 5-ASA zmniejsza stres oksydacyjny poprzez hamowanie produkcji rodników i reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species*; ROS) : H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{CO}_2$, $\cdot\text{OH}$, N_3 i $\cdot\text{CCl}_3\text{O}_2$ [80,83]. W procesie powstawania ROS biorą udział takie enzymy jak: mieloperoksydaza (*myeloperoxidase*; MPO) czy

indukowalna syntaza tlenku azotu (*inducible nitric oxide synthase*; iNOS). U pacjentów chorych na UC, zwiększony napływ neutrofilii i wzrost uwalnianej z ich ziarnistości MPO, zaobserwowano w objętej zapaleniem blaszce właściwej błony śluzowej jelita [84]. Natomiast iNOS zwiększa produkcję tlenku azotu w nabłonku i ogniskach zapalnych UC poprzez stymulację produkcji TNF- α , co sprzyja dalszemu naciekaniu granulocytów i uszkodzeniu okrężnicy. Badania *in vivo* wykazały, że 5-ASA zmniejsza aktywność mieloperoksydazy, poziom NO₂/NO₃ w surowicy oraz ekspresję iNOS [80].

Kwas 5-aminosalicylowy jest również powiązany z aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Uważa się, że oprócz czynników immunologicznych, genetycznych i środowiskowych, dysbioza jelitowa pełni istotną rolę w patogenezie UC. U pacjentów obserwuje się zmniejszoną różnorodność bakterii, z przewagą występowania patogennych szczepów. Mesalazyna może wpływać na skład flory jelitowej [85–87]. Wysokie stężenie 5-ASA w błonie śluzowej jelita związane było ze zmniejszeniem ilości bakterii chorobotwórczych, takich jak *Escherichia-Shigella*, *Dialister*, *Bacteroides*, *Prevotella* i *Klebsiella*, a wzrostem *Enterococcus*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* [86].

Regularne stosowanie preparatów kwasu 5-aminosalicylowego może o połowę zmniejszać ryzyko wystąpienia raka jelita grubego u chorych z UC [27]. Molekularna podstawa chemoprewencyjnego działania 5-ASA obejmuje hamowanie proliferacji komórek nabłonka jelita grubego i nasilanie ich apoptozy. Ochronne właściwości wynikają najprawdopodobniej ze wspomnianych mechanizmów antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych [27]. Regulacja cyklu komórkowego jest kluczowym mechanizmem obronnym, które stabilizuje integralność genomu i zapobiega późniejszej transformacji nowotworowej lub śmierci komórki. 5-ASA moduluje cykl komórkowy na różnych poziomach, m.in. poprzez zahamowanie fazy S i aktywację punktów kontrolnych replikacji [80]. Ponadto, efekt chemoprewencyjny 5-ASA wiąże się z zakłóceniem ścieżki sygnałowej Wnt/ β -kateniny. Szlak ten odgrywa kluczową rolę w onkogenezie i progresji nowotworu, ponieważ prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek. Jego nieprawidłowa aktywacja jest często obserwowana w ludzkim raku jelita grubego [88]. W komórce nowotworowej zaburzenie szlaku transdukcji sygnału zależnego od białka Wnt zachodzi na drodze nadekspresji jego aktywatorów, w tym akumulacji β -kateniny, która w warunkach fizjologicznych utrzymywana jest na niskim poziomie. 5-ASA poprzez fosfatazę białkową 2A, fosforyluje β -kateninę zmniejszając jej ekspresję w jądrze komórkowym [80]. 5-ASA jest również zdolny do indukowania μ -protokadheryny, białka eksprymowanego przez komórki nabłonka jelita grubego,

którego poziom ekspresji ulegał obniżeniu podczas transformacji nowotworowej. μ -protokadheryna aktywowana przez 5-ASA, wiąże β -kateninę do błony komórkowej i hamuje jej aktywność [89]. Właściwości chemoprewencyjne leku wiążą się również z obniżeniem ekspresji protoonkogenu c-Myc [80]. Ponadto, mesalamina aktywuje jądrowe receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (*peroxisome proliferator activated receptor*; PPAR), które są silnie ekspresjonowane w komórkach nabłonkowych jelita i odpowiadają za kontrolę zapalenia oraz proliferację komórek [90]. Wykazano, że w błonie śluzowej jelita grubego u chorych na UC jest mniej PPAR γ , niż u osób zdrowych [91]. Kwas 5-aminosalicylowy, działając jak ligand, jest zdolny do łączenia się z PPAR γ , i pośrednio może wpływać na różnicowanie i indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych [90].

1.3. mikroRNA

1.3.1. Biogeneza mikroRNA

Etiologia cholangiopatii w przebiegu choroby PBC i PSC pozostaje nieznana, jednak liczne dowody podkreślają istotny wpływ czynników epigenetycznych na rozwój i progresję tych chorób. MikroRNA (miRNA, miR) to grupa naturalnie występujących, niekodujących cząsteczek kwasu rybonukleinowego o długości od 18 do około 24 nukleotydów. Szacuje się, że około jedna trzecia genów kodujących białka podlega ich regulacji [92]. Pierwszym zidentyfikowanym miRNA był lin-4 wykryty u nicienia *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) w 1993 przez grupę Ambrosa [93]. Transkrypty lin-4 zawierały sekwencje komplementarne do niepodlegającego translacji fragmentu 3'UTR mRNA, jednak nie kodowały białka. Ze względu na brak homologów w innych organizmach, przez długi czas odkrycie to pozostawało niedocenione. Dopiero po siedmiu latach Reinhart i wsp. [94] donieśli o kolejnym genie kodującym miRNA u *C.elegans* - let-7. Obecność tego miRNA została potwierdzona również u kręgowców, co zapoczątkowało szereg badań dotyczących roli tych cząsteczek w ludzkim organizmie [95]. Dotychczas rozpoznano ok. 38589 miRNA w ponad 200 gatunkach (miRBase 22.1, <http://www.mirbase.org/>). Pierwsze odkryte miRNA posiadają w swojej nazwie przedrostek „lin” lub „let” natomiast w obecnie stosowanej nomenklaturze, stosuje się przedrostek „miR” wraz z nadanym numerem identyfikacyjnym np. miR-21. W przypadku, gdy dwa różne prekursorzy są podstawą do wytworzenia tej samej cząsteczki miRNA dodaje się kolejny numer np. miR-218-1 oraz miR-218-2. Jeżeli

miRNA powstaje z różnych ramion tego samego prekursora (np. miR-7d oraz miR-7d*), w zapisie umieszcza się gwiazdkę, która wskazuje na rzadziej powstającą formę. Nomenklatura może również dokładnie wskazywać na ramię, z którego powstało miRNA np. miR-324-3p lub miR-324-5p. Małą literą alfabetu rozróżnia się cząsteczki miRNA z nieznacznie odmienną sekwencją nukleotydową np. miR-99a i miR-99b [96].

Geny dla miRNA mogą występować pojedynczo lub blisko siebie w postaci klastrów. Zlokalizowane są głównie w obszarze międzygenowym (68%), najczęściej w intronach. Pozostałe geny znajdują się w eksonach lub obszarach nieulegających translacji UTR [97]. Kanoniczny proces biogenezy miRNA składa się z kilku etapów. Transkrypcja genów odpowiedzialnych za powstanie pierwotnego transkryptu RNA (*primary miRNA*; pri-miRNA) zachodzi przy udziale enzymu polimerazy RNA II [98]. Pri-miRNA zbudowany jest z ok. 70 nukleotydów i tworzą go połączone ze sobą struktury szpilek do włosów, zawierające 7-metyloguanozynową czapkę na końcu 5' oraz ogonek Poli(A) na końcu 3' [99]. Pierwotny transkrypt podlega następnie wstępnej obróbce posttranskrypcyjnej w jądrze komórkowym. Rozpoznawany jest przez kompleks tzw. mikroprocesora, w skład którego wchodzi białko jądrowe DGCR8 oraz rybonukleaza III Drosha [98]. Za pomocą domen wiążących RNA, białko DGCR8 uczestniczy w rozpoznawaniu pierwotnych transkryptów. Ponadto orientuje katalityczną domenę enzymu Drosha ułatwiając przecinanie końców pri-miRNA i uwalnianie prekursorowych miRNA (*precursor miRNA*; pre-miRNA) o długości około 65 nukleotydów [100]. Jeżeli geny dla miRNA znajdują się w sekwencjach niekodujących, tzw. mirtronach, to powstawanie pierwotnego miRNA zachodzi na drodze alternatywnego szlaku, z zaangażowaniem spliceosomu (kompleksu wycinającego introny z pre-mRNA), [98]. Pre-miRNA transportowane są aktywnie do cytoplazmy przez białko eksportynę 5 i czynnik RanGTP. Energia uzyskana w wyniku hydrolitycznego rozpadu GTP do GDP, związanego z białkiem RAN, umożliwia uwolnienie pre-miRNA z kompleksu pre-miRNA/Eksportyna5/RanGTP do cytoplazmy [101]. W dalszych procesach dojrzewania miRNA uczestniczy rybonukleaza III Dicer. W wyniku aktywności tego enzymu, dochodzi do powstania dupleksu miRNA- miRNA, którego składową są dojrzałe funkcjonalnie cząsteczki miRNA o długości ok. 20 nukleotydów [99]. Dawniej uważano, że jedna z nici w dupleksie (tzw. nić wiodąca) włączana jest do kompleksu RISC, a druga pasażerska ulega degradacji. Badania wykazały jednak, że obydwie nici mogą pełnić rolę regulatorową [99]. Ostatecznie, jedna z nici zostaje wbudowana w białkowy kompleks RISC, w skład którego oprócz

rybonukleazy Dicer, wchodzi jego kofaktory białkowe TRBP i PACT oraz białko Argonaute - Ago2. Dojrzała nić miRNA, włączona do kompleksu RISC, hybrydyzuje z docelowym mRNA [99]. Oddziaływanie miRNA-mRNA zachodzi częściej w obrębie 3' UTR, niż 5' UTR docelowej sekwencji [102], a w zależności od poziomu dopasowania miRNA do mRNA, obserwowany jest odmienny efekt w komórce. Jeżeli połączenie wykazuje wysoką komplementarność nukleotydów, nić mRNA ulega degradacji przez Ago2. W większości przypadków, miRNA nie wykazuje jednak całkowitego dopasowania do 3'UTR i hamuje endonukleolityczną aktywację Ago2. Proces ten skutkuje represją translacji matrycowego RNA, bez zmian ilości transkryptu [99].

System kontroli ekspresji miRNA może zachodzić pod wpływem różnych czynników (Rycina 4).



Rycina 4. Modyfikatory ekspresji miRNA [103]

Wykazano, że geny dla miRNA są często zlokalizowane w tzw. miejscach łamliwych chromosomów, podatnych na pęknięcia, czy rearanżacje [104]. Ekspresja miRNA jest regulowana już na etapie biosyntezy (głównie przez wpływ rybonukleaz Dicer), a także przez wiele mechanizmów molekularnych na poziomie transkrypcyjnym. Częsteczki miRNA mogą być również regulowane przez metylację DNA i posttranslacyjną modyfikację histonów [103]. Wykazano, że środowiskowe czynniki modulujące takie jak leki, ksenobiotyki, bioaktywne składniki żywności, lub hormony mogą łatwo zmieniać ekspresję miRNA w komórkach i tkankach [105,106]. Geny miRNA mogą być więc regulowane przez wyżej wymienione wpływy epigenetyczne, jednocześnie powstające funkcjonalne cząsteczki miRNA mogą same pełnić rolę epigenetycznych modulatorów, wyciszając ekspresję docelowych genów

[107]. Pojedyncza cząsteczka miRNA jest w stanie rozpoznać wiele docelowych mRNA, a każde mRNA może być regulowane przez różne miRNA. Zależność ta skutkuje istnieniem niezwykle złożonej sieci regulatorowej w komórce. Mnogość sposobów oddziaływań powoduje, że miRNA biorą udział w procesach kluczowych dla rozwoju i funkcjonowania każdego organizmu, w tym: proliferacji, różnicowania się komórek, ich migracji, czy apoptozie. Cząsteczki miRNA, działając głównie jako regulatory posttranskrypcyjne, uczestniczą w wielu procesach regulacji, zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych [99].

1.3.2. Rola mikroRNA w regulacji funkcji immunologicznych

MiRNA odgrywają plejotropową rolę w regulacji funkcji immunologicznych. Poprzez wpływ na czynniki transkrypcyjne i elementy szlaków związanych z transdukcją sygnału, zwiększają lub wyciszają regulowane procesy odpornościowe [108]. Ponadto, miRNA zostały powiązane z regulacją kluczowych procesów fizjologicznych, których deregulacja może prowadzić do nadmiernego i długotrwałego stanu zapalnego. Epigenetyczną modulację układu odpornościowego, przez cząsteczki miRNA, zaobserwowano w wielu chorobach, w tym autoimmunologicznych cholangiopatiach [109]. Genetyczne czynniki ryzyka, predysponujące do rozwoju choroby PBC, powiązane z aktywacją komórek odpornościowych, głównie limfocytów T wraz z produkcją IFN- γ (*TNFSF15*, *IL12 R*, *TYK2*, *STAT4*, *SOCS1*, *NF-kB*, *TNFAIP3*), limfocytów B i immunoglobulin (*POU2AF1*, *SPIB*, *PRKCB*, *IKZF3*, *ARID3A*) oraz prezentacją antygeny i uwalnianiem IL-12 (*IRF5*, *SOCS1*, *TNFAIP3*, *NF-kB*, *IL-12A*) [110]. Cząsteczki miRNA są ważnymi modulatorami rozwoju, dojrzewania oraz różnicowania poszczególnych linii komórek odpornościowych. Ponadto, indukują prozapalne cytokiny, które utrwalają proces zapalny. W komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs), izolowanych od pacjentów chorych na PBC, obniżona ekspresja miR-92a koreluje ze zwiększoną frakcją krążących limfocytów Th17 [111]. Zaburzona równowaga Th17/Treg jest powszechnie obserwowana w PBC. Wykazano również, że miR-92a był eksprymowany wraz z IL-17A, co może świadczyć o znaczącej roli tego miRNA w regulowaniu przebiegu choroby PBC, poprzez modulację limfocytów Th17 [111]. Wśród uczestniczących w patogenezie choroby PBC komórek odpornościowych, szczególną rolę pełnią limfocyty T CD4+, które są odpowiedzialne za produkcję cytokin oraz pobudzenie autoreaktywnych efektorowych komórek T CD8 i limfocytów B.

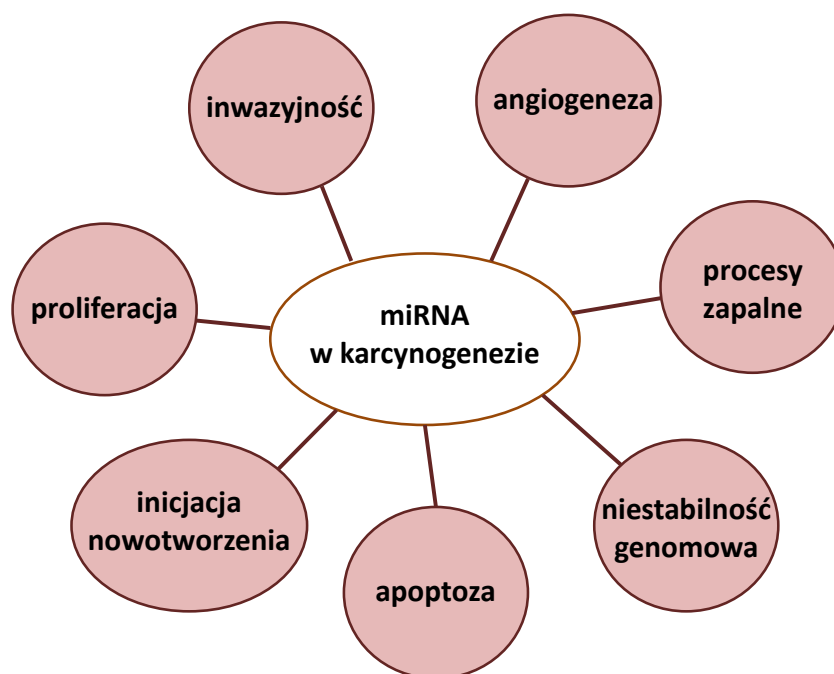
Komórki te powiązano odpowiednio z uszkodzeniem komórek nabłonka dróg żółciowych i wytwarzaniem dużych ilości autoprzeciwciał AMA [112]. W obwodowych limfocytach T CD4⁺ wykazano również zmniejszoną ekspresję miRNA, w tym miR-181a, miR-181b i miR-374b. Szczególnie znaczenie może mieć udział miR-425, którego obniżony poziom silnie indukował cytokiny zapalne: IL-2 i IFN- γ , poprzez dodatnią regulację N-Ras w szlaku sygnalizacyjnym TCR *in vitro* [113]. Zróżnicowany profil miR-223-3p oraz miR-215p wykazano w krążących limfocytach B u pacjentów z różnym stopniem zaawansowania choroby PBC [114]. Natomiast ekspresjonowany miR-139-5p w naciekających limfocytach, reguluje transkrypcję c-FOS i zwiększa produkcję cytokiny TNF- α w szlaku sygnalizacyjnym NF κ B [115], przyczyniając się do cięższego zapalenia cholangiocytoz w przebiegu choroby PBC. Nieliczne są badania nad rolą miRNA w stanie zapalnym u chorych na PSC. Większość z nich koncentruje się na wykazaniu charakterystycznych profili ekspresji lub potencjalnych biomarkerów [116].

1.3.3. Znaczenie mikroRNA w karcynogenezie

Najwcześniejsze dowody na udział miRNA w chorobie nowotworowej opisano na przykładzie przewlekłej białaczki limfocytowej. Wykazano, że na długim ramieniu chromosomu 13, w obszarze 14.2, znajdują się geny dla miR-15a oraz miR-16-1, które regulują ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2. Obniżona ekspresja tych miRNA jest obserwowana u prawie 70% chorych. Delecja w regionie 13q14 skutkuje brakiem lub niedostateczną ekspresją wspomnianych miRNA, co ostatecznie doprowadza do niekontrolowanej proliferacji i gromadzenia nieprawidłowych, monoklonalnych limfocytów B [117].

Dysregulacja ekspresji miRNA w komórkach nowotworowych jest powszechnie obserwowana. Ponad 50% genów miRNA jest zlokalizowanych w miejscach niestabilnych genetycznie lub regionach związanych z rozwojem nowotworu [104]. Stwarza to znaczące ryzyko delecji fragmentów i zahamowania ekspresji transkryptów. MiRNA klasyfikuje się ze względu na znaczącą rolę w regulowaniu szerokiego spektrum kluczowych dla nowotworzenia genów, jako supresorowe (*tumor-suppressive miRNA*; Ts-miRNA) lub onkogenne (zwane inaczej onkomirami). Brak miRNA o funkcji supresorowej może prowadzić do zwiększonej akumulacji czynników proonkogennych i skutkować wzmożoną aktywnością wewnątrzkomórkowych mechanizmów nasilających proliferację, wzrost inwazyjności komórek, aktywację angiogenezy, czy hamowanie apoptozy. Przyczynia się to do uzyskania przez komórki

fenotypu nowotworowego. Wykazano, że wraz z przebiegiem karcynogenezy, poziom Ts-miRNA obniża się. Akumulacja onkogennych miRNA może dodatkowo hamować supresorowe geny i nasilić progresję nowotworu [118,119]. Cząsteczka miRNA wykazuje zdolność do regulacji ekspresji wielu genów, które często pełnią przeciwstawne funkcje np. promujące lub hamujące nowotworzenie. Efekt działania miRNA jako supresora lub onkogenu, zależy od równowagi i sumarycznej aktywności regulowanych przez nie genów [99]. Przykładem miRNA, które pełni podwójną rolę, w zależności od rodzaju nowotworu jest miR-125b i miR-155 [118]. W wielu guzach litych geny docelowe Ts-miR-125b obejmują czynniki proapoptotyczne i prowadzą do hamowania przerzutów. Natomiast, w większości nowotworów hematologicznych, miR-125b pełni rolę onkomiru. Innym przykładem miRNA o dualnej roli jest miR-155, który wykazuje działanie supresyjne w raku żołądka i raku jajnika, a jego podwyższoną ekspresję wykazano w raku płuc [118]. Dysregulację profili miRNA zaobserwowano również w HCC [120], CCA [121] oraz CRC [122], które są najczęściej rozwijającymi się nowotworami w progresji choroby PBC i PSC. Zaburzona równowaga pomiędzy Ts-miRNA, a onkomirami przyczynia się do zainicjowania procesu nowotworzenia i powstawania przerzutów (Rycina 5).



Rycina 5. Udział miRNA w procesie nowotworzenia [123]

MiRNA, modulując ekspresję docelowego transkryptu, hamują lub aktywują wiele komponentów maszyny cyklu komórkowego, w tym: cyklin, zależnych od nich

kinaz (*cyclin-dependent kinases*, CDK) oraz inhibitorów (p21, p27, WEE1) [124]. Większość z tych miRNA działa jako supresory, regulując potencjał proliferacyjny komórek. Wśród miRNA o obniżonej ekspresji w CCA, znajduje się miR-494, który odgrywa kluczową rolę w kontroli cyklu komórkowego poprzez bezpośrednie hamowanie CDK-6 oraz, w mniejszym stopniu: CDK4, CCND1, CCNE2 i HDAC1, co skutkuje zatrzymaniem fazy G1/S cyklu komórkowego. Eksperymentalna nadekspresja miR-494, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, zmniejsza wzrost komórek raka dróg żółciowych [125]. Podobnie, przywrócenie ekspresji miR-6883-5p i miR-149*, które modulują CDK4/6, hamuje cykl komórkowy w fazie G0/G1 i ogranicza procesy apoptozy w komórkach nowotworowych jelita grubego [126]. Wykazano, że miR-140 hamuje progresję raka jelita grubego i jego przerzuty do wątroby poprzez wpływ na BCL9 i BCL2 [119]. Ponadto, miR-34a nasila apoptozę poprzez celowanie w transkrypt SYT1 w raku okrężnicy [127]. Strategie ukierunkowane na przywrócenie ekspresji supresorowych miRNA, mogą stanowić potencjalny cel terapeutyczny w terapii nowotworowej. Ts-miRNA regulują nie tylko kluczowe składowe cyklu komórkowego, lecz pośrednio mogą modulować ścieżki sygnałowe zaangażowane w mechanizm podziałów komórkowych i proliferację.

Niekontrolowany podział komórek jest cechą charakterystyczną progresji nowotworu. Istotną rolę w tym procesie odgrywa szlak Wnt/ β -katenina. Około 90% przypadków raka jelita grubego zawiera mutacje w genie *APC* lub *CTNGB1*, które zwykle prowadzą do akumulacji β -kateniny i aktywacji ścieżki Wnt/ β -katenina. W CRC, cząsteczkami zaangażowanymi w modulowanie tego szlaku są m.in. miR-135a, miR-135b, miR-501-3p, miR-942 oraz miR-494 [122]. Natomiast w raku dróg żółciowych (CCA), podwyższony miR-421 hamuje ekspresję jądrowego receptora kwasów żółciowych (FXR), zarówno na poziomie mRNA jak i białka, promując procesy proliferacyjne w komórkach nowotworowych [128]. Wykazano, że FXR działa również jako supresor nowotworu, m.in. w raku wątrobowokomórkowym. Rodzina czynników transkrypcyjnych E2F mają zasadnicze znaczenie dla proliferacji, a mutacje w kodujących je genach prowadzą do zablokowania podziałów i aktywacji apoptozy. Nadekspresja oncomiR-1 (klastery miR-17-92, zbudowany z sześciu miRNA: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b i miR-92) hamuje translację białek E2F1, E2F2 i E2F3. Wykazano też, że miR-17-5p negatywnie koreluje z E2F1 w bioptatach uzyskanych od pacjentów z rakiem okrężnicy [124].

Utrata funkcji przeciwnowotworowej powiązana jest ze stłumieniem lub mutacją wielu supresorów takich jak PTEN czy p53. Onkogenny miR-21, którego nadekspresja obserwowana jest w wielu nowotworach, w tym CCA [129], HCC [130], ogranicza podziały komórkowe i inicjację apoptozy poprzez hamowanie transkryptów genu PTEN. Nadekspresję tego mikroRNA potwierdzono również w raku jelita grubego oraz dróg żółciowych gdzie wykazuje zdolność wyciszania czynnika programowanej śmierci komórki, PDCD4 [131,132]. MiR-221 również powiązано z hamowaniem PTEN w raku wątrobowokomórkowym [120]. Mutacje w genie *p53* obserwuje się w ponad połowie nowotworów. Wykazano, że wiele miRNA hamuje aktywność p53 odpowiednio przez sprzężenie zwrotne ujemne (miR-33, miR-38, miR-125b, miR-504, miR-1285) i dodatnie (miR-29, miR-34, miR-122, miR-192, miR-194, miR-215) [133]. Białko p53 jest kluczowym regulatorem determinującym los komórki, które może regulować syntezę miRNA w tym: miR-34a/b/c, miR-145, miR-107, miR-30, miR-138, miR-192, miR-215 oraz miR-504. Zaindukowanie miRNA poprzez regulację swoich genów docelowych pośredniczą w supresji nowotworu wpływając na przeżycie komórek (c-Myc) lub hamowanie cyklu komórkowego (CDK4, /6 BCL2, CDC7, MAD2L1, CUL5) [133,134].

Charakterystyczną cechą wielu nowotworów złośliwych jest tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Spośród wielu badanych miRNA, miR-210 wydaje się pełnić kluczową rolę w indukowaniu angiogenezy. Jest on bezpośrednim celem czynnika indukowanego hipoksją - HIF1 α . Nadekspresję miR-210 wykryto w różnych nowotworach, w tym CRC [135], HCC [136] i CCA [137]. Progresji nowotworzenia towarzyszy również zjawisko przejścia epitelialno-mezenchymalnego (*epithelial-mesenchymal transition*; EMT), które związane jest z nabyciem przez komórki nowotworowe inwazyjnego charakteru. Dotychczasowe badania CRC [138] wykazały, że wiele miRNA z rodziny miR-200 zaangażowanych jest bezpośrednio lub pośrednio w regulację czynników transkrypcyjnych i kofaktorów regulujących przemianę nabłonkowo-mezenchymalną [139]. W raku dróg żółciowych, kluczowe dla tego procesu mogą być miR-186 oraz miR-590-3p, przez tłumienie odpowiednio czynników TWIST1 i ZEB2 [121]. Wyciszenie enzymu błonowego ADAM17 przez miR-122, który stanowi około 70% całkowitej populacji miRNA w wątrobie [140], skutkuje znaczącym ograniczeniem zdolności migracji komórek *in vitro* oraz inwazji i onkogenezy w badaniach *in vivo* [141]. Zmniejszoną ekspresję supresorowego miR-122, powiązано z gorszym rokowaniem pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym. Eksperymentalne przywrócenie miR-122 wiązało się z zahamowaniem produkcji wielu białek w tym

metaloproteinazy MMP, które bezpośrednio przyczyniają się do zmniejszenia macierzy zewnątrzkomórkowej oraz kolonizacji komórek i ekspansji przerzutów [142]. W progresji raka jelita grubego, nadekspresja miR-21 i miR-31 może promować EMT poprzez tłumienie docelowego transkryptu TIAM1 [139]. Podobnie może działać niedobór supresorowego miR-150, który oprócz hamowania proliferacji i migracji komórek (SNAIL, GLI1) wykazał zdolność ograniczenia angiogenezy w CRC poprzez docelowy gen czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (*Vascular Endothelial Growth Factor A*; VEGFA) [143]. Proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych odgrywa istotną rolę w procesie wzrastania nowotworów. Supresorowy miR-101 znacząco hamuje proliferację komórek CCA i angiogenezę przez ukierunkowanie na VEGF, cyklooksygenazę-2 (COX-2) i E2F8 [121].

Wiele nowotworów powstaje w miejscu przewlekłego zapalenia. Mikrośrodowisko guza charakteryzuje się akumulacją komórek prozapalnych oraz licznych czynników, które sprzyjają proliferacji, przeżyciu i migracji nowotworowo zmienionych komórek. MiRNA mogą pełnić rolę mediatorów kancerogenezy wywołanej stanem zapalnym. W komórkach CCA, prozapalna IL-6 stymuluje ekspresję metylotransferaz głównie DNMT-1 oraz HASJ4442, które obniżają poziom miR-370. Niedobór tego miRNA powiązано z niedostatecznym wyciszeniem onkogenu MAP3K8. Ponadto IL-6 moduluje miR-148a i miR-152, które bezpośrednio celują w transkrypt DNMT-1, co może przyczynić się do hipermetylacji genów supresorowych *Rassf1a* and *p16^{INK4a}* [144]. MiR-21 również stanowi łącznik pomiędzy stanem zapalnym, a nowotworzeniem. Wzrost tego miRNA, w sposób zależny od ścieżki IL-6/STAT3, prowadzi do aktywacji NF-κB wymaganej do utrzymania stanu transformacji poprzez hamowanie supresorowych genów PTEN i CYLD [145]. Wykazano również związek pomiędzy ekspresją miR-21, a prozapalnymi genami: IL-6, IL-8, IL-10, IL-12a i NOS2a w raku jelita grubego [146]. Co więcej, podwyższony poziom miR-21 w PBMC hamuje RASGRP1 na poziomie mRNA z równoczesnym spadkiem metylotransferazy DNA 1 (*DNA methyltransferase 1*, DNMT1). Powoduje to aktywację genów wrażliwych na metylację i powiazwiazanych z autoimmunizacją. Stan ten może wzmacniać progresję choroby PBC [147]. Zapalenie przyczynia się również do zwiększonej częstości mutacji DNA i uogólnionej niestabilności genetycznej [145]. Ekspresja MSH2, genu biorącego udział w mechanizmie naprawy DNA, jest również ujemnie regulowana przez miR-21 [145].

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Literatura przedmiotu, analizy mikromacierzy (rozdział 3 pkt. 3.4) oraz wyniki badań prowadzonych przez nasz zespół wykazały różne profile ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506 w materiałach biopsyjnych pobranych od pacjentów chorych na pierwotne zapalenie dróg żółciowych (PBC) i pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC) [147,148], z lub bez współistniejącego wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [149–151]. Biorąc pod uwagę, że chorzy na PBC i PSC są leczeni kwasem usodeoksycholowym (UDCA) oraz/lub kwasem 5-aminosalicylowym (5-ASA), które mogą modulować ekspresję miRNA [89,152–156], celem głównym niniejszej dysertacji jest funkcjonalna analiza wpływu ww. leków na ekspresję miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506.

Cele szczegółowe objęły:

1. Ocena ekspresji wybranych miRNA pod wpływem działania UDCA i/lub 5-ASA w niestymulowanych liniach komórkowych;
2. Zbadanie ekspresji wybranych miRNA pod wpływem zaindukowanego *in vitro* stanu zapalnego;
3. Działanie ww. leków w stanie zapalnym na ekspresję wybranych miRNA
4. Przeprowadzenie analizy czynnościowej z użyciem analogów lub inhibitorów wybranych miRNA;
5. Potwierdzenie regulacyjnych funkcji wybranych miRNA poprzez analizę oddziaływań miRNA-mRNA w kontekście patogenezy autoimmunologicznych cholestatycznych chorób wątroby.

W niniejszej pracy postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. UDCA i 5-ASA poprzez modulację wybranych miRNA regulują ścieżki sygnałowe związane ze stanem zapalnym i nowotworzeniem w cholestatycznych chorobach wątroby;
2. Eksperymentalne zahamowanie ekspresji miR-155 przez UDCA zapobiega obniżeniu PPAR α ;
3. *In vitro*, 5-ASA hamując ekspresję miR-155 może modulować geny systemu naprawy błędnie sparowanych nukleotydów.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Linie komórkowe

3.1.1. Linia ludzkich cholangiocytych NHC

Cholangiocyty linii NHC (*normal human cholangiocyte*, pierwotna linia cholangiocytych) wyizolowane ze zdrowej ludzkiej wątroby, otrzymano z Uniwersytetu Nawara (Pampeluna, Hiszpania) dzięki uprzejmości prof. Jesusa Banalesa. Komórki rosną w monowarstwie, a czas ich podwojenia wynosi około 24 h [157]. Dedykowana pożywka hodowlana składa się z mieszaniny DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco 32500-035, Paisaley, UK) z dodatkiem inaktywowanej termicznie surowicy (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA), aminokwasów endogennych (MEM Non-Essential Amino Acids, Gibco 11140-35, Paisaley, UK), antybiotyku (penicylina/streptomycyna; Biowest, Nuaille, FR), chemicznie zdefiniowanej mieszaniny lipidów (Lipid Mixture Chemically Defined, Sigma-Aldrich 20288-100ML, St. Louis, MO, USA) roztworu witamin (MEM Vitamin Solution, Gibco 11120-037, Paisaley, UK) sojowego inhibitora trypsyny (5mg/ml; Soybean Trypsin Inhibitor, Gibco 17075-29, Grand Island, NY, USA), insuliny (Insulin-Transferrin-Selenium, 51500-056 Gibco, Grand Island, NY, USA), ekstraktu z przysadki bydłowej (Bovine Pituitary Extract, Gibco 13028-014, Penrose, Auckland, NZ) deksametazonu (3,9 mg/ml; Sigma-Aldrich D4902-25MG, St. Louis, MO, USA), T3 (3,3'5-trijodo-L-tyroniny, Sigma-Aldrich T2877-100MG, St. Louis, MO, USA), epidermalnego czynnika wzrostu (EGF, Sigma-Aldrich E9633-5MG, St. Louis, MO, USA), oraz forsoliny (Sigma-Aldrich F3917-25MG, St. Louis, MO, USA). W badaniu wykorzystano komórki NHC poniżej 20 pasażu.

3.1.2. Linia ludzkich cholangiocytych H69

Unieśmiertelnioną, nienowotworową linię komórkową nabłonka dróg żółciowych H69 (linia cholangiocytych transformowanych wirusem *SV40*) otrzymano dzięki uprzejmości prof. Jesusa Banalesa z Uniwersytetu Nawara (Pampeluna, Hiszpania). H69 jest linią komórkową wyprowadzoną ze zdrowej wątroby pobranej do przeszczepu [51]. Czas podwojenia populacji komórek wynosi około 20 h [157]. Przygotowanie pożywki oraz warunki hodowli H69 były identyczne jak w przypadku linii NHC. Do badań wykorzystano komórki pomiędzy 20 a 30 pasażem.

3.1.3. Linia ludzkich hepatocytów HepG2

Hepatocyty HepG2 zostały wyizolowane ze zmienionych nowotworowo komórek wątroby 15-letniego chłopca rasy kaukaskiej, chorego na nowotwór wątrobowokomórkowy. Spośród wielu dostępnych wątrobowych linii komórkowych, HepG2 jest najczęściej wykorzystywaną linią w badaniach *in vitro*, gdyż cechuje się fenotypem najbardziej zbliżonym do wątrobowego [158]. Komórki są szeroko stosowane w badaniach toksykologicznych, i rzadziej w badaniach nad metabolizmem leków. Linia HepG2 została komercyjnie zakupiona z kolekcji ATCC (ATCC-HB-8065™). Komórki są adherentne i rosną w monowarstwie, a ich podział następuje po 24h. Komórki linii HepG2 hodowano w pożywce EMEM (Eagle's Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC 30-2003, Manassas, VA, USA) uzupełnionej o surowicę (FBS, ATCC 30-2025, Teddington, UK) i 1% roztwór penicyliny/streptomycyny (Biowest, Nuaille, FR). Do badań wykorzystano komórki poniżej 40 pasażu.

3.1.4. Linia ludzkich enterocytopodobnych komórek Caco-2

Ustaloną linię komórkową Caco-2 stanowią heterogenne komórki pozyskane z gruczolakoraka okrężnicy 72-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej. Caco-2 charakteryzuje się powolnym wzrostem adherentnym, a podwojenie populacji zajmuje od 3 do 4 dni. Okres potrzebny do uzyskania stacjonarnej fazy wzrostu wynosi około 21 dni. W czasie hodowli, komórki przechodzą proces różnicowania i uzyskują morfologiczne oraz funkcjonalne podobieństwo do enterocytów [159]. Z tego względu, linia jest szeroko stosowanym modelem komórkowym służącym do oceny działania leków [160]. Caco-2 pozyskano komercyjnie z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (*American Type Culture Collection*, ATCC) (ATCC-HTB-37™) i hodowano w dedykowanej przez producenta pożywce EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC 30-2003, Manassas, VA, USA) z dodatkiem surowicy bydlęcej (FBS, ATCC 30-2025, Teddington, UK) oraz antybiotyku (penicylina/streptomycyna; Biowest, Nuaille, FR). Do badań wykorzystano komórki pomiędzy 10 a 20 pasażem.

3.2. Hodowla komórkowa

Laboratorium przy Zakładzie Biologii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (ZBM PUM) spełnia wymogi laboratorium zgodnego ze

standardem bezpieczeństwa biologicznego poziomu 2 (BSL2) wymaganego do prowadzenia prac z użyciem hodowli komórkowych. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej w Szczecinie nr KB-0012/69/19 z dnia 25.02.2019r. (Załącznik 10.5) oraz nr KB-0012/44/2021 z dnia 08.11.2021r. (Załącznik 10.6).

Hodowle komórkowe prowadzono w sterylnych i ściśle określonych warunkach. Każdą linię hodowano w 25-cm² lub 75-cm² butelkach, w dedykowanej pożywce oraz inkubowano w stałych warunkach temperatury (37°C), stężenia CO₂ (5%) i wilgotności środowiska (95%). Dodatkowo, naczynia hodowlane dla cholangiocytów (NHC oraz H69) na godzinę przed każdym pasażowaniem lub doświadczeniem opłaszczono kolagenem, w celu zwiększenia przyczepności komórek do podłoża. Pożywkę wymieniano na świeżą co 2-3 dni. Komórki pasażowano po osiągnięciu przez hodowlę około 80% konfluencji. W tym celu, monowarstwę komórek pozbawioną pożywki, przemywano dwukrotnie roztworem PBS (Phosphate-Buffered Saline, Gibco 18912-0140, Paisley, UK), tak aby usunąć martwe komórki i ewentualne pozostałości pożywki na ściankach naczynia. Następnie dodawano ocieplony 0,25% roztwór trypsyny (Trypsin-EDTA Solution, 1X, 30-2101™; ATCC, Manassas, VA, USA) w ilości przeliczonej względem powierzchni danego naczynia hodowlanego. Całość inkubowano w 37°C przez 3-10 minut w zależności od typu komórek. Proces trypsynizacji kontrolowano pod mikroskopem, a po jego zakończeniu dodano PBS w proporcji minimum 1:2. Zawiesinę komórek wirowano w warunkach: 255 ×g, 4°C przez 5 minut. Supernatant odrzucono, a pozyskany osad komórkowy zawieszano w świeżej pożywce hodowlanej. Liczenie komórek przy użyciu komory zliczeniowej Neubauera oraz ocenę żywotności przeprowadzano każdorazowo podczas pasażowania i rozsiewania komórek na eksperyment. W tym celu, przygotowywano mieszaninę składającą się z zawiesiny komórkowej, świeżej pożywki oraz 0,4% błękitu trypanu (Trypan Blue Solution, Sigma-Aldrich T8154-100ML, St. Louis, MO, USA), który przenika jedynie do komórek z uszkodzoną błoną komórkową barwiąc je na niebiesko. W celu utrzymania hodowli, odpowiednią liczbę komórek wysiewano na 25-cm² lub 75-cm² butelki w 5 ml lub 10 ml kompletnej pożywki. Do dalszych eksperymentów, Caco-2 wysiewano w gęstości 1x10⁶ kom./dołek, a pozostałe linie w ilości 300 tys.kom./dołek.

3.3. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego

W celu doboru odpowiedniej dawki kwasu ursodeoksycholowego (UDCA) i kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA) przeprowadzono serię wstępnych doświadczeń z wykorzystaniem testu MTT. Na jego podstawie możliwe jest wyselekcjonowanie dawki badanego związku o najniższym stopniu cytotoksyczności w stosunku do badanych komórek. Zasada testu opiera się na redukcji żółtej soli tetrazolowej (bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowego, MTT) do nierozpuszczalnego, fioletowego formazanu. Powyższa reakcja zachodzi przy udziale dehydrogenazy mitochondrialnej aktywnej jedynie w mitochondriach żywych komórek. Intensywność zabarwienia powstałego roztworu, po rozpuszczeniu kryształów formazanu jest mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm. Ilość wytworzonych kryształów jest wprost proporcjonalna do liczby aktywnych metabolicznie komórek w populacji.

3.3.1. Przebieg oznaczenia testu MTT

Test przeprowadzono niezależnie na linii komórkowej Caco-2 oraz HepG2 w trzech powtórzeniach. Po 24 godzinnej inkubacji w dedykowanej dla danej linii pożywce, wysiane na 96 dołkowej płytce komórki (5tys. i/lub 10 tys. kom./dołek) inkubowano przez 24 godziny kwasem ursodeoksycholowym w zakresie stężeń od 50 μM do 500 μM lub kwasem 5-aminosalicylowym w zakresie stężeń od 50 μM do 1000 μM . Następnie dodano po 100 μl do każdego dołka roztworu MTT (0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific M6494, Eugene, OR, USA) i kontynuowano inkubację przez kolejne 2 godziny w stałych warunkach fizycznych (37°C, >95% wilgotności, 5% CO₂). Wytrącony formazan rozpuszczono w 100 μl DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich D2650-5x5ML, St. Louis, MO, USA). Pomiar absorbancji dla długości fali $\lambda = 570$ nm zmierzono na spektrofotetrze Epoch firmy Bio-Tek. Na podstawie uzyskanych wyników, w kolejnych eksperymentach z wykorzystaniem linii Caco-2 stosowano końcowe stężenia 50 μM i 150 μM dla UDCA (Ursodeoxycholic acid $\geq 99\%$, U5127-1G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz 500 μM i 1000 μM dla 5-ASA (mesalamine 99%, Sigma-Aldrich A3537-25G; St. Louis, MO, USA). Wybrane stężenia dla komórek HepG2 obejmowały dawkę 50 μM i 200 μM dla UDCA oraz 1000 μM 5-ASA. Ze względu na uzyskane podobne wartości dawek ww. związków, dla linii cholangiocytołów NHC i H69 wybrano 150 μM UDCA oraz 1000 μM 5-ASA.

3.3.2. Inkubacja komórek z kwasem ursodeoksycholowym i kwasem 5-aminosalicylowym

W przeddzień rozpoczęcia eksperymentów, komórki NHC, H69, HepG2 oraz Caco-2 rozsiano na 6-dołkową płytkę, w celu adhezji komórek do powierzchni naczynia hodowlanego. Przez następne 24 godziny, komórki inkubowano związkami UDCA, 5-ASA oraz UDCA wraz z 5-ASA. We wszystkich doświadczeniach, 100 mM roztwór podstawowy UDCA uzyskano rozpuszczając związek w etanolu (Alkohol etylowy 99,8%, Chempur, PL), podczas gdy 5-ASA rozpuszczono w DMSO i chroniono przed światłem zgodnie z zaleceniami producenta. W celu zainicjowania procesu zapalnego w komórkach, w oddzielnie zaplanowanych eksperymentach, komórki linii NHC, H69, HepG2 oraz Caco-2 inkubowano przez 24 godziny lipopolisacharydem *Escherichia coli* O111:B4 w stężeniu 5 µg/ml (Sigma-Aldrich L4391-1MG St. Louis, MO, USA). Dodatkowo, w dalszych doświadczeniach nad wpływem badanych związków UDCA i 5-ASA w indukowanym *in vitro* zapaleniu, linie cholangiocyty oraz hepatocyty inkubowano z UDCA i/ lub 5-ASA na 2 godziny przed stymulacją lipopolisacharydem (LPS, 5 µg/ml). We wszystkich doświadczeniach, grupę kontrolną stanowiły komórki nietraktowane żadnym związkiem, którym podano sam rozpuszczalnik. Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji z badanymi związkami, komórki trypsynizowano i wirowano. Pelety komórkowe przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz miRNA i mRNA. Wszystkie eksperymenty powtórzono minimum trzykrotnie.

