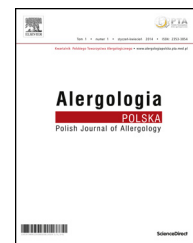


Dostępne online www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/alergo

Praca poglądowa/Review

miRNA – rola i znaczenie w astmie oskrzelowej

miRNA – role and importance in bronchial asthma



Maksymilian Ziaja, Rafał Pawliczak*

Zakład Immunopatologii Katedra Alergologii Immunologii i Dermatologii UMED, Łódź, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 1.7.2017

Zaakceptowano: 20.7.2017

Dostępne online: 01.08.2017

Słowa kluczowe:

- microRNA
- astma oskrzelowa
- krążące miRNA

Keywords:

- microRNA
- Bronchial asthma
- Circulating miRNAs

ABSTRACT

Chronic inflammatory airway diseases, including asthma, are a significant health problem and previous treatment methods seem to be insufficient. There is a lack of effective therapies which are adjusted to treat all classes in terms of severity, and it is probably caused by insufficient understanding of molecular mechanisms involved in its occurrence. Small non-coding microRNA molecules in response to environmental factors lead to modulate gene expression. They regulate many processes associated with physiologic functions of the immune system. Researches showed crucial role of miRNA in pathogenesis of asthma and the other chronic inflammatory airway diseases. Despite the link of microRNA with pathogenesis of inflammatory airway diseases, the role of these molecules is still unclear. More detailed knowledge of the impact of miRNA molecules on the development of bronchial asthma would allow us to better understand the genesis process and might influence the effectiveness of the bronchial asthma treatment.

© 2017 Published by Elsevier Sp. z o.o. on behalf of Polish Society of Allergy.

Wprowadzenie

Budowa miRNA

mikroRNA są to małe, niekodujące cząsteczki, tworzące dużą rodzinę silnie konserwatywnych RNA, które regulują post-transkrypcyjne wyciszanie genów poprzez interakcję z docelowymi cząsteczkami mRNA [1]. Wyróżniono mechanizm opierający się na inhibicji translacji oraz mechanizm promujący degradację docelowego mRNA. Mechanizm promujący degradację funkcjonuje na zasadzie przyłączenia mikroRNA do komplementarnej sekwencji matrycowego RNA, a następnie jego degradacji. Poza wyżej wymienioną funkcją, jaką jest regulacja ekspresji genów, miRNA kontro-

luje wiele innych procesów komórkowych, do których zaliczamy wzrost i różnicowanie komórek, metabolizm, sygnalizację, jak również wpływ na procesy chorobowe powiązane z nowotworami i stanami zapalnymi [2–4]. Długość endogennych cząsteczek miRNA to około 22 nukleotydy, a sam proces powstawania cząsteczek mikroRNA składa się z szeregu ściśle określonych etapów [5].

Biogeneza cząsteczek mikroRNA

Biogeneza miRNA ma swój początek w jądrze komórkowym. Pierwotne transkrypty miRNA (pri-miRNA) tworzone są poprzez działanie polimerazy RNA II, tak dochodzi do wytworzenia „oczyszczonych” i poliadenylowanych transkryptów, które w następnych procesach ulegają dalszym przekształceniom [6]. Kolejny etap obejmuje działanie swoistego

* Adres do korespondencji: Zakład Immunopatologii Katedra Alergologii Immunologii i Dermatologii UMED, ul. Żeligowskiego 7/9 pok. 122, 90-752 Łódź, Polska.

Adres email: rafal.pawliczak@csk.umed.lodz.pl (R. Pawliczak).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.alergo.2017.07.001>

2353-3854/© 2017 Published by Elsevier Sp. z o.o. on behalf of Polish Society of Allergy.

kompleksu enzymatycznego, w którego skład wchodzi białko DGCR8 oraz RNaza III, Drosha o właściwościach endonukleolitycznych. Proces ten obejmuje reakcję katalitycznego cięcia docelowej cząsteczki pri-miRNA, co skutkuje powstaniem zhybrydowanego odcinka RNA, aż do jednoniciowych obszarów pętli. Długość powstałego pre-miRNA to około 70 nukleotydów [7]. Struktura ta często określana jest, jako tzw. spinka do włosów (ang. hairpin). Prowadzi to do powstania prekursorowej cząsteczki miRNA (pre-miRNA), która następnie transportowana jest do cytoplazmy. Transport prekursorowych form miRNA do cytoplazmy możliwy jest dzięki aktywności transportera, którym jest eksportyna-5 oraz jądrowego białka Ran-GTP [7]. Kolejny etap dojrzewania prekursorowego miRNA obejmuje działanie endorybonukleazy, którą jest kompleks enzymatyczny DICER. Etap ten składa się z serii katalitycznych cięć, który finalnie prowadzi do powstania dupleksów RNA o długości ~21 nukleotydów [6, 7]. W powstałym dupleksie miRNA/miRNA* (miRNA* oznacza nić, która ulega degradacji) tylko jedna z nici zostaje preferencyjnie włączona do białkowego kompleksu (RISC), druga nić zostaje zdegradowana [7].

Proces włączenie preferowanej cząsteczki miRNA do kompleksu RISC poprzedza wiązanie się molekuly miRNA z białkiem AGO2 (białko wchodzące w skład kompleksu RISC) [8].

Włączenie jednej z molekuł miRNA do kompleksu jest ściśle kontrolowane, wybór determinowany jest lokalną stabilnością termodynamiczną dupleksu miRNA/miRNA*, nić, której koniec 5' jest mniej stabilnie sparowany, zostaje włączona do kompleksu RISC [7]. Tak powstały kompleks miRNA-AGO2-RISC zdolny jest do preferencyjnej represji docelowego genu. Dzięki obecności tzw. *seed region* możliwe jest przewidywanie celu dla poszczególnych miRNA. Region ten charakteryzuje się całkowitą bądź częściową komplementarnością do sekwencji docelowego mRNA [7, 9]. Długość *seed region* to około 6 nukleotydów, które poprzez występowanie komplementarnych zasad łączą się z nukleotydami docelowego mRNA w pozycji 2-7 od końca 5' miRNA [10]. *Seed region* to stosunkowo krótka sekwencja, istnieje zatem możliwość, aby jedna cząsteczka miRNA regulowała ekspresję więcej niż jednego genu. Zakłada się, że komplet ludzkich miRNA może wpływać na ekspresję nawet jednej trzeciej genów kodujących białka [9].

