

## 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 nieznana, 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 cholangiocytołów (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 mimic/ inhibitor) oraz ekspozycji na UDCA i/lub 5-ASA.

W cholangiocytołach 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 cholangiocytołów 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 $\alpha$ . 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 przeciwwzapalne 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 $\alpha$  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.