3.4. Analizy mikromacierzy

Analizę mikromacierzy przeprowadzono komercyjnie przez Microarray Core facility na Uniwersytecie Bostońskim. Do analiz wykorzystano Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 na podstawie którego określono profil ponad 2000 mikroRNA w próbkach wątroby pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych (PBC), pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych (PSC) oraz dla oddzielnego zestawu dawców kontrolnych dla każdej z grup (n=4 na grupę doświadczalną). W oparciu o obserwowane różnice w ekspresji miRNA w tkance wątroby osób zdrowych i chorych, a także różnic w profilu miRNA pomiędzy PBC i PSC, do badań w ramach niniejszej pracy wytypowano miR-125b, miR-150 oraz miR-155.

Wyniki umieszczono w tabeli 1, w której dla każdego wybranego miRNA przedstawiono zmianę ekspresji względem kontroli (fold), wartości *p* oraz otrzymane wartości poddane korekcie FDR (False Discovery Rate). Poniżej tabeli przedstawiono wyniki w postaci wykresów „map cieplnych” (heat maps) dla każdej badanej próby. Dane przeskalowano do wartości skali Z (zakres od -2 do +2), gdzie wysoką ekspresję miRNA oznaczono kolorem czerwonym ($\geq +2$), a niską wartość ekspresji przedstawiono kolorem niebieskim (≤ -2). Kolor biały oznacza wynik pomiędzy wartością maksymalną a minimalną (z-score równy 0).

Tabela 1. Wyniki analiz mikromacierzy dla miRNA-125b, miRNA-150, miRNA-155

	PBC, kontrola vs choroba			PSC, kontrola vs choroba			choroba, PSC vs PBC	
	Fold	<i>p</i>	FDR <i>q</i>	Fold	<i>p</i>	FDR <i>q</i>	Fold	<i>p</i>
hsa-miR-125b-5p	1,4	5,1E-02	4,6E-01	1,2	1,6E-01	7,2E-01	-1,4	4,0E-02
hsa-miR-150-5p	6,1	1,4E-07	3,5E-04	1,3	1,1E-01	6,7E-01	-5,0	5,9E-06
hsa-miR-155-5p	5,5	8,5E-07	1,0E-03	1,1	8,7E-01	9,7E-01	-3,3	2,3E-04

PBC kontrola				PBC				PSC kontrola				PSC			
10,94	11,05	11,50	11,53	12,05	11,35	11,82	11,55	10,34	10,97	10,97	11,32	11,05	11,65	11,05	11,21
6,95	6,83	6,81	7,11	9,55	9,56	9,91	9,05	6,97	6,66	6,91	6,67	7,51	6,99	6,62	7,59
5,90	6,08	6,32	6,51	8,26	8,76	9,09	8,44	7,23	6,60	7,08	6,31	7,00	6,18	6,64	7,62

3.5. Przejściowa transfekcja miRNA

W celu potwierdzenia relacji miRNA, a docelowym mRNA, komórki Caco-2 inkubowano gotowymi do transfekcji cząsteczkami, które specyficznie indukują lub hamują wybrane miRNA. Zastosowano Ambion mirVana® miRNA inhibitor (hsa-miR-125b-5p ID: MH10148, hsa-miR-155-5p ID: MH28440; oraz mirVana® miRNA mimic (hsa-miR-125b ID: MC10148, hsa-miR-155; ID: MC28440). Cząsteczki naśladujące i hamujące miRNA transfekowano z wykorzystaniem lipofektaminy RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA). Metoda działania wykorzystuje zjawisko opłaszczenia ujemnie naładowanych kwasów nukleinowych, kationowymi związkami lipidowymi, które wnikać przez błonę komórkową do cytoplazmy komórki, ułatwiają endocytozę egzogenego RNA. Przejściową transfekcję przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, uwzględniając zalecaną objętość mieszaniny transfekcyjnej, w przeliczeniu na powierzchnię naczynia hodowlanego. Dzień przed eksperymentem, komórki Caco-2 wysiewano na 6-dołkowe płytki w gęstości 1×10^6 kom./dołek. W dniu transfekcji przygotowano mieszaninę składającą się z medium Opti-MEM® Reduced

Serum Medium (Gibco, Paisley, UK), lipofektaminy RNAiMAX oraz wybranej cząsteczki miRNA (mimic lub inhibitor). Całość inkubowano przez 5 min w celu utworzenia kompleksu transfekcyjnego. W tym czasie, pożywkę hodowlaną EMEM wymieniono na świeżą, bez dodatku antybiotyków. Następnie kroplami dodano mieszaninę transfekcyjną i inkubowano (37°C; 5% CO₂). Aby zmniejszyć potencjalną cytotoksyczność lipofektaminy po 4 godzinach mieszaninę zastąpiono kompletną pożywką. Po 48 godzinach od momentu transfekcji, komórki Caco-2 zebrano, odwirowano (10 000× g, 8 min, 4°C), oraz zamrożono w postaci peletów komórkowych do dalszych analiz. Grupę kontrolną w badaniu stanowiły komórki bez egzogennej cząsteczki miRNA. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wydajność transfekcji potwierdzono analizą ekspresji miRNA techniką PCR.

3.6. Izolacja RNA

Do wyizolowania całkowitego RNA wykorzystano zestaw RNeasy Mini Kit (cat. no. 74106, Qiagen, Hilden, Germany). W celu homogenizacji materiału, rozmrożony pelet komórkowy zawieszono w roztworze RLT i β-merkaptoetanolu w stosunku 1:100 i intensywnie mieszano na wytrząsarce typu Vortex przez 3 minuty. Następnie, do każdej próby dodano 70% etanolu i dokładnie mieszano przez kilkukrotne pipetowanie. Uzyskane roztwory przeniesiono na kolumny i odwirowano. Do procesu oczyszczania materiału ze związków organicznych wykorzystano dwa dołączone do zestawu bufory płuczące. W końcowym etapie izolacji, do procesu elucji RNA wykorzystano 20µL wody wolnej od RNAz.

Analizę jakościową i ilościową preparatów RNA przeprowadzono na spektrofotometrze mikroplótkowym Epoch (Epoch Microplate Spectrophotometer, Bio-Tek) z zastosowaniem oprogramowania Gen5 2.0 All-In-One Microplate Reader Software (Bio-Tek). W celu określenia czystości badanego materiału, wyznaczono stosunek absorbancji mierzonej przy długościach fali 260 nm i 280 nm. Wartości pomiędzy 1.8 a 2.0 świadczyły o wysokiej czystości uzyskanego materiału. Stężenie RNA wyznaczono według wzoru:

$$\text{Stężenie RNA} = A_{260} \times 40 \text{ ug/ml}$$

gdzie:

A- absorbancja przy długości λ 260

40 ug/ml - współczynnik RNA

Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

3.7. Reakcja odwrotnej transkrypcji

3.7.1. Odwrotna transkrypcja mRNA

W celu pozyskania materiału cDNA wykorzystano komercyjny zestaw Superscript II RT kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). W pierwszym etapie mieszanina reakcyjna w przeliczeniu na 1 próbę zawierała następujące składniki (Tabela 2):

Tabela 2. Skład mieszaniny pierwszego etapu odwrotnej transkrypcji mRNA

Skład mieszaniny	Objętość
startery Oligo(dT) 12-18 (500 µg/mL)	1µL
deoksyrybonukleotydy (dNTP) (10 mM)	1µL
heksametry	1µL
woda wolna od nukleaz	6µL

Dodanie heksametrów miało na celu zwiększenie specyficzności reakcji. Inkubację wyizolowanego RNA wraz z przygotowaną mieszaniną prowadzono w termocyklerze (65°C, 5 minut). Następnie próby ochładzano na lodzie przez minutę i dodano składniki wymienione w tabeli 3.

Tabela 3. Skład mieszaniny drugiego etapu odwrotnej transkrypcji mRNA

Skład mieszaniny	Objętość
bufor: 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂)	4µL
ditiotreitol (DTT) (0.1 M)	2µL
inhibitor rybonukleaz RNaseOUT™ (40 U/ µL)	1µL

Próby inkubowano w 42°C przez 2 min następnie do każdej z prób dodano po 1 µL enzymu SuperScript™ II i ponownie inkubowano (42°C, 50 min). Terminacja reakcji nastąpiła poprzez zwiększenie temperatury do 70°C (15 minut). Do schłodzonych na lodzie prób dodano rybonukleazę H (RNaza H) w celu eliminacji pozostałego RNA. Wyizolowane cDNA zawieszono w 40 µL wody wolnej od nukleaz i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz.

3.7.2. Odwrotna transkrypcja miRNA

Odwrotną transkrypcję mikroRNA na cDNA przeprowadzono za pomocą zestawu TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (#A28007; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zgodnie z protokołem producenta. Wydłużenie dojrzałych miRNA obecnych w puli uprzednio wyizolowanego całkowitego RNA, zaszło poprzez dodanie ogonka poli(A) na końcu 3' transkryptu oraz ligację sekwencji adapterów do końca 5'. Następnie cząsteczki miRNA uległy odwrotnej transkrypcji. Uzyskane cDNA zostało zamplifikowane przy użyciu uniwersalnych starterów w celu zwiększenia ilości końcowego produktu cDNA. Produkty amplifikacji zostały zamrożone w temp. -20°C i przechowywane w ZBM PUM w Szczecinie. Skład mieszaniny reakcyjnej w poszczególnych etapach odwrotnej transkrypcji oraz warunki reakcji zostały opisane w poniższej tabeli (Tabela 4).

Tabela 4. Etapy, skład mieszaniny oraz warunki reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA

I. Poliadenylacja końca 3'		
Skład mieszaniny		Objętość
10X bufor Poli (A)		0,5 µL
ATP		0,5 µL
enzym Poli (A)		0,5 µL
woda wolna od RNaz		1,7 µL
Etap	Profil termiczny	Czas
poliadenylacja	37°C	45 min.
zakończenie reakcji	65°C	10 min.
czas utrzymywania	4°C	-
II. Ligacja adaptera do końca 5'		
Skład mieszaniny		Objętość
bufor 5X DNA dla ligazy		3 µL
50% PEG 8000		4,5 µL
25X adapter ligacji		0,6 µL
ligaza RNA		1,5 µL
woda wolna od RNaz		0,4 µL
Etap	Profil termiczny	Czas
ligacja	16°C	60 min.
czas utrzymywania	4°C	-

III. RT-PCR

Skład mieszaniny		Objętość
bufor 5X RT		6 µL
MIX dNTP (25 mM każdy)		1,2 µL
20X Uniwersalny RT Primer		1,5 µL
10X RT Enzyme Mix		3 µL
woda wolna od RNaz		3,3 µL
Etap	Profil termiczny	Czas
odwrotna transkrypcja	42°C	15 min.
zakończenie reakcji	85°C	5 min.
czas utrzymywania	4°C	-

IV. Amplifikacja – reakcja miR-Amp

Skład mieszaniny		Objętość	
2X miR-Amp Master Mix		25 µL	
20X miR-Amp Primer Mix		2,5 µL	
woda wolna od RNaz		17,5 µL	
Etap	Profil termiczny	Czas	Cykle
aktywacja enzymu	95°C	5 min.	1
denaturacja	95°C	3 sek.	14
wydłużanie	60°C	30 sek.	
zakończenie reakcji	99°C	10 min.	1
czas utrzymywania	4°C	-	1

3.8. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qPCR)

Ekspresję genów na poziomie miRNA oraz mRNA analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (*quantitative real-time PCR*, qRT-PCR) przy użyciu aparatury Applied Biosystems 7500 Fast-Real-Time PCR System (Waltham, MA, USA). Matrycę stanowiło cDNA uzyskane w wyniku odwrotnej transkrypcji. Reakcję prowadzono przy użyciu sond i starterów TaqMan (Tabela 5).

Tabela 5. Sondy i startery typu TaqMan

Badany gen	Sonda i startery specyficzne dla danego genu
miR-125b	Assay ID 000449_mir
miR-150	Assay ID 000473_mir
miR-155	Assay ID 002623_mir
miR-346	Assay ID 478046_mir
miR-506	Assay ID 478958_mir
miR-191-5p*	Assay ID 477952_mir
miR-16-5p*	Assay ID 477860_mir
TNF α	Hs00174128-m1
ZC3H12A	Hs00962356-m1
VDR	Hs00172113-m1
SOCS1	Hs00705164_s1
S1PR1	Hs01922614_m1
PPAR α	Hs00947539_m1
18S*	Hs99999901_s1

* Gen referencyjny

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji do analizy ekspresji wybranych miRNA oraz mRNA przedstawiono poniżej (Tabela 6 i 7):

Tabela 6. Skład mieszaniny oraz warunki temperaturowo-czasowe reakcji qRT-PCR do analizy ekspresji miRNA

Skład mieszaniny			Objętość
bufor 2X Fast Advanced Master Mix			10 μ L
sonda i startery: TaqMan [®] Advanced miRNA Assay (20X)			1 μ L
woda wolna od RNaz			4 μ L
cDNA			5 μ L
Etap	Profil termiczny	Czas	Cykle
aktywacja enzymu	95°C	20 min.	1
Denaturacja	95°C	3 sek.	40
Wydłużanie	60°C	30 sek.	

Tabela 7. Skład mieszaniny oraz warunki temperaturowo-czasowe reakcji qRT-PCR do analizy ekspresji mRNA

Skład mieszaniny	Objętość
bufor TaqMan Universal Master Mix	10 μ L
sonda i startery: TaqMan [®] Advanced miRNA Assay (20X)	1 μ L
woda wolna od RNaz	6 μ L
cDNA	3 μ L

Etap	Profil termiczny	Czas	Cykle
denaturacja wstępna	50°C	20 sek.	1
	95°C	10 min.	1
Denaturacja	95°C	15 sek.	40
Wydłużanie	60°C	1 min.	

Każdą próbę amplifikowano w dwóch powtórzeniach. Surowe wartości ekspresji genów wyrażone jako wartości Ct były normalizowane do poziomu ekspresji genu referencyjnego: miRNA-191 lub miRNA-16 w przypadku ekspresji miRNA, oraz 18S dla mRNA. Ekspresję genów przedstawiono jako względną zmianę krotności wobec kontroli, zgodnie ze wzorem:

$$\text{Ekspresja genu badanego} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

gdzie:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{badany gen}) - \Delta Ct (\text{grupa kontrolna})$$

$$\Delta Ct = \text{średnia Ct (genu badanego)} - \text{średnia Ct (genu normalizacyjnego)}$$

3.9. Analiza statystyczna

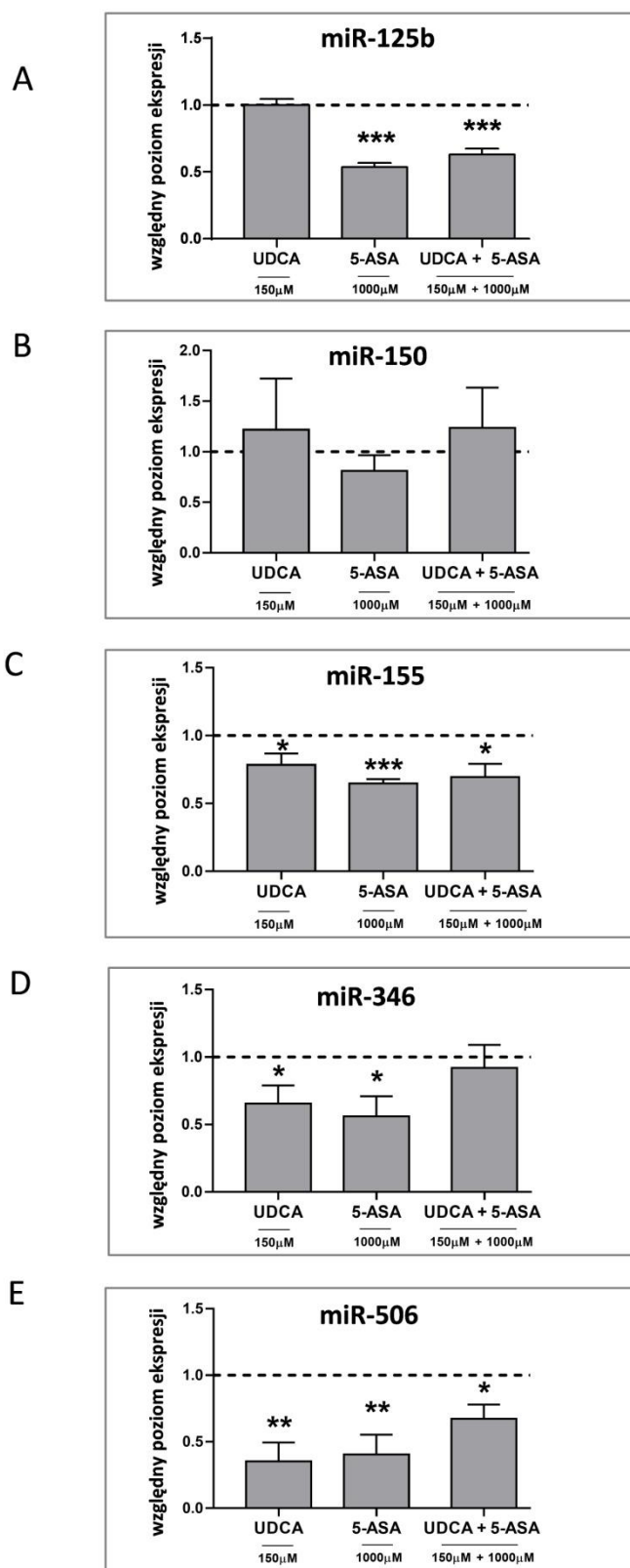
Wszystkie obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą programu StatView 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Analizę różnic między dwoma grupami przeprowadzono przy użyciu niesparowanego testu t-Studenta, natomiast do określenia różnic między kilkoma grupami zastosowano test ANOVA. Wyniki zaprezentowano w formie wykresów przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism w wersji 7 (San Diego, Kalifornia, USA). Dane uzyskane z minimum trzech niezależnych eksperymentów przedstawiano w postaci wartości średnich \pm błęd standardowego średniej (SEM). Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0.05$.

4. WYNIKI

4.1. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w komórkach normalnych ludzkich cholangiocytołów NHC (Na podstawie publikacji *Adamowicz i wsp. Suppression of Hepatic PPARα in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022* oraz badań dotychczas niepublikowanych)

W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem linii ludzkich cholangiocytołów (NHC) (Rycina 6) wykazano, że komórki inkubowane związkiem 5-ASA z lub bez UDCA miały obniżony poziom ekspresji miR-125b w stosunku do kontroli (odpowiednio: 37% redukcji, $p=0,0001$, oraz 46% redukcji, $p=0,0001$) (Rycina 6A). Nie zaobserwowano zmiany poziomu ekspresji miR-125b po ekspozycji na sam UDCA. Ekspresja miR-150 pozostawała niezmienna w każdej grupie badanej (Rycina 6B), natomiast poziom ekspresji miR-155 był obniżony w porównaniu do komórek kontrolnych zarówno po 150 μ M UDCA (22% redukcja, $p=0,03$), 1000 μ M 5-ASA (35% redukcja, $p=0,0001$) oraz UDCA w skojarzeniu z 5-ASA (31% redukcja, $p=0,01$) (Rycina 6C). Inkubacja komórek NHC z UDCA wiązała się z obniżeniem ekspresji miR-346 (34% redukcja, $p=0,03$ w porównaniu do komórek kontrolnych) oraz miR-506 (65% redukcji, $p=0,004$ w stosunku do kontroli) (Rycina 6D, E). W badaniach z zastosowaniem 5-ASA, również zaobserwowano spadek ekspresji miR-346 (ponad 40% redukcji, $p=0,02$ w porównaniu do komórek kontrolnych) oraz miR-506 (60% redukcji, $p=0,004$ w odniesieniu do kontroli) (Rycina 6D, E). Poziom ekspresji miR-346 nie różnił się istotnie w komórkach NHC po jednoczesnej ekspozycji na 5-ASA i UDCA, jednak zaobserwowano spadek w ekspresji miR-506 (ponad 30% redukcja, $p=0,01$ w porównaniu do kontroli) (Rycina 6E).

NHC

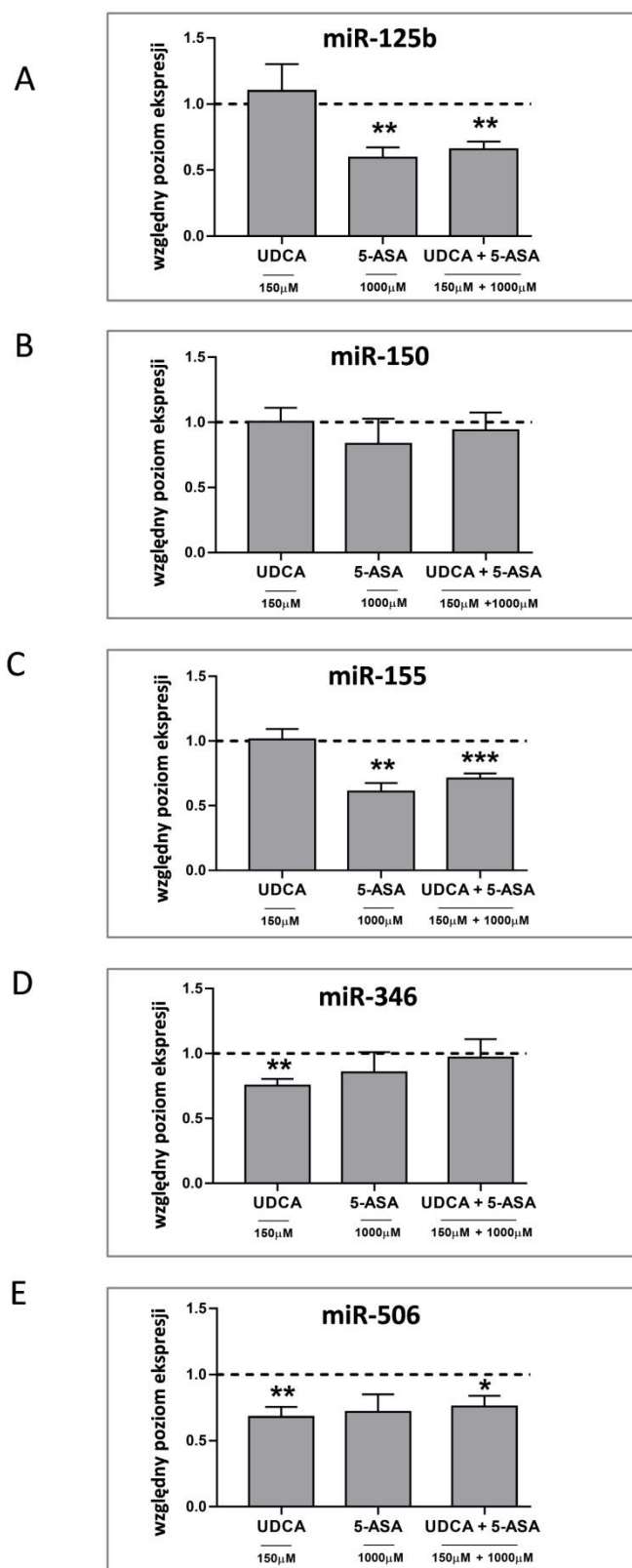


Rycina 6. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach NHC

4.2. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w nienowotworowych, nieśmiertelnionych komórkach ludzkich cholangiocytołów H69

Doświadczenia nad wpływem badanych związków na ekspresję wybranych miRNA przeprowadzono również na innej normalnej linii komórkowej cholangiocytołów, nieśmiertelnionych komórkach H69 (Rycina 7). Inkubacja komórek z 1000 μ M 5-ASA spowodowała spadek ekspresji miR-125b (ponad 40% redukcja, $p=0,0019$ w odniesieniu do grupy kontrolnej) (Rycina 7A) oraz miR-155 (40% redukcja, $p=0,001$ w stosunku do kontroli) (Rycina 7C). W przypadku pozostałych wybranych do badania miRNA nie zaobserwowano istotnie statystycznych różnic. Jednoczesna ekspozycja komórek H69 na 5-ASA wraz z UDCA, obniżyła ekspresję miR-125b (34% redukcji, $p=0,001$) i miR-155 w porównaniu do komórek kontrolnych (28% redukcji, $p=0,0003$) (Rycina 7A,C). UDCA wraz z 5-ASA obniżył również poziom miR-506 (24% redukcji, $p=0,02$ w porównaniu do grupy kontrolnej). Komórki po ekspozycji na sam UDCA wykazały spadek ekspresji miR-346 (25% spadek, $p=0,003$) (Rycina 7D) oraz miR-506 (32%, $p=0,006$) (Rycina 7E). W pozostałych przypadkach nie zaobserwowano znamienych statystycznie różnic. Ekspresja miR-150 nie uległa zmianie pod wpływem żadnego z badanych związków (Rycina 7B).

H69

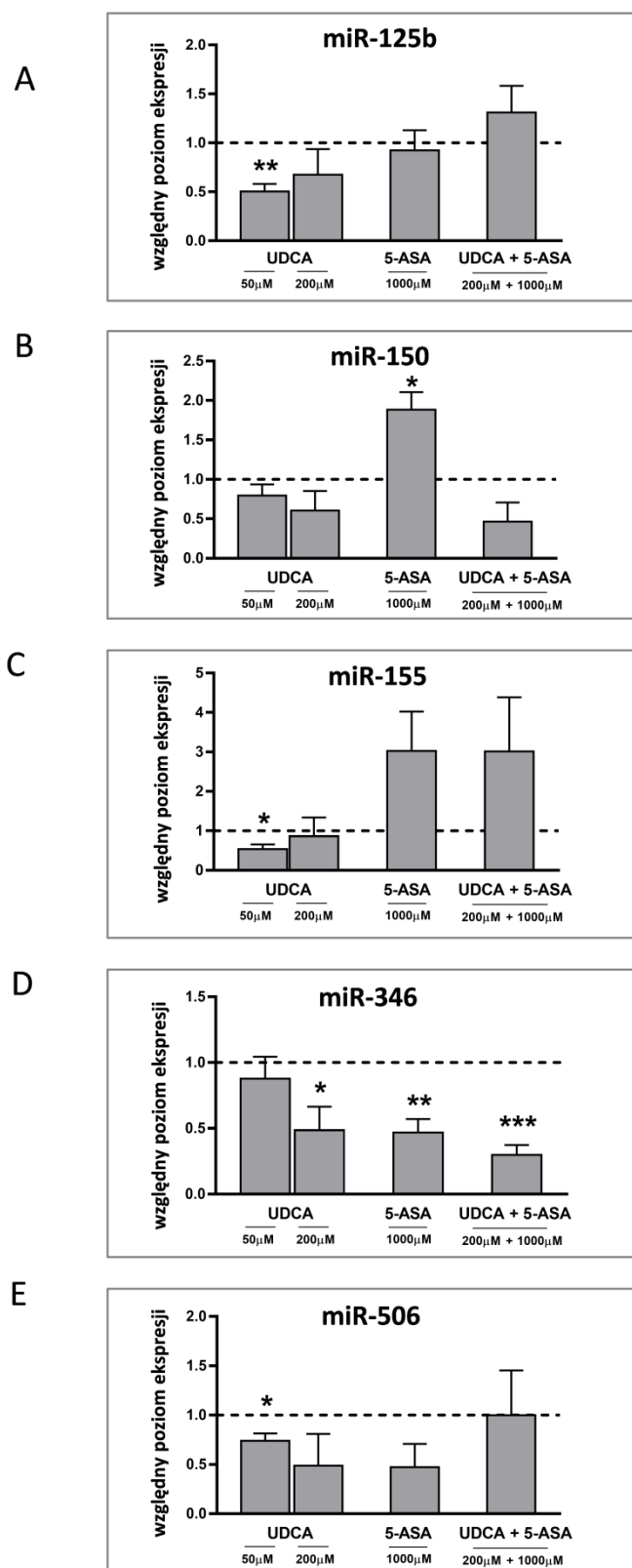


Rycina 7. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach H69

4.3. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w komórkach raka wątroby HepG2 (Na podstawie publikacji Adamowicz i wsp. *Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022* oraz badań dotychczas niepublikowanych)

W badaniach na komórkach HepG2 (Rycina 8) wykazano, że UDCA obniża ekspresję większości wybranych do projektu miRNA. Mniejsza dawka UDCA (50 μ M) obniżyła poziom ekspresji miR-125b (48% redukcji, $p=0,003$) (Rycina 8A), miR-155 (20% redukcji, $p=0,008$) (Rycina 8C) oraz miR-506 (27% redukcji, $p=0,02$) w porównaniu do komórek kontrolnych (Rycina 8E). Wyższa dawka UDCA (200 μ M) zahamowała ekspresję miR-346 (51% redukcji, $p=0,04$ w porównaniu do kontroli) (Rycina 8D). Żadna dawka UDCA (50 μ M, 1000 μ M) nie wpłynęła na poziom ekspresji miR-150 (Rycina 8B). W komórkach HepG2 inkubowanych z 1000 μ M 5-ASA wykazano podwyższony poziom miR-150 (1,8-krotny wzrost, $p=0,02$). Zastosowanie samego 5-ASA wywołało nieistotnie statystycznie wzrost ekspresji miR-155 (Rycina 8C). Spośród badanych miRNA, jedynie miR-346 wykazał obniżenie ekspresji zarówno po samym 5-ASA jak i w skojarzeniu z UDCA (odpowiednio: 53% redukcji, $p=0,007$ w porównaniu do kontroli oraz 71% redukcji, $p=0,0005$ w odniesieniu do komórek kontrolnych Rycina 8D). Inkubacja komórek HepG2 z dwoma związkami nie wpłynęło istotnie na poziom miR-125b, miR-150, miR-155 oraz miR-506.

HepG2

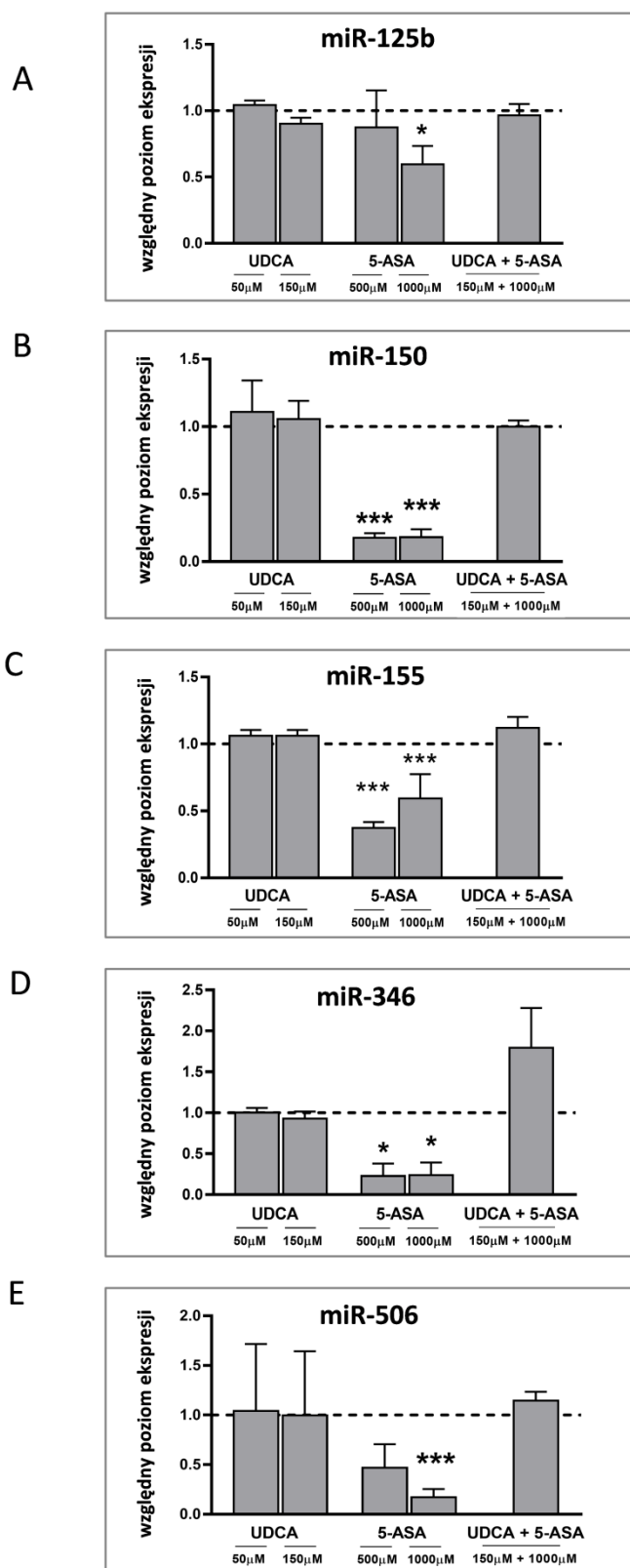


Rycina 8. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach HepG2

4.4. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję wybranych miRNA w komórkach nabłonka jelitowego Caco-2 (Na podstawie publikacji Adamowicz i wsp. *5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. J Physiol Pharmacol. 2021* oraz badań dotychczas niepublikowanych)

Wyniki przeprowadzonych badań z wykorzystaniem kultury Caco-2 pod wpływem związków UDCA oraz 5-ASA przedstawiono na rycinie 9. W doświadczeniu wykazano, że kwas 5-aminosalicylowy obniża ekspresję miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506. Wyższa dawka 5-ASA (1000 μM) zmniejszyła poziom ekspresji miR-125b w stosunku do nietraktowanych związkami komórek z grupy kontrolnej (40% redukcji, $p=0,02$). Przy zastosowaniu mniejszej dawki 5-ASA (500 μM) nie obserwowano powyższych zmian (Rycina 9A). Kwas 5-aminosalicylowy w obu stężeniach hamował ekspresję miR-150 (83% redukcji przy dawce 500 μM w stosunku do kontroli, $p=0,0001$ oraz 82% redukcji przy dawce 1000 μM , $p=0,0003$ w stosunku do kontroli) (Rycina 9B). Pod wpływem obu ww. stężeń 5-ASA, wykazano również obniżenie poziomu miR-155 w stosunku do kontroli (62% redukcji po zastosowaniu dawki 500 μM , $p=0,0001$ oraz o 40% po inkubacji komórek z dawką 1000 μM , $p=0,0005$) (Rycina 9C). Spadek ekspresji po inkubacji komórek Caco-2 zarówno z 500 μM oraz 1000 μM 5-ASA zaobserwowano też w przypadku miR-346 (po obu dawkach obserwowana blisko 80% redukcja, $p=0,01$ w stosunku do kontroli) (Rycina 9D). Ekspozycja komórek jelitowych na 1000 μM 5-ASA spowodowała także znaczną supresję miR-506 (redukcja ekspresji o ponad 80% w stosunku do kontroli, $p=0,0001$) podczas gdy, inkubacja komórek z dwukrotnie mniejszą dawką nie osiągnęła znaczącej istotności statystycznej (Rycina 9E). Komórki Caco-2 traktowane kwasem ursodeoksycholowym w połączeniu z lub bez 5-ASA, nie wykazały znaczących statystycznie różnic w ekspresji badanych miRNA w porównaniu z populacją komórek z grupy kontrolnej.

Caco-2

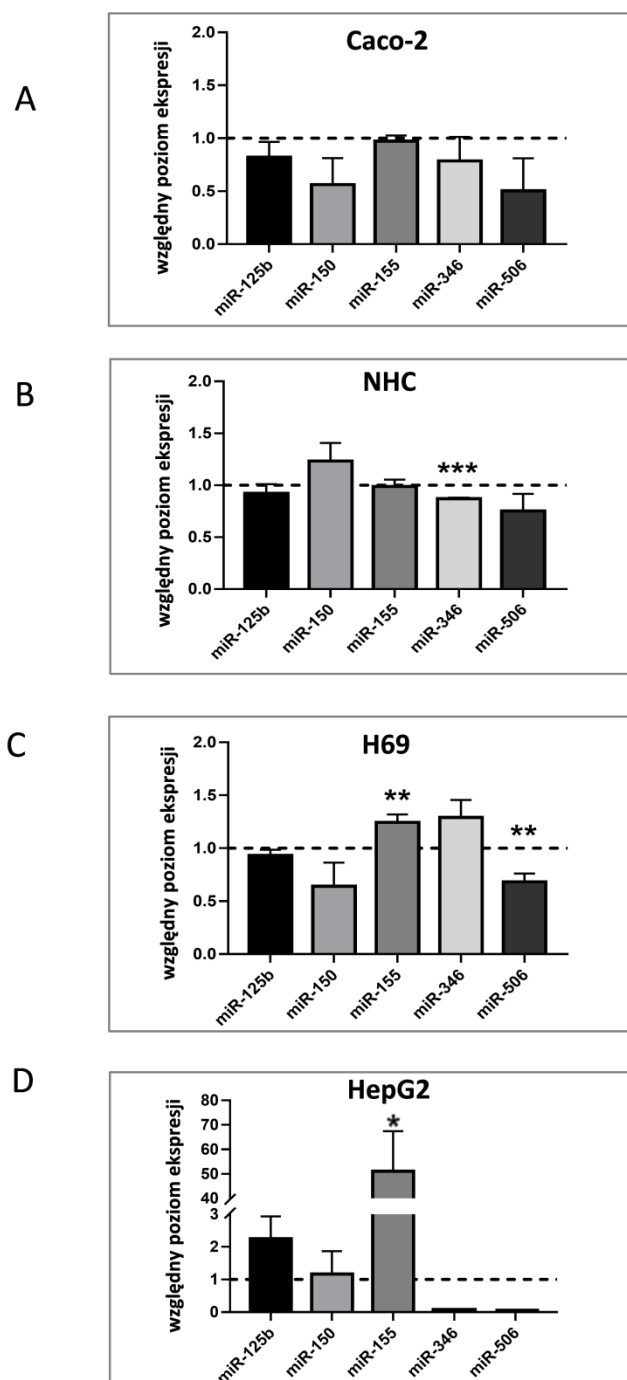


Rycina 9. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach Caco-2

4.5. Wpływ indukowanego stanu zapalnego na ekspresję wybranych miRNA w liniach komórkach Caco-2, NHC, H69 i HepG2 (Na podstawie publikacji Adamowicz i wsp. *Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022, Adamowicz i wsp. *Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. Int J Mol Sci. 2022* oraz badań dotychczas niepublikowanych)*

Z uwagi na fakt, że stan zapalny obejmuje tkankę wątrobową i jelitową u pacjentów PSC-UC kluczowe było przeprowadzenie analiz *in vitro* po ekspozycji na lipopolisacharyd (LPS), w celu sprawdzenia czy stan zapalny moduluje ekspresję miRNA. Nasze dane wskazują, że LPS w odmienny sposób wpływał na ekspresję miRNA w wybranych liniach komórkowych (Rycina 10). W linii komórkowej Caco-2 nie zaobserwowano żadnych zmian po ekspozycji na LPS (Rycina 10A). W cholangiocytach z linii NHC, wykazano spadek miR-346 (13% redukcji, $p=0,0001$ w stosunku do kontroli) (Rycina 10B), a w komórkach H69 wzrost miR-155 (24% wzrost, $p=0,009$) oraz spadek miR-506 (32% redukcja, $p=0,007$) w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 10C). W linii hepatocytów HepG2 po stymulacji LPS zaobserwowano wzrost miR-155 (68-krotny wzrost, $p=0,01$ w stosunku do kontroli) (Rycina 10D).

LPS



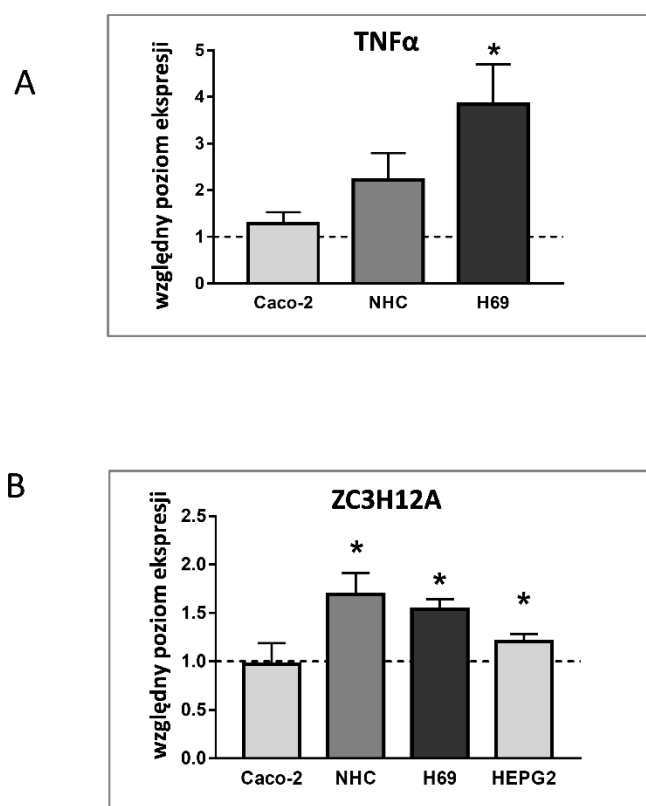
Rycina 10. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 po ekspozycji na LPS w komórkach Caco-2, NHC, H69, HepG2

4.6. Ocena ekspresji TNF α i ZC3H12A w liniach komórkach Caco-2, NHC, H69 i HepG2

Następnie zbadano ekspresję genów TNF α oraz ZC3H12A na poziomie mRNA w celu potwierdzenia, czy w badanych liniach komórkowych doszło do zaindukowania stanu zapalnego pod wpływem podanego lipopolisacharydu (Rycina 11). TNF α jest jedną z głównych cytokin prozapalnych, które wzrasta podczas zapalenia, natomiast ZC3H12A należy do genów odpowiedzi zapalnej i ulega ekspresji pod wpływem aktywacji receptorów Toll-podobnych (*toll-like receptor*, TLR). W obu liniach cholangiocytołów zaobserwowano wzrost ekspresji TNF α (3,8-krotny wzrost w komórkach H69, $p=0,01$ i ponad 2-krotną tendencję wzrostową w linii NHC (Rycina 11A). Ponadto, wykazano wzrost ekspresji ZC3H12A w komórkach H69 (1,5-krotny wzrost, $p=0,0006$) oraz w NHC (1,7-krotny wzrost, $p=0,01$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Podwyższony poziom ZC3H12A mRNA wykazały również hepatocyty HepG2 (1,2 wzrost, $p=0,01$ w porównaniu do grupy kontrolnej) (Rycina 11B). Spośród badanych linii komórkowych jedynie jelitowe komórki Caco-2 nie wykazały istotnej różnicy w sygnale TNF α oraz ZC3H12A mRNA (Rycina 11A, B), co najprawdopodobniej wynika z niskiej ekspresji TLR4 [161], który jest kluczowym receptorem dla lipopolisacharydu.