Mechanizm kontroli ekspresji genów przez cząsteczki miRNA

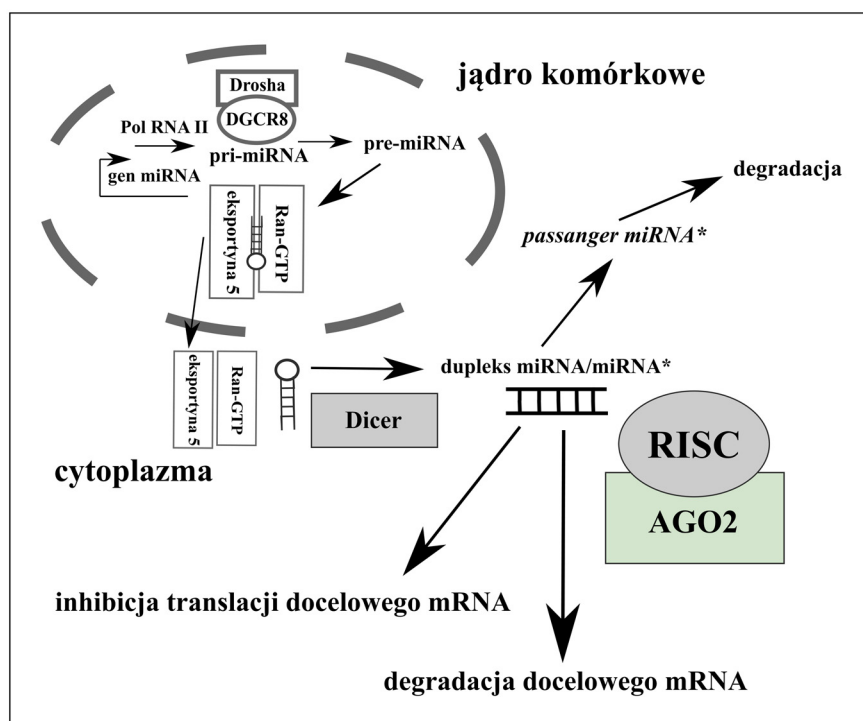
Dwa szlaki represji genów przez mikroRNA zależne są przede wszystkim od stopnia komplementarności – w przypadku, gdy miRNA nie wykazuje rozległej komplementarności w stosunku do docelowego mRNA, kompleks RISC wraz z miRNA prowadzi do inhibicji translacji. Schemat stopniowego dojrzewania pierwotnych transkryptów miRNA z uwzględnieniem lokalizacji komórkowej oraz przewidywany podział działania kompleksu RISC przedstawia rycina 1.

Astma oskrzelowa

Astma oskrzelowa jest to przewlekła, heterogeniczna choroba dróg oddechowych o charakterze zapalnym. Choroba ta

zazwyczaj charakteryzuje się kaszlem, dusznościami, świszczącym oddechem oraz częściowo odwracalną obturacją. Liczba osób chorych na astmę oskrzelową to około 300 milionów na całym świecie [11]. Astma oskrzelowa stanowi jedną z najczęstszych przewlekłych chorób układu oddechowego zarówno u dzieci, jak i dorosłych [12]. Przypuszcza się, że w roku 2025 liczba chorych na astmę oskrzelową wynosić będzie 400 milionów [11]. Stopień nasilenia objawów jest zmienny w czasie i wynika przede wszystkim z ograniczeń przepływu wydychanego powietrza, co stanowi cechę charakterystyczną dla chorób obturacyjnych układu oddechowego [6, 11,]. Do czynników wpływających na nasilenie objawów zaliczyć można ekspozycję na alergen, aktywność fizyczną, infekcje wirusowe dróg oddechowych czy też zmianę warunków pogodowych [11]. Leczenie astmy oskrzelowej opiera się głównie na zastosowaniu glikokortykosteroidów drogą wziewną, β_2 -mimetyków krótko i długodziałających oraz leków antyleukotrienowych [13]. Działanie przeciwzapalne glikokortykosteroidów w dużej mierze opiera się na aktywacji (cytozolowych receptorów glikokortykosteroidowych, które po związaniu z ligandem ulegają translokacji do jądra komórkowego. Docelowym miejscem działania dla ww. receptorów jest jądro komórkowe [14]. Wyróżnia się dwa mechanizmy działania; transaktywację oraz transrepresję [15]. Wiele genów posiada w obszarze promotora sekwencję, która w odpowiedzi na obecność aktywowanych, homodimerycznych receptorów dla glikokortykosteroidów, indukuje ekspresję genów, których produkty białkowe wykazują działanie przeciwzapalne, proces ten określamy mianem transaktywacji [15]. Transrepresja to proces, który finalnie prowadzi do represji genów pro-zapalnych. Dodatkowo do molekularnego mechanizmu glikokortykosteroidów zaliczyć można rekrutację deacetylazy histonowej HDAC2 [16]. Zwiększona aktywność deacetylazy histonowej prowadzi do represji genów poprzez ograniczenie dostępu czynników transkrypcyjnych do docelowych sekwencji regulatorowych [16]. Istotny problem kliniczny stanowią przypadki ciężkiej, niewrażliwej na kortykosteroidy astmy oskrzelowej, której występowanie często powiązane jest z infekcjami bakteryjnymi oraz wirusowymi [14]. Powszechnie izolowaną bakterią od pacjentów z ostrą, steroidooporną astmą oskrzelową jest *Haemophilus influenzae* [14]. Co więcej, infekcje bakteryjne jak i wirusowe, wpływają również na zaostrzenie objawów astmy oskrzelowej. Do zaostrzenia dochodzi w przypadku infekcji dróg oddechowych np. wirusem grypy, wirusem RSV czy też rinowirusem [3, 14]. Świszczący oddech spowodowany infekcją rinowirusową u dzieci w pierwszych trzech latach życia stanowi najsilniejszy czynnik ryzyka, jeżeli chodzi o rozwój astmy wieku dziecięcego [17].

Komórki nabłonkowe dróg oddechowych tworzą barierę między gospodarzem, a środowiskiem zewnętrznym, co za tym idzie stanowią pierwsze miejsce kontaktu z alergenami, zanieczyszczeniami powietrza oraz mikroorganizmami. Wynika to przede wszystkim z faktu, iż na powierzchni komórek nabłonka znajduje się wiele receptorów odpowiedzialnych za interakcję z patogenami, takimi jak rinowirusy, których rola w patogenezie astmy oskrzelowej wydaje się być istotna. W przypadku alergenów, do interakcji z komórkami układu immunologicznego dochodzi poprzez wiązanie z receptorami rozpoznającymi wzorce molekularne