Biorąc pod uwagę, że ekspresja miRNA jest rozregulowana w indukowanych przez LPS komórkach NHC, H69 oraz HepG2, w dalszych badaniach sprawdzono, czy UDCA i/ lub 5-ASA może wpływać na wybrane miRNA podczas zaindukowanego, eksperymentalnego zapalenia. Do dalszych analiz wybrano podzbiór miRNA, których ekspresja zmieniła się pod wpływem LPS.

LPS

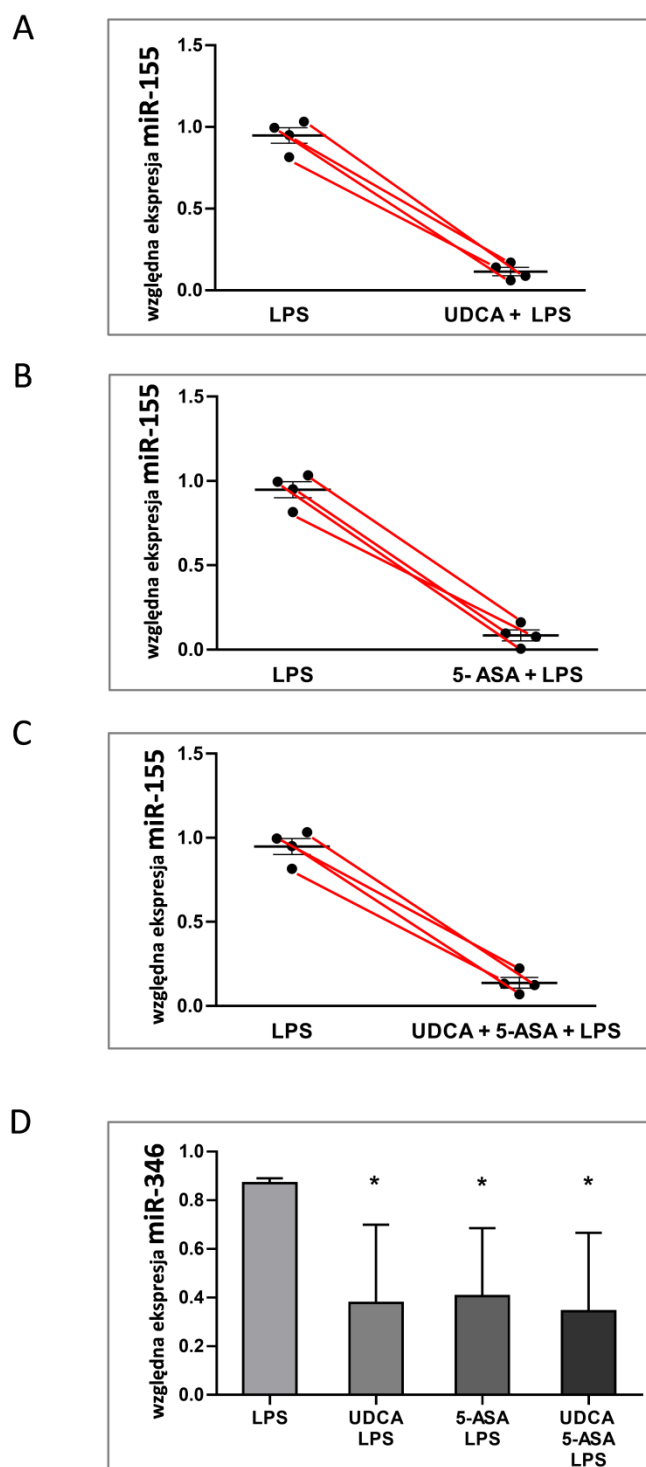


Rycina 11. Względny poziom ekspresji TNF α oraz ZC3H12A po ekspozycji na LPS w komórkach Caco-2, NHC, H69 i HepG2

4.7. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję miR-155 i miR-346 w komórkach NHC z zaindukowanym stanem zapalnym

W przeciwieństwie do cholangiocyty H69, ekspresja miR-155 nie uległa zmianie pod wpływem LPS w komórkach linii NHC. Postanowiono jednak sprawdzić czy badane związki UDCA i 5-ASA, które początkowo obniżały miR-155 (Rycina 6C) wpłyną również na ekspresję tego miRNA w stanie zapalnym (Rycina 12). Komórki inkubowane zarówno UDCA ($p=0,0001$), 5-ASA ($p=0,0001$), jak i UDCA wraz z 5-ASA ($p=0,0001$) w obecności lipopolisacharydu wykazały obniżony poziom miR-155 w porównaniu z poziomem wyjściowym po samym LPS (Rycina 12A, B, C). Ponadto każdy z badanych związków w zaindukowanym stanie zapalnym obniżył ekspresję miR-346 ($p=0,04$ UDCA z LPS vs, LPS; $p=0,03$ 5-ASA z LPS vs, LPS; $p=0,03$ UDCA z 5-ASA z LPS vs, LPS) (Rycina 12D).

NHC

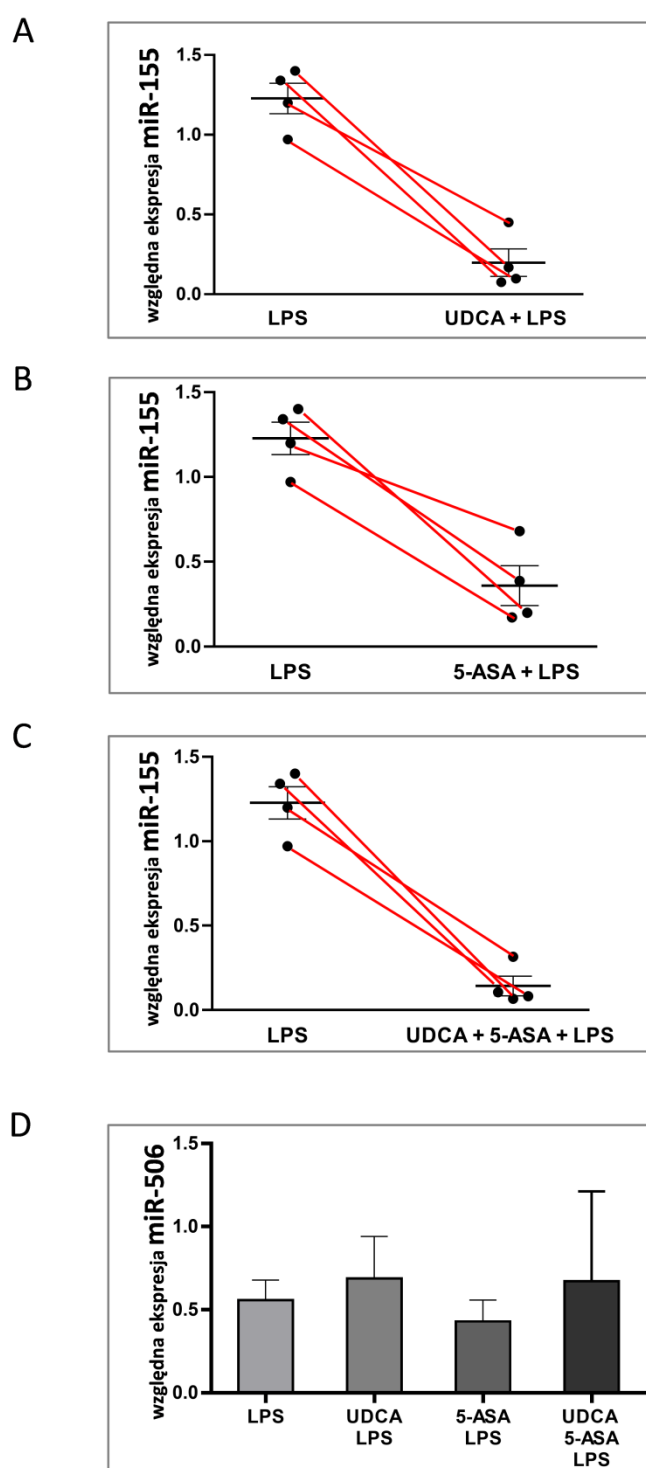


Rycina 12. Wpływ działania leków UDCA i/lub 5-ASA w zaindukowanym stanie zapalnym na poziom ekspresji miR-155 oraz miR-346 w komórkach NHC

4.8. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję miR-155 i miR-506 w komórkach H69 z zaindukowanym stanem zapalnym

W komórkach H69 z zaindukowanym przez LPS stanem zapalnym, podwyższony poziom miR-155 uległ 6-krotnemu obniżeniu pod wpływem UDCA ($p=0,0002$) (Rycina 13A), ponad 3-krotnemu po 5-ASA ($p=0,001$) (Rycina 13B), oraz ponad 8-krotnemu pod wpływem UDCA i 5-ASA ($p=0,0001$) (Rycina 13 C). W przypadku miR-506, nie zaobserwowano istotnych zmian pod wpływem badanych związków. (Rycina 13D).

H69

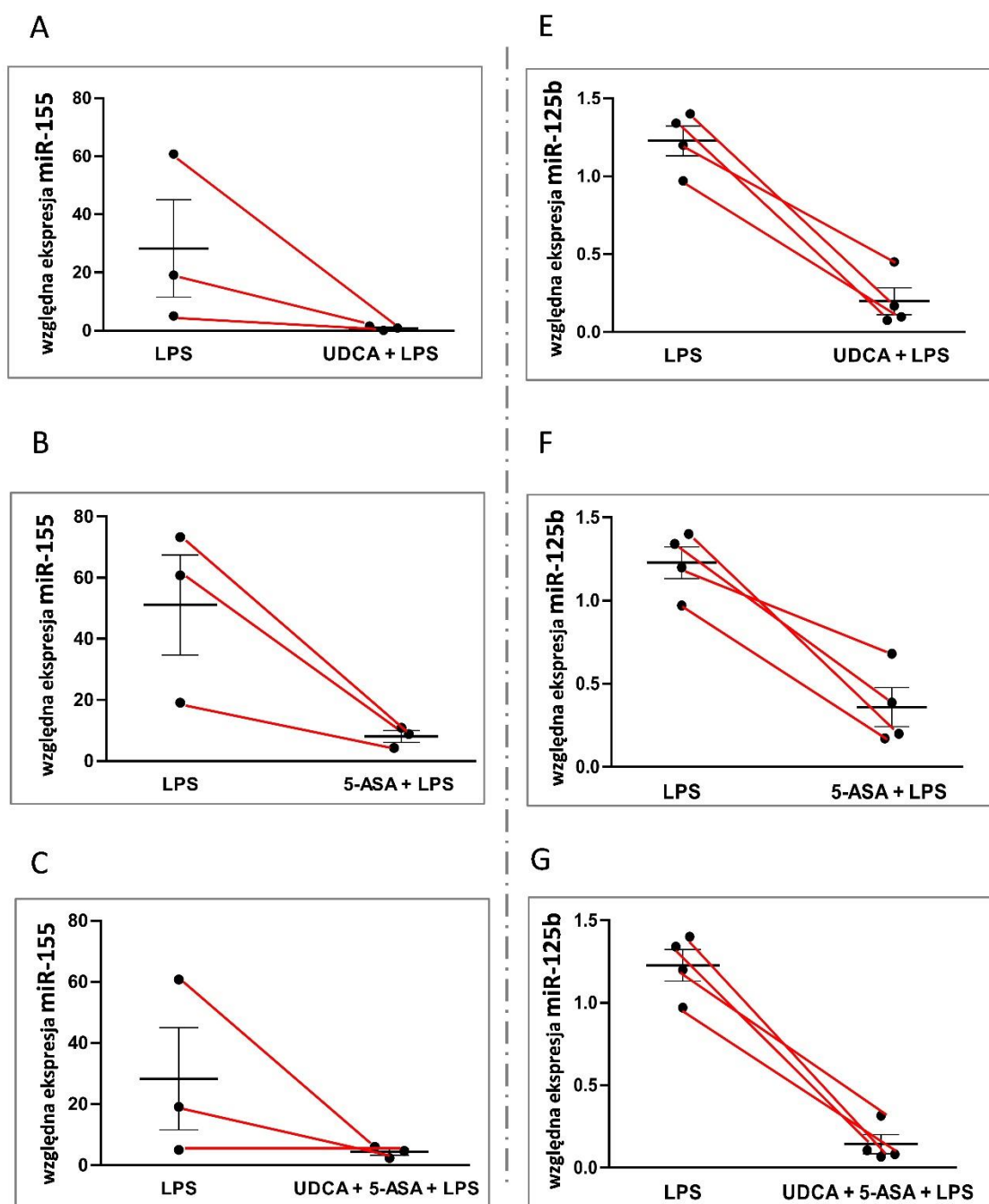


Rycina 13. Wpływ działania leków UDCA i/lub 5-ASA w zaindukowanym stanie zapalnym na poziom ekspresji miR-155 oraz miR-506 w komórkach H69

4.9. Wpływ kwasu ursodeoksycholowego i kwasu 5-aminosalicylowego na ekspresję miR-155 i miR-506 w komórkach HepG2 z zaindukowanym stanem zapalnym

W badaniach na komórkach HepG2 wykazano, że poziom miR-155 obniżył się w komórkach eksponowanych na UDCA ($p=0,04$) (Rycina 14A). Ponadto zaobserwowano tendencję spadkową miR-155 po samym 5-ASA (Rycina 14B) oraz w skojarzeniu z UDCA (Rycina 14C). Zarówno UDCA jak i 5-ASA obniżył ekspresję miR-125b w każdej pojedynczej próbie ($p=0,0002$ UDCA z LPS vs, LPS; $p=0,001$ 5-ASA z LPS vs, LPS; ($p=0,0001$ UDCA z 5-ASA z LPS vs, LPS) (Rycina 14E, F, G).

HepG2



Rycina 14. Wpływ działania leków UDCA i/lub 5-ASA w zaindukowanym stanie zapalnym na poziom ekspresji miR-155 oraz miR-125b w komórkach HepG2

4.10. Przejściowa transfekcja wybranych miRNA w komórkach Caco-2 i HepG2 (Na podstawie publikacji Adamowicz i wsp. *5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. J Physiol Pharmacol. 2021* oraz Adamowicz i wsp. *Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022*)

W celu potwierdzenia relacji miRNA a docelowy transkrypt mRNA wykonano przejściową transfekcję naśladujących i hamujących miRNA na komórkach jelitowych Caco-2. Skuteczność nadekspresji jak i supresji poziomu miR-125b oraz miR-155 potwierdzono reakcją PCR w czasie rzeczywistym. Eksperymentalnie wywołana indukcja miR-125b prowadziła do obniżenia poziomu ekspresji docelowego transkryptu VDR ($p=0.03$) (Figura 1B przedstawiona w drugiej publikacji z cyklu). Wywołana *in vitro* nadekspresja miR-155 wiązała się z obniżeniem ekspresji SOCS1 ($p=0.003$), podczas gdy inhibicja ekspresji tego miRNA przez specyficzny inhibitor miR-155 zwiększyła poziom SOCS1 mRNA ($p=0,04$) (Figura 3B z drugiej publikacji z cyklu). Co więcej eksperymentalne zahamowanie miR-155 wiązało się ze wzrostem S1PR1. (Figura 5A opublikowana w trzeciej publikacji z cyklu).

Przejściową transfekcję postanowiono również przeprowadzić na komórkach linii hepatocytów (HepG2) i cholangiocytych (NHC) w celu potwierdzenia zależności pomiędzy miR-155, a PPAR α . Nadekspresja miR-155 za pośrednictwem egzogenego miR-155 prowadziła do spadku PPAR α w komórkach HepG2 ($p=0,02$), lecz nie w linii NHC (Figura 3 A przedstawiona w pierwszej publikacji z cyklu).

5. DYSKUSJA

Ostatnie doniesienia literaturowe sugerują, że miRNA mogą być regulowane przez wpływy epigenetyczne, w tym przez leki: kwas ursodeoksycholowy i kwas 5-aminosalicylowy stosowane w autoimmunologicznych cholestatycznych chorobach wątroby. Badania na modelu szczurzym przeprowadzone przez Castro i wsp. [152] wykazały, że kwas UDCA jest silnym modulatorem miRNA w wątrobie. Podanie leku wpłynęło na zmianę ekspresji dwudziestu czterech z trzydziestu dziewięciu badanych miRNA. W około połowie zmian, obserwowano podwyższoną ekspresję miRNA, a w przypadku trzynastu wykazano wyraźny spadek ekspresji. Szczególny wpływ UDCA zaobserwowano w zmianie poziomu miR-21, który został eksperymentalnie zaindukowany zarówno w regenerującej się szczurzej tkance wątrobowej po częściowej hepatektomii, jak i *in vitro* w hodowanych komórkach wątrobowych HepG2. Z kolei Huang i wsp. [154] udowodnili zmniejszenie ekspresji miR-21 po ekspozycji na UDCA w modelu uszkodzenia tętnicy szyjnej szczura, jednocześnie wykazując, że lek nie miał wpływu na zmianę ekspresji miR-495 i miR-221. W badaniach na myszach z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby, UDCA modulował ekspresję miR-34a. Związek hamował poziom miR-34a o prawie 40% w szczurzej wątrobie oraz o 50% w hodowanych pierwotnych hepatocytach [153]. Kim i wsp. [155] wykazali, że po 4 tygodniach leczenia UDCA w dawce 300 mg dwa razy dziennie, miR-122 uległ obniżeniu o 39%, a w 8 tygodniu o 42% w surowicy mężczyzn z zaburzeniami czynności wątroby. Udowodniono również modulacyjny wpływ leku 5-ASA, który standardowo podaje się pacjentom ze stanem zapalnym jelit (w tym chorym na PSC). Parenti i wsp. [89] wykazali w badaniach *in vitro*, że ekspozycja komórek jelitowych Caco-2 na 5-ASA hamuje ekspresję miR-130a i miR-135b. Minacapelli i wsp. [156] przeprowadzili natomiast analizę biopsji jelita grubego pacjentów chorych na UC leczonych 5-ASA. Zaobserwowano istotnie niższą ekspresję miR-206 u pacjentów, którzy otrzymywali wyższą dawkę leku. Wyniki te zostały potwierdzone w ludzkiej linii komórkowej raka jelita grubego - HT29, gdzie prawie dwukrotny spadek ekspresji miR-206 zaobserwowano po 4 godzinnej ekspozycji na 5-ASA.

Dotychczasowe badania prowadzone przez nasz zespół, wykazały odmienny profil ekspresji: miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 w tkankach wątroby lub jelit pacjentów chorych na PBC i PSC [147–151]. Mając na uwadze

doniesienia

o możliwej modulacji miRNA przez leki, oraz fakt, że włączeni do naszych badań pacjenci leczeni byli UDCA i/lub 5-ASA, istotnym problemem badawczym było poznanie wpływu ww. leków na te miRNA, które są kluczowe w przebiegu autoimmunologicznych cholestazy chorób wątroby.

Ze względu na pionierski charakter niniejszych badań, dobór i zastosowanie wyselekcjonowanych, różnorodnych linii komórkowych był kluczowy na etapie planowania eksperymentów. Badania miały charakter wielopłaszczyznowy, ponieważ zostały przeprowadzone przy użyciu: komórek wątrobowych (HepG2), komórek przewodów żółciowych (H69, NHC) oraz komórek jelitowych (Caco-2). Wybrane linie komórkowe reprezentują komórki dotknięte procesem chorobowym w przebiegu rozwoju chorób PBC i PSC.

Hodowle komórkowe *in vitro* są powszechnie wykorzystywanymi modelami służącymi badaniu czynników farmakologicznych. Na ich podstawie można zidentyfikować mechanizmy oddziaływania leków oraz zbadać odpowiedź na te związki na poziomie komórkowym. Co więcej, przeprowadzenie eksperymentów w ściśle kontrolowanych warunkach *in vitro* redukuje potencjalne, interferujące czynniki, które mogłyby mieć wpływ przy zastosowaniu innego typu badania np. *in vivo*. Z tego względu, wybór niniejszego modelu doświadczalnego pozwolił w wiarygodny i znaczący sposób odzwierciedlić wpływ leczenia UDCA i 5-ASA na ekspresję wybranych miRNA.

Literatura przedmiotu wskazuje na zaburzoną ekspresję miR-125b w chorobach wątroby. Sugerowano, że niska ekspresja tego miRNA może hamować proliferację komórek oraz indukować apoptozę w hepatocytach PBC [162]. W badaniach na modelu zwierzęcym, Kennedy i wsp. [163] wykazali, że w mysich cholangiocytych we wczesnym stadium PBC wzmożona sygnalizacja sekretyny obniżyła poziom miR-125b, które promowało cechy starzenia się komórek dróg żółciowych i procesy włóknienia wątroby. Z drugiej strony, sugeruje się, że dysfunkcja hormonów płciowych może przyczyniać się do rozwoju PBC, gdyż większość zachorowań obserwuje się wśród pacjentów płci żeńskiej. Prekursor estradiolu, dehydroepiandrosteron (DHEA) może zapobiegać szkodliwemu działaniu niektórych potencjalnie toksycznych kwasów żółciowych i reaktywnych form tlenu, opóźniając początek choroby wątroby [164]. Zang i wsp. [165] wykazali, związek pomiędzy estrogenem a miR-125b w kontekście niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Iniekcja dootrzewnowa estradiolu spowodowała znacząco zwiększone poziomy miR-125b w wątrobach myszy C57BL/6J. Obserwacje te badacze

potwierdzili w badaniach *in vitro*. Komórki HepG2 i pierwotne hepatocyty mysie poddane działaniu estrogenu wykazały zwiększoną ekspresję miR-125b w sposób zależny od dawki. Doniesienia Sakamoto [162] wykazało znaczące różnice w profilu ekspresji miRNA u chorych na PBC z nieadekwatną odpowiedzią na terapię UDCA. MiR-125b może być potencjalnym biomarkerem opornego na leczenie typu PBC, ze względu na obniżoną ekspresję w tej grupie badanych. MiR-125b został uprzednio powiązany z modulacją CYP24A1 (należącego do rodziny cytochromów P450), przez co może indukować oporność na leki [166]. Jednak w badaniach Sakamoto, prawie połowa z włączonych do badania pacjentów, otrzymywała dodatkowy lek - bezafibrat, który również mógł wpływać na miR-125b [162]. W badaniach własnych, ekspozycja komórek hepatocytów HepG2 na kwas UDCA w dawce 50 μ M obniżyła o prawie połowę wyjściowy poziom ekspresji miR-125b, jednak nie zaobserwowano podobnych zmian przy dawce 150 μ M. Ponadto, w eksperymentach przeprowadzonych na cholangiocytach NHC oraz H69, poziom miR-125b był zbliżony do grupy kontrolnej. Badania własne, po raz pierwszy, przedstawiają zależny od dawki, wpływ UDCA na obniżenie ekspresji miR-125b.

Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały podwyższoną ekspresję miR-150 w tkance wątrobowej chorych na PBC oraz w surowicy u AMA ujemnych pacjentów [147]. Rola miR-150 związana jest głównie z bezpośrednim obniżeniem aktywności cMyb, znaczącego czynnika transkrypcyjnego kontrolującego wiele etapów rozwoju limfocytów. Podczas progresji PBC obserwowany jest naciek komórek zapalnych takich jak limfocyty T oraz NK. cMyb jest także ekspresjonowany w wątrobowych komórkach gwiazdzistych (*hepatic stellate cells*, HSC), w których pełni znaczącą rolę w aktywacji i proliferacji tych komórek. Venugopal i wsp.[167] wykazali, że miR-150 poprzez zmniejszenie ekspresji c-Myb może częściowo regulować aktywację HSC i procesy włóknienia wątroby. Ze względu na zaangażowanie miR-150 w powyższe procesy postanowiono włączyć to miRNA do badań własnych i sprawdzić wpływ UDCA na jego ekspresję. W niniejszych badaniach wykazano, że miR-150 nie uległ zmianie pod wpływem ekspozycji na UDCA w żadnej z badanych linii komórkowych. Sakamoto i wsp. [162] twierdzili, że miR-150 był jednym spośród 34 badanych miRNA, którego ekspresja była podwyższona u pacjentów chorych na PBC z nieadekwatną odpowiedzią na terapię UDCA. Porównując te doniesienia z naszymi badaniami, wydaje się, że UDCA może nie mieć modulującego wpływu na miR-150.

MiR-155 był jednym z najwcześniej zidentyfikowanych modulatorów odpowiedzi immunologicznej oraz rozwoju reakcji autoimmunologicznych. Jego rola przejawia się poprzez uczestnictwo w różnicowaniu komórek prozapalnych [168]. Ponadto może kształtować sygnalizację cytokin [169]. Wpływ miR-155 nie ogranicza się jedynie do komórek odpornościowych, ale także dotyczy komórek miększu wątroby, w tym hepatocytów. MiR-155 jest znany z pełnienia funkcji plejotropowych, w zależności od etiologii i kontekstu choroby. Wykazano, że miR-155 kontroluje szlaki funkcjonalne w wątrobie związane z odpowiedzią na uraz, zapalenie, stłuszczenie, zwłóknienie, czy procesy nowotworzenia [170]. Podwyższoną ekspresję miR-155 potwierdziły badania przeprowadzone u pacjentów z alkoholową marskością wątroby [171] oraz z niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby [172]. Liczba doniesień na temat roli miR-155 w autoimmunologicznych cholestatycznych chorobach jest znacznie ograniczona. Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały podwyższoną ekspresję miR-155 w tkance wątrobowej pacjentów z PBC w porównaniu do grupy kontrolnej oraz w stosunku do chorych na PSC. Jednocześnie zaobserwowano obniżenie receptora witaminy D (*vitamin D Receptor*, VDR) oraz spadek ekspresji białka supresora sygnalizacji cytokin (*Suppressor of cytokine signaling 1*, SOCS1). W przeciwieństwie do PBC, w biopsjach wątroby PSC ekspresja białka VDR była porównywalna do grupy kontrolnej osób zdrowych. Ponadto, zaobserwowano wzrost poziomu SOCS1 przy niezmienionej ekspresji miR-155. Powyższe wyniki podkreślają odmienny charakter obu chorób cholestatycznych. Zaangażowanie miR-155 w szlaku sygnałowym łączącym VDR z SOCS1 wpływa na niewyciszoną ekspresję cytokin prozapalnych, co z kolei skutkuje utrzymaniem odpowiedzi zapalnej w PBC [173]. Mając powyższe na uwadze, obniżenie miR-155 u tych chorych może być istotnym celem terapeutycznym. W badaniach własnych wykazano, że UDCA miał wpływ na obniżenie miR-155 w sposób zależny od dawki. W komórkach wątrobowych HepG2, 50 μ M UDCA obniżył ekspresję miR-155, podczas gdy po wyższej dawce poziom tego miRNA był porównywalny do komórek kontrolnych. Pomimo iż w cholangiocytach H69 nie zaobserwowano znaczącego wpływu badanego leku, to w komórkach NHC ekspozycja na 150 μ M UDCA znacząco zmniejszyła bazową ekspresję miR-155 [148]. Wpływ UDCA na miR-155 w hepatocytach i cholangiocytach przedstawiono w pierwszej publikacji z cyklu, *Adamowicz et al. Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. 2022*. Wyniki badań podkreślają nową biologiczną funkcję UDCA jako modulatora miR-155 w komórkach wątrobowych oraz

przewodach żółciowych i wydają się uzupełniać obserwacje innych autorów o potencjalnie kluczowym wpływie obniżenia ekspresji miR-155 u chorych na PBC.

W badaniach własnych, wpływ UDCA na wybrane miRNA obserwowany był w hepatocytach HepG2 i cholangiocytach NHC oraz H69, lecz nie w komórkach jelitowych Caco-2. Działanie ochronne leku przejawia się głównie w komórkach wątroby (hepatocytach oraz cholangiocytach), m.in. poprzez zastępowanie bardziej toksycznych kwasów żółciowych hydrofilowym UDCA [174]. W surowicy pacjentów chorych na PBC [41] i PSC [42] poddanych leczeniu, wykazano, że głównym składnikiem puli kwasów żółciowych jest koniugat UDCA z glicyną, który wraz z niesprężoną formą oraz pochodną związaną z tauryną, stanowią około połowę całkowitej puli kwasów żółciowych. Znaczące zmiany stosunku hydrofobowych do hydrofilowych BA wykazano u pacjentów chorych na PSC po zaprzestaniu terapii [42]. UDCA i jego pochodne zmniejszyły się do 1,7% całkowitej puli BA, podczas gdy pozostała część stanowiły pierwotne oraz wtórne kwasy żółciowe. Zaobserwowano ponadto nagromadzenie koniugatów tauryny: TCA, TCDCA i TDCA. Zhang i współ. [175] wykazali, że kwas TCA indukował ekspresję miR-155 w mysich cholangiocytach oraz hepatocytach, co sprzyjało cholestatycznemu uszkodzeniu wątroby. UDCA poprzez modulację puli BA może również wykazywać pośredni wpływ na spadek poziomu miR-155. Korzystny wpływ UDCA wynikający z obniżenia miR-155 wydaje się być zgodny z naszymi doniesieniami.

W regulacji funkcji cholangiocytołów najbardziej kluczowy jest miR-506. Pomimo iż komórki nabłonka dróg żółciowych stanowią zaledwie 3-5% populacji komórek wątroby, biorą one aktywny udział w produkcji żółci, regulując transport wody oraz jonów HCO₃⁻ poprzez transportowe białko wymiany anionowej 2 (*anion exchange protein 2*, AE2). Banales i wsp. [51] wykazali, że miR-506, który ulega nadekspresji w wewnątrzwątrobowych przewodach żółciowych chorych na PBC wykazuje zdolność wiązania się specyficznie z regionem UTR AE2 mRNA, zapobiegając translacji tego białka i upośledzając funkcje wydzielnicze dróg żółciowych. Erice i wsp. [176] wykazali natomiast, że cytokiny prozapalne takie jak: IL-8, IL-12, IL17, IL-18 i TNF- α , które są zaangażowane w modulację odpowiedzi immunologicznej i progresję choroby PBC, są zdolne stymulować aktywność promotora miR-506. Eksperymentalna nadekspresja miR-506 w cholangiocytach H69 prowadziła do rozwoju cech obserwowanych w przebiegu PBC takich jak: podwyższenie markerów prozapalnych i profibrotycznych, upośledzenie proliferacji i adhezji komórek oraz zaburzenie mitochondrialnego

metabolizmu energetycznego. Erice i wsp. [176] wykazali, że 100 μM UDCA nie miał wpływu na aktywność promotora miR-506 w ludzkich cholangiocytach H69. Wyniki badań własnych wykazały, że ekspozycja na związek UDCA w dawce 150 μM obniżyło bazalną ekspresję miR-506 zarówno w komórkach H69 jak i w NHC. Co ciekawe, dawka 50 μM , lecz nie 200 μM , zmniejszyła poziom tego miRNA w hepatocytach HepG2. Obserwacja ta może mieć szczególne znaczenie nie tylko w kontekście ochronnego działania UDCA na cholangiocyty poprzez oddziaływanie na miR-506, lecz również w zapobieganiu procesom nowotworzenia. Dysregulacja tego miRNA została zaobserwowana w wielu typach nowotworów. Erice i wsp. [176] wykazali, że miR-506 indukował uszkodzenia DNA w cholangiocytach. Z drugiej strony istnieją również doniesienia, o jego supresyjnym działaniu na procesy proliferacyjne i proapoptotyczne w raku wątrobowokomórkowym. Odmienna ekspresja cząsteczek miRNA obserwowana w różnym stopniu zaawansowania stanu zapalnego, rozwoju dysplazji, czy kancerogenezy [177], podkreśla ich regulacyjną rolę, która ma kluczowe znaczenie w utrzymywaniu homeostatycznego balansu w organizmie. Uzyskane wyniki własne wydają się dostarczać nowego spojrzenia na modulacyjną rolę UDCA i konieczność doboru odpowiedniej, korzystnej terapeutycznie dawki, która ochroni cholangiocyty przed skutkami nadmiernej ekspresji miR-506 i podtrzyma jego odpowiedni poziom, zapobiegając zapoczątkowaniu zmian dysplastycznych. Jednakże wyjaśnienie przyczyn zaobserwowanego zjawiska wymaga dalszych badań.

Obecnie brakuje analiz *in vitro* oraz *in vivo* dotyczących wpływu związku UDCA na poziom ekspresji miRNA u chorych z zaburzeniami funkcji wątroby wraz ze współtowarzyszącą chorobą zapalną jelit. Ze względu na brak podobnych doniesień, lecz zauważalną rolę UDCA w leczeniu IBD [178], uzasadnione było sprawdzenie jego modulującego wpływu także w komórkach jelitowych. W badaniach własnych wykazano po raz pierwszy, że UDCA nie wpływał bezpośrednio na zmianę ekspresji żadnego z wybranych miRNA w linii komórek nabłonka jelita grubego Caco-2. Wcześniejsze prace naszego zespołu [149,150] wykazały szczególne zaangażowanie miR-346 oraz miR-506 w modulację procesów zapalnych i nowotworowych u pacjentów chorych na PSC z chorobą zapalną jelit (PSC-UC). Lokalizacja zmian ekspresji onkogenego miR-346 uzależniona była od badanej części jelita grubego. W okrężnicy wstępującej pacjentów chorych na PSC-UC, miR-346 ulegał nadekspresji, podczas gdy bez współistniejącego UC, zmiany te zaobserwowano w okrężnicy esowatej. Również stwierdzono, że znaczny wzrost ekspresji miRNA-346 we wstępującej części jelita może

być odpowiedzialny za modulację docelowych transkryptów VDR i TNF- α oraz tłumienie odpowiedzi ochronnych. Zaburzenie szlaku sygnałowego VDR i TNF- α , może skutkować nieadekwatną supresją procesu nowotworowego u tych pacjentów. Badania pokrywają się z obserwacjami klinicznymi, gdyż pacjenci PSC-UC charakteryzują się częstszymi zmianami zapalnymi i nowotworowymi zlokalizowanymi w prawej części okrężnicy. Co więcej, w okrężnicy wstępującej pacjentów z PSC zwiększony poziom miR-346 związany był ze zmniejszoną ekspresją p27^{Kip1}, genu supresorowego i regulatora proapoptotycznego cyklu komórkowego, który ulega obniżeniu w kilku typach nowotworów, w tym CRC [179]. Delecja p27^{Kip1} wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentów z rakiem jelita grubego w II i III stopniu zaawansowania [180]. Mając na uwadze znaczącą rolę miR-506 w cholangiocytach [51], w ramach kontynuacji badań nad autoimmunologicznymi cholestazycznymi chorobami wątroby, prace naszego zespołu skupiły się również na zbadaniu ekspresji tego miRNA w tkance jelitowej pacjentów chorych na PSC. Podobnie jak miR-346, miR-506 był znacząco podwyższony w okrężnicy wstępującej chorych na PSC- UC [150]. Towarzyszyła temu zmniejszona ekspresja białka AE2 oraz receptora inozytolo-1,4,5-trójfosforanu (InsP3R3) w tej części jelita, co może być odpowiedzialne za destabilizację ochronnych mechanizmów skierowanych przeciwko toksycznym kwasom żółciowym. Co więcej, zahamowanie ścieżki SPHK1/SPL/p53 przez miR-506 może promować transformację nowotworową we wstępnicy. Odmienne wzorce ekspresji zaobserwowano u tych samych pacjentów w okrężnicy esowatej, gdzie spadek miR-506 doprowadza do niedostatecznego wyciszenia ww. ścieżki prowadząc do inicjacji reakcji zapalnych [150]. Wykluczenie modulującego wpływu leku UDCA na te miRNA w badaniach własnych jest znaczące i może potwierdzać, że obserwowane zmiany w ekspresji profili tych niekodujących cząsteczek RNA mogą wynikać z ich zaangażowania w proces chorobowy. Jest to szczególnie ważne przy rozpatrywaniu tych miRNA jako potencjalnie przyszłych celów interwencji farmakologicznej. Z drugiej strony, utrzymanie ekspresji miRNA na poziomie zbliżonym do kontroli może wynikać z protekcyjnego działania UDCA, który chroni przed wzrostem onkogennych miRNA i nowotworzeniem. Szczegółowy mechanizm leżący u podstaw tego wpływu wymaga jednak dalszych badań.

Kolejnym istotnym etapem niniejszych badań, było sprawdzenie, czy stan zapalny leżący u podstaw patogenezy PBC i PSC moduluje ekspresję wybranych miRNA. Oceniono wpływ stosowanej terapii w warunkach aktywnego zapalenia. Lipopolisacharyd wytwarzany przez bakterie gram-ujemne jest induktorem odpowiedzi

immunologicznej w organizmie, stąd jest powszechnie stosowany do wywoływania stanów zapalnych *in vivo* oraz *in vitro*. We wcześniejszych badaniach naszego zespołu zaobserwowaliśmy, że wywołana lipopolisacharydem odpowiedź zapalna zmniejszyła ekspresję miR-506 i zwiększyła poziom jego docelowych transkryptów (SPHK1, DNMT1, AE2 i InsP3R3) [176]. Kontynuacja badań i zwiększenie liczby eksperymentów po ekspozycji na LPS komórek jelitowych Caco-2 wykazała brak zmian w ekspresji miR-506, jak również brak zmian poziomu pozostałych wybranych do badań miRNA. Niedostateczny wpływ na zmiany miRNA w komórkach Caco-2 wiąże się najprawdopodobniej ze względną hiporeaktywnością na LPS. Simiantonaki i wsp. [181] wykazali, że traktowanie komórek Caco-2 lipopolisacharydem może zaindukować wzrost ekspresji jego głównego receptora TLR4, którego ekspresja była pierwotnie wyciszona w grupie niestymulowanych komórek, co może potwierdzać wcześniejsze obserwacje o podwyższonej ekspresji miR-506. Hsu i wsp. [182] również wykazali, że TLR4 jest ekspresjonowany w komórkach Caco-2, jednak repertuar tych cząsteczek sygnalizujących jest znacznie ograniczony w porównaniu z innymi liniami jelitowymi. W celu potwierdzenia tych doniesień, zbadano ekspresję na poziomie mRNA prozapalnej cytokiny TNF α , oraz ZC3H12A, który należy do genów odpowiedzi zapalnej. W obu przypadkach, ekspresja ww. markerów zapalnych na poziomie mRNA w komórkach Caco-2 utrzymywała się na porównywalnym poziomie w odniesieniu do nietraktowanych komórek z grupy kontrolnej. Brak reakcji na LPS wynika najprawdopodobniej ze zmniejszonej ekspresji białka TLR4 w tej linii komórkowej, co potwierdza się z licznymi doniesieniami literaturowymi [161,183,184]. Wyniki badań własnych podkreślają konieczność dalszego poszukiwania odpowiedniego modelu komórkowego do badań nad funkcją leków w stanie zapalnym jelit.

W przeciwieństwie do komórek jelita Caco-2, zarówno hepatocyty HepG2 jak i cholangiocyty NHC oraz H69 wykazały wzrost TNF α lub ZC3H12A po ekspozycji na LPS. Wyniki te wydają się być zgodne z doniesieniami innych autorów o pozytywnej odpowiedzi tych linii komórkowych na stymulację lipopolisacharydem [185,186]. Ponadto, badania własne wykazały specyficzny profil ekspresji wybranych miRNA w powyższych komórkach po zaindukowaniu stanu zapalnego. W pierwotnych cholangiocytach NHC ekspozycja na LPS wykazała spadek miR-346, podczas gdy w nieśmiertelnej, ale nie nowotworowej linii cholangiocytołów H69 obserwowany spadek dotyczył miR-155 oraz miR-506. W komórkach wątrobowych HepG2 po LPS, miR-155 uległ znaczącej indukcji, podczas gdy ekspresja miR-346 i miR-506 była

poniżej progu detekcji. Biorąc pod uwagę, rozregulowaną pod wpływem lipopolisacharydu ekspresję miRNA w cholangiocytych i hepatocytach, w dalszych badaniach sprawdzono wpływ UDCA na wybrane miRNA podczas zaindukowanego zapalenia. Lek obniżył ekspresję miR-346 w NHC oraz miR-125b w HepG2, lecz nie miR-506 w H69. Podwyższona ekspresja miR-155 w tkance wątrobowej została odnotowana w różnych chorobach zapalnych wątroby [187,188]. Ze względu na szczególną rolę miR-155, postanowiono sprawdzić wpływ UDCA na to miRNA we wszystkich badanych liniach komórkowych z zaindukowanym eksperymentalnie stanem zapalnym. Niniejsze badania wykazały, że UDCA obniżył ekspresję miR-155 w każdej pojedynczej próbie badanej z trzech linii komórkowych. Należy podkreślić, że niniejsza dysertacja jest oryginalnym osiągnięciem, które przybliży nowe, nie badane dotąd znaczenie UDCA w kwestii modulacji epigenetycznej. Dalsze eksperymenty wykazały, że w komórkach HepG2 z zaobserwowaną nadekspresją miR-155 po LPS dochodzi do stłumionej ekspresji PPAR α . Wyniki tych badań zostały przedstawione w pierwszej publikacji z cyklu [148].

PPAR α odgrywa znaczącą rolę w homeostazie kwasów żółciowych, oraz wykazuje ochronne działanie przeciwko zapaleniu i apoptozie [189]. U chorych na PBC, terapię wspomagającą UDCA oparte na agonistach PPAR, m.in. bezafibratach i fenofibratach, mają korzystne działanie poprzez normalizację poziomu ALP w surowicy pacjentów [61]. W pierwszej oryginalnej publikacji z cyklu [148], badania na komórkach HepG2 wykazały, że supresji miR-155 po ekspozycji na UDCA, towarzyszyło podwyższenie PPAR α . Dodatkowo funkcjonalne analizy *in vitro* potwierdziły bezpośrednią zależność pomiędzy miR-155, a docelowym transkryptem. UDCA poprzez zmniejszenie ekspresji miR-155 zapobiegał mediowanemu przez zapalenie spadkowi PPAR α . Jest to warta uwagi obserwacja, która uwidacznia nową, pozytywną rolę leku i podkreśla ważność przedstawionych badań.

Drugą część badań własnych poświęcono 5-ASA. W związku z tym, że mesalazyna (monomer kwasu 5-aminosalicylowego) jest metabolizowana w ścianie jelita oraz w wątrobie, postanowiono sprawdzić wpływ 5-ASA na wybrane miRNA w modelu komórkowym cholangiocytych (NHC, H69) oraz hepatocytów (HepG2). W niniejszych badaniach 5-ASA obniżył ekspresję miR-125b, miR-155, miR-346 i miR-506 w komórkach dróg żółciowych lub wątrobowych. W obu typach cholangiocytych zaobserwowano podobny profil cząsteczek miRNA, zarówno po samym 5-ASA, jak i łącznej ekspozycji tego związku z UDCA. W komórkach HepG2, 5-ASA

wywołał zmiany wyjściowej ekspresji wybranych miRNA, ale obserwowany profil nie pokrywał się ze wzorcem obecnym w komórkach NHC i H69. W wątrobie hepatocyty i cholangiocyty pełnią bardzo różne funkcje, co może mieć związek z odmienną ekspresją wyjściową i rolą miRNA. 5-ASA sam oraz w połączeniu z UDCA obniżał miR-125b, miR-155 oraz miR-346 w powyższych modelach komórkowych z zaindukowanym stanem zapalnym. Mając na uwadze wcześniej wspomnianą rolę miRNA w tych typach komórek, niniejsze badania wydają się potwierdzać korzystne, przeciwzapalne działanie leków UDCA i 5-ASA. Chociaż należy podkreślić, że 5-ASA jest lekiem działającym głównie na jelito grube, dlatego funkcjonalny wpływ tego leku na badane przez nas miRNA przejawia się najprawdopodobniej lokalnie. Co więcej, obecnie tworzone są coraz nowsze preparaty 5-ASA różniące się zarówno drogą podania jak i postacią, co ma na celu zapewnić jak najefektywniejszą podaż leku do konkretnych odcinków jelita grubego z aktywnym procesem zapalnym. W związku z tym, lek 5-ASA najprawdopodobniej wykazuje niewielki efekt na wybrane miRNA w wątrobie w warunkach *in vivo*.

Najważniejsza była analiza wpływ leku 5-ASA na wybrane miRNA w linii komórek jelitowych Caco-2. Wyniki tych eksperymentów zostały przedstawione w drugim artykule z cyklu: *Adamowicz et al. 5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. J Physiol Pharmacol. 2021*. W niniejszej publikacji opisano, że ekspresja miR-125b oraz miR-346 uległa znacznemu spadkowi pod wpływem wyższego stężenia 5-ASA (1000 μ M) w komórkach Caco-2. Jednocześnie, obniżonej ekspresji tych miRNA pod wpływem 5-ASA towarzyszyła indukcja ekspresji docelowego transkryptu VDR na poziomie mRNA. Badania relacji miRNA-VDR zostały więc potwierdzone analizami funkcjonalnymi z zastosowaniem przejściowej transfekcji. Nadekspresja zarówno miR-125b jak i miR-346 prowadziła do znacznego obniżenia ekspresji VDR [149,190]. Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi wykazującymi obniżenie ekspresji VDR przez miR-346 lub miR-125b [191,192]. Niniejsze wyniki są pionierskie i wskazują, że 5-ASA może indukować ekspresję VDR poprzez hamowanie wyżej wymienionych miRNA.

Witamina D jest bardzo ważna w modulacji odpowiedzi immunologicznych, a jej suplementacja wykazała korzystny wpływ na obniżenie jednego z podstawowych markerów stanu zapalnego - białka CRP, u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelit [193]. Większość procesów regulowanych przez witaminę D zachodzi poprzez jej

receptor VDR. Znaczenie genu *VDR* w etiopatologii autoimmunologicznych chorób wątroby powiązано z występowaniem polimorfizmów: *Bsm1*, *Apal*, *Taq1*. W poprzednich badaniach naszego zespołu wykazano zależność pomiędzy częstością występowania polimorfizmu *Apal*, a nasileniem objawów i pogorszeniem jakości życia chorych na PSC [19]. Szczególnie nosicielstwo allelu C było znacząco związane z nasileniem objawów. Ponadto porównując kwestionariuszową ocenę jakości życia (*health related quality of life*, HRQoL), obecność allelu C korespondowała z ograniczonym funkcjonowaniem fizycznym, emocjonalnym oraz sumaryczną komponentą zdrowia psychicznego i fizycznego. Powyższe doniesienia wskazują na znaczące zaangażowanie receptora witaminy D w mechanizmie patogenezy PSC. VDR może być również istotny w kontekście pacjentów chorych na PSC ze współistniejącym UC, gdyż ostatnie badania skupiają się na znaczącej roli tego receptora w utrzymaniu integralności nabłonka i funkcji bariery jelitowej [194]. Chen i wsp. [191] wykazali, że ekspresja VDR zmniejszała się wraz z postępem procesu zapalnego w eksperymentalnie zaindukowanym mysim modelu przewlekłego zapalenia jelita grubego. Kwas 5-aminosalicylowy jest również znany z korzystnego wpływu na homeostazę nabłonka jelitowego poprzez hamowanie wielu ścieżek, takich jak Wnt/ β -katenina, mTOR, ERK1/2, AKT1 i NF- κ B [195]. Modulacja VDR poprzez miR-125b i miR-346 może być kolejnym znaczącym szlakiem, którego regulacja świadczy o korzystnym działaniu leku 5-ASA poprzez mechanizmy epigenetyczne. Tym bardziej, że wcześniejsze badania naszego zespołu [149] wykazały związek niskiej ekspresji miR-346 ze wzrostem VDR u chorych na wrzodziejące zapalenie jelita grubego, którzy otrzymywali 5-ASA w dawce 2-3 g/dobę. MiR-346 ulegał nadekspresji w okrężnicy wstępującej u chorych na PSC-UC, co najprawdopodobniej jest powiązane z procesami nowotworzenia w tej części jelita. Utrzymanie poziomu miR-346 lub ograniczenie jego wzrostu przez 5-ASA może być przykładem chemoprewencyjnego działania leku. Konieczne jest jednak dalsze badanie potencjalnego znaczenia miR-346 oraz miR-125b u pacjentów chorych na PSC-UC, zwłaszcza w kontekście rozwoju CRC oraz ochronnego działania leku 5-ASA. Jak dotąd takie badania nie były przeprowadzone w żadnym ośrodku badawczym.

Wyniki prezentowanych badań w drugim artykule z cyklu, wykazały znaczący spadek miR-150 po ekspozycji komórek Caco-2 na dawki 500 μ M i 1000 μ M 5-ASA. Literatura przedmiotu wskazuje, że ekspresja miR-150 była podwyższona w objętej zapaleniem błonie śluzowej jelita grubego u pacjentów z UC, w porównaniu do fragmentów prawidłowej tkanki okrężnicy [196]. MiR-150 wykazując zdolność wiązania

się z regionem 3'UTR genu *c-Myb* reguluje pośrednio kluczowe procesy zaangażowane w różnicowanie komórek, proliferację i integralność krypt jelitowych [168,197,198]. Ochronne działanie 5-ASA poprzez inhibicję miR-150 może więc zapobiegać zaburzeniu funkcji bariery nabłonkowej i promować jej integralność. W związku z tym, znaczące wydaje się kontynuowanie badań nad wpływem 5-ASA na modulację miR-150 i docelowych transkryptów genów, w kontekście utrzymania prawidłowej bariery nabłonkowej jelita, chroniącej przed rozprzestrzenieniem lokalnych procesów zapalnych.

5-ASA jest lekiem rutynowo stosowanym u pacjentów z IBD w celu łagodzenia objawów zapalenia i utrzymania długotrwałej remisji choroby, ale istnieją również doniesienia o jego chemoprotekcyjnych właściwościach [199]. Z tego względu sprawdzono wpływ 5-ASA na ekspresję miR-506, który został wcześniej powiązany z różnymi typami nowotworów. Ponadto wykazano, że miR-506 był zaangażowany w przejście epitelialno-mezenchymalne, które promuje powstawanie przerzutów podczas progresji nowotworów [200]. Wyniki badań przedstawionych w drugiej publikacji z cyklu wykazały, że ekspozycja komórek jelitowych na większą dawkę 5-ASA (1000 μ M) zmniejszyła ekspresję miR-506, co jednocześnie towarzyszyło zwiększonej ekspresji docelowego genu, metylotransferazy DNA 1 na poziomie mRNA. Podobny wzorzec zaobserwowaliśmy w poprzednich badaniach naszego zespołu w okrężnicy wstępującej i esowatej pacjentów z UC leczonych 5-ASA [150]. DNMT1 należy do białek enzymatycznych, regulujących proces metylacji DNA. Zaburzenia tego procesu wynikające z hiperekspresji genu kodującego enzym DNMT1 lub utraty jego działania zostały powiązane z transformacją nowotworową [201]. Do tej pory nikt inny nie badał relacji miR-506 i DNMT1 w tkankach pacjentów z PSC i występującą dysplazją lub CRC. Na podstawie uzyskanych wyników, znaczące może być ustalenie ewentualnej roli obserwowanej indukcji DNMT1 w odpowiedzi na leczenie 5-ASA.

Dalsze badania nad modulacyjnym wpływem 5-ASA skoncentrowały się na wielofunkcyjnym miR-155. Jego zwiększoną ekspresję wykazano w błonie śluzowej jelita grubego [202] oraz we krwi [203] i kale [204] pacjentów w aktywnej fazie choroby UC. Co więcej, w trzeciej publikacji z cyklu: *Adamowicz et al. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. Int J Mol Sci. 2022*, po raz pierwszy wykazano podwyższoną ekspresję miR-155 w okrężnicy wstępującej pacjentów z PSC-UC. Prozapalne właściwości miR-155 powiązano również z aktywacją szlaku sygnalizacyjnego czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B), który odgrywa znaczącą rolę

w progresji zapalenia jelit [205]. Sugeruje się, że miR-155 działa jako węzeł regulacyjny, łączący zapalenie i nowotworzenie. El-Daly i wsp. [206] wykazali, że miR-155 może odgrywać kluczową rolę w progresji nowotworów jelita grubego związanych ze stanem zapalnym (*colitis-associated colorectal cancer*, CAC). Wykorzystując myszy model (AOM/DSS) autorzy wykazali, że ekspresja tego miRNA stopniowo rosła w miarę jak tkanka okrężnicy myszy przekształcała się ze stanu prawidłowego poprzez aktywny stan zapalny, aż do etapu nowotworowego. Podwyższoną ekspresję miR-155 wykazano również w ludzkich tkankach CRC, która korelowała z zaawansowaniem stadium klinicznego choroby oraz przerzutami odległymi [207]. Pacjenci z PSC mają zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów złośliwych, w tym raka jelita grubego zlokalizowanego w prawej części okrężnicy [208]. Chociaż mechanizm nowotworzenia został uprzednio powiązany z epigenetycznymi modyfikacjami, to badania nad rolą miRNA w patogenezie CRC u pacjentów chorych na PSC są nadal niewystarczające. Hu i wsp. [209] analizując dane z bazy *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* wykazali, że nowotwory jelita grubego z prawostronną lokalizacją ogniska pierwotnego cechują się znacznie podwyższoną ekspresją miR-155 w porównaniu do lewostronnej lokalizacji. Badania te są zgodne z naszymi doniesieniami, nad ekspresją miR-155 w tkance jelitowej pacjentów PSC - trzecia publikacja z cyklu [151]. W okrężnicy wstępującej miR-155 indukowany przez toksyczne BA hamował ekspresję SOCS1, co prowadziło do indukcji przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji 3 (*signal transducer and activator of transcription*, STAT-3) znanego z aktywacji pronowotworowych ścieżek prozapalnych [210]. W przeciwieństwie do okrężnicy wstępującej, w okrężnicy esowatej pacjentów chorych na PSC-UC brak nadekspresji miR-155 aktywował szlak sygnalizacyjny IL-6/S1PR1 i zaburzał równowagę stosunku IL17/FOXP3, co może wzmacniać przewlekłe zapalenie jelita grubego. Potencjalna rola miR-155 wydaje się być wieloaspektowa, gdyż w zależności od swoich genów docelowych, potęguje odpowiedzi prozapalne lub aktywność onkogeną [211–214]. W badaniach opublikowanych w drugiej publikacji z cyklu wykazano, że 5-ASA hamował miR-155 w komórkach jelitowych Caco-2 w sposób zależny od dawki. 5-ASA poprzez modulację miR-155 może pośrednio oddziaływać na wspomniane szlaki wykazując swoje ochronne działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Konieczne jest jednak dokładne określenie dawki leku, która jest wymagana do modulacji tego miRNA w warunkach klinicznych.

Szczególnym typem nowotworów są nowotwory z wysoką niestabilnością mikrosatelitarną (MSI-H), w której co najmniej dwa z pięciu markerów (MLH1, MSH2,

MSH6, PMS1 lub PMS2), wykazują niestabilność wynikającą z dysfunkcji systemu naprawy błędnie sparowanych nukleotydów DNA (mismatch repair, MMR). Nowotwory MSI-H występują głównie w proksymalnej części okrężnicy i stanowią około 15% raków jelita grubego [209]. Badania naszego zespołu wykazały zmniejszenie ekspresji MSH2 w okrężnicy wstępującej zarówno w PSC oraz w PSC-UC, a MSH6 w PSC-UC i MLH1 u chorych na PSC. Co więcej, patogeneza MSI-H u pacjentów z PSC w proksymalnej części okrężnicy była modulowana przez miR-155 [151]. Wyniki tych pionierskich badań zostały opublikowane w trzecim artykule z cyklu prezentowanych prac [151]. Powyższe obserwacje zostały potwierdzone w badaniach funkcjonalnych *in vitro*. W zdrowych komórkach nabłonkowych NCM460D, podwyższony poziom miR-155 hamował ekspresję MLH1, MSH2 i MSH6, co było jednocześnie związane z indukcją ekspresji p53, kluczowego regulatora cyklu komórkowego, naprawy DNA i apoptozy. Odwrotny efekt zaobserwowano w komórkach gruczolakoraka HT-29, co wskazuje na to, że miR-155 skuteczniej tłumy gen p53 w komórkach nowotworowych [151].

Co ciekawe, niedawno rozpoczęto wielośrodkowe badanie kliniczne II fazy nad wpływem mesalaminy w zapobieganiu neoplazji jelita grubego u pacjentów z zespołem Lyncha (zespół uwarunkowany mutacjami w genach związanych z naprawą niesparowanych zasad DNA). [215]. Mając na uwadze modulujący wpływ miR-155 na geny MRR [151] oraz kluczowe wyniki badań dotyczących zahamowania ekspresji miR-155 przez 5-ASA [190], ciekawym kierunkiem przyszłych badań może być sprawdzenie wpływu leczenia 5-ASA na system MMR poprzez modulację miR-155. Takie badania nie były jak dotąd przeprowadzone.

Podsumowując, zdolność miRNA do regulowania wielu genów, świadczy o ich zaangażowaniu w skomplikowanej sieci oddziaływań w organizmie. Zrozumienie pełnej roli miRNA w funkcjach komórkowych oraz procesach patologicznych, jak również zbadanie udziału czynników modulujących ich ekspresję stanowi molekularną podstawę do poznania etiopatogenezy chorób i rozwoju terapii celowanej. Dzięki nowoczesnym metodom inżynierii genetycznej prowadzone są badania kliniczne nad zastosowaniem syntetycznych mimetyków miRNA lub antagomirów, czyli oligonukleotydów komplementarnych do ich sekwencji [216]. Nadekspresja oraz hamowanie miRNA skutkuje odpowiednio wyciszeniem docelowych transkryptów mRNA lub prowadzi do blokowania funkcji miRNA, co umożliwia dalszą, niezakłóconą transkrypcję genów. Pomimo obiecujących wyników badań, kliniczne zastosowanie terapii opartej na miRNA nie zostało jeszcze wprowadzone.

W związku z tym, że leki stosowane w terapii autoimmunologicznych cholestatycznych chorób wątroby, są silnymi modulatorami transkrypcyjnymi [152,217], w niniejszej dysertacji zasadne było sprawdzenie, czy UDCA i 5-ASA bezpośrednio regulują ekspresję miRNA potencjalnie zaangażowanych w patogenezę cholestatycznych chorób wątroby. Pionierskie badania wykazały modulujący wpływ leków stosowanych jako „złoty standard” w leczeniu PBC i PSC na ekspresję miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506. Narzuca to konieczność uwzględnienia wpływu ww. leków w badaniach patomechanizmu tych chorób.

Na koniec należy wspomnieć, że zastosowany komórkowy model *in vitro* zapewnia ściśle kontrolowane i powtarzalne warunki eksperymentu. Mimo to opisane badania podlegają pewnym ograniczeniom, co uwzględnia m. in. dobór efektywnej dawki związku dla poszczególnych linii komórkowych i przełożenie dawki leków na warunki *in vivo* w zaprojektowanych eksperymentach. Ponadto, ograniczenia finansowe i czasowe nie pozwalały na identyfikację pełnego szlaku zależności pomiędzy wytypowanymi miRNA i ich docelowymi genami oraz badanymi lekami [166]. Jednak, z całą pewnością, uzyskane wyniki inspirują do kontynuacji rozpoczętych badań.

6. WNIOSKI

1. Wykazana *in vitro* możliwość modulacji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506 przez kwas ursodeoksycholowy i 5-aminosalicylowy daje potencjalną możliwość regulacji ekspresji docelowych transkryptów mRNA o znaczeniu strategicznym w patogenezie chlestatycznych chorób wątroby.
2. UDCA hamując ekspresję miR-155 może zapobiegać obniżeniu ekspresji PPAR α , co poszerza wskazania dla leku stosowanego w leczeniu pierwotnego zapalenia dróg żółciowych.
3. Wykorzystanie modulującego efektu 5-ASA na sygnalizację miR-155 może być potencjalną strategią w prewencji raka jelita grubego wykazującego wysoki stopień niestabilności mikrosatelitarnej u pacjentów chorych na stwardniejące zapalenie dróg żółciowych. Wymaga to jednak dalszych badań *in vitro* oceniających mechanizm działania leku w miejscu docelowym.

7. PIŚMIENICTWO

1. Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of Cholestatic Liver Disease and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1481–96.
2. Dienes HP, Lohse AW, Gerken G, Schirmacher P, Gallati H, Löhr HF, et al. Bile duct epithelia as target cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Virchows Arch*. 1997;431(2):119–24.
3. Vesterhus M, Nielsen MJ, Hov JR, Saffioti F, Manon-Jensen T, Leeming DJ, et al. Comprehensive assessment of ECM turnover using serum biomarkers establishes PBC as a high-turnover autoimmune liver disease. *JHEP Reports*. 2021;3(1):100178.
4. Lv T, Chen S, Li M, Zhang D, Kong Y, Jia J. Regional variation and temporal trend of primary biliary cholangitis epidemiology: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021;36(6):1423–34.
5. Cooper J, Markovinovic A, Coward S, Shaheen AM, Swain M, Panaccione R, et al. A211 Incidence of primary sclerosing cholangitis: A meta-analysis of population-based studies. *J Can Assoc Gastroenterol*. 2022;5(Suppl 1):98–9.
6. Milkiewicz P, Heathcote J. Primary biliary cirrhosis. in: diseases of the gallbladder and bile ducts. John Wiley & Sons, Ltd; 2006. p. 341–52.
7. Marchioni Beery RM, Vaziri H, Forouhar F. Primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: a review featuring a women's health perspective. *J Clin Transl Hepatol*. 2014;2(4):266–84.
8. John B V, Aitchison G, Schwartz KB, Khakoo NS, Dahman B, Deng Y, et al. Male sex is associated with higher rates of liver-related mortality in primary biliary cholangitis and cirrhosis. *Hepatology*. 2021;74(2):879–91.
9. Raszeja-Wyszomirska J, Wunsch E, Koziarska D, Milkiewicz P. Patogeneza zespołu przewlekłego zmęczenia w pierwotnej marskości żółciowej wątroby *Przegląd Gastroenterol*. 7, 192–196.
10. Raszeja-Wyszomirska J, Wunsch E, Krawczyk M, Rigopoulou EI, Kostrzewa K, Norman GL, et al. Assessment of health related quality of life in polish patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2016;40(4):471–9.
11. Liu Y, Han K, Liu C, Duan F, Cheng J, Yang S. Clinical characteristics and prognosis of concomitant primary biliary cholangitis and autoimmune diseases: a retrospective study. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2021;2021:5557814.
12. Natarajan Y, Tansel A, Patel P, Emologu K, Shukla R, Qureshi Z, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in primary biliary cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2021;66(7):2439–51.
13. Habior A, Hartleb M, Milkiewicz P, Gutkowski K, Cichoż-Lach H, Mach T, et al. Rekomendacje Sekcji Hepatologicznej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące cholestatycznych chorób wątroby - adaptacja wytycznych europejskich. *Gastroenterol Klin*. 2013;1(5):5–39.
14. Carey EJ, Ali AH, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 2015;386(10003):1565–75.
15. Kempinska-Podhorodecka A, Shums Z, Wasilewicz M, Wunsch E, Milkiewicz M, Bogdanos DP, et al. TRAF1 gene polymorphism correlates with the titre of Gp210 antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:487521.
16. Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet*. 2018;391(10139):2547–59.
17. Habior A. Pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych. *Gastroenterol Klin Postępy i Stand*. 2013;5(2–3):74–84.

18. Porayko MK, Wiesner RH, LaRusso NF, Ludwig J, MacCarty RL, Steiner BL, et al. Patients with asymptomatic primary sclerosing cholangitis frequently have progressive disease. *Gastroenterology*. 1990;98(6):1594–602.
19. Kempinska-Podhorodecka A, Milkiewicz M, Jabłonski D, Milkiewicz P, Wunsch E. ApaI polymorphism of Vitamin D receptor affects health-related quality of life in patients with primary sclerosing cholangitis. *PLoS One*. 2017;12(4).
20. Hov JR, Boberg KM, Karlsen TH. Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol*. 2008;14(24):3781-3791.
21. Tischendorf JJW, Meier PN, Strassburg CP, Klempnauer J, Hecker H, Manns MP, et al. Characterization and clinical course of hepatobiliary carcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41(10):1227–34.
22. Hartleb M, Krawczyk M, Wunsch E, Raszeja-Wyszomirska J, Cichoż-Lach H, Żorniak M, et al. Choroby cholestatyczne u dorosłych-wytyczne postępowania Sekcji Hepatologicznej PTG-E. *Med po Dyplomie*. 2018;27(12).
23. Trivedi PJ, Crothers H, Mytton J, Bosch S, Iqbal T, Ferguson J, et al. Effects of primary sclerosing cholangitis on risks of cancer and death in people with inflammatory bowel disease, based on sex, race, and age. *Gastroenterology*. 2020;159(3):915–28.
24. Uździcki AW, Wawrzynowicz-Syczewska M. Characteristic features of ulcerative colitis with concomitant primary sclerosing cholangitis. *Prz Gastroenterol*. 2021/09/17. 2021;16(3):184–7.
25. Krugliak Cleveland N, Rubin DT, Hart J, Weber CR, Meckel K, Tran AL, et al. Patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis frequently have subclinical inflammation in the proximal colon. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(1):68–74.
26. Loftus Jr E V, Harewood GC, Loftus CG, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2005;54(1):91–6.
27. Zagórowicz E, Albrecht P, i wsp. WB. Rekomendacje Sekcji Jelitowej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące aminosalicylanów we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego oraz dotyczące chemoprewencji raka jelita grubego w tej chorobie. *Gastroenterol Klin Postępy i Stand*. 2010;2(2):41–8.
28. Nakazawa T, Naitoh I, Hayashi K, Sano H, Miyabe K, Shimizu S, et al. Inflammatory bowel disease of primary sclerosing cholangitis: a distinct entity? *World J Gastroenterol*. 2014;20(12):3245–54.
29. Bajer L, Kverka M, Kostovcik M, Macinga P, Dvorak J, Stehlikova Z, et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(25):4548–58.
30. Little R, Wine E, Kamath BM, Griffiths AM, Ricciuto A. Gut microbiome in primary sclerosing cholangitis: A review. *World J Gastroenterol*. 2020;26(21):2768-2780.
31. Lichtman SN, Keku J, Clark RL, Schwab JH, Sartor RB. Biliary tract disease in rats with experimental small bowel bacterial overgrowth. *Hepatology*. 1991;13(4):766–72.
32. Chen ML, Takeda K, Sundrud MS. Emerging roles of bile acids in mucosal immunity and inflammation. Vol. 12, *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 851–61.
33. Li B, Selmi C, Tang R, Ma X. The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut-liver axis. *Nat Publ Gr*. 2018;
34. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid “mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders”. *J Hepatol* . 2001;35(1):134–46.
35. Beuers U, Boyer JL, Paumgartner G. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: Potential mechanisms of action and therapeutic applications. *Hepatology*. 1998;28(6):1449–53.
36. Habior A. Kwas ursodeoksycholowy w cholestatycznych chorobach wątroby - w

- jakich sytuacjach jest skuteczny? *Gastroenterol Klin Postępy i Stand.* 2011;3(2):79–87.
37. Rawa-Gołębiwska A. Kwas ursodeoksycholowy w leczeniu chorób wątroby. *Gastroenterol Klin Postępy i Stand.* 2016;8(4):131–41.
 38. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ. Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis.* 2000;20(3):273–92.
 39. Ward A, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1984;27(2):95–131.
 40. Dilger K, Hohenester S, Winkler-Budenhofer U, Bastiaansen BAJ, Schaap FG, Rust C, et al. Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid profiles and intestinal detoxification machinery in primary biliary cirrhosis and health. *J Hepatol.* 2012;57(1):133–40.
 41. Chen W, Wei Y, Xiong A, Li Y, Guan H, Wang Q, et al. Comprehensive analysis of serum and fecal bile acid profiles and interaction with gut microbiota in primary biliary cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(1):25–38.
 42. Wunsch E, Trottier J, Milkiewicz M, Raszeja-Wyszomirska J, Hirschfield GM, Barbier O, et al. Prospective evaluation of ursodeoxycholic acid withdrawal in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology.* 2014;60(3):931–40.
 43. Innes GK, Nagafuchi Y, Fuller BJ, Hobbs KE. Increased expression of major histocompatibility antigens in the liver as a result of cholestasis. *Transplantation.* 1988;45(4):749–52.
 44. Ballardini G, Mirakian R, Bianchi FB, Pisi E, Doniach D, Bottazzo GF. Aberrant expression of HLA-DR antigens on bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis: relevance to pathogenesis. *Lancet.* 1984;2(8410):1009–13.
 45. Tazuma S, Takikawa H. *Bile Acids in Gastroenterology.* Springer; 2017.
 46. Shimoyama S, Kawata K, Ohta K, Chida T, Suzuki T, Tsuneyama K, et al. Ursodeoxycholic acid impairs liver-infiltrating T-cell chemotaxis through IFN- γ and CX3CL1 production in primary biliary cholangitis. *Eur J Immunol.* 2021;51(6):1519–30.
 47. Kikuchi K, Hsu W, Hosoya N, Moritoki Y, Kajiyama Y, Kawai T, et al. Ursodeoxycholic acid reduces CpG-induced IgM production in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* 2009;39(5):448–54.
 48. Ko WK, Lee SH, Kim SJ, Jo MJ, Kumar H, Han IB, et al. Anti-inflammatory effects of ursodeoxycholic acid by lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. Mukhopadhyay P, editor. *PLoS One.* 2017;12(6):e0180673.
 49. Tanaka H, Makino Y, Miura T, Hirano F, Okamoto K, Komura K, et al. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by ursodeoxycholic acid. Repression of IFN-gamma-induced MHC class II gene expression via a glucocorticoid receptor-dependent pathway. *J Immunol.* 1996;156(4):1601–8.
 50. Beuers U, Hohenester S, de Buy Wenniger LJM, Kremer AE, Jansen PLM, Elferink RPJO. The biliary HCO₃⁻ umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology.* 2010;52(4):1489–96.
 51. Banales JM, Sáez E, Uriz M, Sarvide S, Urribarri AD, Splinter P, et al. Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2012;56(2):687–97.
 52. Arenas F, Hervias I, Uriz M, Joplin R, Prieto J, Medina JF. Combination of ursodeoxycholic acid and glucocorticoids upregulates the AE2 alternate promoter in human liver cells. *J Clin Invest.* 2008;118(2):695–709.
 53. Roma MG, Toledo FD, Boaglio AC, Basiglio CL, Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ.

- Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin Sci*. 2011;121(12):523–44.
54. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Blendis LM. An electron microscopic and morphometric study of ursodeoxycholic effect in primary biliary cirrhosis. *Liver*. 2002;22(3):235–44.
55. Lleo A, Bowlus CL, Yang GX, Invernizzi P, Podda M, Van de Water J, et al. Biliary apoptoses and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2010;52(3):987–98.
56. Rodrigues CMP, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ*. 1999;6(9):842–54.
57. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*. 1998;101(12):2790–9.
58. Miura T, Ouchida R, Yoshikawa N, Okamoto K, Makino Y, Nakamura T, et al. Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of NF-kappaB-dependent transcription by ursodeoxycholic acid. *J Biol Chem*. 2001;276(50):47371–8.
59. Arisawa S, Ishida K, Kameyama N, Ueyama J, Hattori A, Tatsumi Y, et al. Ursodeoxycholic acid induces glutathione synthesis through activation of PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(5):858–66.
60. Lindor KD, Bowlus CL, Boyer J, Levy C, Mayo M. Primary Biliary Cholangitis: 2018 Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2019;69(1):394–419.
61. EASL Clinical Practice Guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J Hepatol*. 2017;67(1):145–72.
62. Simental-Mendía M, Sánchez-García A, Simental-Mendía LE. Effect of ursodeoxycholic acid on liver markers: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled clinical trials. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;86(8):1476–88.
63. Parés A, Caballería L, Rodés J, Bruguera M, Rodrigo L, García-Plaza A, et al. Long-term effects of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a double-blind controlled multicentric trial. UDCA-cooperative group from the Spanish association for the study of the liver. *J Hepatol*. 2000;32(4):561–6.
64. Lindor KD, Therneau TM, Jorgensen RA, Malinchoc M, Dickson ER. Effects of ursodeoxycholic acid on survival in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 1996;110(5):1515–8.
65. Abbas G, Lindor KD. Pharmacological treatment of biliary cirrhosis with ursodeoxycholic acid. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11(3):387–92.
66. Shi J, Li Z, Zeng X, Lin Y, Xie WF. Ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Hepatol Res*. 2009;39(9):865–73.
67. Triantos CK, Koukias NM, Nikolopoulou VN, Burroughs AK. Meta-analysis: ursodeoxycholic acid for primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(8):901–10.
68. Olsson R, Boberg KM, de Muckadell OS, Lindgren S, Hultcrantz R, Folvik G, et al. High-dose ursodeoxycholic acid in primary sclerosing cholangitis: a 5-year multicenter, randomized, controlled study. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1464–72.
69. Lindor KD, Kowdley K V, Luketic VAC, Harrison ME, McCashland T, Befeler AS, et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2009;50(3):808–14.

70. Pardi DS, Loftus EVJ, Kremers WK, Keach J, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 2003;124(4):889–93.
71. Prokopič M, Beuers U. Management of primary sclerosing cholangitis and its complications: an algorithmic approach. *Hepatol Int*. 2021;15(1):6–20.
72. Ueda Y, Kaido T, Okajima H, Hata K, Anazawa T, Yoshizawa A, et al. Long-term prognosis and recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: A Single-Center Experience. *Transplant direct*. 2017;3(12):e334–e334.
73. Rabiee A, Silveira MG. Primary sclerosing cholangitis. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021;6:29.
74. Gonciarz M, Szkudłapski D, Mularczyk A, Radwan P, Kłopocka M, Bartnik W, et al. Wytyczne postępowania z chorymi na nieswoiste choroby zapalne jelit w praktyce lekarza rodzinnego. *Lek POZ*. 2017;3(1):1–11.
75. De Vos M, Verdievel H, Schoonjans R, Praet M, Bogaert M, Barbier F. Concentrations of 5-ASA and Ac-5-ASA in human ileocolonic biopsy homogenates after oral 5-ASA preparations. *Gut*. 1992;33(10):1338–42.
76. McQuaid KR. Drugs Used in the Treatment of Gastrointestinal Diseases. In: Katzung BG, editor. *Basic & Clinical Pharmacology*, 14e. McGraw-Hill; 2017.
77. Rawa T. Doustne preparaty kwasu 5-aminosalicylowego w leczeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. *Gastroenterol Klin Postępy i Stand*. 2012;4(3):98–104.
78. Hufnagel B, Muellner V, Hlatky K, Tallian C, Vielnascher R, Guebitz GM, et al. Chemically modified inulin for intestinal drug delivery - A new dual bioactivity concept for inflammatory bowel disease treatment. *Carbohydr Polym*. 2021;252:117091.
79. Frieri G, Giacomelli R, Pimpo M, Palumbo G, Passacantando A, Pantaleoni G, et al. Mucosal 5-aminosalicylic acid concentration inversely correlates with severity of colonic inflammation in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2000;47(3):410–4.
80. Lyakhovich A, Gasche C. Systematic review: molecular chemoprevention of colorectal malignancy by mesalazine. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(2):202–9.
81. Wasilewski A, Cygankiewicz A. Rola mesalazyny w chemoprewencji raka jelita grubego. *Folia Medica Lodz*. 2014;41(2):121–37.
82. Guan G, Lan S. Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. Zhai L, editor. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1290179.
83. Piechota-Polanczyk A, Fichna J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2014;387(7):605–20.
84. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CBHW, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol*. 2003;201(1):28–36.
85. Dai L, Tang Y, Zhou W, Dang Y, Sun Q, Tang Z, et al. Gut microbiota and related metabolites were disturbed in ulcerative colitis and partly restored after mesalamine treatment. *Front Pharmacol*. 2021;11:620724.
86. Xu J, Chen N, Wu Z, Song Y, Zhang Y, Wu N, et al. 5-Aminosalicylic acid alters the gut bacterial microbiota in patients with ulcerative colitis. *Front Microbiol*. 2018;9:1274.
87. Tang-Fichaux M, Branchu P, Nougayrède JP, Oswald E. Tackling the threat of cancer due to pathobionts producing colibactin: is mesalamine the magic bullet? *Toxins*. 2021;13(12):897.
88. Oliveira LFS, Predes D, Borges HL, Abreu JG. Therapeutic potential of naturally occurring small molecules to target the Wnt/ β -Catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Cancers*. 2022;14(2).
89. Parenti S, Montorsi L, Fantini S, Mammoli F, Gemelli C, Atene CG, et al. KLF4

- Mediates the Effect of 5-ASA on the β -Catenin Pathway in Colon Cancer Cells. *Cancer Prev Res*. 2018;11(8):503–10.
90. Schwab M, Reynders V, Loitsch S, Shastri YM, Steinhilber D, Schröder O, et al. PPARgamma is involved in mesalazine-mediated induction of apoptosis and inhibition of cell growth in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(7):1407–14.
 91. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1265–76.
 92. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2006;94(6):776–80.
 93. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
 94. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901–6.
 95. Hertel J, Bartschat S, Wintsche A, Otto C, Lab S of the BC, Stadler PF. Evolution of the *let-7* microRNA family. *RNA Biol*. 2012;9(3):231–41.
 96. Hukowska-Szematowicz B, Deptuła W. Biologiczna rola mikroRNA [miRNA]- nowe dane. *Postep Biol Komorki*. 2010;37:585–97.
 97. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. Vol. 9, *Front Endocrinol*. 2018.
 98. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509–24.
 99. Alwani A, Baj-Krzyworzeka M. MikroRNA jako cel terapeutyczny w chorobach nowotworowych. *Postepy Biochem*. 2021;67(3).
 100. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125(5):887–901.
 101. Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(16):4776–85.
 102. Xu W, San Lucas A, Wang Z, Liu Y. Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*. 2014;15(7):S4.
 103. Si W, Shen J, Zheng H, Fan W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):25.
 104. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(9):2999–3004.
 105. Rodrigues AC, Li X, Radecki L, Pan YZ, Winter JC, Huang M, et al. MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines. *Biopharm Drug Dispos*. 2011;32(6):355–67.
 106. Kaur S, Kumar S. Crosstalk between food components and microRNAs: Role in metabolism, nutrition, health and diseases. *Integr Food Nutr Metab*. 2020;7.
 107. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):704–14.
 108. Sikora E, Ptak W, Bryniarski K. Immunoregulation by interference RNA (iRNA) - mechanisms, role, perspective. *Postepy Hig Med Dosw*. 2011;65:482–95.
 109. Qu Z, Li W, Fu B. MicroRNAs in autoimmune diseases. *Biomed Res Int*. 2014;2014:527895.
 110. Tanaka A, Leung PSC, Gershwin ME. The genetics and epigenetics of primary biliary cholangitis. *Clin Liver Dis*. 2018;22(3):443–55.
 111. Liang DY, Hou YQ, Luo LJ, Ao L. Altered expression of miR-92a correlates with Th17 cell frequency in patients with primary biliary cirrhosis. *Int J Mol Med*.

- 2016/05/27. 2016;38(1):131–8.
112. Ma WT, Chen DK. Immunological abnormalities in patients with primary biliary cholangitis. *Clin Sci*. 2019;133(6):741–60.
 113. Nakagawa R, Muroyama R, Saeki C, Goto K, Kaise Y, Koike K, et al. miR-425 regulates inflammatory cytokine production in CD4+ T cells via N-Ras upregulation in primary biliary cholangitis. *J Hepatol*. 2017;66(6):1223–30.
 114. Huang C, Xing X, Xiang X, Fan X, Men R, Ye T, et al. MicroRNAs in autoimmune liver diseases: from diagnosis to potential therapeutic targets. *Biomed Pharmacother*. 2020;130:110558.
 115. Katsumi T, Ninomiya M, Nishina T, Mizuno K, Tomita K, Haga H, et al. MiR-139-5p is associated with inflammatory regulation through c-FOS suppression, and contributes to the progression of primary biliary cholangitis. *Lab Invest*. 2016;96(11):1165–77.
 116. Kennedy L, Francis H, Meng F, Glaser S, Alpini G. Diagnostic and therapeutic potentials of microRNAs in cholangiopathies. *Liver Res*. 2017;1(1):34–41.
 117. Calin GA, Pekarsky Y, Croce CM. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(3):425–37.
 118. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer. *Cancer Res*. 2016;76(13):3666–70.
 119. Otmani K, Lewalle P. Tumor Suppressor miRNA in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Mechanism of Deregulation and Clinical Implications. *Front Oncol*. 2021;11:708765.
 120. Morishita A, Oura K, Tadokoro T, Fujita K, Tani J, Masaki T. MicroRNAs in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Cancers*. 2021;13(3).
 121. Shi T, Morishita A, Kobara H, Masaki T. The Role of microRNAs in Cholangiocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14).
 122. Zhang N, Hu X, Du Y, Du J. The role of miRNAs in colorectal cancer progression and chemoradiotherapy. *Biomed Pharmacother*. 2021;134:111099.
 123. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett*. 2009;285(2):116–26.
 124. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2011;1812(5):592–601.
 125. Oлару A V, Ghiaur G, Yamanaka S, Luvsanjav D, An F, Popescu I, et al. MicroRNA down-regulated in human cholangiocarcinoma control cell cycle through multiple targets involved in the G1/S checkpoint. *Hepatology*. 2011;54(6):2089–98.
 126. Lulla AR, Slifker MJ, Zhou Y, Lev A, Einarson MB, Dicker DT, et al. miR-6883 Family miRNAs target CDK4/6 to induce G(1) phase cell-cycle arrest in colon cancer cells. *Cancer Res*. 2017;77(24):6902–13.
 127. Lu H, Hao L, Yang H, Chen J, Liu J. miRNA-34a suppresses colon carcinoma proliferation and induces cell apoptosis by targeting SYT1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019;12(8):2887–97.
 128. Zhong X yu, Yu J hua, Zhang W guang, Wang Z dong, Dong Q, Tai S, et al. MicroRNA-421 functions as an oncogenic miRNA in biliary tract cancer through down-regulating farnesoid X receptor expression. *Gene*. 2012;493(1):44–51.
 129. He Q, Cai L, Shuai L, Li D, Wang C, Liu Y, et al. Ars2 is overexpressed in human cholangiocarcinomas and its depletion increases PTEN and PDCD4 by decreasing microRNA-21. *Mol Carcinog*. 2013;52(4):286–96.
 130. Feng YS, Zhou JM, Sun CH, Zhu J, Yang J, Guo L. The diagnostic value of miR-21 combined with CT in patients with liver cancer. *Clin Transl Oncol*. 2021;23(6):1238–1244.

131. Sun LH, Tian D, Yang ZC, Li JL. Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. *Sci Rep.* 2020;10(1):8271.
132. Selaru FM, Olaru A V, Kan T, David S, Cheng Y, Mori Y, et al. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology.* 2009;49(5):1595–601.
133. Sargolzaei J, Etemadi T, Alyasin A. The P53/microRNA network: A potential tumor suppressor with a role in anticancer therapy. *Pharmacol Res.* 2020;160:105179.
134. Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol.* 2011;3(1):44–50.
135. Qu A, Du L, Yang Y, Liu H, Li J, Wang L, et al. Hypoxia-inducible MiR-210 is an independent prognostic factor and contributes to metastasis in colorectal cancer. *PLoS One.* 2014;9(3):e90952–e90952.
136. Yang Y, Zhang J, Xia T, Li G, Tian T, Wang M, et al. MicroRNA-210 promotes cancer angiogenesis by targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2016;36(5):2553–62.
137. Silakit R, Kitirat Y, Thongchot S, Loilome W, Techasen A, Ungarreevittaya P, et al. Potential role of HIF-1-responsive microRNA210/HIF3 axis on gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma cells. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199827.
138. Niu L, Yang W, Duan L, Wang X, Li Y, Xu C, et al. Biological Implications and Clinical Potential of Metastasis-Related miRNA in Colorectal Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;23:42–54.
139. Zaravinos A. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J Oncol.* 2015;2015:865816.
140. Jopling C. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol.* 2012;9(2):137–42.
141. Tsai WC, Hsu PWC, Lai TC, Chau GY, Lin CW, Chen CM, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009;49(5):1571–82.
142. Sendi H, Yazdimamaghani M, Hu M, Sultanpuram N, Wang J, Moody AS, et al. Nanoparticle Delivery of miR-122 Inhibits Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Cancer Res.* 2022;82(1):105–13.
143. Chen X, Xu X, Pan B, Zeng K, Xu M, Liu X, et al. miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer. *Aging.* 2018;10(11):3421–37.
144. Munoz-Garrido P, García-Fernández de Barrena M, Hijona E, Carracedo M, Marín JGG, Bujanda L, et al. MicroRNAs in biliary diseases. *World J Gastroenterol.* 2012;18(43):6189–96.
145. Okayama H, Schetter AJ, Harris CC. MicroRNAs and Inflammation in the Pathogenesis and Progression of Colon Cancer. *Dig Dis.* 2012;30(suppl 2(Suppl. 2)):9–15.
146. Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, Mathé EA, Yuen ST, Hawkes JE, et al. Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(18):5878–87.
147. Wasik U, Kempinska-Podhorodecka A, Bogdanos DP, Milkiewicz P, Milkiewicz M. Enhanced expression of miR-21 and miR-150 is a feature of anti-mitochondrial antibody-negative primary biliary cholangitis. *Mol Med.* 2020;26(1):8.
148. Adamowicz M, Kempinska-Podhorodecka A, Abramczyk J, Banales JM, Milkiewicz P, Milkiewicz M. Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary cholangitis is modulated by miR-155. *Cells.* 2022;11(18):2880.
149. Kempinska-Podhorodecka A, Blatkiewicz M, Wunsch E, Krupa L, Gutkowski K, Milkiewicz P, et al. Oncomir MicroRNA-346 is upregulated in colons of patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin Transl Gastroenterol.* 2020;11(1):e00112.