Ryc. 1 – Schemat przedstawiający biogenezę i zasadę działania miRNA

Fig. 1 – Scheme presenting biogenesis and mechanisms of miRNA action

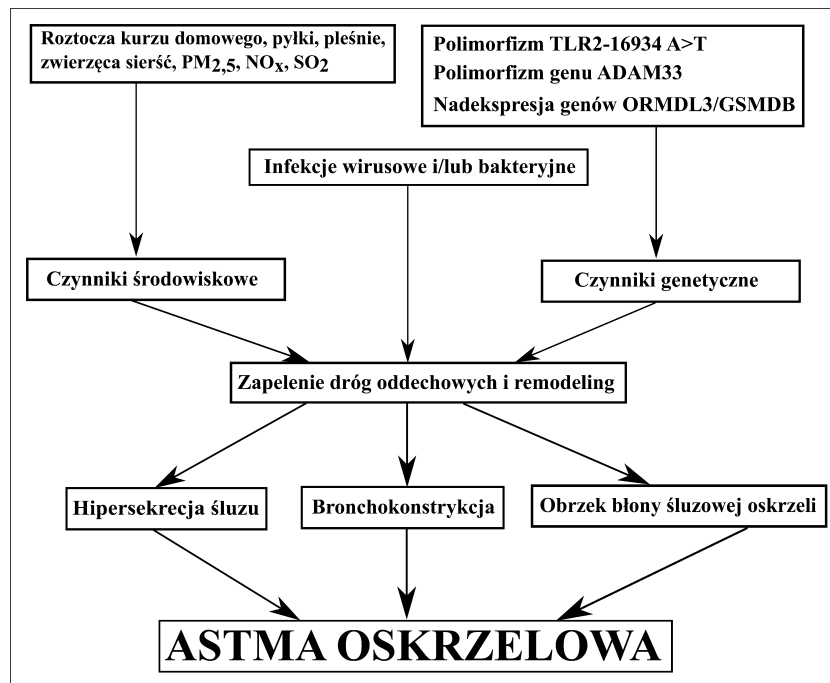
na powierzchni komórek nabłonka oddechowego, bądź bezpośrednio poprzez interakcję z komórkami dendrytycznymi [18, 19]. Nabłonek dróg oddechowych odgrywa zatem kluczową rolę w inicjacji procesów zapalnych, podczas których dochodzi do produkcji interferonów, cytokin czy ten chemokin [4, 20].

Istotny wydaje się fakt, że liczba chorych na świecie dramatycznie wzrasta, a dokładny mechanizm molekularny tej choroby jest nadal nie do końca poznany. Stanowi to prawdopodobnie największy problem, jeżeli chodzi o astmę oskrzelową, dlatego też poznanie mechanizmów na poziomie molekularnym pozwoliłoby na opracowanie nowych i przede wszystkim skuteczniejszych strategii terapeutycznych. Dodatkowo należy wspomnieć, że astma oskrzelowa nadal pozostaje chorobą nieuleczalną, która finalnie prowadzi do trwałego upośledzenia czynności układu oddechowego [21].

Aktualny stan wiedzy ukazuje znaczącą rolę miRNA w procesie patogenezy astmy oskrzelowej poprzez uczestnictwo w regulacji/modulacji wielu procesów z tym związanych [1, 2, 6, 22, 23]. Mimo to dokładna rola miRNA jest relatywnie słabo poznana. Celem pracy jest przedstawienie krytycznego przeglądu na temat relacji pomiędzy obecnością specyficznych miRNA a astmą oskrzelową. Dalsze prace nad miRNA, które będą stanowiły krok w przód, w poznaniu roli miRNA mogą znacząco wpłynąć na lepszą diagnostykę astmy oskrzelowej, a przede wszystkim poprawę komfortu życia pacjentów dotkniętych tą chorobą.

Wpływ czynników środowiskowych i genetycznych na astmę oskrzelową

Przewlekły stan zapalny oskrzeli spowodowany jest przede wszystkim wzrostem liczby komórek tucznych, wzrostem stężenia immunoglobulin klasy E oraz naciekiem eozynofili [24]. Patogeneza astmy dalej pozostaje niejasna, przypuszcza się, że jej występowanie indukowane jest wieloczynnikowo. Do czynników tych zalicza się funkcjonowanie układu odpornościowego, czynniki środowiskowe oraz predyspozycje genetyczne [25]. Wybrane czynniki wpływające na występowanie astmy oskrzelowej przedstawia rycina 2. Przykładami cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th2, które uczestniczą w patogenezie astmy oskrzelowej, są przede wszystkim: IL-4, IL-5, IL-9 IL-13 oraz GM-CSF [26, 27]. Jednym z przykładów jest nadekspresja efektorowej interleukiny 13, jest to kluczowa cytokina syntetyzowana przez aktywowane limfocyty Th2 [28]. Odpowiedź Th2-zależna jest typową odpowiedzią w przypadku astmy oskrzelowej. IL-13 odgrywa rolę w patogenezie astmy, jak i w indukcji zapalenia dróg oddechowych o podłożu alergicznym, charakteryzującym się naciekiem komórek zapalnych, hipersekrecją śluzu, nadwrażliwością dróg oddechowych czy też hiperplazją mięśniówki gładkiej [29]. Wyżej wymienione procesy zależne są głównie od zmian stopnia ekspresji genów na poziomie mRNA jak i białka, wliczając w to przede wszystkim zmiany w stężeniu cytokin i chemokin. U pacjentów z umiarkowaną ciężką astmą oskrzelową dochodzi do zwiększonej odpowiedzi ze strony limfocytów Th1 i/lub



Ryc. 2 – Wieloczynnikowy patomechanizm astmy oskrzelowej
Fig. 2 – Multifactor pathomechanism of bronchial asthma

Th17, przeważa neutrofilowy charakter stanu zapalnego [30]. Istnieją doniesienia, które wskazują na zmienny stopień ekspresji miRNA w różnych modelach zapalenia dróg oddechowych. Przykładem może być model indukowanego zapalenia dróg oddechowych u bitransgenicznym myszy [29]. W modelu dochodzi do ekspresji transgenu kodującego IL-13 w komórkach płuc, ekspresja indukowana jest użyciem doksocykliny. Wyniki wskazują, że dochodzi nawet do trzykrotnej nadekspresji niektórych genów kodujących miRNA. Przykładami molekuł, które w wyniku nadekspresji kodujących je genów zwiększają swoje stężenie, są m.in.: miRNA-21, miRNA-142, miRNA-483, miRNA-709, miRNA-706. Pomimo że otrzymywane eksperymentalne modele astmy oskrzelowej indukowane są w odmienny sposób, to ostatecznie pod względem fenotypowym modele te są do siebie bardzo podobne [24].

Model steroidoopornej astmy oskrzelowej

Przykładem, który jednoznacznie ukazuje, jak znaczącą rolę odgrywa miRNA w astmie oskrzelowej, jest praca Richarda Y. Kim i wsp. [14]. Celem autorów było opracowanie reprezentatywnego mysiego modelu ciężkiej, steroidoopornej astmy oskrzelowej, bliższe poznanie mechanizmów patogennych oraz określenie potencjalnie nowych metod leczenia. U podłoża steroidoopornej astmy oskrzelowej leży wiele czynników, do których zaliczyć można: odpowiedź układu immunologicznego, upośledzone funkcjonowanie receptorów dla glikokortykosteroidów, jak i wzrost stopnia ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne [14, 31].