150. Kempinska-Podhorodecka A, Adamowicz M, Ostrycharz E, Chmielarz M, Wójcicki M, Milkiewicz P, et al. Role of miR-506 in ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis. *Sci Rep.* 2021;11(1):10134.
151. Adamowicz M, Stukan I, Milkiewicz P, Bialek A, Milkiewicz M, Kempinska-Podhorodecka A. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4905.
152. Castro RE, Ferreira DMS, Zhang X, Borrallho PM, Sarver AL, Zeng Y, et al. Identification of microRNAs during rat liver regeneration after partial hepatectomy and modulation by ursodeoxycholic acid. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2010;299(4):G887–97.
153. Castro RE, Ferreira DMS, Afonso MB, Borrallho PM, Machado M V., Cortez-Pinto H, et al. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013;58(1):119–25.
154. Huang R, Huang Y, Zeng G, Li M, Jin Y. Ursodeoxycholic acid inhibits intimal hyperplasia, vascular smooth muscle cell excessive proliferation, migration via blocking miR-21/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Cell Cycle.* 2020;19(8):918–32.
155. Kim DJ, Yoon S, Ji SC, Yang J, Kim YK, Lee S, et al. Ursodeoxycholic acid improves liver function via phenylalanine/tyrosine pathway and microbiome remodelling in patients with liver dysfunction. *Sci Rep.* 2018;8(1):11874.
156. Minacapelli CD, Bajpai M, Geng X, Van Gorp J, Poplin E, Amenta PS, et al. miR-206 as a biomarker for response to mesalamine treatment in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2019;25(1):78–84.
157. Tabibian JH, Trussoni CE, O'Hara SP, Splinter PL, Heimbach JK, LaRusso NF. Characterization of cultured cholangiocytes isolated from livers of patients with primary sclerosing cholangitis. *Lab Invest.* 2014;94(10):1126–33.
158. Coward SM, Legallais C, David B, Thomas M, Foo Y, Mavri-Damelin D, et al. Alginate-encapsulated HepG2 cells in a fluidized bed bioreactor maintain function in human liver failure plasma. *Artif Organs.* 2009;33(12):1117–26.
159. Jumarie C, Malo C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol.* 1991;149(1):24–33.
160. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21(1):1–26.
161. Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, Macfarlane GT, Microbiology & Gut Biology Group TT& TB. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology.* 2005;115(4):565–74.
162. Sakamoto T, Morishita A, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, et al. Identification of microRNA profiles associated with refractory primary biliary cirrhosis. *Mol Med Rep.* 2016;14(4):3350–6.
163. Kennedy L, Francis H, Invernizzi P, Venter J, Wu N, Carbone M, et al. Secretin/secretin receptor signaling mediates biliary damage and liver fibrosis in early-stage primary biliary cholangitis. *FASEB J.* 2019;33(9):10269–79.
164. Kilanczyk E, Ruminkiewicz D, Banales JM, Milkiewicz P, Milkiewicz M. DHEA protects human cholangiocytes and hepatocytes against apoptosis and oxidative stress. *Cells.* 2022;11(6).
165. Zhang ZC, Liu Y, Xiao LL, Li SF, Jiang JH, Zhao Y, et al. Upregulation of miR-125b by estrogen protects against non-alcoholic fatty liver in female mice. *J Hepatol.* 2015;63(6):1466–75.

166. Rukov JL, Wilentzik R, Jaffe I, Vinther J, Shomron N. Pharmaco-miR: linking microRNAs and drug effects. *Brief Bioinform.* 2014;15(4):648–59.
167. Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2009;298(1):G101–6.
168. Jeker LT, Bluestone JA. MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev.* 2013;253(1):65–81.
169. Wang D, Tang M, Zong P, Liu H, Zhang T, Liu Y, et al. MiRNA-155 regulates the Th17/Treg ratio by targeting SOCS1 in severe acute pancreatitis. *Front Physiol.* 2018;9:686.
170. Hartmann P, Tacke F. Tiny RNA with great effects: miR-155 in alcoholic liver disease. Vol. 64, *Journal of hepatology.* Netherlands; 2016. p. 1214–6.
171. Bala S, Csak T, Saha B, Zatsiorsky J, Kodys K, Catalano D, et al. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J Hepatol.* 2016;64(6):1378–87.
172. Longchamps RJ, Abey SK, Martino AC, Henderson WA. Letter: gender-associated cell-free microRNA profiles in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(9):997–998.
173. Kempinska-Podhorodecka A, Milkiewicz M, Wasik U, Ligocka J, Zawadzki M, Krawczyk M, et al. Decreased expression of Vitamin D Receptor affects an immune response in primary biliary cholangitis via the VDR-miRNA155-SOCS1 pathway. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2).
174. Setchell KD, Rodrigues CM, Clerici C, Solinas A, Morelli A, Gartung C, et al. Bile acid concentrations in human and rat liver tissue and in hepatocyte nuclei. *Gastroenterology.* 1997;112(1):226–35.
175. Zhang Y, Wang R, Wang Y, Tai Y, Ge P, Wu J, et al. 215 BILE ACID-INDUCED UPREGULATION OF MICRORNA 155 PROMOTES CHOLESTATIC LIVER INJURY VIA TARGETING THE INSIG2/SREBP1 PATHWAY IN MDR2-/- MICE. *Gastroenterology.* 2020;158:S-1262.
176. Erice O, Munoz-Garrido P, Vaquero J, Perugorria MJ, Fernandez-Barrena MG, Saez E, et al. MicroRNA-506 promotes primary biliary cholangitis-like features in cholangiocytes and immune activation. *Hepatology.* 2018;67(4):1420–40.
177. Onishi M, Ochiya T, Tanaka Y. MicroRNA and liver cancer. *Cancer drug Resist Drug Resist.* 2020;3(3):385–400.
178. Wang Z, Chen J, Chen Z, Xie L, Wang W. Clinical effects of ursodeoxycholic acid on patients with ulcerative colitis may improve via the regulation of IL-23-IL-17 axis and the changes of the proportion of intestinal microflora. *Saudi J Gastroenterol.* 2021;27(3):149–157.
179. Tenjo T, Toyoda M, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, et al. Prognostic significance of p27(kip1) protein expression and spontaneous apoptosis in patients with colorectal adenocarcinomas. *Oncology.* 2000;58(1):45–51.
180. Bertagnolli MM, Warren RS, Niedzwiecki D, Mueller E, Compton CC, Redston M, et al. p27Kip1 in stage III colon cancer: implications for outcome following adjuvant chemotherapy in cancer and leukemia group B protocol 89803. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):2116–2122.
181. Simiantonaki N, Kurzik-Dumke U, Karyofylli G, Jayasinghe C, Michel-Schmidt R, Kirkpatrick James C. Reduced expression of TLR4 is associated with the metastatic status of human colorectal cancer. *Int J Mol Med.* 2007;20(1):21–9.
182. Hsu RYC, Chan CHF, Spicer JD, Rousseau MC, Giannias B, Rousseau S, et al. LPS-induced TLR4 signaling in human colorectal cancer cells increases beta1 integrin-mediated cell adhesion and liver metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(5):1989–98.

183. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun.* 2003;71(6):3503–11.
184. Böcker U, Yezersky O, Feick P, Manigold T, Panja A, Kalina U, et al. Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(1):25–32.
185. Lin A, Wang G, Zhao H, et al. TLR4 signaling promotes a COX-2/PGE₂/STAT3 positive feedback loop in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *Oncimmunology.* 2015;5(2):e1074376.
186. Chen XM, O'Hara SP, Nelson JB, Splinter PL, Small AJ, Tietz PS, et al. Multiple TLRs are expressed in human cholangiocytes and mediate host epithelial defense responses to *Cryptosporidium parvum* via activation of NF-kappaB. *J Immunol.* 2005;175(11):7447–56.
187. Blaya D, Aguilar-Bravo B, Hao F, Casacuberta-Serra S, Coll M, Perea L, et al. Expression of microRNA-155 in inflammatory cells modulates liver injury. *Hepatology.* 2018;68(2):691–706.
188. Feng X, Bao J, Song C, Xie L, Tan X, Li J, et al. Functional role of miR-155 in physiological and pathological processes of liver injury (Review). *Mol Med Rep.* 2021;24(4).
189. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab.* 2014;3(4):354–71.
190. Adamowicz M, Milkiewicz P, Kempinska-Podhorodecka A. 5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. *J Physiol Pharmacol.* 2021;72(4).
191. Chen Y, Du J, Zhang Z, Liu T, Shi Y, Ge X, et al. MicroRNA-346 mediates tumor necrosis factor α -induced downregulation of gut epithelial vitamin D receptor in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(11):1910–8.
192. Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer.* 2009;125(6):1328–33.
193. Sharifi A, Hosseinzadeh-Attar M, Vahedi H, Nedjat S. A randomized controlled trial on the effect of vitamin D3 on inflammation and cathelicidin gene expression in ulcerative colitis patients. *Saudi J Gastroenterol.* 2016;22(4):316–23.
194. Sun J, Zhang YG. Vitamin D receptor influences intestinal barriers in health and disease. *Cells.* 2022;11(7).
195. Campregher C, Gasche C. Aminosalicylates. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(4):535–46.
196. Bian Z, Li L, Cui J, Zhang H, Liu Y, Zhang CY, et al. Role of miR-150-targeting c-Myb in colonic epithelial disruption during dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis and human ulcerative colitis. *J Pathol.* 2011;225(4):544–53.
197. Zorbas M, Sicurella C, Bertoncello I, Venter D, Ellis S, Mucenski ML, et al. c-Myb is critical for murine colon development. *Oncogene.* 1999;18(42):5821–30.
198. Malaterre J, Carpinelli M, Ernst M, Alexander W, Cooke M, Sutton S, et al. c-Myb is required for progenitor cell homeostasis in colonic crypts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):3829–3834.
199. Qiu X, Ma J, Wang K, Zhang H. Chemopreventive effects of 5-aminosalicylic acid on inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer and dysplasia: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(1):1031–45.
200. Wei C, Yang C, Wang S, Shi D, Zhang C, Lin X, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer.* 2019;18(1):64.

201. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*. 2001;20(24):3139–55.
202. Guz M, Dworzański T, Jeleniewicz W, Cybulski M, Kozicka J, Stepulak A, et al. Elevated miRNA inversely correlates with E-cadherin gene expression in tissue biopsies from crohn disease patients in contrast to ulcerative colitis patients. *Biomed Res Int*. 2020;2020:4250329.
203. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating microRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2012;6(9):900–4.
204. Schönauen K, Le N, von Arnim U, Schulz C, Malfertheiner P, Link A. Circulating and fecal microRNAs as biomarkers for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(7):1547–57.
205. Min M, Peng L, Yang Y, Guo M, Wang W, Sun G. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(4):652–9.
206. El-Daly SM, Omara EA, Hussein J, Youness ER, El-Khayat Z. Differential expression of miRNAs regulating NF-κB and STAT3 crosstalk during colitis-associated tumorigenesis. *Mol Cell Probes*. 2019;47:101442.
207. Zhang GJ, Xiao HX, Tian HP, Liu ZL, Xia SS, Zhou T. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression. *Int J Mol Med*. 2013;31(6):1375–80.
208. Wang R, Leong RW. Primary sclerosing cholangitis as an independent risk factor for colorectal cancer in the context of inflammatory bowel disease: a review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):8783–9.
209. Hu W, Yang Y, Li X, Huang M, Xu F, Ge W, et al. Multi-omics approach reveals distinct differences in left- and right-sided colon cancer. *Mol Cancer Res*. 2018;16(3):476–85.
210. Tošić I, Frank DA. STAT3 as a mediator of oncogenic cellular metabolism: Pathogenic and therapeutic implications. *Neoplasia*. 2021;23(12):1167–78.
211. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M, Brun P, D’Inca R, Nai L, et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Exp Mol Med*. 2015;47(5):e164–e164.
212. Xiao B, Liu Z, Li BS, Tang B, Li W, Guo G, et al. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis*. 2009;200(6):916–25.
213. Arif KMT, Elliott EK, Haupt LM, Griffiths LR. Regulatory mechanisms of epigenetic miRNA relationships in human cancer and potential as therapeutic targets. *Cancers*. 2020;12(10):2922..
214. Cao H, Huang S, Liu A, Chen Z. Up-regulated expression of miR-155 in human colonic cancer. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(3):604–7.
215. Gasche C, Möslein G, Vasen HF, Lubinski J, Karner-Hanusch J, Niv Y. Mesacapp: Mesalamine for colorectal cancer prevention program in lynch syndrome. 2017.
216. Toyonaga T, Saruta M. Role of microRNAs in the pathophysiology of ulcerative colitis. *Immuno*. 2021; 1(4):558-573.
217. Kennedy M, Wilson L, Szabo C, Salzman AL. 5-aminosalicylic acid inhibits iNOS transcription in human intestinal epithelial cells. *Int J Mol Med*. 1999;4(4):437–43.

8. SPIS RYCIN

Rycina 1. Lokalizacja zmian zapalnych dróg żółciowych w przebiegu PBC i PSC [3].	11
Rycina 2. Mechanizm działania kwasu ursodeoksycholowego [34]	16
Rycina 3. Mechanizm działania kwasu 5-aminosalicylowego [80]	21
Rycina 4. Modyfikatory ekspresji miRNA [103]	25
Rycina 5. Udział miRNA w procesie nowotworzenia [123]	28
Rycina 6. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach NHC	46
Rycina 7. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach H69	48
Rycina 8. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach HepG2	50
Rycina 9. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 pod wpływem UDCA i/lub 5-ASA w komórkach Caco-2	52
Rycina 10. Względny poziom ekspresji miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 oraz miR-506 po ekspozycji na LPS w komórkach Caco-2, NHC, H69, HepG2	54
Rycina 11. Względny poziom ekspresji TNF α oraz ZC3H12A po ekspozycji na LPS w komórkach Caco-2, NHC, H69 i HepG2	56
Rycina 12. Wpływ działania leków UDCA i/lub 5-ASA w zaindukowanym stanie zapalnym na poziom ekspresji miR-155 oraz miR-346 w komórkach NHC	58
Rycina 13. Wpływ działania leków UDCA i/lub 5-ASA w zaindukowanym stanie zapalnym na poziom ekspresji miR-155 oraz miR-506 w komórkach H69	60
Rycina 14. Wpływ działania leków UDCA i/lub 5-ASA w zaindukowanym stanie zapalnym na poziom ekspresji miR-155 oraz miR-125b w komórkach HepG2	62

9. SPIS TABEL

<i>Tabela 1. Wyniki analiz mikromacierzy dla miRNA-125b, miRNA-150, miRNA-155....</i>	38
<i>Tabela 2. Skład mieszaniny pierwszego etapu odwrotnej transkrypcji mRNA.....</i>	40
<i>Tabela 3. Skład mieszaniny drugiego etapu odwrotnej transkrypcji mRNA</i>	40
<i>Tabela 4. Etapy, skład mieszaniny oraz warunki reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA</i>	41
<i>Tabela 5. Sondy i startery typu TaqMan</i>	43
<i>Tabela 6. Skład mieszaniny oraz warunki temperaturowo-czasowe reakcji qRT-PCR do analizy ekspresji miRNA.....</i>	43
<i>Tabela 7. Skład mieszaniny oraz warunki temperaturowo-czasowe reakcji qRT-PCR do analizy ekspresji mRNA</i>	43

10.ZAŁĄCZNIKI

Załącznik	Opis załącznika
Załącznik nr 1	<i>Pierwsza publikacja z cyklu prezentowanych prac</i>
Załącznik nr 2	<i>Druga publikacja z cyklu prezentowanych prac</i>
Załącznik nr 3	<i>Trzecia publikacja z cyklu prezentowanych prac</i>
Załącznik nr 4	<i>Opis dorobku oraz osiągnięć naukowych</i>
Załącznik nr 5	<i>Zgoda Komisji Bioetycznej w Szczecinie nr BN-001/43/06 z dnia 25.02.2019r.</i>
Załącznik nr 6	<i>Zgoda Komisji Bioetycznej w Szczecinie nr KB-0012/44/2021 z dnia 08.11.2021r.</i>

Pierwsza publikacja z cyklu prezentowanych prac



Article

Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155

Monika Adamowicz ^{1,*}, Agnieszka Kempinska-Podhorodecka ¹, Joanna Abramczyk ¹, Jesus M. Banales ^{2,3}, Piotr Milkiewicz ^{4,5} and Malgorzata Milkiewicz ¹

¹ Department of Medical Biology, Pomeranian Medical University in Szczecin, 70-111 Szczecin, Poland

² Department of Liver and Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Health Research Institute, Donostia University Hospital, University of the Basque Country (UPV/EHU), CIBERehd, Ikerbasque, 20014 San Sebastian, Spain

³ Department of Biochemistry and Genetics, School of Sciences, University of Navarra, 31009 Pamplona, Spain

⁴ Liver and Internal Medicine Unit, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland

⁵ Translational Medicine Group, Pomeranian Medical University, 70-111 Szczecin, Poland

* Correspondence: monikadamowicz@gmail.com; Tel.: +48-91-466-1867



Citation: Adamowicz, M.; Kempinska-Podhorodecka, A.; Abramczyk, J.; Banales, J.M.; Milkiewicz, P.; Milkiewicz, M. Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. *Cells* **2022**, *11*, 2880. <https://doi.org/10.3390/cells11182880>

Academic Editors: Kay-Dietrich Wagner and Nicole Wagner

Received: 21 July 2022

Accepted: 10 September 2022

Published: 15 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: PPAR α is a ligand-activated transcription factor that shows protective effects against metabolic disorders, inflammation and apoptosis. Primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis result in the intrahepatic accumulation of bile acids that leads to liver dysfunction and damage. Small, non-coding RNAs such as miR-155 and miR-21 are associated with silencing PPAR α . Methods: The expression of miR-155, miR-21 and PPAR α were evaluated using real-time PCR on liver tissue, as well as on human hepatocytes (HepG2) or cholangiocytes (NHCs) following exposure to lipopolysaccharide (LPS), glycodeoxycholic acid (GCDCA), lithocholic acid (LCA) and/or ursodeoxycholic acid (UDCA). Results: A reduction of PPAR α in primary biliary cholangitis (PBC) livers was associated with miR-21 and miR-155 upregulation. Experimental overexpression of either miR-155 or miR-21 inhibited PPAR α in hepatocytes, whereas, in cholangiocytes, only miR-21 suppressed PPAR α . Both GCDCA and LCA induced the cell type-specific upregulation of miR-155 or miR-21. In HepG2, LPS-induced miR-155 expression was blocked by a cotreatment with UDCA and was associated with PPAR α upregulation. In NHC cells, the expression of miR-21 was induced by LPS but did not affect PPAR α expression. Conclusions: Hepatic PPAR α expression is reduced in PBC livers as a likely result of miR-155 overexpression. UDCA effectively reduced both baseline and LPS-induced miR-155 expression, thus preventing the suppression of PPAR α .

Keywords: miRNA; PPAR α ; liver; primary biliary cholangitis

1. Introduction

Primary biliary cholangitis (PBC) is a slow, progressive, chronic liver disease that predominantly affects middle-aged women [1]. While the aetiology of PBC has not been established, it is believed that cholangiocyte secretory failure and/or autoimmunity against intrahepatic bile ducts is linked to the presence of auto-reactive T-lymphocytes and raised plasma concentrations of specific anti-mitochondrial antibodies (AMA) [1]. Disrupted bile acid metabolism in the entero-hepatic circulation, enhanced oxidative stress, and induced inflammation cytokines causes cholestatic liver damage, which ultimately leads to liver fibrosis and cirrhosis. Another chronic cholestatic condition is primary sclerosing cholangitis (PSC), which frequently is associated with inflammatory bowel disease. Ursodeoxycholic acid (UDCA) is the first-line treatment for patients with PBC or PSC and significantly delays the progression of liver disease in the majority of cases [2].

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) belongs to the superfamily of nuclear receptors (PPARs) that are ligand-activated transcription factors. PPAR α regulates gene expression by binding with its heterodimeric partner, retinoid X receptor,

to specific PPAR-response elements. PPAR α is primarily expressed in tissues with fatty acid oxidation activity, including the liver, and regulates the expression of multiple genes involved in lipid metabolism and energy homeostasis. It is also involved in protecting against inflammation and cell apoptosis [3]. PPAR α has an important role in both the inhibition of excessive inflammatory responses and in the development of innate host defences [4]. PPAR α also protects against hyperglycaemia-induced endothelial inflammation and the retinal cell apoptosis pathway via blocking of the nuclear factor- κ B pathway [5]. The pivotal role of PPAR α in the maintenance of self-tolerance and immune homeostasis is mediated via iTregs induced by PPAR α -dependent Foxp3 expression [6]. PPAR agonists (fibrates) contribute to a range of actions, including cholesterol and bile acid (BA) homeostasis, and hinder the proinflammatory response. Both bezafibrate, an agonist of all three isoforms of human PPARs, and fenofibrate, a PPAR α -selective agonist, lower serum liver biochemical markers in patients with PBC [7]. The beneficial effect of fibrates in PBC is explained by its anti-cholestatic function, as they have the ability to inhibit bile acid uptake and synthesis, as well as reduce the toxicity of bile through the translocation of phosphatidylcholine into bile [8,9]. In PBC patients who do not respond satisfactorily to UDCA treatment, the addition of bezafibrate has led to the reduction of both fibrosis and the inflammatory response [10]. Although PPAR α agonists are given consideration in the treatment of various cholestatic liver disorders, knowledge of hepatic expression of PPAR α at different stages of the disease is scarce.

MicroRNAs (miRs) are naturally occurring, highly conserved families of short, non-coding RNAs that regulate gene expression either via the inhibition of transcription or by repressing mRNA translation. A number of human diseases, including cancer, metabolic disorders, immune dysfunction and liver diseases, are associated with abnormal miRNA profiles [11]. A single miRNA can target numerous transcripts; therefore, the dysregulated expression of miRs can modify multiple target proteins. Some miRs, such as miR-155 or miR-21, are able to suppress the expression of different PPAR isoforms in distinct tissues [12,13]. MiR-155 was one of the earliest to be identified as a modulator of both the immune response and autoimmune development. Moreover, it appears to be the most relevant miRNA involved in several liver diseases [13–15]. In contrast, miR-21 is most abundantly expressed in hematopoietic cells, and its main role is in resolving inflammation and the suppression of proinflammatory responses [16,17]. Its absence gives rise to vascular inflammation and plaque formation.

In view of the critical role of PPAR α signalling in the regulation of the immune response and the physiological relevance of miR-155 or miR-21 in the regulation of the PPAR α gene, we evaluated the expression of these factors in liver tissue. Primary normal human cholangiocyte and hepatocyte cell lines were used to investigate: (i) whether PPAR α expression is modulated by miR-155 or miR-21, (ii) the effect of toxic bile acids and LPS stimulation on miR-155 and miR-21 expression and (iii) the effect of UDCA treatment on PPAR α expression.

2. Materials and Methods

2.1. Liver Tissue

Liver tissue specimens were obtained either during routine percutaneous liver biopsies from patients with early-stage (F0-F2) esPBC ($n = 18$) or were collected from explanted livers of patients with advanced (F4) PBC ($n = 24$) or primary sclerosing cholangitis (PSC) ($n = 18$) who underwent liver transplantation. Control liver samples ($n = 16$) were comprised of large-margin liver resections of colorectal metastases that showed no pathologist-identified microscopic changes indicative of liver disease. The samples were collected in the Hepatology and Internal Medicine Unit of the Medical University of Warsaw. Each patient gave informed consent prior to participating in the study. Table 1 lists the patient demographic details.

Table 1. Demographic and laboratory features of all analysed subjects.

	Control (n = 16)	esPBC (n = 18)	PBC (n = 24)	PSC (n = 18)
Gender (Female/Male)	7/9	18/0	22/2	6/12
Age (years)	50 (25–60)	55 (28–64)	57 (36–69)	33 (20–57)
Bilirubin (mg/L/dL, NR: 0.1–1.1)	0.5 (0.2–1.0)	0.6 (0.3–7.8)	4.4 (0.6–21)	2.7 (0.4–32.2)
ALP (IU/L, NR: 40–120)	24 (40–118)	178 (47–456)	400 (119–1373)	387 (114–2181)
AST (IU/L, NR: 5–35)	23 (9–34)	40 (13–182)	104 (51–295)	99 (24–500)

Median and range values (in parentheses). Abbreviations: esPBC, early-stage primary biliary cholangitis; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase and NR, normal range.

2.2. Cell Culture and Treatments

Primary normal human cholangiocytes (NHC), as well as the human hepatocarcinoma cell line (HepG2, American Type Culture Collection), were used for the in vitro studies [18,19]. NHC cells were established, characterised and cultured, as previously described [20–22]. For all analyses, NHCs and HepG2s were seeded in 6-well plates (3×10^5 cells/well) and allowed to attach overnight. Cells were transfected with commercially available miRNA Mimics for miR-155 and miR-21 (mirVana® miRNA mimic hsa-miR-155; ID: MC28440; hsa-miR-21 ID: 477975_mir Ambion, Austin, TX, USA). Transient transfection was performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Vehicle-treated cells (Lipofectamine) were used as the control group. Forty-eight hours after transfection, the HepG2 and NHC cells were lysed and frozen as pellets for further analysis. For all experiments, UDCA (U5127-1G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved as a 100 mM stock solution in EtOH. HepG2 and NHC cells were incubated with UDCA alone (50–200 μ M) or two hours prior to 24-h stimulation with a lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111:B4 (LPS, 5 μ g/mL L4391-1MG SIGMA). To investigate the effect of bile acids, HepG2 and NHC cells were exposed to 500 μ M of GCDCA and 150 μ M GCDCA (ID: 24895023, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectively. The effect of lithocholic acid (LCA) at a dose of 100 μ M (LCA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was tested independently in both cell types for 24 h. All experiments were repeated at least three times, and the untreated cells were used as a negative control. Cells were stored at -80°C until molecular analyses were performed.

2.3. MicroRNA and mRNA Extraction and Quantification

Total RNA was extracted using the RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and subjected to reverse transcription using either the TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for the quantitative analysis of microRNA or SuperScript IV RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for further gene expression analysis according to the manufacturer's protocol. The expression of miR-155, miR-21 and the reference miRNA miR-16-5p were measured using TaqMan® Advanced miRNA Assays (Assays ID 002623_mir, 477975_mir and 477860_mir, respectively) and TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The quantitative analyses of the change in expression of specific target genes were measured using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using human TaqMan Gene Expression Assays for PPAR α (Hs00947539_m1), PDCC4 (Hs00377253_m1), PTEN (Hs02621230_s1), IL-6 (Hs001741131-m1), IL-1B (Hs01555410-m1) and 18S RNA (Hs99999901_s1). Relative amounts of transcripts in comparison to controls were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula [23].

2.4. Immunoblot Analysis

Proteins were extracted from liver tissue samples by homogenisation with lysis buffer (RIPA buffer) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP EASYpack; Roche, Basel, Switzerland). Proteins

were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and then blotted onto a polyvinylidene difluoride PVDF membrane (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) under semi-dry transfer conditions (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). After blocking with 5% non-fat dried milk, membranes were probed overnight at 4 °C using the primary antibodies: anti-PPAR α (H-2): SC-398394, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) followed by incubation with peroxidase-conjugated secondary anti-mouse (1:1000) antibodies (GE Healthcare, code: NA9310). Protein loading was normalised to anti-GAPDH (1:5000, sc-25,778 + HRP; Santa Cruz). Bands were visualised through a chemiluminescence detection system (Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, MA, USA) and quantified using the MicroChemi 2.0 System and GelQuant software (Maale HaHamisha, Jerusalem, Israel).

2.5. Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses of liver sections were performed using the ImmPRESS Universal Reagent kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, #SP-2001). The deparaffinisation of the tissue sections were followed by antigen unmasking with antigen retrieval buffer (citrate-based solution, pH 6.0; 95 °C for 20 min). After blocking with ready-to-use normal horse serum (2.5%), samples were incubated with primary antibodies against PPAR α (sc-398394, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Oregon, USA) for 90 min in room temperature. After washing, samples were left for 30 min with ImmPRESS reagent and then dyed with a substrate/chromogen mixture (ImmPACT™ DAB). After washing, samples were counterstained with haematoxylin and mounted (Aqueous Permanent Medium, Dako, Denmark). A Zeiss Axio Imager Z2 optical microscope equipped with the Zen Pro 2011 acquisition program was used to acquire the images.

2.6. Statistical Analysis

StatView software version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) was used for the statistical analyses. Statistical differences between groups were analysed using the Student's *t*-test and multiple groups' comparisons were performed with one-way analysis of variance (ANOVA). All graphs were generated using GraphPad Prism version 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are expressed as the mean \pm SEM. Results were considered statistically significant when *p*-values were less than 0.05.

3. Results

First, human hepatic samples obtained from patients with PBC or PSC during liver transplantation were examined for PPAR α expression. The analysis showed a marked reduction both at the mRNA (Figure 1a) and protein (Figure 1b) levels in PBC livers. The 50% reduction in mRNA expression was significant in comparison to the controls ($p = 0.01$), early-stage esPBC ($p = 0.01$) and in comparison to another cholestatic liver disease, PSC ($p = 0.001$; Figure 1a). A histological evaluation of PPAR α in the control (Figure 1c) and PBS livers (Figure 1d) demonstrated the expression of this protein both in hepatocytes and cholangiocytes within bile ducts. However, in contrast to PBC livers, in the control tissue, a strong nuclear localisation of PPAR α within hepatocytes was observed.

Knowing that both miR-155 and miR-21 target PPAR α , we estimated the levels of these miRs in the liver tissue. The observed phenomenon of the reduction of PPAR α in cirrhotic PBC livers was associated with a substantial induction of miR-155 (3.5-fold increase vs. controls, $p = 0.004$; Figure 2a) and miR-21 (50-fold increase vs. controls, $p = 0.0001$, and $p = 0.01$ vs. PSC; Figure 2b). There was a negative correlation between PPAR α and miR-21 ($r = -0.45$, $p = 0.01$), and the expression of miR-21 positively correlated with the inflammatory cytokines, both IL-6 ($r = 0.56$, $p = 0.003$) and IL-1b ($r = 0.46$, $p = 0.027$).

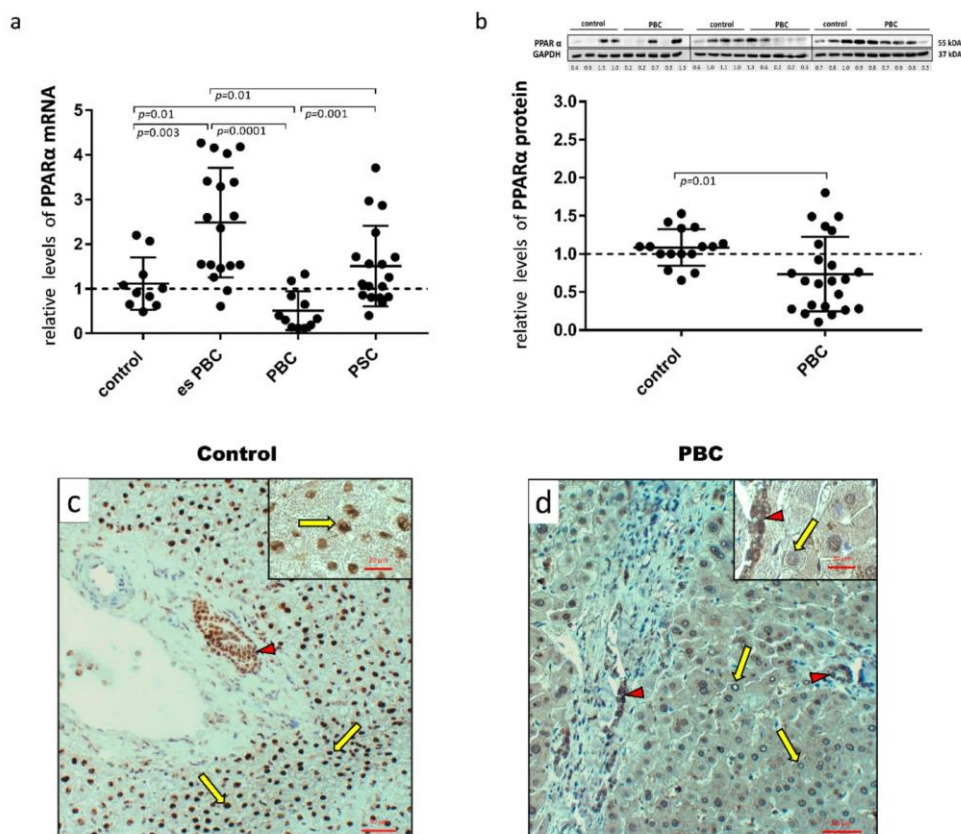


Figure 1. Presence of PPAR α in liver tissue samples obtained from the controls, the early-stages of primary biliary cholangitis (esPBC), cirrhotic PBC and primary sclerosing cholangitis (PSC) patients. PPAR α mRNA expression was suppressed in cirrhotic PBC (a), and Western blot analysis confirmed lower levels of PPAR α at the protein level (b). Levels of gene expression were normalised to the endogenous reference, 18S RNA and the levels of each protein were normalised to GAPDH. Dots illustrate each patient, and the data are presented as mean plus interquartile range (IQR). Statistical analysis was performed using ANOVA or a Student's *t*-test. Immunohistochemical staining clearly showed a dominant nuclear localisation of the PPAR α protein in the control tissue (c) in contrast to liver tissue from patients with PBC (d). Both hepatocytes (yellow arrows) and cholangiocytes (red arrow heads) were positive for PPAR α . Original magnification 200 \times or 400 \times (inserts).

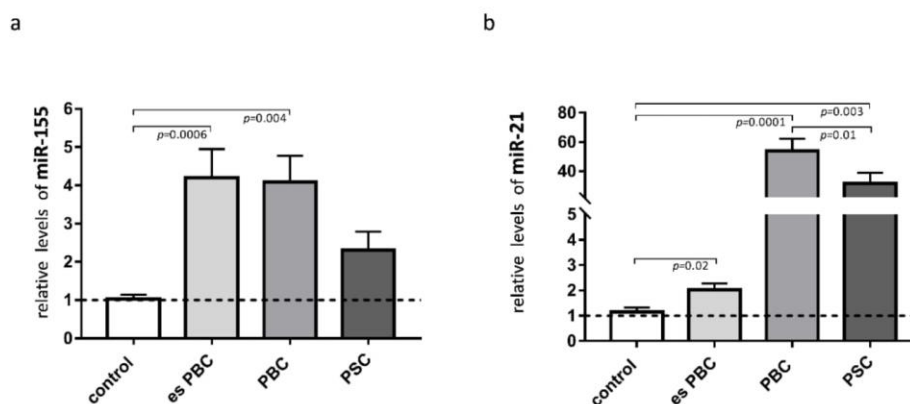


Figure 2. Expression of miR-155 and miR-21 in liver tissue. In patients with primary biliary cholangitis (PBC), both miR-155 (a) and miR-21 (b) expression were increased in comparison to the healthy controls. In livers of PSC patients, only miR-21 was substantially induced. MiR-16 served as the reference for loading. Bars indicate the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA or a Student's *t*-test.

To further investigate the specific role of these miRNAs in the aforementioned liver diseases, we transfected HepG2 and NHC cells with either miR-155 or miR-21 mimics. The experimental overexpression of miR-155 reduced the PPAR α mRNA levels in HepG2 cells (0.6 ± 0.01 vs. $1.0 \pm$ in the controls $p = 0.02$; Figure 3a) but not in NHC cells (Figure 3a). Similarly, the overexpression of miR-21 inhibited PPAR α in HepG2 (0.8 ± 0.05 vs. $1.0 \pm$ in the controls $p = 0.01$ Figure 3b) but not in NHC cells (Figure 3b).

Inflammation contributes to the pathogenesis of PBC; therefore, to investigate the effect of activated inflammatory response on the miRs expression, we exposed HEPG2 and NHC cells to lipopolysaccharide (LPS), which activates Toll-like receptor 4 (TLR4). The incubation of HepG2 cells with LPS led to the induction of miR-155 expression (40-fold, $p = 0.001$ vs. controls, Figure 4a), which was blocked by the UDCA cotreatment ($p = 0.04$ vs. LPS). Moreover, UDCA alone suppressed the baseline expression of miR-155 ($p = 0.008$ vs. controls) in HepG2. In contrast, in NHC cells, miR-155 expression did not change after LPS exposure, but, similarly to HepG2, UDCA substantially reduced both the baseline expression of miR-155 (20% reduction, $p = 0.03$ vs. nontreated control cells) and after LPS exposure (80% reduction, $p = 0.001$ vs. nontreated cells; Figure 4a). The expression of miR-21 was induced by LPS only in NHC cells (1.4-fold increase, $p = 0.0001$ vs. nontreated cells) and was further enhanced by the UDCA cotreatment (4-fold increase, $p = 0.04$ vs. nontreated cells; Figure 4b). PPAR α gene expression was enhanced by UDCA in both LPS-stimulated ($p = 0.0001$ vs. nontreated cells; Figure 4c), and non-LPS-stimulated HepG2 cells ($p = 0.002$ vs. nontreated cells; Figure 4c).

The development of cholestatic liver diseases such as PBC is negatively impacted not only by inflammation but also by chronic exposure to toxic bile acid. There have been few studies on the effect of bile acids on miR profiles. It was reported that, in primary human hepatocytes, chenodeoxycholic acid affected the expression of different miRs; however, neither miR-155 or miR-21 were evaluated in the study [24]. Our study showed that both glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) and lithocholic acid (LCA) induced miR-21 expression in HepG2 cells (1.7 ± 0.15 , $p = 0.004$ and 1.3 ± 0.06 , $p = 0.01$, respectively, Figure 5a,b), whereas, in NHC cells, these bile acids upregulated miR-155 (2.13 ± 0.39 , $p = 0.05$ and 2.253 ± 0.66 , $p = 0.05$, respectively, Figure 5a,b). Moreover, in NHC cells, the expression of miR-21 was stimulated by LCA exposure (Figure 5b). Interestingly, one of

these bile acids species, namely GCDCA, decreased the PPAR α level but only in the HepG2 cell line (0.84 ± 0.03 , $p = 0.002$, Figure 5a).

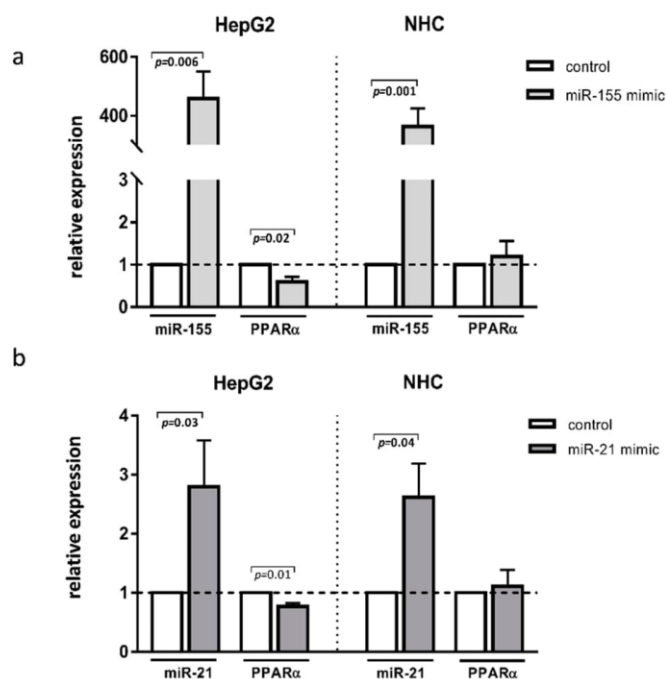


Figure 3. PPAR α , expression after miR-155 or miR-21 activation. Human hepatocarcinoma (HepG2) and normal human cholangiocyte (NHC) cells were transfected with miR-155 mimic (a) or miR-21 mimic (b). Increased levels of these miRNAs were confirmed in both cell lines. Overexpression of both miR-155 and miR-21 led to the strong downregulation of PPAR α in HepG2 but not in NHC cells. Each experiment was repeated at least three times. Levels of gene expression were normalised to the reference miR-16 for miRNA or 18S RNA for other genes. Bars indicate the mean \pm SEM. Student's *t*-test was used for the quantitative data analysis.

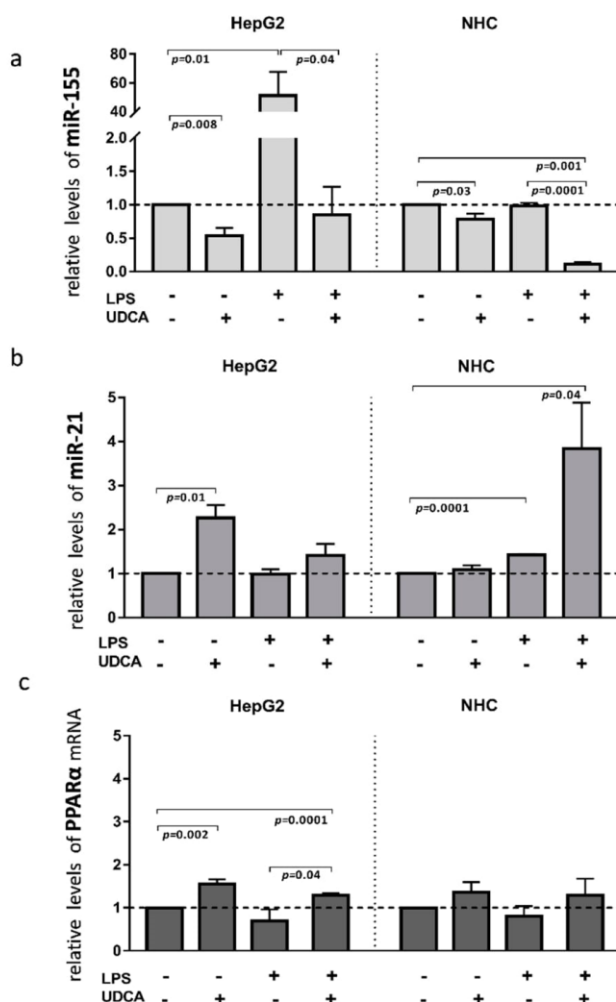


Figure 4. The effect of lipopolysaccharide (LPS) and/or ursodeoxycholic acid (UDCA) exposure in human hepatocarcinoma (HepG2) and normal human cholangiocyte (NHC) cell lines. LPS stimuli enhanced miR-155 (a) in HepG2 cells and miR-21 (b) in NHC cells. MiR-155 was enhanced after the incubation of HepG2 cells with LPS, whereas, in NHC, the expression of miR-21 was induced by LPS stimuli. UDCA reduced both the baseline and LPS-induced miR-155 expression in HepG2 cells, which was accompanied by the upregulation of PPAR α . In NHC cells, UDCA enhanced the expression of miR-21 but did not affect PPAR α expression (c). Bars indicate the mean \pm SEM. The statistical analysis was performed using ANOVA.

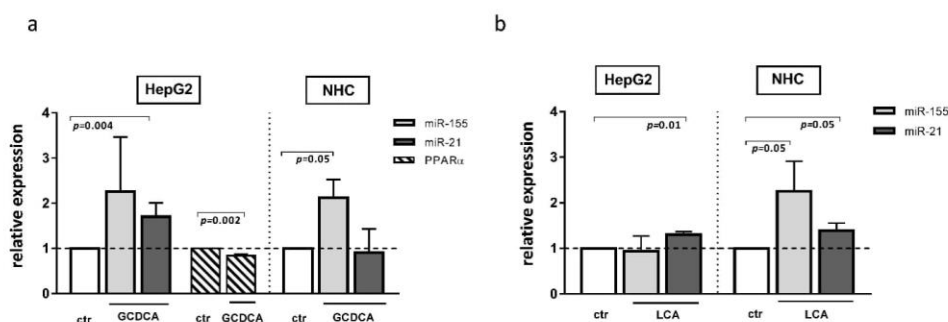


Figure 5. The effect of glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) and lithocholic acid (LCA) in human hepatocarcinoma (HepG2) and normal human cholangiocytes (NHC) cells. In HepG2 cells, both GCDCA (a) and LCA (b) induced miR-21. In NHC cells, both bile acids induced miR-155, whereas miR-21 was enhanced only after LCA stimulation. The PPAR α level was reduced in HepG2 after GCDCA treatment (a). Each experiment was repeated at least three times. MiR-16 was used as an endogenous reference for miRNA or 18S RNA for other genes. Bars indicate the mean \pm SEM. A Student's *t*-test were used for a quantitative data analysis.