Astmę oskrzelową indukowano owalbuminą u myszy BALB/c, zaostrenie objawów i/lub niewrażliwość na leczenie steroidami osiągnięto poprzez zainfekowanie myszy bakterią *Chlamydia maridarum* oraz *Haemophilus influenzae*. W przypadku infekcji *Chlamydia maridarum* dochodzi do supresji eozynofilowej odpowiedzi zapalnej na rzecz zwiększenia odpowiedzi typu neutrofilowego. Promuje to odpowiedź Th1/Th17-zależną zamiast dominującej wcześniej odpowiedzi Th2-zależnej [14]. Model ciężkiej, steroidoopornej astmy oskrzelowej typu neutrofilowego indukowany owalbuminą oraz dodatkowo współistniejąca infekcja *Chlamydia maridarum* prowadzi do wzrostu ekspresji miRNA-21 w komórkach płuc w porównaniu do grupy kontrolnej (Sal/SPG).

Rola infekcji bakteryjnych i wirusowych w indukcji SSIAAD

Istotny jest również fakt zwiększenia ekspresji miRNA-21 w przypadkach, gdzie nie dochodziło do odpowiedzi układu immunologicznego [14]. Do zwiększenia ekspresji miRNA-21 dochodzi również w przypadku modelu niealergicznego, infekowanego przy użyciu *Chlamydia maridarum*, bez ekspozycji na owalbuminę [14]. Wzrost ekspresji miRNA-21 powiązany jest ze wzrostem czynników Th1 i/lub Th17-zależnych, do których zalicza się np. IL-17, IL-6, STAT1, IFN γ , TNF [14]. Wnioskować zatem można, że miRNA-21 jest czynnikiem indukowanym przez infekcję i może wpływać na środowisko płuc przed ekspozycją na alergen, którym była owalbumina [14]. Ilościowy PCR tkanki płucnej szczepu C57BL/6, u którego indukowano alergiczne zapalenie dróg oddechowych, oraz infekowanego *C. maridarum* wykazał wzrost ekspresji miRNA-21. Dowodzi to, że wzrost ekspresji miRNA-21 indukowany

alergicznym zapaleniem dróg oddechowych nie jest specyficzny szczepowo, może zatem dotyczyć każdego innego szczepu [14]. Ponadto modele Ova/Cmu wykazują obniżoną ekspresję białek, takich jak PTEN, NR3C1 oraz HDAC2 w porównaniu do modelu bez infekcji *C. maridarum* (Ova/SPG) [14].

Wpływ miRNA-21 na aktywność ścieżki sygnałowej PI3K/AKT
Wyżej wymienione czynniki powiązane są z odpowiedzią PI3K-zależną oraz odpowiedzią pośredniczącą w działaniu steroidów. W celu określenia, czy wywołane infekcją zmiany w ekspresji białek (PTEN, NR3C1, HDAC2) związane są ze zwiększoną aktywnością szlaku PI3K, oznaczono poziom ufosforylowanej formy białka AKT. Aktywacja szlaku PI3K prowadzi do fosforylacji i aktywacji cząsteczki efektorowej, którą jest AKT [32]. Wyniki wskazują na wzrost jądrowej frakcji ufosforylowanych form AKT (pAKT) na skutek translokacji do jądra komórkowego [14]. Zredukowany poziom HDAC2 oraz wzrost liczby cząsteczek pAKT w odpowiedzi na indukowaną ekspresję miRNA-21 ukazuje znaczącą rolę w procesie regulacji wrażliwości na steroidy w przypadku zapalenia dróg oddechowych [14]. Dlatego u myszy z indukowaną ciężką, steroidooporną, alergiczną chorobą dróg oddechowych (SSIAAD) zwiększoną aktywność kinazy PI3K, obniżone stężenie białek HDAC2 oraz atenuację genu NR3C1 powiązać można z ekspresją miRNA-21 w stopniu przewyższającym stopień fizjologiczny. Białko kodowane przez gen NR3C1 stanowi receptor dla glikokortykosteroidów – różne formy polimorficzne tego receptora czy też jego obniżona ekspresja wpływa na efektywność terapii u pacjentów chorych na astmę oskrzelową leczonych glikokortykosteroidami [33]. Hamowanie miRNA-21 poprzez zastosowanie specyficznego leku Antagomir (Ant-21) pozwoliło na przywrócenie fizjologicznego stężenia białka PTEN oraz HDAC2, lecz nie dochodziło do przywrócenia fizjologicznego stopnia ekspresji genu NR3C1 [14]. Przywrócenie parametrów do prawidłowych wartości nie było zależne od zastosowania deksametazonu (DEX), ponieważ zarówno w grupie, w której stosowano deksametazon, jak i w grupie bez (równolegle stosowanie Ant-21), dochodzi do przywrócenia parametrów fizjologicznych białka PTEN, jak i HDAC2. Dotyczy to zarówno modelu SSIAAD wyindukowanego poprzez infekcję *C. maridarum*, jak i modelu wyindukowanego poprzez zastosowanie *Haemophilus influenzae*. W celu zbadania powiązań pomiędzy infekcją wirusową a stopniem ekspresji miRNA-21 na modele steroidooporne wyprowadzono dwa modele, do których wyindukowania użyto wirusa grypy (A/PR/8/34 H1N1) oraz syncytialnego wirusa nabłonka oddechowego (RSV). W przeciwieństwie do modelu Ova/Cmu, gdzie dochodziło do zmian w całkowitej liczbie leukocytów w drogach oddechowych, oba modele wirusowe nie wykazują znaczących zmian w całkowitej liczbie leukocytów. Cechą charakterystyczną dla obu typów infekcji (bakteryjnej i wirusowej) jest stan zapalny z dominacją eozynofili, częściowo bądź całkowicie niewrażliwy na leczenie steroidami, jak i nadwrażliwość dróg oddechowych, która również przejawia cechy steroidooporności. Wyprowadzenie nowego, eksperymentalnego modelu ciężkiej, steroidoopornej, alergicznego choroby dróg oddechowych pozwoliło na bliższe poznanie procesów, które przyczyniają się do występowania

steroidoopornych przypadków astmy oskrzelowej. Wyniki jednoznacznie wskazują na rolę infekcji bakteryjnych, jak i wirusowych w procesie kształtowania się steroidooporności. Dane przedstawione przez twórców artykułu wskazują, że ciężka, steroidooporna, alergiczna choroba dróg oddechowych indukowana zarówno poprzez infekcję bakteryjną (*C. maridarum*, *H. influenzae*) i wirusową (wirus grypy, syncytialny wirus nabłonka oddechowego) ma wspólną cechę, którą jest oś miR-21/PI3K/pAKT/HDAC2 [14]. Zastosowanie specyficznych względem miR-21 oligonukleotydów prowadzących do obniżenia stężenia oraz niespecyficznego inhibitora LY294002 o wysokim powinowactwie względem kinazy PI3K pozwoliło na zobrazowanie wpływu nadekspresji miRNA-21 indukowanej infekcją na rozwój steroidooporności. Translokacja jądrowa pAKT indukowana aktywacją PI3K prowadzi do obniżenia aktywności deacetylazy histonowej 2, co bezpośrednio przyczynia się do oporności na leczenie steroidami [14].

Wpływ cząsteczek stałych na modulację miRNA oraz mRNA

Na modulację ekspresji miRNA w płynach ustrojowych, komórkach układu odpornościowego, jak i w komórkach dróg oddechowych wpływają również czynniki środowiskowe, takie jak zanieczyszczenia powietrza. Rolę cząsteczek stałych w modulacji stężenia miRNA w komórkach dróg oddechowych przedstawia praca naukowa Christophera F. Ridera i wsp. [4]. Celem pracy było określenie korelacji pomiędzy zmianą ekspresji genów oraz modulacją miRNA a ekspozycją na alergen czy też cząsteczki stałe (PM_{2.5}). Materiał badawczy stanowił płyn pozyskany z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) od pacjentów z cechami atopii, 48 h po ekspozycji na alergen i/lub cząsteczki stałe (300 µg PM_{2.5}/m³) [4]. Po okresie 4 tygodni pacjentom podano kolejną dawkę alergenu do segmentów płuc, które w początkowych etapach doświadczenia nie były narażone na działanie alergenu. Dokonano podziału na następujące grupy: cząsteczki stałe/alergen (DEA), cząsteczki stałe/roztwór soli fizjologicznej (DES), filtrowane powietrze/alergen (FAA) oraz filtrowane powietrze/roztwór soli fizjologicznej (FAS).

We wszystkich trzech porównywanych grupach (DEA, DES, FAA) dochodzi do modulacji 5 różnych cząsteczek miRNA. Do największej modulacji dochodzi w przypadku grupy DES, wzrostu stężenia 11 cząsteczek miRNA, spadek obejmował 15 różnych miRNA [4]. W przypadku grupy FAA doszło do wzrostu 7 miRNA oraz spadku 10 miRNA [4]. W grupie DEA mimo ekspozycji na cząsteczki stałe oraz alergen doszło do modulacji stężenia dla 19 cząsteczek miRNA, wzrost ekspresji dla 12 cząsteczek oraz spadek ekspresji w przypadku 7 cząsteczek miRNA [4]. Niemniej jednak po przeprowadzeniu testu FDR (False Discovery Rate) dla wartości $q \leq 0,2$, tylko 5 cząsteczek miRNA spełniało wymóg postawiony przez oprogramowanie analityczne [4]. Do miRNA z grupy DEA, które spełniały ten wymóg, zaliczyć można: miR-183-5p, miR-324-5p, miR-132-3p, miR-331-3p oraz miR-28-3p [4]. W przypadku grup narażonych na cząsteczki stałe, 6 miRNA posiadało wartości $p \leq 0,05$, lecz żadne z wartości q dla miRNA nie spełniało wymogu $q \leq 0,2$. Obojętny nie pozostaje również wpływ cząsteczek

stałych i/lub alergenów na zmiany ekspresji genów [4]. Zjawisko fałszywie dodatnich wyników obserwowano także w przypadku modulowanych cząsteczek mRNA. Przeprowadzenie testu FDR dla grupy narażonej na działanie alergenu (FAA) pozwoliło na wyodrębnienie cząsteczek mRNA będących produktami transkrypcji następujących genów: NFKB1Z, STAT5A, TSFSF12, AHR, CXCL1, CXCL2, IFNGR1, FKBP5 czy też CDKN1A. Ze względu na rolę, jaką pełni produkt białkowy genu CDKN1A, jego represja przez indukowaną alergenem cząsteczkę miR-132-3p może przyczyniać się do złuszczenia się komórek nabłonka oskrzeli.

Podsumowując, wywnioskować można, że występuje zależność pomiędzy ekspozycją na dany czynnik środowiskowy a modulacją stężenia miRNA oraz ekspresją genów w nabłonku dróg oddechowych 48 godzin po ekspozycji [4]. Nie obserwujemy jednak korelacji pomiędzy narażeniem na cząsteczki stałe i alergen jednocześnie a istotną zmianą w ekspresji miRNA czy też mRNA [4]. Różnica pomiędzy wynikami dla grup DES oraz FAA może wynikać ze sposobu narażenia, a tym samym siły działania danego czynnika. Założeniem inhalacji było osiągnięcie przez cząsteczki stałe docelowych segmentów płuc, w przypadku alergenów narażenie osiągnięto poprzez bezpośrednią aplikację roztworu do obszarów docelowych, co może mieć znaczący wpływ na prezentowane wyniki.

Wpływ krążących miRNA na parametry czynnościowe płuc

Krążące w osoczu miRNA budzą coraz to większe zainteresowanie jako potencjalne biomarkery chorobowe, posłużyć mogą również do kontrolowania, jak i wykrywania wielu zaburzeń, takich jak progresja czy też rozwój nowotworów [30]. Dalsze badania nad rolą krążących miRNA jako potencjalnych biomarkerów przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów z tym związanych, a co za tym idzie efektywniejszego zastosowania wiedzy w praktyce diagnostyczno-klinicznej. Praca badawcza prowadzona przez Alvin T. Kho i wsp. [2] jednoznacznie przedstawia współzależność pomiędzy zmianą parametrów czynnościowych płuc a występowaniem specyficznych cząsteczek miRNA. Materiał badawczy stanowiła surowica pobrana od 160 pacjentów rasy kaukaskiej, objętych Programem Ochrony Dzieci z Astmą Oskrzelową [2]. Za kryteria zmian w funkcjonowaniu płuc obrano parametry, takie jak; FEV1/FVC, FEV1% oraz FVC%. Dodatkowo określono podzbiór miRNA względem powiązania FEV1/FVC i cząsteczek mikroRNA ze specyficznością płciową. Przeprowadzone dotychczas badania na ograniczonym pod względem wielkości materiale pozwoliły na powiązanie z ogólnej puli 30 krążących miRNA. Wyodrębniono 4, które wykazują asocjację z astmą oskrzelową [1, 34]. Źródłem krążących cząsteczek mikroRNA w przypadku chorób o podłożu zapalnym jest przede wszystkim zbiór aktywowanych komórek układu odpornościowego oraz uszkodzone na skutek odpowiedzi immunologicznej tkanki [35]. Detekcji poddano 738 różnych cząsteczek mikroRNA niebędących cząsteczkami metabolizmu podstawowego (*non-housekeeping microRNAs*) [2]. W analizowanych próbkach wykryto 108 (14,6%) cząsteczek miRNA, które występowały u 75% badanych pacjentów pediatrycznych z astmą oskrzelową [2].

Współzależność między krążącym miRNA a FEV1/FVC, FEV1% oraz FVC%.