4. Discussion

This study provides new insight into the regulation of PPAR α in cholestatic livers. In cirrhotic PBC livers, a substantial reduction of PPAR α expression was associated with the upregulation of both miR-21 and miR-155. A cell-based analysis demonstrated that the experimental overexpression of either miR-155 or miR-21 inhibited PPAR α mRNA in hepatocytes, whereas, in cholangiocytes, only the overexpression of miR-21 led to PPAR α downregulation. The factors responsible for the induction of these miRNAs appeared to be cell type-specific when the HepG2 and NHC cell lines were compared. Moreover, a new biological function of UDCA as a modulator of miR-21 and miR-155 in those cells was found.

We observed a substantial reduction of both the mRNA and protein levels of PPAR α in cirrhotic PBC livers. In contrast, in another cholestatic condition such as PSC, the hepatic expression of this nuclear receptor was comparable to the control values. Moreover, this study showed that the inhibition of PPAR was present only in advanced phases and not in the early stages of the disease. This is in line with reports on altered hepatic PPAR α expression in liver diseases. In patients with Wilson's disease, PPAR α expression was found to be altered in proportion to the progression of liver injury, i.e., it was enhanced in patients with mild liver impairment but reduced in patients with moderate or intense liver damage [25]. Similarly, in subjects with non-alcoholic steatohepatitis (NASH), hepatic PPAR α expression declined with the development of NASH features and was negatively correlated with the severity of steatosis, hepatocyte ballooning or fibrosis [26]. In the context of cholestatic liver diseases, our study represents a novel report, as there is a lack of information on the hepatic expression of this nuclear expression under conditions of sustained cholestasis.

PPAR α plays a crucial role in bile acid homeostasis via the regulation of bile acid biosynthesis, transport and secretion [27]. Furthermore, it has been demonstrated that fenofibrate-activated PPAR α signalling eliminates oxidative stress and attenuates cholestatic liver injury [28]. In patients with PBC, therapies based on PPAR α agonists are well-tolerated and allied with a significant decrease in the alkaline phosphatase (ALP) levels and anti-inflammatory markers [29,30]. Moreover, a prospective, long-term, longitudinal study showed a potentially beneficial effect of bezafibrate in combination with UDCA in patients who had an inadequate response to UDCA [10]. A key factor influencing the effective-

ness of fibrate-based therapy is the adequate expression of PPAR α ; however, our study showed a substantial reduction of PPAR α expression in cirrhotic PBC livers. Therefore, understanding the molecular mechanism responsible for the hepatic reduction of PPAR α is of particular importance.

This study focused on two miRNAs that are known to modulate the PPAR α gene, i.e., miR-155 and miR-21. We showed that, in cirrhotic PBC livers, the expressions of both miRNAs were substantially upregulated, which is in contrast to cirrhotic PSC, where only miR-21 was increased. MiR-155 modifies proinflammatory responses that affect not only immune cells but also hepatic parenchymal cells, including hepatocytes. MiR-155 is known to exert pleiotropic functions depending on the aetiology and disease context. However, miR-155 expression in cholestatic diseases has not been described to date, although there are reports from other hepatobiliary diseases. The serum level of miR-155 is increased in patients with alcoholic cirrhosis [13] and in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [31]. In patients with biliary atresia or PBC, an inverse correlation between miR-155 and the suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1) has been reported [32,33]. In addition, the antiviral treatment of hepatitis C (HCV) patients normalised the level of miR-155 in peripheral monocytes in contrast to non-responders [14].

Since the specific suppression of PPAR α in PBC livers was accompanied by a substantial upregulation of miR-155 and miR-21, we conducted functional studies in hepatocyte and cholangiocyte cells. Of note, the experimental overexpression of either miR-155 or miR-21 suppressed the PPAR α levels in HepG2 cells but not in NHC cells. The downregulation of PPAR α by miR-21 has been described in numerous pathologic processes. For example, miR-21 directly inhibits PPAR α translation [12,34], which promotes the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and favours the adhesion of inflammatory cells [35] or leads to retinal microvascular dysfunction [36]. In the context of liver pathology, PPAR α was demonstrated to be a direct target of miR-155 or miR-21 in mouse biliary, hepatic and inflammatory cells in a mouse model of alcohol-induced steatohepatitis, NASH and in the development of hepatocellular carcinoma (HCC) [13,34,35,37].

Further, to investigate the factors involved in the hepatic upregulation of these miRNAs, we induced inflammatory responses by LPS or exposed the cells to toxic bile acids. The factors involved in the hepatic upregulation of the miRNAs were cell-specific. Consistent with previous studies [38,39], we found that miR-155 expression was induced by the inflammatory response activated by LPS exposure but only in HepG2 cells. In NHC cells, the induction of this miRNA was only observed in response to toxic bile acids (both GCDA and LCA). Comparatively little is known about the effects of bile acids on the cellular microRNAome. In accordance with our observations, chenodeoxycholic acid did not affect miR-155 expression in primary human hepatocytes [24]; however, the acidic, bile-induced upregulation of miR-155 was noted in human hypopharyngeal primary cells [40]. Here, we present the first report that prolonged exposure to bile acids may induce miR-155 expression in normal human cholangiocytes.

Interestingly, LPS-induced miR-155 expression in HepG2 was overridden by UDCA treatment. Moreover, UDCA effectively reduced the baseline expression of miR-155 in both HepG2 and NHC cells. Given the relevance of miR-155 dysregulation in the proper homeostasis of the immune response and macrophage polarisation [41], this is a noteworthy observation that confirms the positive role of UDCA in modulating miR-155 expression. Previously, UDCA was shown to effectively decrease both miR-34 in primary rat hepatocytes and miR-122 in human serum [42,43].

Considerable evidence has highlighted miR-21 as one of the key switches that controls the magnitude of inflammation [16,44]. However, its presence is not entirely attributed to a proinflammatory or an immunosuppressive condition. Recently, miR-21 has been proposed as a negative modulator of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) signalling by targeting PTEN and PDCD4, which resulted in the elevated production of IL-10 [44,45]. Moreover, miR-21 influences the fine balance between Th1 and Th2 responses, and elevated miR-21 expression leads to a reduction of IL-6 secretion and the induction of IL-10 production in

macrophages [46–48]. Similarly, a negative regulation of the TNF- α levels by miR-21 has been reported [16,44,48]. Thus, miR-21 dysregulation that has been observed in a number of inflammatory diseases promotes an anti-inflammatory, immunosuppressive environment. The absence of miR-21 in hematopoietic cells also enhances vascular inflammation and atherosclerosis [17]. Interestingly, we found a substantially induced expression of miR-21 in the liver tissue of both PBC and PSC patients. miR-21 was previously implicated in the development of fibrosis; however, in this study, a small increase was observed in the early stages of PBC (F0-F2), followed by a substantial increase in cirrhotic PBC. There was no correlation between the levels of miR-21 and the stages of fibrosis, which is in agreement with previous reports [49,50]. Even though miR-21 ablation has been shown to protect from fibrosis and acute oxidative stress in the livers of mice with bile duct ligation, it was an acute model of cholestasis, which did not completely mimic the sustained cholestasis that occurs in PBC [51]. Interestingly, the authors noticed that miR-21 $^{-/-}$ mice displayed an increased hepatic TLR4 expression, which was attributed to the anti-inflammatory function of miR-21 [51].

Our current study demonstrated that LPS, and two distinct bile acid species (LCA and GCDA) induced miR-21 expression; however, the responses were cell-dependent. Consequently, the upregulation of miR-21 was observed in NHC cells after LPS or LCA incubation. This was in contrast to HepG2 cells, where GCDA and LCA exposure triggered miR-21 induction. Previously, LPS was reported to induce miR-21 in a number of cell lines, including human biliary epithelial cells and hepatic stellate cells [52,53]. In contrast to our study, an inhibition of miR-21 by another bile acid, cytotoxic deoxycholic acid (DCA) in a dose-dependent manner was reported in primary rat hepatocytes [54]. Interestingly, we noticed a further upregulation of miR-21 by UDCA in NHC cells incubated with LPS, which is in line with the observation that UDCA is a strong inducer of miR-21 in regenerating rat livers and cultured HepG2 cells [54,55]. The induction of miR-21 in murine macrophages via a treatment with LPS was associated with silencing its target genes, PTEN and PDCD4, which are powerful inhibitors of the AP-1 transcription factor [44]. In this study, the forced overexpression of miR-21 in HepG2 cells decreased PDCD4 and PTEN mRNA expressions (Figure S1). Bile acids are strong modulators of AP-1 activity, and the increase of miR-21 expression stimulated by UDCA was shown to inhibit the activation of AP-1 and thus favour a pro-proliferative environment [56].

Cumulatively, hepatic PPAR α expression is substantially reduced in PBC livers, potentially as a result of enhanced miR-155 expression. Furthermore, the increased miR-21 expression in PBC and PSC livers may be implicated in resolving inflammation. UDCA effectively reduced both baseline and lipopolysaccharide-induced miR-155 expression, which prevented the suppression of PPAR.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11182880/s1>, Figure S1: Programmed cell death 4 (PDCD4) and phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression after miR-21 activation.

Author Contributions: Conceptualisation, M.M.; methodology, M.A., A.K.-P., J.A. and M.M.; validation, M.M.; formal analysis, M.A. and J.A.; investigation, M.M., A.K.-P. and P.M.; resources, M.M. and P.M.; data curation, M.A. and J.A.; writing—original draft preparation, M.M.; writing—review and editing, all authors; visualisation, M.A. and J.A.; supervision M.M., P.M. and J.M.B.; project administration, M.M. and funding acquisition, M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Program of Polish Minister of Science and Higher Education “Regional Initiative of Excellence” in 2019–2022, project no, 002/RID/2018/19.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Pomeranian Medical University (BN-001/43/06).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Lleo, A.; Wang, G.Q.; Gershwin, M.E.; Hirschfield, G. Primary biliary cholangitis. *Lancet* **2020**, *396*, 1915–1926. [\[CrossRef\]](#)
- Corpechot, C.; Abenavoli, L.; Rabahi, N.; Chretien, Y.; Andreani, T.; Johanet, C.; Chazouilleres, O.; Poupon, R. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **2008**, *48*, 871–877. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ghonem, N.S.; Assis, D.N.; Boyer, J.L. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* **2015**, *62*, 635–643. [\[CrossRef\]](#)
- Christofides, A.; Konstantinidou, E.; Jani, C.; Boussiotis, V.A. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism* **2021**, *114*, 154338. [\[CrossRef\]](#)
- Hu, Y.; Chen, Y.; Ding, L.; He, X.; Takahashi, Y.; Gao, Y.; Shen, W.; Cheng, R.; Chen, Q.; Qi, X.; et al. Pathogenic role of diabetes-induced PPAR+/- down-regulation in microvascular dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 15401–15406. [\[CrossRef\]](#)
- Lei, J.; Hasegawa, H.; Matsumoto, T.; Yasukawa, M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists together with TGF-beta convert human CD4+. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 7186–7198. [\[CrossRef\]](#)
- Corpechot, C.; Chazouilleres, O.; Rousseau, A. Bezafibrate in primary biliary cholangitis. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 985.
- Grigorian, A.Y.; Mardini, H.E.; Corpechot, C.; Poupon, R.; Levy, C. Fenofibrate is effective adjunctive therapy in the treatment of primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2015**, *39*, 296–306. [\[CrossRef\]](#)
- Gallucci, G.M.; Trottier, J.; Hemme, C.; Assis, D.N.; Boyer, J.L.; Barbier, O.; Ghonem, N.S. Adjunct fenofibrate up-regulates bile acid glucuronidation and improves treatment response for patients with cholestasis. *Hepatol. Commun.* **2021**, *5*, 2035–2051. [\[CrossRef\]](#)
- Sorda, J.A.; Gonzalez, B.E.; Barreyro, F.J.; Avagnina, A.; Carballo, P.; Paes de Lima, A.; Daruich, J. Bezafibrate therapy in primary biliary cholangitis refractory to ursodeoxycholic acid: A longitudinal study of paired liver biopsies at 5 years of follow up. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2021**, *54*, 1202–1212. [\[CrossRef\]](#)
- Szabo, G.; Bala, S. MicroRNAs in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 542–552. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kida, K.; Nakajima, M.; Mohri, T.; Oda, Y.; Takagi, S.; Fukami, T.; Yokoi, T. PPARalpha is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2467–2476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bala, S.; Csak, T.; Saha, B.; Zatsiorsky, J.; Kodys, K.; Catalano, D.; Satishchandran, A.; Szabo, G. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1378–1387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bala, S.; Tilahun, Y.; Taha, O.; Alao, H.; Kodys, K.; Catalano, D.; Szabo, G. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hartmann, P.; Tacke, F. Tiny RNA with great effects: miR-155 in alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1214–1216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sheedy, F.J. Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 19. [\[CrossRef\]](#)
- Canfran-Duque, A.; Rotllan, N.; Zhang, X.; Fernandez-Fuertes, M.; Ramirez-Hidalgo, C.; Araldi, E.; Daimiel, L.; Busto, R.; Fernandez-Hernando, C.; Suarez, Y. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherosclerosis. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1244–1262. [\[CrossRef\]](#)
- Weerachayaphorn, J.; Amaya, M.J.; Spirli, C.; Chansela, P.; Mitchell-Richards, K.A.; Ananthanarayanan, M.; Nathanson, M.H. Nuclear factor, erythroid 2-like 2 regulates expression of type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calcium signaling in cholangiocytes. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 211–222. [\[CrossRef\]](#)
- Kilanczyk, E.; Ruminkiewicz, D.; Banales, J.M.; Milkiewicz, P.; Milkiewicz, M. DHEA protects human cholangiocytes and hepatocytes against apoptosis and oxidative stress. *Cells* **2022**, *11*, 1038. [\[CrossRef\]](#)
- Urribarri, A.D.; Munoz-Garrido, P.; Perugorria, M.J.; Erice, O.; Merino-Azpitarte, M.; Arbelaz, A.; Lozano, E.; Hijona, E.; Jimenez-Aguero, R.; Fernandez-Barrena, M.G.; et al. Inhibition of metalloprotease hyperactivity in cystic cholangiocytes halts the development of polycystic liver diseases. *Gut* **2014**, *63*, 1658–1667. [\[CrossRef\]](#)
- Banales, J.M.; Sáez, E.; Uriz, M.; Sarvide, S.; Urribarri, A.D.; Splinter, P.; Bogert, P.S.T.; Bujanda, L.; Prieto, J.; Medina, J.F.; et al. Upregulation of mir-506 leads to decreased AE2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **2012**, *56*, 687–697. [\[CrossRef\]](#)
- De Urturi, D.S.; Buque, X.; Porteiro, B.; Folgueira, C.; Mora, A.; Delgado, T.C.; Prieto-Fernandez, E.; Olaizola, P.; Gomez-Santos, B.; Apodaka-Biguri, M.; et al. Methionine adenosyltransferase 1a antisense oligonucleotides activate the liver-brown adipose tissue axis preventing obesity and associated hepatosteatosis. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1096. [\[CrossRef\]](#)
- Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. *Rev. Biol.* **2008**, *6*, 4371095.
- Krattinger, R.; Bostrom, A.; Lee, S.M.L.; Thasler, W.E.; Schioth, H.B.; Kullak-Ublick, G.A.; Mwynyi, J. Chenodeoxycholic acid significantly impacts the expression of miRNAs and genes involved in lipid, bile acid and drug metabolism in human hepatocytes. *Life Sci.* **2016**, *156*, 47–56. [\[CrossRef\]](#)

25. Nagasaka, H.; Miida, T.; Inui, A.; Inoue, I.; Tsukahara, H.; Komatsu, H.; Hiejima, E.; Fujisawa, T.; Yorifuji, T.; Hirano, K.; et al. Fatty liver and anti-oxidant enzyme activities along with peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha expressions in the liver of Wilson's disease. *Mol Genet. Metab.* **2012**, *107*, 542–547. [\[CrossRef\]](#)
26. Francque, S.; Verrijken, A.; Caron, S.; Prawitt, J.; Paumelle, R.; Derudas, B.; Lefebvre, P.; Taskinen, M.R.; Van, H.W.; Mertens, I.; et al. PPARalpha gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 164–173. [\[CrossRef\]](#)
27. Li, F.; Patterson, A.D.; Krausz, K.W.; Tanaka, N.; Gonzalez, F.J. Metabolomics reveals an essential role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in bile acid homeostasis. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1625–1635. [\[CrossRef\]](#)
28. Zhao, Q.; Yang, R.; Wang, J.; Hu, D.D.; Li, F. PPARalpha activation protects against cholestatic liver injury. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9967. [\[CrossRef\]](#)
29. Carrion, A.F.; Lindor, K.D.; Levy, C. Safety of fibrates in cholestatic liver diseases. *Liver Int.* **2021**, *41*, 1335–1343. [\[CrossRef\]](#)
30. Schattenberg, J.M.; Pares, A.; Kowdley, K.V.; Heneghan, M.A.; Caldwell, S.; Pratt, D.; Bonder, A.; Hirschfield, G.M.; Levy, C.; Vierling, J.; et al. A randomized placebo-controlled trial of elafibranor in patients with primary biliary cholangitis and incomplete response to UDCA. *J. Hepatol.* **2021**, *74*, 1344–1354. [\[CrossRef\]](#)
31. Longchamps, R.J.; Abey, S.K.; Martino, A.C.; Henderson, W.A. Letter: Gender-associated cell-free microRNA profiles in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2014**, *39*, 997–998. [\[CrossRef\]](#)
32. Kempinska-Podhorodecka, A.; Milkiewicz, M.; Wasik, U.; Ligocka, J.; Zawadzki, M.; Krawczyk, M.; Milkiewicz, P. Decreased expression of vitamin D receptor affects an immune response in primary biliary cholangitis via the VDR-miRNA155-SOCS1 pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 289. [\[CrossRef\]](#)
33. Zhao, R.; Dong, R.; Yang, Y.; Wang, Y.; Ma, J.; Wang, J.; Li, H.; Zheng, S. MicroRNA-155 modulates bile duct inflammation by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 in biliary atresia. *Pediatr. Res.* **2017**, *82*, 1007–1016. [\[CrossRef\]](#)
34. Loyer, X.; Paradis, V.; Henique, C.; Vion, A.C.; Colnot, N.; Guerin, C.L.; Devue, C.; On, S.; Scetbun, J.; Romain, M.; et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPARalpha expression. *Gut* **2016**, *65*, 1882–1894. [\[CrossRef\]](#)
35. Zhou, J.; Wang, K.C.; Wu, W.; Subramaniam, S.; Shyy, J.Y.; Chiu, J.J.; Li, J.Y.; Chien, S. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor-alpha in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10355–10360. [\[CrossRef\]](#)
36. Chen, Q.; Qiu, F.; Zhou, K.; Matlock, H.G.; Takahashi, Y.; Rajala, R.V.S.; Yang, Y.; Moran, E.; Ma, J.X. Pathogenic role of microRNA-21 in diabetic retinopathy through downregulation of PPARalpha. *Diabetes* **2017**, *66*, 1671–1682. [\[CrossRef\]](#)
37. Koehnig, A.B.; Barajas, J.M.; Guerrero, M.J.; Ghoshal, K. A comprehensive analysis of argonaute-CLIP data identifies novel, conserved and species-specific targets of miR-21 in human liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 851. [\[CrossRef\]](#)
38. Bala, S.; Marcos, M.; Kodys, K.; Csak, T.; Catalano, D.; Mandrekar, P.; Szabo, G. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor [alpha] (TNF[alpha]) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1436–1444. [\[CrossRef\]](#)
39. Csak, T.; Bala, S.; Lippai, D.; Kodys, K.; Catalano, D.; Iracheta-Vellve, A.; Szabo, G. MicroRNA-155 deficiency attenuates liver steatosis and fibrosis without reducing inflammation in a mouse model of steatohepatitis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129251. [\[CrossRef\]](#)
40. Doukas, S.G.; Vageli, D.P.; Sasaki, C.T. NF-kappaB inhibition reverses acidic bile-induced miR-21, miR-155, miR-192, miR-34a, miR-375 and miR-451a deregulations in human hypopharyngeal cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 2922–2934. [\[CrossRef\]](#)
41. Mashima, R. Physiological roles of miR-155. *Immunology* **2015**, *145*, 323–333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Kim, D.J.; Yoon, S.; Ji, S.C.; Yang, J.; Kim, Y.K.; Lee, S.; Yu, K.S.; Jang, I.J.; Chung, J.Y.; Cho, J.Y. Ursodeoxycholic acid improves liver function via phenylalanine/tyrosine pathway and microbiome remodelling in patients with liver dysfunction. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11874. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Castro, R.E.; Ferreira, D.M.; Afonso, M.B.; Borralho, P.M.; Machado, M.V.; Cortez-Pinto, H.; Rodrigues, C.M. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 119–125. [\[CrossRef\]](#)
44. Sheedy, F.J.; Palsson-McDermott, E.; Hennessy, E.J.; Martin, C.; O'Leary, J.J.; Ruan, Q.; Johnson, D.S.; Chen, Y.; O'Neill, L.A. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 141–147. [\[CrossRef\]](#)
45. Merline, R.; Moreth, K.; Beckmann, J.; Nastase, M.V.; Zeng-Brouwers, J.; Tralhao, J.G.; Lemarchand, P.; Pfeilschifter, J.; Schaefer, R.M.; Iozzo, R.V.; et al. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci. Signal.* **2011**, *4*, ra75. [\[CrossRef\]](#)
46. Caescu, C.I.; Guo, X.; Tesfa, L.; Bhagat, T.D.; Verma, A.; Zheng, D.; Stanley, E.R. Colony stimulating factor-1 receptor signaling networks inhibit mouse macrophage inflammatory responses by induction of microRNA-21. *Blood* **2015**, *125*, e1–e13. [\[CrossRef\]](#)
47. Barnett, R.E.; Conklin, D.J.; Ryan, L.; Keskey, R.C.; Ramjee, V.; Sepulveda, E.A.; Srivastava, S.; Bhatnagar, A.; Cheadle, W.G. Anti-inflammatory effects of miR-21 in the macrophage response to peritonitis. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *99*, 361–371. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhu, W.D.; Xu, J.; Zhang, M.; Zhu, T.M.; Zhang, Y.H.; Sun, K. MicroRNA-21 inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting nuclear factor-kappaB. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 4616–4622.

49. Caviglia, J.M.; Yan, J.; Jang, M.K.; Gwak, G.Y.; Affo, S.; Yu, L.; Olinga, P.; Friedman, R.A.; Chen, X.; Schwabe, R.F. MicroRNA-21 and dicer are dispensable for hepatic stellate cell activation and the development of liver fibrosis. *Hepatology* **2018**, *67*, 2414–2429. [[CrossRef](#)]
50. Wasik, U.; Kempinska-Podhorodecka, A.; Bogdanos, D.P.; Milkiewicz, P.; Milkiewicz, M. Enhanced expression of miR-21 and miR-150 is a feature of anti-mitochondrial antibody-negative primary biliary cholangitis. *Mol. Med.* **2020**, *26*, 8. [[CrossRef](#)]
51. Afonso, M.B.; Rodrigues, P.M.; Simao, A.L.; Gaspar, M.M.; Carvalho, T.; Borralho, P.; Banales, J.M.; Castro, R.E.; Rodrigues, C.M.P. miRNA-21 ablation protects against liver injury and necroptosis in cholestasis. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 857–872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhou, R.; Hu, G.; Gong, A.Y.; Chen, X.M. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3222–3232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wu, N.; McDaniel, K.; Zhou, T.; Ramos-Lorenzo, S.; Wu, C.; Huang, L.; Chen, D.; Annable, T.; Francis, H.; Glaser, S.; et al. Knockout of microRNA-21 attenuates alcoholic hepatitis through the VHL/NF-kappaB signaling pathway in hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* **2018**, *315*, G385–G398. [[CrossRef](#)]
54. Castro, R.E.; Ferreira, D.M.; Zhang, X.; Borralho, P.M.; Sarver, A.L.; Zeng, Y.; Steer, C.J.; Kren, B.T.; Rodrigues, C.M. Identification of microRNAs during rat liver regeneration after partial hepatectomy and modulation by ursodeoxycholic acid. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* **2010**, *299*, G887–G897. [[CrossRef](#)]
55. Rodrigues, P.M.; Afonso, M.B.; Simao, A.L.; Borralho, P.M.; Rodrigues, C.M.P.; Castro, R.E. Inhibition of NF-kappaB by deoxycholic acid induces miR-21/PDCD4-dependent hepatocellular apoptosis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17528. [[CrossRef](#)]
56. Shah, S.A.; Volkov, Y.; Arfin, Q.; Abdel-Latif, M.M.; Kelleher, D. Ursodeoxycholic acid inhibits interleukin beta 1 and deoxycholic acid-induced activation of NF-kappaB and AP-1 in human colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 532–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Druga publikacja z cyklu prezentowanych prac

JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 2021, 72, 4, 529-535
www.jpp.krakow.pl | DOI: 10.26402/jpp.2021.4.04

M. ADAMOWICZ¹, P. MILKIEWICZ^{2,3}, A. KEMPINSKA-PODHORODECKA¹

5-AMINOSALICYLIC ACID INHIBITS THE EXPRESSION OF ONCOMiRS
AND PRO-INFLAMMATORY microRNAs: AN *IN VITRO* STUDY

¹Department of Medical Biology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland; ²Liver and Internal Medicine Unit, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland; ³Translational Medicine Group, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

5-aminosalicylic acid (5-ASA) is commonly used as the first-line treatment for ulcerative colitis (UC). In this study, we show that the mechanism responsible for the protective effect of 5-ASA is associated with the modulation of non-coding microRNA molecule (miRNA) expression. Stimulation of human intestinal epithelial cells (Caco-2) with 1000 μ M of 5-ASA suppressed the levels of miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 and miR-506, which are known to be involved in the regulation of colitis and/or colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. The 5-ASA-induced inhibitions of these miRNAs were associated with significant inductions of their target genes such as vitamin D receptor (VDR), suppressor of cytokine signaling (SOCS1), Forkhead box O (FOXO3a) and DNA methyltransferase 1 (DNMT1). The relationships between the selected miRNAs and their target genes were further confirmed in Caco-2 cells transfected with specific miRNA inhibitors or miRNA mimics. Moreover, we showed that 5-ASA has the potential to hinder miR-155 expression induced by the transfection of miR-155 mimic into Caco-2 cells. These findings underline the anti-inflammatory and chemoprotective effects of 5-ASA treatment.

Key words: *ulcerative colitis, 5-aminosalicylic acid, microRNA, Caco-2 cell line, drug targets, microRNA pharmacogenomics, vitamin D receptor, Forkhead box O, DNA methyltransferase*

INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory bowel disease, which may lead to ulceration, oedema, and haemorrhage. These changes begin in the distal part of the colon and rectum (1, 2). Accumulating evidence suggests that the presence of UC is an important additional risk factor for the development of colorectal cancer (CRC) 8 – 10 years after diagnosis of the disease (3). 5-ASA is commonly used in UC (4), it greatly reduces the signs and symptoms of the disease and brings long-term remission, but also this drug was reported to have a chemopreventive effect on inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer (5). It penetrates the colon mucosa easily and reduces the production of prostaglandins (6, 7). 5-ASA modifies various signalling pathways including the NF- κ B, PPAR- γ , MAPK, and PI3K/Akt axes, which are thought to be responsible for the inhibition of colonic inflammation. 5-ASA alleviates macroscopic and microscopic signs of IBD disease in experimental model of colitis. It also restores the expression of μ -protocadherin (a protein expressed by colorectal epithelial cells that is downregulated upon malignant transformation) and promotes the sequestration of β -catenin to the plasma membrane (8-11). Although previous work has suggested that treatment with 5-ASA might be chemo-preventive for colorectal cancer (12, 13), the molecular mechanisms underlying the effect of 5-ASA are not entirely understood.

Although the aetiology of colitis in UC remains largely unknown, a growing body of evidence has underlined the important role of epigenetic factors, such as a group of non-coding RNAs known as microRNAs (miRNAs), which play an essential role in post-transcriptional regulation of gene expression (14). The involvement of miRNAs is related to a large variety of physiological processes whose deregulation may lead to excessive and long-term inflammation. Indeed, microRNAs have been reported to be a crucial regulator of the immune response (15). MicroRNAs not only modulate the proliferation and maturation of immune cells, but also induce pro-inflammatory cytokines, which are known to activate the immune system and perpetuate the inflammatory process (14, 16). Alterations in miRNA expressions are associated with UC severity (17-19). Most studies concentrate on profiling miRNAs in the active and inactive forms of UC (19-21) or demonstrate their role in controlling major signalling pathways leading to increased immune and inflammatory responses or mucosal barrier dysfunction (22, 23). The involvement of miRNAs in the inflammatory process has also been confirmed in autoimmune diseases (24, 25). Hence, the potential therapeutic application of targeting miRNAs has received increased attention and both the inhibition and over-expression of miRNAs are pharmaceutically possible, as has been shown in clinical trials (26, 27).

However, the direct modulatory effect of drugs on miRNA expression remains largely unknown. Recently, the effect of mesalamine (a form of 5-ASA) on miR-206 expression was

observed in patients with UC (28). The over-expression of miR-206 decreased CRC cell proliferation, migration, and invasion (29). An analysis of colon biopsy tissues has shown significantly lower expressions of miR-206 in UC patients who received a higher dose of mesalazine (28). These results were confirmed in the human colon cancer cell line-HT29 (28). Furthermore the downregulation of miR-130a and miR-135b upon 5-ASA treatment was demonstrated in Caco-2 cells (10). However, the modulatory role of 5-ASA has never been fully examined in the context of other microRNAs that are specifically involved in the inflammatory process. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of 5-ASA on miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 and miR-506 expressions in human intestinal epithelial cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatments

The experiments were conducted using the human intestinal epithelial cell line Caco-2, which is widely used as a model for assessing drug interaction (30). Caco-2 from the American Type Culture Collection (ATCC) were grown in dedicated Eagle's Minimum Essential Medium supplemented with 10% foetal bovine serum (ATCC 30-2025) and 1% antibiotic solution (penicillin/streptomycin; Biowest, Nuaille, France). Cells were cultured in 25-cm² or 75-cm² culture flasks and routinely maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. The medium was refreshed every three days and cultured cells reached 80–90% confluence within seven days after passage.

5-ASA cell treatment

To determine the non-toxic level of drugs, a series of initial *in vitro* experiments was conducted with Caco-2 cells treated with different concentrations of 5-amino-2-hydroxybenzoic acid (5-ASA, mesalazine ≥ 99%, ID: A3537-25G; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Assessment of the viability of the cells after stimulation with doses of 5-ASA (50–1000 μM) was performed by colorimetric MTT assay and compared to the medium-treated (control) group. Based on the results of those experiments, the final concentrations of 500 μM and 1000 μM 5-ASA were used in subsequent experiments.

To evaluate the influence of 5-ASA treatment on microRNA expressions, Caco-2 were aliquoted into a 6-well plate (10⁶ cells/well) to adhere over-night before the planned experiments. After 24 h of culture, cells were treated for next 24 h with or without 5-ASA. For all experiments, 5-ASA was dissolved as a 100 mM stock solution in Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Cat #D2650-5X5ML, CAS: 67-68-5) and protected from light according to the manufacturer's instructions. Cell pellets were stored at –80°C until further miRNA and mRNA analysis. All experiments were repeated four times (n = 4).

Transfection assay

Caco-2 cells were transfected with miRNA Inhibitors or miRNA Mimics for miR-125b and miR-155 using Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). All transfections with commercially available reagents (Ambion mirVana® miRNA inhibitor: hsa-miR-125b-5p ID: MH10148, hsa-miR-155-5p ID: MH28440, mirVana® miRNA mimic: hsa-miR-125b ID: MC10148, hsa-miR-155; ID: MC28440; Ambion, Austin, TX, USA) were performed according to manufacturer's instructions. Caco-2 cells

at 80% confluence were seeded on a 6-well plate at a concentration of 1 × 10⁶ cells/well 24 h prior to the experiment. On the day of transfection, cells were incubated with transfection solution and maintained contact with cells for 4 hours. Culture medium was then removed to reduce the potential cytotoxicity effect of lipofectamine and replaced with media supplemented with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. At 48 h post-transfection, cells were collected, centrifuged at 10,000 × g for 8 min at 4°C and then frozen as pellets.

To confirm the inhibitory 5-ASA effect on miR-155 expression, hsa-miR-155-5p mirVana® miRNA mimic was transfected into Caco-2 cells using lipofectamine RNAiMAX Reagent, following the manufacturer's protocol. At 4 h, the transfection medium was replaced. At 24 h, after stable transfection, 5-ASA (1000 μM) was added for 24 h and cells were harvested at 48 h post-transfection for further miRNA analysis.

RNA isolation and reverse-transcription

Total RNA was extracted using the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) or the RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesised using the TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for further miRNA expression or the SuperScript II RT (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for mRNA analysis.

miRNA and mRNA expression analysis

The expression of selected microRNAs: miR-125b (000449_mir), miR-150 (Assay ID 000473_mir), miR-155 (Assay ID 002623_mir), miR-346 (478046_mir) and miR-506 (Assay ID 478958_mir) were measured using commercially available TaqMan Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). MiR-191-5p (477952_mir) or miR-16-5p (477860_mir) was used as a control for the normalisation of miRNA expression. The expression of the target/specific genes: VDR (Hs00172113_m1), SOCS1 (Hs00705164_s1), DNMT1 (Hs00945875_m1), FOXO3a (Hs00818121_m1) and 18S ribosomal RNA (Hs99999901_s1) as most stable endogenous control were measured using Gene Expression Assays by quantitative real-time PCR.

Data were analysed with 7500 Software version 2.0.2 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Results are presented as a relative fold change to controls according to 2^{-ΔΔCt} method. Values are means ± SE.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using StatView software version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA). An analysis of the differences between treated groups and untreated controls was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Graphs were generated using GraphPad Prism version 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results from four independent experiments were presented as means, and the error bars in the figures represent the standard error of the mean (SEM). Differences between groups were considered to be significant if the *p*-value was less than 0.05.

RESULTS

The higher dose of 5-ASA (1000 μM) significantly reduced miR-125b expression (40% reduction, *p* = 0.02 vs. controls, Fig. 1A). Vitamin D receptor (VDR) has been reported to be a target

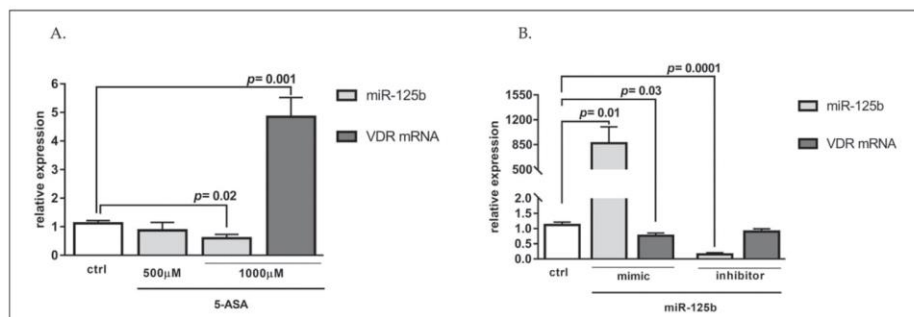


Fig. 1. The effect of 5-ASA and miRNA inhibition or activation on miR-125b and VDR expression. The levels of miR-125b and VDR transcript were quantified by q-PCR. (A): MicroRNA-125b expression was comparable to controls (ctrl) after 24 h exposure to 500 µM 5-ASA, but decreased significantly after exposure to higher concentrations of 5-ASA (1000 µM) and was accompanied by the induction of VDR mRNA expression. (B): Following transfection with miR-125b mimic or miR-125b inhibitor, the upregulation and suppression of this microRNA were confirmed. Induction of miR-125b led to a significant downregulation of VDR. All results are representative of four independent experiments per group. Data are present as mean \pm standard error of the mean. 5-ASA, 5-aminosalicylic; VDR, vitamin D receptor.

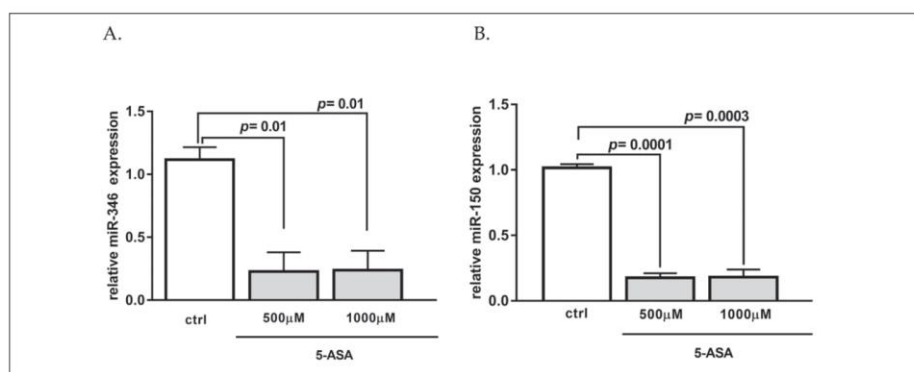


Fig. 2. miR-346 and miR-150 expression after exposure to 5-ASA. Downregulation of miRNA-346 (A) and miR-150 was demonstrated after both doses (500 and 1000 µM) of 5-ASA. All results are representative of four independent experiments per group. Data are present as mean \pm standard error of the mean. 5-ASA, 5-aminosalicylic acid.

gene of miR-125, therefore, we analysed the VDR mRNA levels in Caco-2 after 5-ASA exposure. In cells with reduced expression of miR-125 induced by 5-ASA, the level of VDR was significantly increased compared to the non-stimulated control group (4.8-fold, $p = 0.001$ vs. controls, Fig. 1A). In addition, we used a transient transfection of chemically synthesised microRNAs as a functional *in vitro* model to examine the relationship between miR-125 and VDR. A modified miR-125b that mimicked endogenous miRNA clearly induced miR-125b activity (858-fold, $p = 0.01$ vs. controls), whereas a miR-125b inhibitor effectively suppressed miR-125b expression (99.3% reduction vs. controls, $p = 0.0001$ Fig. 1B). Moreover, we confirmed that the over-expression of miR-125b negatively regulated VDR (24.6% reduction, $p = 0.03$ vs. controls), while transfection of the miR-125 inhibitor did not affect VDR expression in Caco-2 cells (Fig. 1B).

Further, we analysed the expression of miR-346. As shown in Fig. 2A, 5-ASA inhibited miR-346 expression at both 500 µM and 1000 µM concentrations (a nearly 80% reduction vs. controls for both drug concentrations, $p = 0.01$). Moreover, we found that both 500 µM and 1000 µM concentrations of 5-ASA displayed an inhibitory effect on miR-150 expression in Caco-2 (83% reduction, $p = 0.0001$ vs. controls and 82% reduction, $p = 0.0003$ vs. controls, respectively; Fig. 2B).

The expression of miR-155 substantially decreased following 24 h treatment with 5-ASA (a 3-fold decrease after 500 µM, $p = 0.0001$ vs. controls and a 2.5-fold decrease after 1000 µM, $p = 0.0005$ vs. controls, respectively), which resulted in increased expression of its target genes i.e. SOCS1 and FOXO3a (6.0-fold increase, $p = 0.02$ vs. controls and a 10-fold increase, $p = 0.02$ vs. controls, respectively; Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, Caco-2 cells were successfully transfected with miR-

532

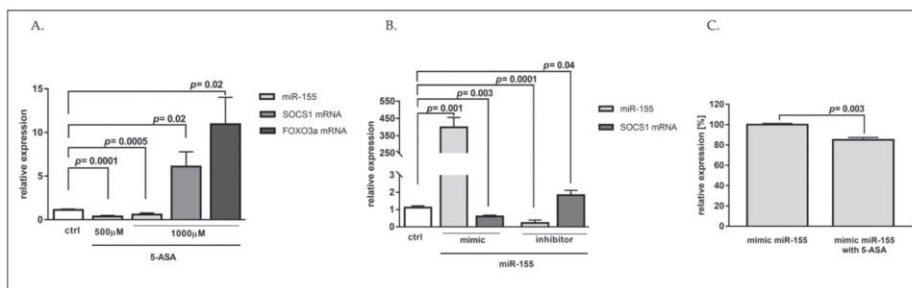


Fig. 3. The effect of 5-ASA and miRNA inhibition or activation on miR-155 and SOCS-1 expression in Caco-2 cells. (A): 24 h after drug administration, the levels of miR-155 and SOCS1 transcript were quantified by q-PCR. MiRNA-155 expression decreased whereas SOCS1 and FOXO3a mRNA levels significantly increased after 5-ASA (1000 μ M); (B): Upregulation and suppression of miR-155 by mimic and antisense molecules were confirmed. Induction of miR-155 led to a significant downregulation of SOCS1 expression, while miR-155 inhibition enhanced the SOCS1 mRNA level. (C): Treatment with 5-ASA (1000 μ M) reduced the expression of miR-155 induced by transfection with miR-155 mimics. Values are relative to untreated controls (ctrl). All results are representative of four independent experiments per group. Data are present as mean \pm standard error of the mean. 5-ASA, 5-aminosalicylic acid.

155 mimics, which significantly induced miR-155 activity (392-fold increase, $p = 0.001$ vs. controls), and simultaneously suppressed SOCS1 mRNA expression (40.9% reduction, $p = 0.003$ vs. controls). Correspondingly, the miR-155 inhibitor markedly decreased the microRNA expression level (99.6% reduction, $p = 0.0001$ vs. controls) and enhanced SOCS1 mRNA expression (1.8-fold increase, $p = 0.04$ vs. controls). Additionally, Caco-2 cells were transfected with miR-155 mimic and then co-treated with 1000 μ M of 5-ASA. The over-expression of miRNA-155 was suppressed by 5-ASA (15% reduction, $p = 0.003$ vs. mimic miR-155, as shown in Fig. 3C).

Although the observed 50% reduction of miRNA-506 expression after 500 μ M of 5-ASA did not reach statistical significance, exposure to a higher dose of the drug (1000 μ M of 5-ASA) resulted in a significant suppression of miR-506 (over 80% reduction, $p = 0.0001$ vs. controls; Fig. 4), which was associated with the induction of its target gene DNMT1 (7-fold increase, $p = 0.002$ vs. controls).

DISCUSSION

The microRNAs used in this project were selected because of their potential role in pathogenesis of colitis and neoplasia in patients with UC, which has been previously reported by our group and others (17–20, 22, 31–34). We demonstrated that the well-known protective effect of 5-ASA may be mediated by the downregulation of miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 and miR-506 expression.

MicroRNA-125b promotes inflammation by activation of the signalling pathway, which is involved in the regulation of cytokine and chemokine production (35). In patients with UC, the expression of miR-125b is significantly enhanced in the inflamed mucosa in comparison to non-inflamed regions (20), and mesalamine has been shown to inhibit the activation of NF- κ B in the inflamed mucosa of UC patients (36). However, no studies have examined the impact of mesalamine on miR-125b. Our experiments using Caco-2 cells showed that 5-ASA (at 1000 μ M) suppressed the expression of miR-125b and was associated with the over-expression of VDR. This is an important observation as it shows that 5-ASA may induce VDR expression

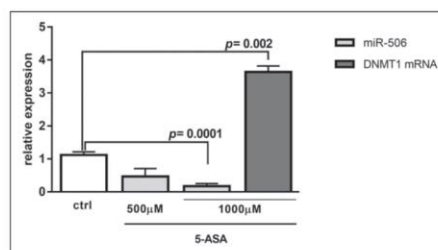


Fig. 4. Expression levels of miR-506 and DNMT1 determined by q-PCR following 24 h treatment with 5-ASA. The expression of miR-506 was suppressed by 5-ASA (1000 μ M), which was associated with the upregulation of DNMT1 mRNA. All results are representative of four independent experiments per group. Data are present as mean \pm standard error of the mean. 5-ASA, 5-aminosalicylic acid.

via the inhibition of miR-125b (37). Vitamin D is very important in the modulation of innate and adaptive immune responses. It enhances the diversification of macrophages and their bactericidal effects and modulates the maturation of dendritic cells, which are essential in autoimmune diseases. The presence of VDR has been confirmed on Th2 cells, which (after activation) produces the anti-inflammatory interleukins IL-4 and IL-10. It is noteworthy that vitamin D metabolites acting via VDR have the clinical potential to modulate specific immune responses (37). The direct effect of miR-125b on VDR expression was further confirmed in our functional studies, which has shown that the enhanced activation of miR-125b induced by transfection with miR-125b mimic led to a substantial inhibition of VDR mRNA levels.