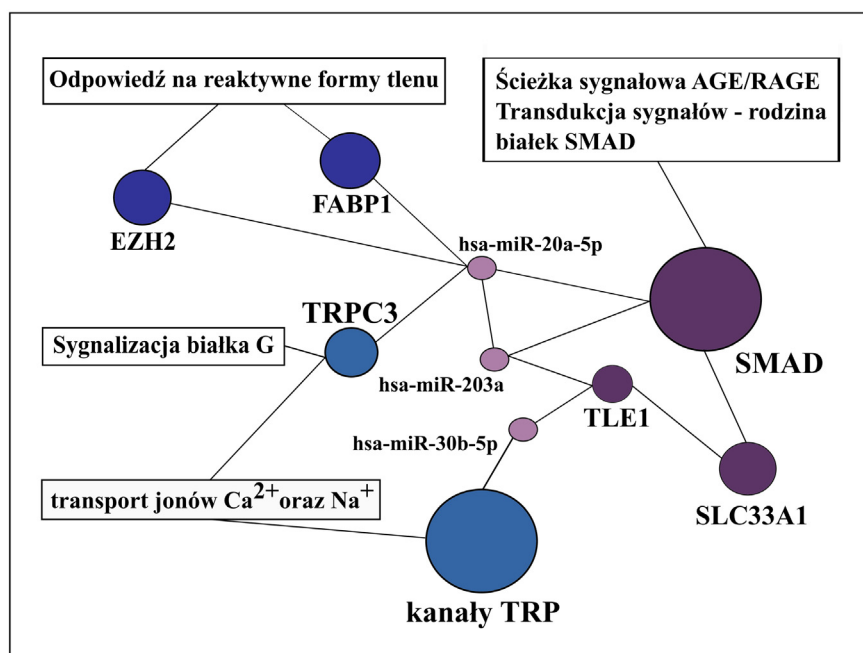
Parametrem, który po wykonaniu testu korelacji liniowej uzyskał największą liczbę powiązanych cząsteczek, był parametr FEV1/FVC. Liczba krążących miRNA powiązanych z parametrem FEV1/FVC wynosiła 22 cząsteczki na 108 badanych (20,4%). Powiązanie z parametrem FEV1% wykazywały 4 krążące miRNA, w przypadku FVC% współzależność wykazało 8 krążących cząsteczek miRNA [2]. Najsilniejsze powiązanie względem parametru FEV1/FVC wykazywała cząsteczka miR-15b-5p, obserwujemy dwukrotną zmianę w ekspresji miRNA, silny wpływ cząsteczki miR-15b-5p wynika prawdopodobnie z silnie negatywnego wpływu tej cząsteczki na parametr FVC [2]. Analogicznie dla parametru FEV1% cząsteczką wykazującą najsilniejszą asocjację była cząsteczka miR-27b-3p, zaś dla parametru FVC% - miR-320a [2]. W przypadku FEV1/FVC, 12 cząsteczek miRNA wykazujących asocjację z tym parametrem znajduje naukowe uzasadnienie w wybranych pracach naukowych, które przedstawiają predyspozycje do występowania astmy oskrzelowej względem wybranych cząsteczek miRNA (Panganiban i wsp. [34], Suojalehto i wsp., [36], Williams i wsp. [37]) [2]. Warto również zaznaczyć, że współzależność pomiędzy funkcjonowaniem płuc a parametrem FEV1/FVC może być determinowana płciowo [2]. Analiza 22 miRNA wykazujących powiązanie z parametrem FEV1/FVC dokonana przez Alvin T. Kho i wsp. prezentuje powiązanie 9 krążących cząsteczek miRNA (40,9%) z płcią męską, w przypadku osobników płci żeńskiej asocjację wykazują tylko 3 cząsteczki miRNA (13,6%) [2].

Krążące miRNA jako potencjalne regulatory szlaków sygnałowych

Krążące cząsteczki miRNA wykazują również wpływ na szlaki sygnałowe, różnicowanie komórek czy też wiązanie się poszczególnych białek [2, 14]. Rycina 3 obrazuje uproszczony schemat powiązań pomiędzy wybranymi cząsteczkami miRNA oraz białkami ścieżek sygnałowych.

EV jako cząsteczki pośredniczące w komunikacji międzykomórkowej

Obojętna nie pozostaje również komunikacja pomiędzy komórkami, która wykorzystuje fakt wydzielania przez komórki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) [3]. Do komunikacji pomiędzy komórkami może dochodzić na obszarze całego układu oddechowego, wliczając w to zarówno komórki tworzące górne drogi oddechowe, jak i komórki drobnych dróg oddechowych [3]. miRNA zawarte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych regulują ekspresję genów w komórkach docelowych. Do wymiany informacji pomiędzy komórkami dochodzi zarówno w stanach fizjologicznych, jak i w przypadku stanów patologicznych, jakimi są infekcje dróg oddechowych, w tym infekcje powodowane rinowirusem [3]. Założeniem pracy badawczej prowadzonej przez Marię J. Gutierrez i wsp. było określenie podstawowego profilu (puli) cząsteczek mikroRNA wydzielanych w EV, w nabłonku dróg oddechowych oraz określenie jak



Ryc. 3 – Schemat oddziaływań wybranych cząsteczek miRNA z białkami szlaków sygnałowych
 Fig. 3 – Scheme of chosen miRNA particles interactions with pathway-signaling proteins

infekcja rinowirusem (RV) wpływa na zmianę profilu wydzielanych cząsteczek miRNA [3]. Materiałem badawczym była wydzielina z górnych dróg oddechowych pozyskana od dzieci w wieku ≤ 3 lat z potwierdzoną infekcją rinowirusową ($n = 10$). Grupę kontrolną stanowiły dzieci zgodne z grupą badawczą pod względem wieku, nie będące w trakcie infekcji rinowirusowej ($n = 10$) [3]. Wyniki otrzymane z wydzieliny górnych dróg oddechowych poddano walidacji za pomocą badania *in vitro* na ludzkim modelu nabłonka dróg oddechowych, poprzez pozyskanie wydzieliny z wierzchniej strony pierwotnych komórek nabłonka oskrzeli (HBEC) [3]. Badania *in vitro* na ludzkiej linii komórkowej (HBEC) pozwoliło na pozyskanie reprezentatywnej, czystej od zanieczyszczeń środowiskowych próbki, określającej jednolity profil mikroRNA [3]. Celem walidacji było wykluczenie kontaminacji próbki cząsteczkami środowiskowymi, których obecność mogła wynikać z nieuniknionych, naturalnych procesów fizjologicznych (wymiana gazowa) bądź wynikać z wprowadzenia cząsteczek środowiskowych podczas pobierania próbek [3]. Wyniki uzyskane z analizy miRNA dla grupy kontrolnej pozwoliły na identyfikację 7 potencjalnie istotnych mikroRNA wchodzących w skład podstawowej puli miRNA wydzielanych w drogach oddechowych [3]. Kryterium uznania danej cząsteczki miRNA za istotną statystycznie była wartość odchylenia standardowego (SD) większa od 3 ($>SD$). Do cząsteczek spełniających ten warunek zaliczamy: hsa-miR-630, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-320e, hsa-miR-612, hsa-miR-378e, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-188-5p [3].