We also examined miR-346 expression, which has been reported to be an oncogenic miRNA in numerous cancers, including prostate, lung, breast, and liver cancers (38–40). We have previously reported on the alteration of miR-346 expression in colon tissue (31). In patients with UC who received 5-ASA (2 – 3 g/daily), an exceptionally low colonic

expression of miRNA-346 was accompanied by an extensive upregulation of VDR and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) genes. Additionally, functional studies with either miR-346 mimic or inhibitor have confirmed these observations (31). There is a report indicating that inflammation in the colon is positively correlated with miR-346 expression in UC patients, however, the authors did not state whether the patients received 5-ASA (41). MicroRNA-346 may act as a regulator of inflammation as it similarly to miR-125b targets VDR, which plays an important role in maintaining the integrity of the mucosal barrier. Thus, inhibition of these two microRNAs' expression by 5-ASA may contribute to the modulation of VDR, which is involved in the chemopreventive effect of vitamin D (42). Aberrant methylation of VDR gene with consequent loss in its expression was reported in CRC (43), whereas high expression of VDR in tumoral tissue was associated with a good prognosis (44).

Elevation of miR-150 has been observed in human colons with active UC when compared with normal colons (45). MicroRNA-150 is involved in immunological processes due to its high expression in mature T and B lymphocytes. Furthermore, it may be involved in the maturation of B cells (46), whose increasing number has been observed in UC disease (47). We found that miR-150 was significantly reduced in Caco-2 cells following 5-ASA treatment. Recently, transcription factor c-Myb has been shown to be targeted by microRNA-150 (48). c-Myb is an essential transcriptional regulator for the maintenance of stem cells in colon epithelia, and it is required for colon crypt homeostasis *via* the regulation of cell differentiation, proliferation, and crypt integrity (49-51). Recent studies have associated high levels of MYB transcription with a low incidence of metastasis and a good prognosis in CRC (52). Thus, the inhibition of miR-150 expression by 5-ASA may preserve colon integrity in UC. We did not investigate c-Myb expression in Caco-2 cells after 5-ASA treatment as cells (when cultured over confluence for 21 days as was the case in our experiments) spontaneously undergo cell cycle arrest and differentiate with the formation of a polarised enterocyte-like monolayer (53).

MicroRNA-155 plays a pleiotropic role in the regulation of immune responses as it participates in the activation, proliferation and differentiation of pro-inflammatory cells (49). Moreover, miR-155 was shown to be upregulated in inflamed UC colons compared to neighbouring inactive tissue in the same patient, which may confirm its involvement in the immune response (54). In this study, our *in vitro* analyses confirmed an inverse relationship between miR-155 and SOCS1. Transfection of miR-155 mimic into Caco-2 cells suppressed SOCS1 mRNA expression, whereas transfection of the miR-155 inhibitor effectively enhanced levels of SOCS1. It has been shown that SOCS1 inactivation in human inflammatory bowel disease contributes to mucosa inflammation (54), and SOCS1-deficient mice demonstrate deregulated cytokine production, which disturbs the activation of immune cells and triggers the development of systemic autoimmunity. Our results have shown that the anti-inflammatory activity of 5-ASA may be related to the upregulation of SOCS1 *via* the inhibition of miR-155. Additionally, the suppression of miR-155 by 5-ASA was associated with increased levels of Forkhead Transcription Factor O Subfamily Member 3a (FOXO3). A previous study indicated that miR-155 directly targets FOXO3a (55). Our observations are in line with a study showing an important role of miR-155-induced suppression of FOXO3a in the regulation of intestinal inflammation in patients with active UC. These authors also showed that silenced FOXO3a by miR-155 increased levels of IL-8 in TNF- α -treated HT29 cells by suppressing the inhibitory I κ B α (55). FOXO3a also acts as a tumour suppressor in colon cancer (56). *In vitro*, the over-expression of FOXO3a inhibits the

proliferation, tumorigenic potential and invasiveness of cancer cells (57-60), while silencing FOXO3a results in marked attenuation of the protection against tumourigenesis (61-63). In this study, we also demonstrated the efficacy of 5-ASA in the inhibition of miR-155 expression after the transfection of miR-155 mimics into Caco-2 cells.

The role of miR-506 is multi-faceted as it acts either as a tumour suppressor in ovarian (64) and lung cancer (65) or as an oncogene in melanomas (66). MiR-506 is involved in the epithelial-mesenchymal transition, which influences and promotes certain cell motility and metastasis steps during tumour progression (67, 68). The results of our previous study showed that the expression of miR-506 in the ascending and sigmoid colon of UC patients (treated with 5-ASA) decreased and was associated with upregulation of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) (34). Belonging to a group of transferases, DNMT1 is an enzyme that catalyses the transfer of the methyl group from S-adenosylmethionine to the cytosine or adenine base in DNA (DNA methylation) (69). DNMT1 has been widely assumed to be responsible for most of the methylation of the human genome, including the abnormal methylation found in cancers (70). A functional *in vitro* analysis in Caco-2 cells showed that the induction of miR-506 activity suppressed DNMT1, whereas direct miR-506 inhibition or lipopolysaccharide-induced inhibition of miR-506 upregulated the target genes (34). In this study, treatment with 5-ASA enhanced the expression of DNMT1 in Caco-2 cells, which was associated with the inhibition of miR-506. The observed induction of DNMT1 expression in response to 5-ASA treatment may play an important role in the context of UC. Therefore, further studies *in vivo* are needed to find out which gene methylation is associated with the induction of DNMT1 expression, and/or whether DNMT1 may act as a transcriptional repressor independently from its methyltransferase function as it was previously reported (71).

In conclusion, the results of our study in human intestinal epithelial cell line indicate that 5-ASA therapy can effectively attenuate the expression of selected miRNAs involved in immune modulation and/or in tumorigenesis. However, it is necessary to precisely determine the dose of 5-ASA that is required for the modulation of miRNA in clinical settings.

Funding: This study was supported by grant no. 2020/39/O/NZ4/01732 from the National Science Centre in Poland.

Conflicts of interest: None declared.

REFERENCES

- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 79-94.
- Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012; 380: 1606-1619.
- Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA, Young HS, Blackstone MO. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 48-54.
- MacDermott RP. Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3343-3345.
- Qiu X, Ma J, Wang K, Zhang H. Chemopreventive effects of 5-aminosalicylic acid on inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer and dysplasia: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8: 1031-1045.

6. Schoonjans R, De Vos M, Schelphout AM, Praet M, Elewaut A. Distribution and concentrations of 5-aminosalicylic acid in rectosigmoid biopsy specimens after rectal administration. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 788-793.
7. Stockdale AD, Biswas A. Long-term control of radiation proctitis following treatment with sucralfate enemas. *Br J Surg* 1997; 84: 379. doi: 10.1046/j.1365-2168.1997.02587.x
8. Szatkowski P, Krzysciak W, Mach T, Owczarek D, Brzozowski B, Szczeklik K. Nuclear factor- κ B - importance, induction of inflammation, and effects of pharmacological modulators in Crohn's disease. *J Physiol Pharmacol* 2020; 71: 453-465.
9. Krajewska JB, Pietruszka P, Tomczyk D, et al. Evaluation of the effect of liposomes loaded with chlorogenic acid in treatment of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis. *J Physiol Pharmacol* 2019; 70: 269-275.
10. Parenti S, Montorsi L, Fantini S, et al. KLF4 mediates the effect of 5-ASA on the beta-catenin pathway in colon cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2018; 11: 503-510.
11. Stolfi C, De Simone V, Pallone F, Monteleone G. Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and mesalazine in the chemoprevention of colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 17972-17985.
12. Parenti S, Ferrarini F, Zini R, et al. Mesalazine inhibits the beta-catenin signalling pathway acting through the upregulation of mu-protocadherin gene in colo-rectal cancer cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 108-119.
13. Lyakhovich A, Gasche C. Systematic review: molecular chemoprevention of colorectal malignancy by mesalazine. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 202-209.
14. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
15. Baulina NM, Kulakova OG, Favorova OO. MicroRNAs: The role in autoimmune inflammation. *Acta Naturae* 2016; 8: 21-33.
16. Panella M, Carotenuto P, Braconi C. MicroRNAs link inflammation and primary biliary cholangitis. *Non-coding RNA Investigation* 2018; 2: 29. doi: 10.21037/ncri.2018.05.02
17. Iborra M, Bernuzzi F, Correale C, et al. Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2013; 173: 250-258.
18. Fisher K, Lin J. MicroRNA in inflammatory bowel disease: translational research and clinical implication. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 12274-12282.
19. Valmiki S, Ahuja V, Paul J. MicroRNA exhibit altered expression in the inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 5324-5332.
20. Valmiki S. PWE-066 Microrna signatures can differentiate between inflamed and non inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *Gut* 2018; 67 (Suppl. 1): A100.
21. Juzenas S, Skieceviciene J, Kupcinskis J, et al. MiRNA expression patterns in colon of active and inactive ulcerative colitis. International 5th Cluster Symposium Inflammation at Interfaces, February 26-28, 2015, Kiel, Germany.
22. Gwiggner M, Martinez-Nunez RT, Whiteoak SR, et al. MicroRNA-31 and microRNA-155 are overexpressed in ulcerative colitis and regulate IL-13 signaling by targeting interleukin 13 receptor alpha-1. *Genes (Basel)* 2018; 9: 85. doi: 10.3390/genes9020085
23. Soroosh A, Rankin CR, Polytaichou C, Pothoulakis C, Iliopoulos D, Padua DM. P124 microRNA-24 is overexpressed in ulcerative colitis and significantly affects intestinal barrier function. *Gastroenterology* 2019; 156: S86.
24. Long H, Wang X, Chen Y, Wang L, Zhao M, Lu Q. Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Lett* 2018; 428: 90-103.
25. Salvi V, Gianello V, Tiberio L, Sozzani S, Bosisio D. Cytokine targeting by miRNAs in autoimmune diseases. *Front Immunol* 2019; 10: 15. doi: 10.3389/fimmu.2019.00015
26. Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biol* 2012; 199: 407-412.
27. Vautrin A, Manchon L, Garcel A, et al. Both anti-inflammatory and antiviral properties of novel drug candidate ABX464 are mediated by modulation of RNA splicing. *Sci Rep* 2019; 9: 792. doi: 10.1038/s41598-018-37813-y
28. Minacapelli CD, Bajpai M, Geng X, et al. miR-206 as a Biomarker for response to mesalazine treatment in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2019; 25: 78-84.
29. Park YR, Seo SY, Kim SL, et al. MiRNA-206 suppresses PGE2-induced colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion by targeting TM4SF1. *Biosci Rep* 2018; 38: BSR20180664. doi: 10.1042/BSR20180664
30. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21: 1-26.
31. Kempinska-Podhorodecka A, Blatkiewicz M, Wunsch E, et al. Oncomir MicroRNA-346 is upregulated in colons of patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin Transl Gastroenterol* 2020; 11: e00112. doi: 10.14309/ctg.0000000000000112
32. Wasik U, Kempinska-Podhorodecka A, Bogdanos D, Milkiewicz P, Milkiewicz M. Enhanced expression of miR-21 and miR-150 is a feature of anti-mitochondrial antibody-negative primary biliary cholangitis. *Mol Med* 2020; 26: 8. doi: 10.1186/s10020-019-0130-1
33. Kempinska-Podhorodecka A, Milkiewicz M, Wasik U, et al. Decreased expression of vitamin D receptor affects an immune response in primary biliary cholangitis via the VDR-miRNA155-SOCS1 pathway. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 289. doi: 10.3390/ijms18020289
34. Kempinska-Podhorodecka A, Adamowicz M, Ostrycharz E, et al. Role of miR-506 in ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis. *Sci Rep* 2021; 11: 10134. doi: 10.1038/s41598-021-89631-4
35. Zhang B, Wang LS, Zhou YH. Elevated microRNA-125b promotes inflammation in rheumatoid arthritis by activation of NF-kappaB pathway. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 1151-1157.
36. Bantel H, Berg C, Vieth M, Stolte M, Kruijs W, Schulze-Osthoff K. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3452-3457.
37. Fabbri A, Infante M, Ricordi C. Vitamin D status: a key modulator of innate immunity and natural defense from acute viral respiratory infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24: 4048-4052.
38. Yang F, Luo LJ, Zhang L, et al. MiR-346 promotes the biological function of breast cancer cells by targeting SRCIN1 and reduces chemosensitivity to docetaxel. *Gene* 2017; 600: 21-28.
39. Chen B, Pan W, Lin X, et al. MicroRNA-346 functions as an oncogene in cutaneous squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2016; 37: 2765-2767.
40. Yu Q, Yang X, Duan W, Li C, Luo Y, Lu S. miRNA-346 promotes proliferation, migration and invasion in liver cancer. *Oncol Lett* 2017; 14: 3255-3260.
41. Chen Y, Du J, Zhang Z, et al. MicroRNA-346 mediates tumor necrosis factor alpha-induced downregulation of gut epithelial vitamin D receptor in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20: 1910-1918.

42. Aslam A, Ahmad J, Baghdadi MA, *et al.* Chemopreventive effects of vitamin D(3) and its analogue, paricalcitol, in combination with 5-fluorouracil against colorectal cancer: the role of calcium signalling molecules. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2021; 1867: 166040. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.166040
43. Afshan FU, Masood A, Nissar B, *et al.* Promoter hypermethylation regulates vitamin D receptor (VDR) expression in colorectal cancer - a study from Kashmir valley. *Cancer Genet* 2021; 252-253: 96-106.
44. Slattery ML, Neuhausen SL, Hoffman M, *et al.* Dietary calcium, vitamin D, VDR genotypes and colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 111: 750-756.
45. Bian Z, Li L, Cui J, *et al.* Role of miR-150-targeting c-Myb in colonic epithelial disruption during dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis and human ulcerative colitis. *J Pathol* 2011; 225: 544-553.
46. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7080-7085.
47. Rabe H, Malmquist M, Barkman C, *et al.* Distinct patterns of naive, activated and memory T and B cells in blood of patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2019; 197: 111-129.
48. Xiao C, Calado DP, Galler G, *et al.* MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007; 131: 146-159.
49. Jeker LT, Bluestone JA. MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev* 2013; 253: 65-81.
50. Zorbas M, Sicurella C, Bertonecello I, *et al.* c-Myb is critical for murine colon development. *Oncogene* 1999; 18: 5821-5830.
51. Malaterre J, Carpinelli M, Ernst M, *et al.* c-Myb is required for progenitor cell homeostasis in colonic crypts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3829-3834.
52. Tichy M, Knopfova L, Jarkovsky J, *et al.* High c-Myb expression associates with good prognosis in colorectal carcinoma. *J Cancer* 2019; 10: 1393-1397.
53. Leoni BD, Natoli M, Nardella M, *et al.* Differentiation of Caco-2 cells requires both transcriptional and post-translational down-regulation of Myc. *Differentiation* 2012; 83: 116-127.
54. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M, *et al.* MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Exp Mol Med* 2015; 47: e164. doi: 10.1038/emmm.2015.21
55. Min M, Peng L, Yang Y, Guo M, Wang W, Sun G. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20: 652-659.
56. Bullock MD, Bruce A, Sreekumar R, *et al.* FOXO3 expression during colorectal cancer progression: biomarker potential reflects a tumour suppressor role. *Br J Cancer* 2013; 109: 387-394.
57. Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* 2002; 277: 47928-47937.
58. Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 2002; 295: 2450-2452.
59. Tran H, Brunet A, Grenier JM, *et al.* DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002; 296: 530-534.
60. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, *et al.* The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 2002; 168: 5024-5031.
61. Sasaki T, Irie-Sasaki J, Horie Y, *et al.* Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature* 2000; 406: 897-902.
62. Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 3127-3134.
63. Khaleghpour K, Li Y, Banville D, Yu Z, Shen SH. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 241-248.
64. Yang D, Sun Y, Hu L, *et al.* Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer Cell* 2013; 23: 186-199.
65. Yin M, Ren X, Zhang X, *et al.* Selective killing of lung cancer cells by miRNA-506 molecule through inhibiting NF-kappaB p65 to evoke reactive oxygen species generation and p53 activation. *Oncogene* 2015; 34: 691-703.
66. Streicher KL, Zhu W, Lehmann KP, *et al.* A novel oncogenic role for the miRNA-506-514 cluster in initiating melanocyte transformation and promoting melanoma growth. *Oncogene* 2012; 31: 1558-1570.
67. Schliekelman MJ, Gibbons DL, Faca VM, *et al.* Targets of the tumor suppressor miR-200 in regulation of the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 7670-7682.
68. Slabakova E, Pernicova Z, Slavickova E, Starsichova A, Kozubik A, Soucek K. TGF-beta1-induced EMT of non-transformed prostate hyperplasia cells is characterized by early induction of SNAI2/Slug. *Prostate* 2011; 71: 1332-1343.
69. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression - belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-454.
70. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3139-3155.
71. Clements EG, Mohammad HP, Leadem BR, *et al.* DNMT1 modulates gene expression without its catalytic activity partially through its interactions with histone-modifying enzymes. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 4334-4346.

Received: July 20, 2021

Accepted: August 30, 2021

Author's address: Dr Agnieszka Kempinska-Podhorodecka, Department of Medical Biology, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland.
E-mail: agnieszkakempinska@interia.eu

Trzecia publikacja z cyklu prezentowanych prac

International Journal of
Molecular Sciences

Article

Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing CholangitisMonika Adamowicz ¹, Iga Stukan ¹, Piotr Milkiewicz ^{2,3}, Andrzej Bialek ⁴, Malgorzata Milkiewicz ¹ and Agnieszka Kempinska-Podhorodecka ^{1,*} ¹ Department of Medical Biology, Pomeranian Medical University in Szczecin, 70-111 Szczecin, Poland; monikadamowicz@gmail.com (M.A.); iga.stukan@pum.edu.pl (I.S.); malgorzata.milkiewicz@pum.edu.pl (M.M.)² Liver and Internal Medicine Unit, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland; p.milkiewicz@wp.pl³ Translational Medicine Group, Pomeranian Medical University, 70-111 Szczecin, Poland⁴ Department of Gastroenterology, Pomeranian Medical University in Szczecin, 70-111 Szczecin, Poland; bialekab@pum.edu.pl

* Correspondence: agnieszka.kempinska.podhorodecka@pum.edu.pl



Citation: Adamowicz, M.; Stukan, I.; Milkiewicz, P.; Bialek, A.; Milkiewicz, M.; Kempinska-Podhorodecka, A. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4905. <https://doi.org/10.3390/ijms23094905>

Academic Editor: Francesca Virginia Negri

Received: 13 April 2022

Accepted: 26 April 2022

Published: 28 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Deficient mismatch repair (MMR) proteins may lead to DNA damage and microsatellite instability. Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a risk factor for colitis-associated colon cancer. miR-155 is suggested to act as a key regulating node, linking inflammation and tumorigenesis. However, its involvement in the chronic colitis of PSC-UC patients has not been examined. We investigated the involvement of miR-155 in the dysregulation of MMR genes and colitis in PSC patients. Colon tissue biopsies were obtained from patients with PSC, PSC with concomitant ulcerative colitis (PSC-UC), uncomplicated UC, and healthy controls ($n = 10$ per group). In the ascending colon of PSC and PSC-UC patients, upregulated miR-155 promoted high microsatellite instability and induced signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3) expression via the inhibition of suppressors of cytokine signalling 1 (SOCS1). In contrast, the absence of miR-155 overexpression in the sigmoid colon of PSC-UC patients activated the IL-6/S1PR1 signalling pathway and imbalanced the IL17/FOXP3 ratio, which reinforces chronic colitis. Functional studies on human intestinal epithelial cells (HT-29 and NCM460D) confirmed the role of miR-155 over-expression in the inhibition of MMR genes and the modulation of p53. Moreover, those cells produced more TNF α upon a lipopolysaccharide challenge, which led to the suppression of miR-155. Additionally, exposure to bile acids induced upregulation of miR-155 in Caco-2 cell lines. Thus, under different conditions, miR-155 is involved in either neoplastic transformation in the ascending colon or chronic colitis in the sigmoid colon of patients with PSC. New insight into local modulation of microRNAs, that may alter the course of the disease, could be used for further research on potential therapeutic applications.

Keywords: miR-155; biomarker; microsatellite instability; inflammation; primary sclerosing cholangitis; colorectal cancer

1. Introduction

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic biliary disorder with a complex aetiology, characterised by the progressive destruction of the biliary tract (and consequently the liver), through the mechanisms of autoimmunity and cholestasis. PSC primarily affects men and is commonly accompanied by inflammatory bowel disease (IBD), predominantly in the form of ulcerative colitis (UC) [1]. Accumulating evidence has suggested that the presence of PSC is an important additional risk factor for the development of colorectal neoplasia in patients with UC (PSC-UC) [2]. This risk is thought to be 4–10-times greater than the risk of developing colorectal carcinoma (CRC) in patients with UC with PSC,

and develops at a much younger age than in patients with UC alone [3]. This may indicate differences in the pathogenesis of inflammation and CRC in PSC-UC patients in comparison to patients with UC alone. Broomé et al. [4] first proposed an association between PSC and CRC in UC patients in 1992; however, currently, there is no molecular explanation for how PSC increases the risk of CRC.

MicroRNA (small non-coding RNA molecules) are key players in the regulation of immune response and their expressions are dysregulated in different types of cancer. A plethora of miRNAs has been implicated in various liver diseases. Based on our initial results from microarray analysis (commercially performed by Microarray Core facility at Boston University), we chose miR-155, since its expression was significantly increased in samples from our cohort of PSC patients, and this microRNA (miRNA) is known as a multifunctional regulator of naïve and adaptive immunity.

Moreover, miR-155 can regulate mismatch repair (MMR) genes' (e.g., MLH1, MSH2, MSH6) expression to influence genomic stability in CRC [5]. The expression patterns of MMR proteins are one parameter by which colorectal cancers can be classified [6–8]. MMR proteins are nuclear enzymes that form heterodimers that bind to areas of abnormal DNA and initiate its removal. Loss of MMR proteins leads to an accumulation of DNA replication errors, which is termed microsatellite instability (MSI) [8].

MiR-155 is most commonly upregulated in malignancy and is hypothesised to target tumour suppressor genes, such as the suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1). Furthermore, SOCS1 contributes to p53 activation and regulates the process of oncogene-induced senescence, which is an important tumour suppressor response [9].

Our previous research showed that miR-155 not only directly inhibits SOCS1 expression, but also increases the production of pro-inflammatory mediators in the liver of PSC patients [10]. In fact, SOCS1 can promote or inhibit the activation of macrophages and dendritic cells, and participate in T cell differentiation and innate and adaptive immune regulation [11,12].

Moreover, miR-155 is able to potentiate the inflammation response, and its expression is upregulated upon lymphocyte activation to control cell proliferation and differentiation [13]. However, the involvement of miR-155 in chronic inflammation in the colons of PSC-UC patients has not been investigated. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) was found to be a new target gene of miR-155 by *in vitro* and *in vivo* studies [14]. Degradation of S1PR1 prevents lymphocytes from sensing the sphingosine-1-phosphate (S1P) gradient from the lymphoid organs to the blood, thus, blocking egress and inducing lymphopenia [15]. Furthermore, pro-inflammatory cytokines (including IL-6) raise the level of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3), which, in turn, induces a higher expression of S1PR1 [16]. The role of S1PR1 in tumour formation is consistent with the finding of S1PR1 upregulation in STAT3-positive tumours and in oestrogen receptor-positive breast cancer cells. This has been further confirmed by experiments showing that prevention of S1PR1 activation inhibits tumour growth, metastasis and persistent STAT3 activation [17]. The tight control of S1PR1 expression is crucial for cell homeostasis.

Depending on its target genes, miR-155 is able to potentiate pro-inflammatory responses [18,19] or oncogenic activity [20,21] in the colon. Therefore, in this study, we aimed to confirm the interaction between miR-155 and its targets (including MMR genes, SOCS1, and S1PR1), given that their molecular mechanisms have not yet been elucidated in patients with PSC. Additionally, given that miR-155 regulates the Th17/Treg ratio by targeting SOCS1 [22], and that miR-155 and STAT3 form an axis that promotes the expansion of pathogenic Th17 cells [23], we investigated the contribution of miR-155 in the modulation of the immune response in colonic tissues and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of PSC patients, with and without concurrent UC. Besides, these molecular analyses of human samples were complemented by functional studies in three human intestinal cell lines (Caco-2, HT-29, and NCM460D).

2. Results

In the ascending colon, miR-155 expression was substantially increased in PSC and PSC-UC patients (3.4 ± 0.4 vs. 1.1 ± 0.2 in controls, $p = 0.0001$, and 2.1 ± 0.2 vs. 1.1 ± 0.2 in controls, $p = 0.002$, respectively, Figure 1a), which was associated with considerable suppression of SOCS1 mRNA (0.4 ± 0.3 vs. 1.9 ± 0.9 in controls, $p = 0.0002$, and 0.6 ± 0.4 vs. 1.9 ± 0.9 in controls, $p = 0.0005$; respectively, Figure 1b). The upregulation of miR-155 was higher in PSC compared to PSC-UC patients ($p = 0.02$). In contrast, miR-155 and SOCS1 mRNA levels were unchanged in UC patients in comparison to controls (Figure 1a,b). In the ascending colon, STAT3 expression was enhanced in all of the patient groups, i.e., PSC, PSC-UC and UC (Figure 1c). We observed a negative correlation between miR-155 and SOCS1 mRNA ($r = -0.4$, $p = 0.03$) or STAT3 ($r = -0.8$, $p = 0.002$). We suggest that miR-155 is involved in the pathogenesis of cancer tumorigenesis in the ascending colon of PSC patients.

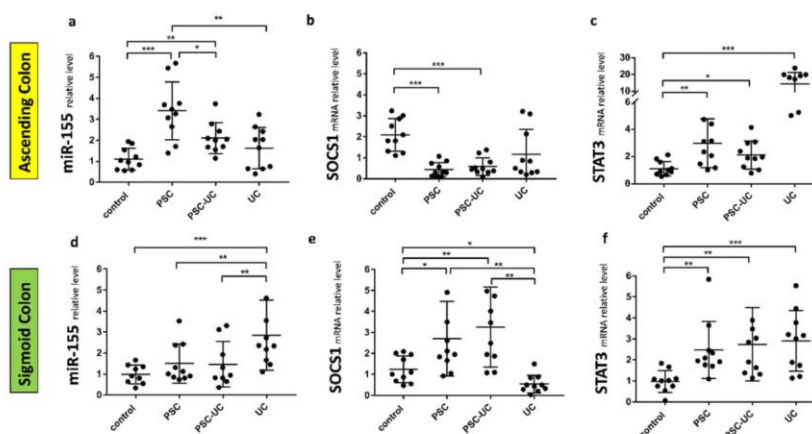


Figure 1. Expression of miR-155, suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1), and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mRNAs in human colon tissue. A scatter dot plot showing the relative expression levels of miR-155 (a,d), SOCS1 (b,e), (STAT3) (c,f) in both the ascending (a–c) and sigmoid colons (d–f) of controls, primary sclerosing cholangitis patients (PSC), PSC and concomitant ulcerative colitis patients (PSC-UC), and ulcerative colitis (UC). Levels of gene expression were normalised to an endogenous reference, miR-191 for miRNA or 18S RNA for other genes, and presented as a fold-change relative to healthy controls. Results are representative of 10 independent experiments per group. Dots illustrate each patient, and data are presented as mean plus interquartile range (IQR) * p -value < 0.05, ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001.

In the sigmoid colon of PSC patients with and without UC, miR-155 levels were similar to control values (Figure 1d), whereas the SOCS1 mRNA levels were substantially increased ($p = 0.004$ and, $p = 0.03$ respectively, Figure 1e). In UC patients, miR-155 was induced ($p = 0.0004$ vs. controls; $p = 0.008$ vs. PSC, and $p = 0.006$ vs. PSC-UC) and was accompanied by the suppression of SOCS1 ($p = 0.02$ vs. controls, $p = 0.002$ vs. PSC, and $p = 0.004$ vs. PSC-UC). Moreover, in the sigmoid colon of all patients, a substantial upregulation of STAT3 expression was observed ($p = 0.004$ in PSC vs. controls; $p = 0.0067$ in PSC-UC vs. controls, and $p = 0.0009$ in UC vs. controls) (Figure 1f). This may suggest differences in inflammation in the sigmoid colon of PSC-UC patients in comparison to patients with UC alone.

Appreciating the role of miR-155 in the modulation of immunity and to further address its potential involvement in colitis, we evaluated the expression of miR-155 and its down-

stream targets in PBMCs. The expression of miR-155 in PBMCs was significantly increased in PSC and PSC-UC patients (2-fold, $p = 0.01$ vs. controls, and 1.8-fold, $p = 0.04$ vs. controls, respectively; Figure 2a). In PSC patients with and without UC, the level of SOCS1 mRNA was significantly lower (over 70% reduction, $p = 0.05$ in PSC-UC vs. controls, and over 80% reduction, $p = 0.02$ in PSC vs. controls, Figure 2b). We further evaluated the concentration of phospho-STAT3 (p-STAT3) in the PBMCs of PSC patients (Figure 2c) and observed significantly upregulated p-STAT3 expression in both PSC and PSC-UC patients (13.0 ± 2.6 pg/ μ L vs. 5.5 ± 0.9 in controls, $p = 0.002$, and 9.8 ± 1.2 pg/ μ L vs. 5.5 ± 0.9 in controls, $p = 0.01$, respectively).

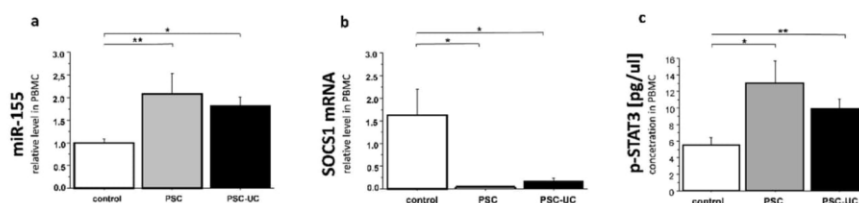


Figure 2. Relative expression of miR-155, SOCS1, and the concentration of p-STAT3 protein in PBMCs. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from PSC and PSC-UC patients, and healthy subjects. Significant upregulation of miR-155 in the PSC and PSC-UC groups was accompanied by the inhibition of SOCS1 and enhancement of p-STAT3. Bars indicate the mean \pm SEM * p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 .

As miR-155 is associated with the modulation of MMR repair machinery, we examined the expression of MSH2, MSH6 and MLH1 in colonic tissue. In the ascending colon of PSC patients with and without UC, the expression of MSH2 mRNA was downregulated (0.6 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.2 in controls, $p = 0.005$; and 0.7 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.2 in controls, $p = 0.01$, respectively; Figure 3a). The inhibition of MSH6 expression was observed in the ascending colon of PSC patients with concurrent UC (0.7 ± 0.3 vs. 1.2 ± 0.2 in controls, $p = 0.01$), whereas downregulation of MLH1 mRNA was observed in the ascending colon of UC patients (0.8 ± 0.1 vs. 1.1 ± 0.1 in controls, $p = 0.02$). However, in the ascending colon of UC patients, and in the sigmoid colon of all patients, the levels of MSH2, MSH6, and MLH1 were unchanged (Figure 3a,b).

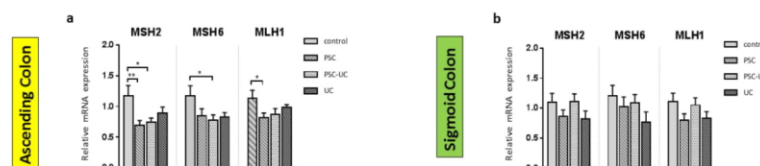


Figure 3. The expression patterns of mismatch repair (MMR) components in colonic tissue. Levels of gene expression were normalised to 18S RNA and presented as a fold-change relative to healthy controls. Bars indicate the mean \pm SEM * p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 .

As miR-155 is reported to be modulated by Treg-specific factors, such as forkhead box O3 (FOXP3), we evaluated the mRNA level of this gene in colonic tissue. In addition, the expression of IL-17, the best marker for immuno-phenotyping of Th17 cells, was evaluated. There was an increased level of IL-17 mRNA (27-fold increase vs. controls, $p = 0.04$, data not shown) and an imbalanced IL-17/FOXP3 ratio in the sigmoid colon tissue of patients with PSC-UC ($p = 0.02$ vs. control and $p = 0.04$ vs. PSC; Figure 4d). Similarly, an imbalance in the IL-17/FOXP3 ratio was observed in the ascending colon of

patients with UC ($p = 0.004$ vs. controls; $p = 0.008$ vs. PSC-UC; $p = 0.006$ vs. PSC; Figure 4a). The IL-17/FOXP3 ratio imbalance was associated with a very high expression of pro-inflammatory IL-6. In the sigmoid colon of PSC-UC patients, the expression of IL-6 was increased over 40-fold ($p = 0.04$ vs. controls, and $p = 0.01$ vs. PSC, and $p = 0.01$ vs. UC, Figure 4e), while in the ascending colon of UC patients, we observed a 13-fold increase in IL-6 ($p = 0.02$ vs. controls; $p = 0.03$ vs. PSC, and $p = 0.05$ vs. PSC-UC, Figure 4b). Based on the observed IL-6 enhancement, we examined the expression of the receptor S1PR1, which is known to be modulated by IL-6. In the ascending colon of PSC and PSC-UC patients, the S1PR1 mRNA levels remained at control values, while in UC patients, the expression of S1PR1 mRNA was considerably enhanced ($p = 0.0001$, Figure 4c). This substantial increase was also evident in comparison to PSC and PSC-UC patients ($p = 0.003$ and $p = 0.002$, respectively). We found a negative correlation between S1PR1 mRNA and miR-155 ($r = -0.5$, $p = 0.009$). However, the opposite was observed in the sigmoid colon of PSC and PSC-UC patients, given that the expression of S1PR1 mRNA was enhanced ($p = 0.0005$, and $p = 0.004$, respectively), whereas in UC patients, it remained at control values (Figure 4f). The expression of S1PR1 negatively correlated with miR-155 ($r = -0.4$, $p = 0.04$) but positively with STAT3 ($r = 0.4$, $p = 0.04$).

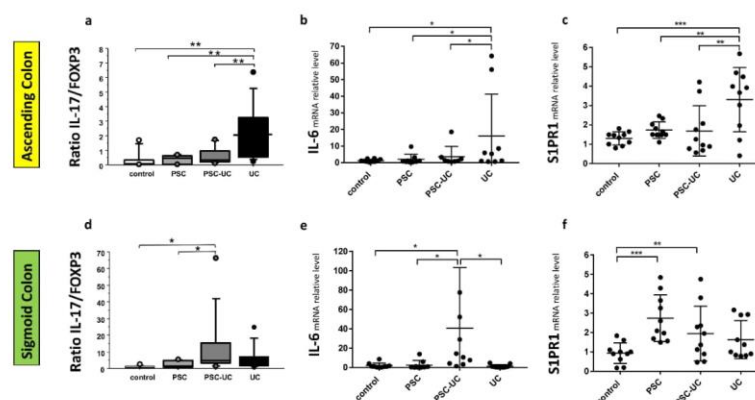


Figure 4. Distinct intestinal IL-17/FOXP3 ratio and the expression of IL-6 and S1PR1 mRNAs in the colonic tissue of PSC patients with and without UC. * Scatter dot plot showing IL-17 and FOXP3 proportions (a,d), and the relative expression levels of IL-6 (b,e) and S1PR1 (c,f) in the ascending (a–c) and sigmoid colons (d–f) of controls, PSC, PSC with UC, and UC patients. Levels of gene expression presented as fold-change relative to healthy controls were normalised to the endogenous reference 18S RNA. Results are representative of 10 independent experiments per group. Dots illustrate each patient and data are presented as means plus interquartile ranges (IQRs) * p -value < 0.05, ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001.

In previous work, we conducted a set of *in vitro* functional studies on the human intestinal epithelial cells Caco-2 [24], and showed an inverse relationship between miR-155 and SOCS1. Therefore, in this study, we examined another target for miR-155, the receptor S1PR1. We investigated whether miR-155 is directly involved in the regulation of S1PR1 gene expression. Transfection of the inhibitor targeting miR-155 into cells effectively suppressed miR-155 and simultaneously induced S1PR1 mRNA expression (3.1 ± 0.5 vs. 1.1 ± 0.2 in controls, $p = 0.01$; Figure 5a). We further verified the relationship between the expression of miR-155 and glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) in the Caco-2 cell line. The expression of miR-155 was substantially increased following exposure for 24 h to 500 μ M GCDCA (1.5-fold, $p = 0.05$ vs. controls; Figure 5b).

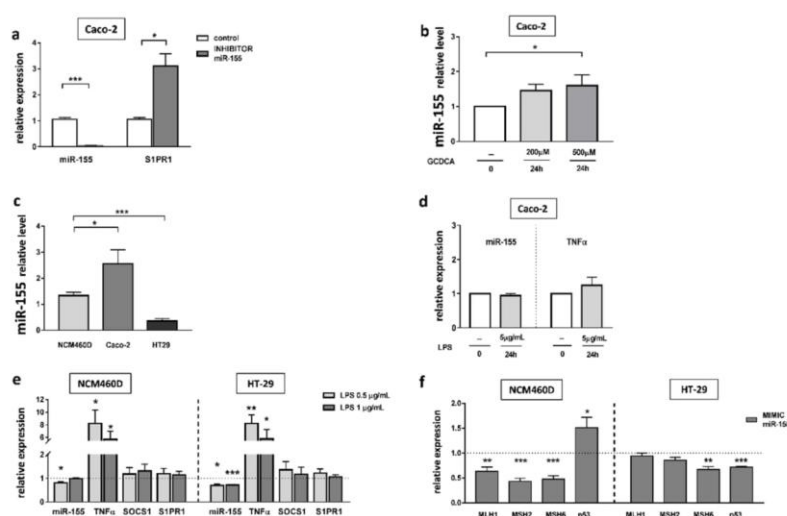


Figure 5. The effect of miRNA inhibition on miR-155 and S1PR1 expression (a). Dose-dependent effect of GCDCA on miR-155 expression (b). The basal miR-155 expression in colonic cell lines (c). miR-155 and TNF α mRNA levels in Caco-2 after lipopolysaccharide (LPS) exposure (d). The expression of miR-155, TNF α , SOCS1 and S1PR1 in HT29 and NCM460D cells following 24 h treatment with LPS (e). Modulation of MMR (MLH1, MSH2, MSH6) and p53 gene expression levels after miR-155 mimic transfection in colonic cell lines (f). At least three independent experiments were conducted. The dotted lines represent control values. Levels of gene expression were normalised to the endogenous reference miR-191/miR-16 for miRNA, or 18S RNA for other genes. Bars indicate the mean \pm SEM * p -value < 0.05, ** p -value < 0.01, *** p -value < 0.001.

In normal cells derived from colonic mucosa (NCM460D) and cancerous cell lines (Caco-2 and HT-29), miR-155 expression displayed an altered profile at baseline (Figure 5c). We found that the miR-155 level varied between cancerous cell lines in relation to NCM460D cells. In HT-29 cells, the expression of miR-155 was decreased (3.8-fold vs. NCM460D cells, $p < 0.0001$), whereas in Caco-2 cells, it was increased (2.2-fold vs. NCM460D cells, $p = 0.02$). To gain insight into the effects of miR-155 during ongoing inflammation in the intestine, the expression of miR-155 was measured following LPS exposure in Caco-2 cells (Figure 5d). The results uncovered no significant difference in miR-155 levels and no changes were found in the major pro-inflammatory cytokine, TNF- α . Some sources have reported a lack of responses to LPS in Caco-2 cells, attributed to a low expression of TLR4 receptors on these cells [25]. Therefore, we conducted further experiments on HT-29 and NCM460D cell lines. Since the literature varies regarding LPS concentrations used in these particular cell lines, we decided to use two concentrations, namely 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS (Figure 5e). Both HT-29 and NCM460D cells responded to these concentrations. The elevated expression of TNF α was detected in HT-29 (8.3-fold increase, $p = 0.002$ and 5.8-fold increase, $p = 0.03$, respectively, for both doses of LPS) and in NCM460D (8.2-fold increase, $p = 0.01$ and 5.7-fold, $p = 0.02$, respectively, for both doses of LPS). We found that upon stimulation with LPS, miR-155 expression was inhibited in HT-29 cells at both concentrations (0.7 ± 0.1 at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, $p = 0.002$ vs. controls, and 0.7 ± 0.04 at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, $p < 0.0001$ vs. controls), and in NCM460D cells after treatment with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS (0.8 ± 0.05 , $p = 0.005$ vs. controls).

To confirm the relationship between MMR genes and miR-155, we transiently transfected NCM460D and HT-29 cells with an miR-155 mimic (Figure 5f). Results from the NCM460D cell line confirmed that, in normal non-tumorigenic cells, the response to miR155 led to a significant downregulation of MLH1 (40% reduction, $p = 0.005$), MSH2 (60% reduction, $p = 0.0001$), and MSH6 (50% reduction, $p = 0.0003$) in comparison to non-transfected cells. The drops were accompanied by an enhanced expression of p53 (1.5-fold increase, $p = 0.03$ vs. non-transfected cells). In the case of HT-29 cells, we observed a downregulation of only one of the MMR genes i.e., MSH6 (30% reduction, $p = 0.004$ vs. controls), and a reduction in p53 mRNA (30% reduction, $p = 0.0001$ vs. controls).

3. Discussion

One of the most prominent microRNAs implicated in both inflammation and cancer is miR-155. The importance of miR-155 deregulation in colitis arises from its cellular role, as either an inhibitor of oncogenic suppressors or a modulator of anti-inflammatory pathways [26]. Our results suggest that, first, miR-155 may promote carcinogenesis via the modulation of the SOCS1/p53 axis and high microsatellite instability (MSI-H), as it was observed in the ascending colon of PSC patients. Secondly, in the absence of miR-155 over-expression, the activated IL-6/S1PR1 signalling pathway reinforced chronic colitis in the sigmoid colon of PSC-UC patients. The biological relevance of these findings was confirmed in human intestinal cell lines *in vitro*.

The expression of miR-155 was substantially increased in the ascending colon of PSC patients with or without UC, which was in contrast to UC patients for whom miR-155 was significantly enhanced only in the sigmoid colon. Interestingly, in patients with PSC, the increased levels of miR-155 were seen in those parts of the colon where high concentrations of secondary bile acids (BAs) were observed. It has been established that prolonged exposure to high levels of BAs can lead to the generation of genomic instability, the development of apoptosis resistance and, ultimately, cancer [27]. The effect of toxic GCDCA on miR-155 expression was further confirmed in the Caco-2 cell line.