Korelacja w puli miRNA pomiędzy badanym materiałem a linią HBEC

Porównanie wyników *in vivo* z wynikami otrzymanymi z linii komórkowej HBEC (*in vitro*) wskazuje na jednoznaczne

podobieństwo w przypadku czterech cząsteczek miRNA (hsa-miR-630, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-320e, hsa-miR-612), co pozwala uznać je za cząsteczki bazowe [3]. Co ciekawe, w przypadku linii komórkowej kryterium włączenia danej cząsteczki miRNA jako istotnej spełniają również cząsteczki: hsa-miRNA-21-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-192-5p oraz hsa-miR-4454, czego nie obserwujemy w przypadku próbek *in vivo* [3]. Wartości stężenia miRNA uzyskane dla poszczególnych pacjentów w przypadku badań *in vivo* różnią się od siebie, wynika to przede wszystkim z dynamiczności zakresu miRNA w zależności od stanu fizjologicznego organizmu, a nawet płci [2, 3].

Modelowanie analityczne dla wybranych cząsteczek miRNA

Analiza bioinformatyczna w kierunku ustalenia powiązań pomiędzy miRNA a potencjalnym oddziaływaniem na komórkę wykazała wpływ głównie na ekspresję genów, śmierć lub przeżycie komórki oraz wpływ na funkcjonowanie, jak i utrzymanie komórki [3]. Analityczne modelowanie wybranych miRNA w programie IPA zidentyfikowało kilka cząsteczek docelowych, które uczestniczą m.in. w remodelingu nabłonka dróg oddechowych oraz różnicowaniu komórek mezenchymalnych poprzez regulację cząsteczki efektorowej szlaku PI3K, którą jest kinaza białkowa B (AKT) [3]. Dodatkowo do cząsteczek wytypowanych przez program IPA zaliczyć można transformujący czynnik wzrostu β (TGF β) oraz grupę kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) [3]. Wnioskujemy zatem, że wybrane cząsteczki miRNA w analizowanej puli wpływają na podstawowe procesy zachodzące w komórkach nabłonkowych, co za tym idzie, odpowiadają również za równowagę parametrów wewnętrznych komórki [3].

Wpływ infekcji rinowirusowej na profil wydzielanych miRNA w drogach oddechowych

Wbrew założeniom, infekcja rinowirusem nie wpływa diametralnie na zmianę stężenia wydzielanych miRNA w drogach oddechowych [3]. Różnica pomiędzy wynikami u pacjentów z infekcją rinowirusem a wynikami dla zdrowych pacjentów dotyczy przede wszystkim znaczącego wzrostu stężenia dwóch cząsteczek; hsa-miR-155-5p oraz hsa-miR-21-5p. Obecność cząsteczki hsa-miR-21-5p obserwujemy zarówno w przypadku pacjentów z infekcją RV, jak i w przypadku linii komórkowej HBEC [3]. Należy również zaznaczyć, że w przypadku osób zdrowych nie dochodzi do ekspresji cząsteczki hsa-miR-21-5p. Na uwagę zasługuje cząsteczka hsa-miR-155-5p ze względu na jej odmienność co do występowania [38]. Potencjalnie 81 genów wykazuje asocjację z cząsteczką miRNA-155-5p w trakcie infekcji rinowirusowej [3]. Obserwujemy wzrost ekspresji genów DPP7 oraz NAMPT, spadek ekspresji obejmuje geny IL-8 oraz TNFAIP2 [3]. Zmiany w ekspresji docelowych genów dla cząsteczki hsa-miR-155 zależne są również od czasu post-eksperymentalnej infekcji rinowirusem [3]. Spadek ekspresji po 8 h od eksperymentalnej infekcji rinowirusem obserwujemy w przypadku genów ANKFY1, MATR3, SOCS1 czy też MECP2 [3]. Wzrost ekspresji genów docelowych dla cząsteczki miR-155-5p obejmuje: SOC1, CCL2, ICAM1 czy też MYD88, ekspresji jest obserwowany po 48 h od ekspozycji.

Podsumowanie

Cząsteczki mikroRNA odgrywają kluczową rolę w procesie patogenezы i uczestniczą w zaostrzeniu astmy oskrzelowej, czego dowodem są wyniki przedstawiane w artykułach stanowiących podstawę teży pracy przeglądowej. Modyfikacja ekspresji genów w nabłonku dróg oddechowych indukowana obecnością specyficznych cząsteczek miRNA odgrywa kluczową rolę w procesie powstawania stanów zapalnych, remodelingu czy też utrzymaniu homeostazy. Narastająca wśród pacjentów niewrażliwość na leczenie steroidami budzi zainteresowanie i stwarza wiele problemów ze względu na fakt, że glikokortykosteroidy stanowią podstawę leczenia pacjentów z astmą oskrzelową [13]. Dotychczas błędnie powiązywano niewrażliwość na leczenie steroidami z upośledzonym funkcjonowaniem receptorów dla glikokortykosteroidów. Okazuje się jednak, że mechanizm nabywania niewrażliwości powiązany jest z indukowaną przez zakażenia ekspresją cząsteczek miR-21, które prowadzą do wzrostu aktywności szlaku sygnałowego PI3K/AKT, przyczyniając się tym samym do spadku ekspresji HDAC2 [14]. Dalsze prace w kierunku określenia bardziej szczegółowej roli miR-21 pozwolą na lepsze poznanie procesów prowadzących do występowania przypadków steroidooporności wśród pacjentów chorujących na astmę oskrzelową. Wnioskujemy zatem, że cząsteczka miRNA-21, której ekspresja indukowana jest zakażeniami zarówno bakteryjnymi, jak i wirusowymi, stanowi potencjalny cel terapeutyczny dla niestandardowych terapii ukierunkowanych na steroidooporne przypadki astmy oskrzelowej. Jak już wcześniej wspomniano, infekcje wirusowe przyczyniają się do występowania astmy oskrzelowej w wieku dziecięcym, wpływają również na zaostrzenie objawów astmy oskrzelowej [3].

W przypadku infekcji rinowirusowych uwagę skupia cząsteczka miR-155 ze względu na występowanie tylko w przypadkach infekcji górnych dróg oddechowych. miR-155-5p wykazuje współzależność z regulacją ekspresji docelowych genów, lecz powiązanie to wymaga bliższego poznania. Identyfikacja krążących cząsteczek miRNA w ludzkim organizmie, które wykazują jednoznaczную asocjację ze zmianą parametrów określających funkcjonalność układu oddechowego, pozwoli na lepsze kontrolowanie ww. parametrów u pacjentów z astmą oskrzelową, włącznie z efektywniejszym i wcześniejszym wykrywaniem postępujących zmian w funkcjonalności układu oddechowego. Przypuszczając, że wraz z coraz lepszym poznaniem tych współzależności cząsteczki mikroRNA zdobędą miano biomarkerów.

Prócz wyżej wymienionych czynników biologicznych wpływ na modulację ekspresji cząsteczek miRNA mają również czynniki środowiskowe, takie jak cząsteczki stałe, których źródłem są np. silniki Diesla [4]. Obecność cząsteczek stałych w środowisku przyczynia się do wzrostu ekspresji cząsteczek miRNA, takich jak: miR-21, miR-30e czy też miR-144 [4]. Współzależność pomiędzy ekspresją wybranych miRNA a ekspozycją na cząsteczki stałe prowadzi do występowania stresu oksydacyjnego w nabłonku dróg oddechowych, wydzielania cytokin oraz rekrutacji komórek układu immunologicznego zaangażowanych w proces powstawania stanu zapalnego [4].

Podsumowując powyższe przykłady, bez wahania stwierdzić można, że cząsteczki miRNA odgrywają krytyczną rolę w astmie oskrzelowej. Każda z wyżej wymienionych cząsteczek miRNA ze względu na swoje właściwości czy też procesy, które indukuje w różny sposób, wpływa na poszczególne aspekty związane z astmą oskrzelową. Dokładniejsze poznanie każdej z wyżej wymienionych cząsteczek miRNA pozwoli na skuteczniejsze zapobieganie występowaniu astmy oskrzelowej, jak i jej kontrolę. Co więcej wpłynie to na wzrost skuteczności leczenia, a co za tym idzie poprawę komfortu życia pacjentów dotkniętych tą chorobą.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje

Finansowanie/Financial support

Nie występuje

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

P I Ś M I E N N I C T W O / R E F E R E N C E S

- [1] Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in

- patients with allergic rhinitis and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;137(5):1423-1432.
- [2] Kho AT, Sharma S, Davis JS, Spina J, Howard D, McEnroy K, et al. Circulating MicroRNAs: Association with Lung Function in Asthma. *PLoS one* 2016;11(6):e0157998.
 - [3] Gutierrez MJ, Gomez JL, Perez GF, Pancham K, Val S, Pillai DK, et al. Airway Secretory microRNAome Changes during Rhinovirus Infection in Early Childhood. *PLOS ONE* 2016;11(9):e0162244.
 - [4] Rider CF, Yamamoto M, Gunther OP, Hirota JA, Singh A, Tebbutt SJ, et al. Controlled diesel exhaust and allergen coexposure modulates microRNA and gene expression in humans: Effects on inflammatory lung markers. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;138(6):1690-1700.
 - [5] Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(17):9779-9784.
 - [6] Pattarayan D, Thimmulappa RK, Ravikumar V, Rajasekaran S. Diagnostic Potential of Extracellular MicroRNA in Respiratory Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2016.
 - [7] Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005;132(21):4645-4652.
 - [8] Elkayam E, Kuhn CD, Tocilj A, Haase AD, Greene EM, Hannon GJ, et al. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 2012;150(1):100-110.
 - [9] Zhang C. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiological Genomics* 2008;33(2):139-147.
 - [10] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120(1):15-20.
 - [11] Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, 2017. www.ginasthma.org Zawartość według stanu na dzień 31.03.2017.
 - [12] Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global Initiative for Asthma P. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59(5):469-478.
 - [13] Glossop P, Whitlock G, Gibson K. Small-molecule anti-inflammatory drug compositions for the treatment of asthma: a patent review (2013-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2015;25(7):743-754.
 - [14] Kim RY, Horvat JC, Pinkerton JW, Starkey MR, Essilfie AT, Mayall JR, et al. MicroRNA-21 drives severe, steroid-insensitive experimental asthma by amplifying phosphoinositide 3-kinase-mediated suppression of histone deacetylase 2. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017;139(2):519-532.
 - [15] Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 2008;8(3):218-230.
 - [16] Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, et al. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *The Journal of Experimental Medicine* 2006;203(1):7-13.
 - [17] Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2008;178(7):667-672.
 - [18] Adam E, Hansen KK, Astudillo Fernandez O, Coulon L, Bex F, Duhant X, et al. The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2- independent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281(11):6910-6923.
 - [19] Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Reviews Immunology* 2008;8(3):193-204.
 - [20] Hirota JA, Knight DA. Human airway epithelial cell innate immunity: relevance to asthma. *Current Opinion in Immunology* 2012;24(6):740-746.
 - [21] Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *The New England Journal of Medicine* 1998;339(17):1194-1200.
 - [22] Dong X, Xu M, Ren Z, Gu J, Lu M, Lu Q, et al. Regulation of CBL and ESR1 expression by microRNA-223p, 513a-5p and 625-5p may impact the pathogenesis of dust mite-induced pediatric asthma. *International Journal of Molecular Medicine* 2016;38(2):446-456.
 - [23] Liu F, Qin HB, Xu B, Zhou H, Zhao DY. Profiling of miRNAs in pediatric asthma: upregulation of miRNA-221 and miRNA-485-3p. *Molecular Medicine Reports* 2012;6(5):1178-1182.
 - [24] Szymczak I, Wiczfinska J, Pawliczak R. Molecular Background of miRNA Role in Asthma and COPD: An Updated Insight. *BioMed Research International* 2016;2016:7802521.
 - [25] Marks GB. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 2006;33(3):285-289.
 - [26] Ebrahimi A, Sadroddiny E. MicroRNAs in lung diseases: Recent findings and their pathophysiological implications. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2015;34:55-63.
 - [27] Venkayya R, Lam M, Willkom M, Grunig G, Corry DB, Erle DJ. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002;26(2):202-208.
 - [28] Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* 2015;75(1):14-24.
 - [29] Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *Journal of Immunology* 2009;182(8):4994-5002.
 - [30] He Y, Lin J, Kong D, Huang M, Xu C, Kim TK, et al. Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers. *Clinical Chemistry* 2015;61(9):1138-1155.
 - [31] Wang W, Li JJ, Foster PS, Hansbro PM, Yang M. Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. *Current Drug Targets* 2010;11(8):957-970.
 - [32] Faes S, Dormond O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16(9):21138-21152.
 - [33] Panek M, Pietras T, Fabijan A, Ziolo J, Wieteska L, Malachowska B, et al. The NR3C1 Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphisms May Modulate the TGF-beta mRNA Expression in Asthma Patients. *Inflammation* 2015;38(4):1479-1492.
 - [34] Panganiban RP, Pinkerton MH, Maru SY, Jefferson SJ, Roff AN, Ishmael FT. Differential microRNA expression in asthma and the role of miR-1248 in regulation of IL-5. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* 2012;1(2):154-165.
 - [35] Mi S, Zhang J, Zhang W, Huang RS. Circulating microRNAs as biomarkers for inflammatory diseases. *MicroRNA* 2013;2(1):63-71.
 - [36] Suojalehto H, Lindstrom I, Majuri ML, Mitts C, Karjalainen J, Wolff H, et al. Altered microRNA expression of nasal mucosa in long-term asthma and allergic rhinitis. *International Archives of Allergy and Immunology* 2014;163(3):168-178.

- [37] Williams AE, Larner-Svensson H, Perry MM, Campbell GA, Herrick SE, Adcock IM, et al. MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy. *PLOS ONE* 2009;4(6): e5889.
- [38] Proud D, Turner RB, Winther B, Wiehler S, Tiesman JP, Reichling TD, et al. Gene expression profiles during in vivo human rhinovirus infection: insights into the host response. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2008;178(9):962-968.