Our study also demonstrated that increased miR-155 expression is associated with the downregulation of SOCS1 in the ascending colon of PSC patients, with and without UC, and in the sigmoid colon of UC patients. The direct effect of miR-155 on SOCS1 expression was confirmed in our earlier studies, which showed a substantial inhibition of SOCS1 mRNA levels, in response to enhanced activation of miR-155 [24]. MiR-155, via suppression of SOCS1, exaggerates immune responses in the colonic mucosa of patients with IBD [28–31]. In UC, the inflammatory process starts in the rectum and progresses up to the sigmoid colon, and the descending and transverse colons [32]. In colitis that co-exists with PSC, colonic inflammation usually affects the right colon, i.e., it starts from the ascending colon and progresses in the opposite direction. Pro-inflammatory mediators, such as TNF- α , have been shown to be a positive modulator of miR-155, which affects miR-155 production in macrophages [33]. The elevated level of miR-155 correlates with the upregulation of TNF- α and the downregulation of SOCS1 in rheumatoid arthritis [34,35]. In our previous study, we observed the upregulation of TNF- α mRNA in the ascending colon of PSC-UC patients and in the sigmoid colon of UC patients [36]. Of note, in this study, we demonstrated the increased expression of miR-155 in the same parts of the colon. In accordance with our findings on human biopsies, TNF- α was shown to contribute to the induction of miR-155 [37]. The persistently increased levels of TNF- α can drive miR-155 overexpression, and consequently, lead to the inhibition of SOCS1. MiR-155 activates STAT3 by targeting SOCS1 [38], and it is worth emphasising that STAT3 activation can occur before histological changes in the intestinal tissue are detectable [22]. Our study demonstrated correlations between miR-155, SOCS1, and STAT3 in the ascending colon of PSC patients, with or without concurrent colitis, and in the sigmoid colon of UC patients. Similarly, in the PBMCs of PSC patients, the upregulation of miR-155 was associated with the suppression of SOCS1 and the enhanced expression of phospho-STAT3. Phosphorylated STATs can trigger

the expression of genes involved in inflammatory responses [39] and angiogenesis [40], and STAT3 is associated with cancer pathogenesis [41].

MSI-H tumours occur when two or more of the five markers (i.e., MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, or PMS2) show instability [42]. These tumours are predominantly found in the proximal colon and comprise approximately 15% of colorectal cancers. The finding of MSI-H in CRC has been associated with a favourable patient prognosis [43,44] but, paradoxically, a poor response to 5-fluorouracil-based chemotherapy [45–47]. This study, to our knowledge, for the first time, analysed MSI in the colon of PSC patients and demonstrated that the overexpression of miR-155 in the ascending colon was inversely related to the level of MSH2, MSH6, and MLH1 mRNA, whereas the expression of MMR mRNA was changed in the colon of UC patients. Our data are in line with other reports showing that MSI was not observed in stromal cells at any sites, including those within colitis cancer/dysplasia lesions in UC patients [48,49]. Thus, the microsatellite alterations in the ascending colon are a factor that clearly differentiates patients with UC alone from patients with PSC-UC.

We previously observed a substantial suppression of the p53 gene in the ascending colon of PSC patients, which might predispose them to pro-tumorigenic transformations [50]. A mutation in the p53 gene occurs in 34% of proximal colon tumours [51]. In contrast, in the sigmoid colon of UC patients, the levels of p53 were unchanged in comparison to controls [50]. This is in line with reports showing that approximately half of UC-associated tumours do not have p53 alterations [52–54]. This is related to the fact that carcinomas occurring in UC do not arise *de novo* but are preceded by, and evolve from, dysplastic mucosa, which is analogous to the development of sporadic colorectal carcinomas from adenomas [53,55]. Our *in vitro* analysis on the effect of miR-155 overexpression demonstrated a cell-type dependent response. In healthy epithelial NCM460D cells, miR-155 upregulation inhibited MLH1, MSH2, and MSH6 expression, which was associated with the induction of the p53 gene. In the context of DNA damage, the enhanced expression of p53 initiated various pathways, including cell cycle arrest, DNA repair, senescence, and apoptosis [56]. However, in adenocarcinoma HT-29 cells, the contrasting effect was observed as only MSH6 being suppressed, and the p53 gene was significantly downregulated. This suggests that miR-155 more efficiently suppresses the p53 gene in cancer cells than in healthy ones.

The second important observation from this study is related to the IL-6/STAT3/S1PR1 axis. Interleukin IL-6, together with TGF-beta, induces the development of Th17 cells from naïve T cells [57] and also inhibits TGF-beta-induced Treg differentiation [58,59]. At mucosal sites, IL-6 promotes Th17 development [60] and has an important role in regulating the balance between Th17/Treg in IBD [61]. The disturbed Th17/Treg ratio [22] is associated with various autoimmune and inflammatory diseases [62–66]. IL-17A is produced by Th17 cells and binds to receptors on the basal surface of intestinal epithelial cells to produce antimicrobial molecules that limit bacterial penetration through the epithelial barrier [67]. Human Th17 cells directly secrete inflammatory cytokines, such as IL-8, IFN- γ , TNF, and GM-CSF [55]. In turn, Treg cells control effector T cells, maintain tolerance against self or foreign antigens, and are essential for suppressing IBD [68,69]. Recent studies have suggested that miR-155 controls the properties of Treg, and the expression of miR-155 is itself controlled by Treg-specific factors, such as FOXP3 [70]. In humans and mice, the mutations in the FOXP3 locus on the X chromosome are associated with severe autoimmunity [71–73]. In this study, the significant imbalance in the IL-17/FOXP3 ratio, which was accompanied by IL-6 upregulation, was observed in both the sigmoid colon of PSC-UC patients and the ascending colon of UC patients, indicating persistent inflammation in these parts of the colon.

In response to inflammatory, environmental stimuli, IL-6 raises the level of STAT3, which, in turn, induces higher expression of S1PR1 [74]. S1PR1 stimulates the STAT3 protein through a positive feedback mechanism, causing the level of this protein to remain elevated, which leads to more severe inflammatory processes [75]. In our study, the significant differences in S1PR1 mRNA levels were apparent between the groups, and S1PR1 mRNA

expression was negatively correlated with miR-155 expression. Thus, S1PR1 mRNA levels were upregulated in the sigmoid colon of PSC-UC patients and in the ascending colon of UC patients, where miR-155 was not enhanced. The observed negative correlation between miR-155 and S1PR1 mRNA was further confirmed in intestinal epithelial cell lines. Our observations concerning the involvement of S1PR1 in Th17 development are supported by Garriss et al. [76]. Our results suggest that enhanced production of IL-6, associated with the upregulation of S1PR1, is a critical effector in chronic intestinal inflammation, which may result in neoplastic transformation.

Despite the strengths of this study, some limitations should be noted. First of all, the number of analysed samples per each group was only 10 and, for sure, if it was higher, then the results would be more substantiated. However, PSC is a rare liver condition that means only a scarcity of biological material was available to us. An additional limitation may be the older age of controls when compared to studied groups. Nevertheless, it does not reach a statistical significance when controls are compared to the UC or PSC-UC group. We believe that the age difference between the controls and PSC group would not have an impact on the results of the study, but obviously this cannot be definitely ruled out.

4. Materials and Methods

4.1. Subjects

Three groups of subjects were included in the study: (i) PSC patients (n = 10) who had never been diagnosed with concomitant IBD; (ii) PSC-UC patients (n = 10) showing macroscopic features of UC on colonoscopy, which was confirmed with a histology examination, and (iii) UC (n = 10) healthy subjects who underwent colonoscopies for various indications and showed neither macroscopic nor microscopic abnormalities in their colon (controls n = 10). Colon biopsy specimens (for histological and mRNA evaluations) were obtained from the ascending and sigmoid colons from each patient. PBMCs were freshly isolated from heparinised venous blood samples of PSC and PSC-UC patients and healthy subjects.

All included patients with primary sclerosing cholangitis fulfilled EASL criteria for this diagnosis. The ages were between 18 and 75 years.

The main exclusion criteria for the study were: an inability to give informed consent; patients with other forms of chronic liver diseases; a diagnosis of decompensated liver cirrhosis (Child-Pugh class B–C); pregnant or breastfeeding women, and any other condition, which in the opinion of the investigators, would impede the patient's participation or compliance during the study.

Demographic and clinical data on analysed patients are summarised in Table 1. Written, informed consent was obtained from each patient included in the study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Pomeranian Medical University (BN-001/43/06 and BN-001/122/06) and adhered to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Table 1. Demographic and laboratory features of analysed subjects.

	Control (n = 10)	PSC (n = 10)	PSC-UC (n = 10)	UC (n = 10)
Gender (Male/Female)	6/4	8/2	8/2	2/8
Age (years)	50 ± 4	28 ± 10	34 ± 15	43 ± 17
Hb (mg/dl, normal M: 14–18, F: 12–16)	ND	15 ± 0.8	16. ± 1.7	ND
Bilirubin (mg/dl, normal < 1.1)	ND	1.2 ± 0.4	2.6 ± 0.7	0.4 ± 0.2
ALP (IU/l, normal 30–120)	ND	304 ± 241	381 ± 277	80 ± 24
GGTP (IU/l, normal M < 100, F < 66)	ND	325 ± 310	484 ± 232	17 ± 13.3
ALT (IU/l, normal < 40)	ND	103 ± 72	104 ± 23	15 ± 8.4
Cirrhosis (yes/no)	N/A	4/6	4/6	N/A

Values are given as mean ± SD, unless stated otherwise. Abbreviations: PSC, primary sclerosing cholangitis; UC, ulcerative colitis; Hb, haemoglobin; ALP, alkaline phosphatase; GGTP, gamma-glutamyl transferase; ALT, alanine aminotransferase; SD, standard deviation; N/A, not applicable; ND, no data.

4.2. RNA and miRNA Expression Analysis

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), and cDNA synthesis was carried out using the TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or the SuperScript IV RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Gene expressions were measured using human TaqMan Gene Expression Assays for 18S ribosomal RNA (Hs99999901_s1), S1PR1 (Hs01922614_m1), SOCS1 (Hs00705164_s1), FOXP3 (Hs01085834_m1), IL-17A (Hs00174383_m1), IL-6 (Hs001741131_m1), STAT3 (Hs00374230_m1), MLH1 (Hs00179866_m1), MSH2 (Hs00954125_m1), MSH6 (Hs00943000_m1).

MiRNA cDNA synthesis was carried out using the TaqMan Advanced miRNA cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The expression of miR-155 (002623_mir) and reference microRNA (miR-191 (477952_mir) or miR-16 (477860_mir) were measured using TaqMan Advanced miRNA assays and TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

Fluorescence data were analysed using 7500 software v2.0.2. (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and the relative amounts of transcripts were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula.

4.3. PBMCs

Isolation of PBMCs was carried out in accordance with the manufacturer's protocol (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Changes in miR-155 and SOCS1 mRNA expression were then detected, as described earlier.

4.4. ELISA

The PBMCs of phospho-STAT3 [pY705] levels were detected by ELISA (Multispecies ELISA Kit; ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

4.5. Cell Culture, Transfection and Treatments

NCM460D (INCELL Innovative Life Science Solutions, San Antonio, TX, USA; Cell License Material Transfer Agreement #204) is a normal mucosal epithelial cell line, a mixed monolayer/suspension culture, spontaneously immortalized, and non-tumorigenic. Cells were grown in INCELL's enriched M3:10 BaseF Medium (INCELL Innovative Life Science Solutions San Antonio, TX, USA), 10% *v/v* Fetal Bovine Serum (ATCC 30-2025), and 1% antibiotic solution (penicillin/streptomycin; Biowest, Nuaille, France) in accordance with the manufacturer's recommendations. Caco-2 (HTB-37TM) are heterogenous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells, and HT-29 (HTB-38TM) is a colorectal adenocarcinoma cell line with epithelial morphology. Both were purchased from the American Type Culture Collection and were grown according to the original protocol. All of the cell lines were cultured in 25-cm² or 75-cm² culture flasks and routinely maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

Transient transfections with either miR-155 inhibitor (Ambion mirVana[®] Anti-miR miRNA Inhibitor, hsa-miR-155; ID: AM10238; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or an miR-155 mimic (Ambion mirVana[®] miRNA mimic, hsa-miR-155; ID: MC28440; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were performed using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. Forty-eight hours after transfection, the cells were lysed, and RNA was isolated for further analysis.

To investigate the effect of GCDCA on miR-155 expression, Caco-2 cells were exposed to 200 or 500 μ M of GCDCA for 24 h. GCDCA, provided by Sigma (St. Louis, MO, USA), was dissolved in sterile phosphate-buffered saline.

To initiate the inflammatory process, Caco-2, HT-29, and NCM460D cells were incubated in an appropriate complete cell culture medium with the addition of lipopolysaccharides

from *Escherichia coli* 0111:B4 (0.5 µg/mL or 1 µg/mL) (4391, Sigma, St. Louis, MO, USA). After 24 h, cells were lysed and RNA was isolated for further analysis.

4.6. Statistics

Statistical analyses done with StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA), and GraphPad Prism7 applications (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Continuous variables reported as mean + SEM. Statistical differences of baseline characteristics between groups were analyzed using the χ^2 test for categorical data, and the Mann-Whitney U test or Student's *t*-test for quantitative data analysis. Correlation analyses were performed using the Spearman Rank method. Results were considered statistically significant when *p*-values were <0.05.

5. Conclusions

Though great efforts have been made to investigate the pathogenesis of PSC-UC over the past decades, the molecular mechanisms causing it remain largely unknown. A direct comparison of experimental results from an animal model of PSC (*mdr2*^{-/-} mice develop chronic cholangitis, but not colitis [77]) with the observations from PSC patients is difficult to evaluate [78]. The innovation presented here is the direct study in patients with PSC-UC, in comparison to isolated PSC or UC. This study suggests that miR-155 acts as a link between inflammation and cancer in colitis associated with PSC (Figure 6). The upregulation of miR-155 results in failure of SOCS1 expression and the inhibition of p53, which may predispose patients to pro-tumorigenic transformations. Moreover, the miR-155-modulated suppression of MMR proteins may be responsible for the initiation of colorectal neoplastic transformation in patients with PSC. In contrast, enhanced IL-6/S1PR1 production and a lack of upregulation of miR-155 leads to pro-inflammatory signalling in the sigmoid colon of PSC patients. The observed changes in MMR protein expression, which is representative for MSI-H, could be used for further research focussed on developing useful biomarkers for monitoring colorectal cancer development.

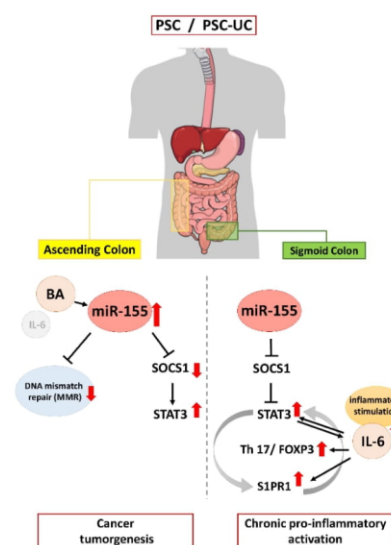


Figure 6. Schematic figure showing the contribution of miR-155 in inflammation and neoplastic transformation in the colon of patients with primary sclerosing cholangitis.

Author Contributions: Conceptualisation, A.K.-P.; methodology, M.A., I.S. and A.K.-P.; validation, A.K.-P. and M.M.; formal analysis, A.K.-P., M.A. and I.S.; investigation, P.M.; resources, A.K.-P., A.B., M.M. and P.M.; data curation, A.K.-P., M.A. and I.S.; writing—original draft preparation, A.K.-P.; writing—review and editing, all authors; visualisation, M.A., I.S. and A.K.-P.; supervision M.M. and P.M.; project administration, A.K.-P.; funding acquisition, A.K.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre in Poland, grant number 2020/39/O/NZ4/01732. For the purpose of Open Access, the authors has applied a CC-BY public copyright licence to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Pomeranian Medical University (BN-001/43/06 and KB0012/44/2021).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Hirschfield, G.M.; Karlsen, T.H.; Lindor, K.D.; Adams, D.H. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* **2013**, *382*, 1587–1599. [[CrossRef](#)]
- Torres, J.; Pineton de Chambrun, G.; Itzkowitz, S.; Sachar, D.B.; Colombel, J.F. Review article: Colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharm. Ther.* **2011**, *34*, 497–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Soetikno, R.M.; Lin, O.S.; Heidenreich, P.A.; Young, H.S.; Blackstone, M.O. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gastrointest. Endosc.* **2002**, *56*, 48–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Broomé, U.; Lindberg, G.; Löfberg, R. Primary sclerosing cholangitis in ulcerative colitis—A risk factor for the development of dysplasia and DNA aneuploidy? *Gastroenterology* **1992**, *102*, 1877–1880. [[CrossRef](#)]
- Valeri, N.; Gasparini, P.; Fabbri, M.; Braconi, C.; Veronese, A.; Lovat, F.; Adair, B.; Vannini, I.; Fanini, F.; Bottoni, A.; et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6982–6987. [[CrossRef](#)]
- Ionov, Y.; Peinado, M.A.; Malkhosyan, S.; Shibata, D.; Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **1993**, *363*, 558–561. [[CrossRef](#)]
- Aaltonen, L.A.; Peltomäki, P.; Leach, F.S.; Sistonen, P.; Pylkkänen, L.; Mecklin, J.P.; Järvinen, H.; Powell, S.M.; Jen, J.; Hamilton, S.R.; et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **1993**, *260*, 812–816. [[CrossRef](#)]
- Thibodeau, S.N.; Bren, G.; Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **1993**, *260*, 816–819. [[CrossRef](#)]
- Mallette, F.A.; Calabrese, V.; Ilangumaran, S.; Ferbeyre, G. SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging* **2010**, *2*, 445–452. [[CrossRef](#)]
- Kempinska-Podhorodecka, A.; Milkiewicz, M.; Wasik, U.; Ligocka, J.; Zawadzki, M.; Krawczyk, M.; Milkiewicz, P. Decreased Expression of Vitamin D Receptor Affects an Immune Response in Primary Biliary Cholangitis via the VDR-miRNA155-SOCS1 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 289. [[CrossRef](#)]
- Tamiya, T.; Kashiwagi, I.; Takahashi, R.; Yasukawa, H.; Yoshimura, A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: Regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 980–985. [[CrossRef](#)]
- Yoshimura, A. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins. *Keio J. Med.* **2009**, *58*, 73–83. [[CrossRef](#)]
- O’Connell, R.M.; Kahn, D.; Gibson, W.S.; Round, J.L.; Scholz, R.L.; Chaudhuri, A.A.; Kahn, M.E.; Rao, D.S.; Baltimore, D. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* **2010**, *33*, 607–619. [[CrossRef](#)]
- Xin, Q.; Li, J.; Dang, J.; Bian, X.; Shan, S.; Yuan, J.; Qian, Y.; Liu, Z.; Liu, G.; Yuan, Q.; et al. miR-155 Deficiency Ameliorates Autoimmune Inflammation of Systemic Lupus Erythematosus by Targeting S1pr1 in FasLpr/lpr Mice. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 5437–5445. [[CrossRef](#)]
- Pham, T.H.; Okada, T.; Matloubian, M.; Lo, C.G.; Cyster, J.G. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* **2008**, *28*, 122–133. [[CrossRef](#)]
- Zhao, S.; Adebiyi, M.G.; Zhang, Y.; Couturier, J.P.; Fan, X.; Zhang, H.; Kellems, R.E.; Lewis, D.E.; Xia, Y. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 mediates elevated IL-6 signaling to promote chronic inflammation and multitissue damage in sickle cell disease. *FASEB J.* **2018**, *32*, 2855–2865. [[CrossRef](#)]
- Lee, H.; Deng, J.; Kujawski, M.; Yang, C.; Liu, Y.; Herrmann, A.; Kortylewski, M.; Horne, D.; Somlo, G.; Forman, S.; et al. STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1421–1428. [[CrossRef](#)]

18. Pathak, S.; Grillo, A.R.; Scarpa, M.; Brun, P.; D'Incà, R.; Nai, L.; Banerjee, A.; Cavallo, D.; Barzon, L.; Palù, G.; et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Exp. Mol. Med.* **2015**, *47*, e164. [\[CrossRef\]](#)
19. Xiao, B.; Liu, Z.; Li, B.S.; Tang, B.; Li, W.; Guo, G.; Shi, Y.; Wang, F.; Wu, Y.; Tong, W.D.; et al. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 916–925. [\[CrossRef\]](#)
20. Arif, K.M.T.; Elliott, E.K.; Haupt, L.M.; Griffiths, L.R. Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers* **2020**, *12*, 2922. [\[CrossRef\]](#)
21. Cao, H.; Huang, S.; Liu, A.; Chen, Z. Up-regulated expression of miR-155 in human colonic cancer. *J. Cancer Res. Ther.* **2018**, *14*, 604–607. [\[PubMed\]](#)
22. Wang, D.; Tang, M.; Zong, P.; Liu, H.; Zhang, T.; Liu, Y.; Zhao, Y. MiRNA-155 Regulates the Th17/Treg Ratio by Targeting SOCS1 in Severe Acute Pancreatitis. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 686. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Escobar, T.; Yu, C.R.; Muljo, S.A.; Egwuagu, C.E. STAT3 activates miR-155 in Th17 cells and acts in concert to promote experimental autoimmune uveitis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 4017–4025. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Adamowicz, M.; Milkiewicz, P.; Kempinska-Podhorodecka, A. 5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: An in vitro study. *J. Physiol. Pharm.* **2021**, *72*, 529–535. [\[CrossRef\]](#)
25. Furrle, E.; Macfarlane, S.; Thomson, G.; Macfarlane, G.T. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* **2005**, *115*, 565–574. [\[CrossRef\]](#)
26. Tili, E.; Michaille, J.J.; Croce, C.M. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol. Rev.* **2013**, *253*, 167–184. [\[CrossRef\]](#)
27. Ajouz, H.; Mukherji, D.; Shamseddine, A. Secondary bile acids: An underrecognized cause of colon cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2014**, *12*, 164. [\[CrossRef\]](#)
28. Iborra, M.; Bernuzzi, F.; Invernizzi, P.; Danese, S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: Crucial regulators in immune response. *Autoimmun. Rev.* **2012**, *11*, 305–314. [\[CrossRef\]](#)
29. Pekow, J.R.; Kwon, J.H. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2012**, *18*, 187–193. [\[CrossRef\]](#)
30. Vigorito, E.; Kohlhaas, S.; Lu, D.; Leyland, R. miR-155: An ancient regulator of the immune system. *Immunol. Rev.* **2013**, *253*, 146–157. [\[CrossRef\]](#)
31. Horino, J.; Fujimoto, M.; Terabe, F.; Serada, S.; Takahashi, T.; Soma, Y.; Tanaka, K.; Chinen, T.; Yoshimura, A.; Nomura, S.; et al. Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int. Immunol.* **2008**, *20*, 753–762. [\[CrossRef\]](#)
32. Claessen, M.M.; Lutgens, M.W.; van Buuren, H.R.; Oldenburg, B.; Stokkers, P.C.; van der Woude, C.J.; Hommes, D.W.; de Jong, D.J.; Dijkstra, G.; van Bodegraven, A.A.; et al. More right-sided IBD-associated colorectal cancer in patients with primary sclerosing cholangitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 1331–1336. [\[CrossRef\]](#)
33. Bala, S.; Marcos, M.; Kody, K.; Csak, T.; Catalano, D.; Mandrek, P.; Szabo, G. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor [alpha] (TNF[alpha]) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 1436–1444. [\[CrossRef\]](#)
34. Sharma, A.R.; Sharma, G.; Lee, S.S.; Chakraborty, C. miRNA-Regulated Key Components of Cytokine Signaling Pathways and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36*, 425–439. [\[CrossRef\]](#)
35. Churov, A.V.; Oleinik, E.K.; Knip, M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 1029–1037. [\[CrossRef\]](#)
36. Kempinska-Podhorodecka, A.; Blatkiewicz, M.; Wunsch, E.; Krupa, L.; Gutkowski, K.; Milkiewicz, P.; Milkiewicz, M. Oncomir MicroRNA-346 Is Upregulated in Colons of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2020**, *11*, e00112. [\[CrossRef\]](#)
37. Judit, B.N. Role of altered expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 327–335.
38. Alexander, W.S.; Hilton, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 503–529. [\[CrossRef\]](#)
39. Tye, H.; Kennedy, C.L.; Najdovska, M.; McLeod, L.; McCormack, W.; Hughes, N.; Dev, A.; Sievert, W.; Ooi, C.H.; Ishikawa, T.O.; et al. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 466–478. [\[CrossRef\]](#)
40. Chen, S.H.; Murphy, D.A.; Lassoued, W.; Thurston, G.; Feldman, M.D.; Lee, W.M. Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 1994–2003. [\[CrossRef\]](#)
41. Laudisi, F.; Cherubini, F.; Monteleone, G.; Stolfi, C. STAT3 Interactors as Potential Therapeutic Targets for Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1787. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Boland, C.R.; Thibodeau, S.N.; Hamilton, S.R.; Sidransky, D.; Eshleman, J.R.; Burt, R.W.; Meltzer, S.J.; Rodriguez-Bigas, M.A.; Fodde, R.; Ranzani, G.N.; et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5248–5257. [\[PubMed\]](#)

43. Gryfe, R.; Kim, H.; Hsieh, E.T.; Aronson, M.D.; Holowaty, E.J.; Bull, S.B.; Redston, M.; Gallinger, S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 69–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Popat, S.; Hubner, R.; Houlston, R.S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 609–618. [[CrossRef](#)]
45. Carethers, J.M.; Smith, E.J.; Behling, C.A.; Nguyen, L.; Tajima, A.; Doctolero, R.T.; Cabrera, B.L.; Goel, A.; Arnold, C.A.; Miyai, K.; et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* **2004**, *126*, 394–401. [[CrossRef](#)]
46. Ribic, C.M.; Sargent, D.J.; Moore, M.J.; Thibodeau, S.N.; French, A.J.; Goldberg, R.M.; Hamilton, S.R.; Laurent-Puig, P.; Gryfe, R.; Shepherd, L.E.; et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 247–257. [[CrossRef](#)]
47. Jover, R.; Zapater, P.; Castells, A.; Llor, X.; Andreu, M.; Cubiella, J.; Piñol, V.; Xicola, R.M.; Bujanda, L.; Reñé, J.M.; et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* **2005**, *55*, 848–855. [[CrossRef](#)]
48. Ozaki, K.; Nagasaka, T.; Notohara, K.; Kambara, T.; Takeda, M.; Sasamoto, H.; Jass, J.R.; Tanaka, N.; Matsubara, N. Heterogeneous microsatellite instability observed within epithelium of ulcerative colitis. *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 2513–2519. [[CrossRef](#)]
49. Yagishita, H.; Yoshida, T.; Ishiguro, K.; Numata, Y.; Okayasu, I. Epithelial and stromal genetic instability linked to tumor suppressor genes in ulcerative colitis-associated tumorigenesis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2008**, *43*, 559–566. [[CrossRef](#)]
50. Kempinska-Podhorodecka, A.; Adamowicz, M.; Ostrycharz, E.; Chmielarz, M.; Wojcicki, M.; Milkiewicz, P.; Milkiewicz, M. Role of miR-506 in ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 10134. [[CrossRef](#)]
51. Ryan, K.M.; Phillips, A.C.; Vousden, K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 332–337. [[CrossRef](#)]
52. Lashner, B.A.; Silverstein, M.D.; Hanauer, S.B. Hazard rates for dysplasia and cancer in ulcerative colitis. Results from a surveillance program. *Dig. Dis. Sci.* **1989**, *34*, 1536–1541. [[CrossRef](#)]
53. Gyde, S.N.; Prior, P.; Allan, R.N.; Stevens, A.; Jewell, D.P.; Truelove, S.C.; Lofberg, R.; Brostrom, O.; Hellers, G. Colorectal cancer in ulcerative colitis: A cohort study of primary referrals from three centres. *Gut* **1988**, *29*, 206–217. [[CrossRef](#)]
54. Isbell, G.; Levin, B. Ulcerative Colitis and Colon Cancer. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **1988**, *17*, 773–791. [[CrossRef](#)]
55. Riddell, R.H.; Goldman, H.; Ransohoff, D.F.; Appelman, H.D.; Fenoglio, C.M.; Haggitt, R.C.; Ahren, C.; Correa, P.; Hamilton, S.R.; Morson, B.C.; et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications. *Hum. Pathol.* **1983**, *14*, 931–968. [[CrossRef](#)]
56. Marei, H.E.; Althani, A.; Afifi, N.; Hasan, A.; Caceci, T.; Pozzoli, G.; Morrione, A.; Giordano, A.; Cenciarelli, C. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int.* **2021**, *21*, 703. [[CrossRef](#)]
57. Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L.; Kuchroo, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **2006**, *441*, 235–238. [[CrossRef](#)]
58. Chen, W.; Jin, W.; Hardegen, N.; Lei, K.J.; Li, L.; Marinos, N.; McGrady, G.; Wahl, S.M. Conversion of peripheral CD4 + CD25-naïve T cells to CD4 + CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 1875–1886. [[CrossRef](#)]
59. Wing, K.; Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 7–13. [[CrossRef](#)]
60. Hu, W.; Troutman, T.D.; Edukulla, R.; Pasare, C. Priming microenvironments dictate cytokine requirements for T helper 17 cell lineage commitment. *Immunity* **2011**, *35*, 1010–1022. [[CrossRef](#)]
61. Kimura, A.; Kishimoto, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 1830–1835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Tzartos, J.S.; Friese, M.A.; Craner, M.J.; Palace, J.; Newcombe, J.; Esiri, M.M.; Fugger, L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* **2008**, *172*, 146–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Jamshidian, A.; Kazemi, M.; Shaygannejad, V.; Salehi, M. The Effect of Plasma Exchange on the Expression of FOXP3 and RORC2 in Relapsed Multiple Sclerosis Patients. *Iran. J. Immunol.* **2015**, *12*, 311–318. [[PubMed](#)]
64. Jamshidian, A.; Shaygannejad, V.; Pourazar, A.; Zarkesh-Esfahani, S.H.; Gharagzloo, M. Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms. *J. Neuroimmunol.* **2013**, *262*, 106–112. [[CrossRef](#)]
65. Lochner, M.; Wang, Z.; Sparwasser, T. The Special Relationship in the Development and Function of T Helper 17 and Regulatory T Cells. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2015**, *136*, 99–129.
66. Venkatesha, S.H.; Dudics, S.; Weingartner, E.; So, E.C.; Pedra, J.; Moudgil, K.D. Altered Th17/Treg balance and dysregulated IL-1beta response influence susceptibility/resistance to experimental autoimmune arthritis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2015**, *28*, 318–328. [[CrossRef](#)]
67. Pappu, R.; Rutz, S.; Ouyang, W. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 343–349. [[CrossRef](#)]
68. Makita, S.; Kanai, T.; Oshima, S.; Uraushihara, K.; Totsuka, T.; Sawada, T.; Nakamura, T.; Koganei, K.; Fukushima, T.; Watanabe, M. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 3119–3130. [[CrossRef](#)]

69. Yu, Q.T.; Saruta, M.; Avanesyan, A.; Fleshner, P.R.; Banham, A.H.; Papadakis, K.A. Expression and functional characterization of FOXP3 + CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2007**, *13*, 191–199. [[CrossRef](#)]
70. Yamamoto, M.; Kondo, E.; Takeuchi, M.; Harashima, A.; Otani, T.; Tsuji-Takayama, K.; Yamasaki, F.; Kumon, H.; Kibata, M.; Nakamura, S. miR-155, a Modulator of FOXP3a Protein Expression, Is Underexpressed and Cannot Be Upregulated by Stimulation of HOZOT, a Line of Multifunctional Treg. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16841. [[CrossRef](#)]
71. Wildin, R.S.; Ramsdell, F.; Peake, J.; Faravelli, F.; Casanova, J.L.; Buist, N.; Levy-Lahad, E.; Mazzella, M.; Goulet, O.; Perroni, L.; et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 18–20. [[CrossRef](#)]
72. Bennett, C.L.; Christie, J.; Ramsdell, F.; Brunkow, M.E.; Ferguson, P.J.; Whitesell, L.; Kelly, T.E.; Saulsbury, F.T.; Chance, P.F.; Ochs, H.D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 20–21. [[CrossRef](#)]
73. Brunkow, M.E.; Jeffery, E.W.; Hjerrild, K.A.; Paepker, B.; Clark, L.B.; Yasayko, S.A.; Wilkinson, J.E.; Galas, D.; Ziegler, S.F.; Ramsdell, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 68–73. [[CrossRef](#)]
74. Grivennikov, S.; Karin, E.; Terzic, J.; Mucida, D.; Yu, G.Y.; Vallabhapurapu, S.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Cheroutre, H.; Eckmann, L.; et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 103–113. [[CrossRef](#)]
75. Nguyen, A.V.; Wu, Y.-Y.; Lin, E.Y. STAT3 and sphingosine-1-phosphate in inflammation-associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 10279–10287. [[CrossRef](#)]
76. Garris, C.S.; Wu, L.; Acharya, S.; Arac, A.; Blaho, V.A.; Huang, Y.; Moon, B.S.; Axtell, R.C.; Ho, P.P.; Steinberg, G.K.; et al. Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1166–1172. [[CrossRef](#)]
77. Battista, K.D.; Shearn, C.T.; Alexeev, E.E.; Glover, L.E.; Petersen, D.R.; Colgan, S.P.; Fennimore, B.P. A Novel Murine Model of Primary Sclerosing Cholangitis Associated Inflammatory Bowel Disease. *FASEB J.* **2017**, *31*, 469.1.
78. Fickert, P.; Pollheimer, M.J.; Beuers, U.; Lackner, C.; Hirschfield, G.; Housset, C.; Keitel, V.; Schramm, C.; Marschall, H.-U.; Karlsen, T.H.; et al. Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). *J. Hepatol.* **2014**, *60*, 1290–1303. [[CrossRef](#)]

Opis dorobku oraz osiągnięć naukowych

AUTOREFERAT



1. Imię i Nazwisko: **Monika Adamowicz**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2018 – dyplom ukończenia jednolitych studiów magisterskich na Wydziale Lekarsko-Biotechnologicznym i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie na kierunku Analityka Medyczna, temat pracy magisterskiej: Oznaczanie markerów aktywacji granulocytów obojętnochłonnych w ścianach i zakrzepach tętniaka aorty brzusznej

2018- uzyskanie prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego nr 16893

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2018 - Staż w Zakładzie Biologii Medycznej PUM, w ramach realizowanego projektu pn. "Staż studentów Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie przepustką do rynku pracy" nr POWR.03.01.00-00-S029/17-00

2019/ 2021 - Wykonanie badań molekularnych w Zakładzie Biologii Medycznej PUM przewidzianych w projektach finansowanym z Funduszu Stymulacji Nauki 314-04/19

4. Osiągnięcia naukowe tworzące cykl trzech publikacji rozprawy doktorskiej

- **Adamowicz Monika**, Stukan Iga, Milkiewicz Piotr, Bialek Andrzej, Milkiewicz Małgorzata, Kempieńska-Podhorodecka Agnieszka. Modulation of mismatch repair and the SOCS1/p53 axis by microRNA-155 in the colon of patients with primary sclerosing cholangitis. Int. J. Mol. Sci. 2022, IF: 6.208, MEiN: 140.000
- **Adamowicz Monika**, Kempieńska-Podhorodecka Agnieszka, Abramczyk Joanna, Banales Jesus M., Milkiewicz Piotr, Milkiewicz Małgorzata. Suppression of hepatic PPAR α in primary biliary cholangitis is modulated by miR-155. Cells, 2022, IF: 7.666, MEiN: 140.000
- **Adamowicz Monika**, Milkiewicz Piotr, Kempieńska-Podhorodecka Agnieszka. 5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomirs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. J. Physiol. Pharmacol. 2021, IF: 2.589, MEiN: 100.000

5. Pozostałe prace spoza cyklu powiązane z tematyką prowadzonych badań

- Kempieńska-Podhorodecka Agnieszka, **Adamowicz Monika**, Ostrycharz Ewa, Chmielarz Mateusz, Wójcicki Maciej, Milkiewicz Piotr, Milkiewicz Małgorzata. Role of miR-506 in ulcerative colitis associated with primary sclerosing cholangitis. Sci. Rep. 2021, IF: 4.996, MEiN:140.000
- Kempieńska-Podhorodecka Agnieszka, **Adamowicz Monika**, Chmielarz Mateusz, Janik Maciej K., Milkiewicz Piotr, Milkiewicz Małgorzata. Vitamin-D receptor-gene polymorphisms affect quality of life in patients with autoimmune liver diseases. Nutrients 2020, IF: 5.717, MEiN: 140.000

6. Konferencje naukowe związane z tematyką prowadzonych badań

- Abramczyk Joanna, **Adamowicz Monika**, Milkiewicz Piotr, Kempinska-Podhorodecka Agnieszka, Milkiewicz Małgorzata. UDCA effectively prevented the suppression of PPAR α via reduction of miR-155 expression: In vitro study Falk foundation, Symposium 229, XXVI International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health And Disease 2022, Amsterdam, The Netherlands
- **Adamowicz Monika**, Kempinska-Podhorodecka Agnieszka, Abramczyk Joanna, Banales Jesus Maria, Milkiewicz Piotr, Milkiewicz Małgorzata Reduced hepatic expression of PPAR alpha in primary biliary cirrhosis is modulated by miR-155. EASL International Liver Congress 2022, 22-26 June 2022, London, United Kingdom
- Kempinska-Podhorodecka Agnieszka, **Adamowicz Monika**, Milkiewicz Piotr, Milkiewicz Małgorzata. The role of microRNAs in S1P-dependend signaling axis in a different phenotypic presentation of ulcerative colitis in patients with primary sclerosing cholangitis (PSC). Falk foundation, Symposium 215, IBD: From Diagnosis to Therapy 2019, St. Petersburg, Russia

7. Inne prace oryginalne, uzyskane nagrody oraz konferencje związane z działalnością dodatkową

- Siennicka Aldona, **Adamowicz Monika**, Grzesch Natalie, Kłysz Magdalena, Woźniak Jarosław, Cnotliwy Miłosław, Galant Katarzyna, Jastrzębska Maria. Association of aneurysm tissue neutrophil mediator levels with intraluminal thrombus thickness in patients with abdominal aortic aneurysm. Biomolecules 2022, IF: 6.064, MEiN: 100.000
- Siennicka Aldona, **Adamowicz Monika**, Grzesch Natalie. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm the role of inflammation and proteolysis. Pomeranian J. Life Sci. 2021,MEiN:40.000
- Wyróżnienie za pracę: **Adamowicz Monika**, Grześ Natalia, Siennicka Aldona. The effect of Homocysteine on fibrinolytic and proteolytic parameters depends on the intraluminal thrombus thickness. International Cardiovascular Research Meeting. Copernicus Award Session, Bydgoszcz, 2019
- Grześ Natalia, **Adamowicz Monika**, Siennicka Aldona. Selected haemostatic factors in patients with abdominal aortic aneurysm. International Cardiovascular Research Meeting. Medical Research Journal 2019


Wszystkie publikacje/osiągnięcia

	łączna liczba prac	liczba prac z IF	liczba prac z punktacją MEiN	łączna wartość IF	łączna wartość punktacji MEiN
ogółem	38	6	8	33.240	805

Załącznik nr 5

Zgoda Komisji Bioetycznej w Szczecinie nr KB-0012/69/19 z dnia 25.02.2019r.

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KOMISJA BIOETYCZNA
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
tel. +48 91 4200 775 fax +48 91 4200 842
e-mail: kbi@pum.edu.pl



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie


KB-0012/69/19
25.02.2019 r.

Sz.P.


prof. dr hab. n. med. Piotr Milkiewicz
Samodzielną Pracownią Hepatologii
PUM w Szczecinie

Uzupełnienie zgody wydanej pismem BN-001/43/06 dnia 20.04.2006 r. do badania pt.:
"Badanie molekularnych i genetycznych mechanizmów odgrywających rolę w patogenezie przewlekłych
cholestatycznych chorób wątroby"

Na posiedzeniu w dniu 25.02.2019 r., Członkowie Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu
Medycznego w Szczecinie, /obradującej zgodnie z zasadami GCP Good Clinical Practice/, wyrazili
pozytywną opinię na rozszerzenie składu zespołu badawczego o Panią dr Ewę Kilańczyk, mgr Monikę
Adamowicz, mgr Dagmarę Ruminkiewicz.

PRZEWODNICZĄCY
Komisji Bioetycznej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik

Zgoda Komisji Bioetycznej w Szczecinie nr KB-0012/44/2021 z dnia 08.11.2021r



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KOMISJA BIOETYCZNA
71-210 Szczecin, ul. Żołnierska 54, pok. 202
tel./fax: +48 91 4830 909
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl

Uchwała nr KB-0012/44/2021
Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
w Szczecinie z dnia 08 listopada 2021 r.

Na podstawie art. 29 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza i lekarza dentystry (tj. z 2020 r., Dz. U. poz. 514 z późn. zm.) oraz § 6 rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480) uchwała się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, w składzie według listy dołączonej do niniejszej uchwały, po zapoznaniu się z przedstawioną dokumentacją,

wyraża pozytywną opinię dotyczącą eksperymentu medycznego p.t.:

„Badania molekularne i rola mikroRNA w pierwotnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych (PSC)”

Główny Badacz: dr hab. Agnieszka Kempieńska-Podhorodecka

Współbadacz:

- mgr Iga Stukan, Zakład Biologii Medycznej Pomorskiego uniwersytetu Medycznego w Szczecinie,
- mgr Monika Adamowicz, Zakład Biologii Medycznej Pomorskiego uniwersytetu Medycznego w Szczecinie,
- prof. dr hab. Małgorzata Milkiewicz, Zakład Biologii Medycznej Pomorskiego uniwersytetu Medycznego w Szczecinie,
- prof. dr hab. Piotr Milkiewicz, Klinika Hepatologii i Chorób Wewnętrznych Katedry Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby, Warszawski Uniwersytet Medyczny
- dr Sławomir Kozieł, Pracownia Endoskopowa Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
- dr hab. Anna Kozłowska, Centrum Medyczne SONOMED w Szczecinie

Termin zakończenia badań: 31.12.2025 r.

§ 2

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku i przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja projektu badawczego wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji, o ciężkich lub niespodziewanych zdarzeniach niepożądanych i nieprzewidzianych okolicznościach, o zakończeniu badania i o jego wynikach.

§ 3

Zgodnie z §3 rozporządzenia Ministra Finansów, Funduszy i Polityki Regionalnej z dnia 23.12.2020 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej podmiotu przeprowadzającego eksperyment medyczny (Dz.U. z 2020 r. poz. 2412), eksperyment medyczny może być przeprowadzony po zawarciu przez podmiot przeprowadzający eksperyment medyczny umowy ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej na rzecz jego uczestnika oraz osoby, której skutki eksperymentu mogą bezpośrednio dotknąć, przy czym obowiązek ten powstaje najpóźniej w dniu poprzedzającym dzień rozpoczęcia eksperymentu medycznego.

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, 70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1, tel. + 48 91 48 00 700, fax + 48 91 48 00 705, www.pum.edu.pl

§ 4

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Pouczenie:

1. Odwołanie od niniejszej uchwały może wnieść:
 - 1) podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny,
 - 2) kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony,
 - 3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.
2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały.

PRZEWODNICZĄCY
Komisji Bioetycznej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik