

**PRACA POGLĄDOWA**

## **miRNA – rola i znaczenie w alergii pokarmowej**

### miRNA – role and importance in food allergy

Aleksandra Gawlak, Rafał Pawliczak

Katedra Alergologii, Immunologii i Dermatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

#### **STRESZCZENIE**

Alergia pokarmowa jest patologiczną odpowiedzią organizmu mediowaną za pośrednictwem alergenów znajdujących się w spożywanym produktach. Problem ten dotyka częściej dzieci niż osoby dorosłe. Alergię pokarmową klasyfikuje się jako IgE-zależną, w którą zaangażowane są przeciwciała IgE, a także IgE-niezależną, której patomechanizm nie jest do końca poznany. Cząsteczki miRNA o długości 19–25 nukleotydów są zaangażowane w wiele procesów, między innymi biorą udział w odpowiedzi immunologicznej. W tej pracy zwrócono uwagę na zmianę ekspresji miRNA-98 oraz na klaster miRNA-17-92 w przebiegu alergii pokarmowej. Wzrost ekspresji tych cząsteczek wiąże się ze zmniejszoną ekspresją cytokiny przeciwzapalnej IL-10, a także ze zmniejszoną ekspresją trombospondyny 1, która również jest zaangażowana w proces odpowiedzi immunologicznej. Galektyna 1 jest obiecującym celem dalszych badań dotyczących leczenia alergii pokarmowej. Cząsteczki miRNA mogą mieć ochronny wpływ na występowanie alergii dzięki zastosowaniu odpowiednich metod przetwórstwa mleka krowiego.

#### **SŁOWA KLUCZOWE:**

microRNA, alergia pokarmowa, galektyna 1.

#### **ABSTRACT**

Food allergy is the pathological response of the body mediated by the allergens present in the food products. This problem more often affects children than adults. Food allergy is classified as IgE dependent, in which IgE antibodies are involved, as well as IgE independent, which pathomechanism is not fully understood. 19–25 nucleotide miRNAs are involved in many processes, including, but not limited to, the immune response. In this paper I focused on the altered expression of miRNA-98, and on the miRNA-17-92 cluster in food allergy. The increase in expression of these molecules is associated with decreased expression of anti-inflammatory cytokine IL-10, as well as reduced expression of thrombospondin-1, which is also involved in the immune response. Galectin-1 offers the promising future goal of further research as its use in the treatment of food allergy in patients. miRNA molecules can also be assigned a protective effect on the occurrence of allergies through appropriate processing of cow's milk.

#### **KEY WORDS:**

microRNA, food allergy, galectin-1.

**ADRES DO KORESPONDENCJI:**

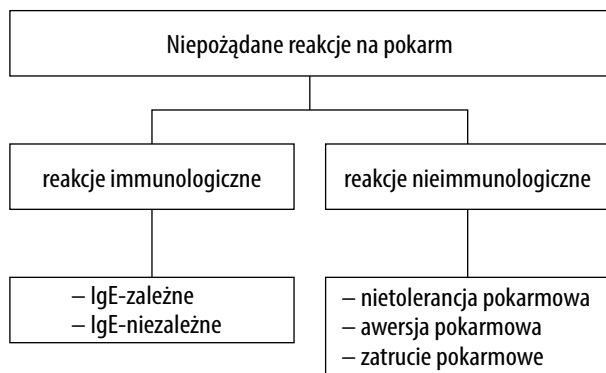
prof. dr hab. n. med. Rafał Pawliczak, Katedra Alergologii, Immunologii i Dermatologii,  
 Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, pok. 122, 90-752 Łódź, Polska,  
 e-mail: rafal.pawliczak@umed.lodz.pl

**WPROWADZENIE**

Alergia pokarmowa jest niepożądaną reakcją organizmu mediowaną przez spożywane produkty [1]. Alergeny pokarmowe to przede wszystkim cząsteczki białkowe, na które najbardziej narażony jest przewód pokarmowy [2]. Ekspozycja nawet na bardzo małą ilość alergenu może wywołać objawy dotyczące każdego odcinka przewodu pokarmowego, takie jak nudności, biegunka, ból brzucha, wymioty, dysfagia czy hematochezja [3]. Objawy te mogą stanowić jedyną manifestację alergii pokarmowej, ale także towarzyszyć reakcji anafilaktycznej, wyprzedzając wstrząs. Częstość występowania alergii pokarmowej różni się w poszczególnych populacjach świata i w pewnym stopniu zależy od nawyków żywieniowych, a także wieku. Najbardziej powszechnymi produktami wywołującymi alergię w wieku dziecięcym są: mleko krowie, jaja, soja, pszenica, orzeszki ziemne, orzechy oraz gluten [4]. U dzieci częstość występowania wynosi 5–10% w krajach zachodnich i 7% w Chinach [5], natomiast u osób dorosłych 4% w krajach rozwijających się [1]. Głównymi produktami, po których obserwuje się reakcje alergiczne u dorosłych, są owoce morza, ryby i surowe pokarmy roślinne [4]. W ciągu ostatnich dwóch dekad częstość występowania alergii pokarmowej na orzechy ziemne u dzieci znacznie wzrosła – z 1% do 4% w krajach zachodnich, między innymi w USA, Wielkiej Brytanii i Kanadzie, prawdopodobnie ze względu na popularność masła orzechowego [1]. Postępowanie diagnostyczne w przypadku podejrzenia alergii pokarmowej obejmuje przeprowadzenie wywiadu z pacjentem, badanie przedmiotowe, wykonanie testów skórnych, a także badań labo-

ratoryjnych [2]. Złotym standardem w potwierdzeniu lub wykluczeniu alergii pokarmowej jest podwójnie ślepa próba kontrolowana placebo, która ze względów bezpieczeństwa powinna być przeprowadzana pod ścisłym nadzorem lekarza [4]. Pacjenci z podejrzeniem alergii pokarmowej prowadzą dziennik, w którym zapisują skrupulatnie, jaką żywność spożywali. Stosowane są też diety eliminacyjne, które polegają na całkowitym zaprzestaniu spożywania pokarmów potencjalnie odpowiedzialnych za wystąpienie reakcji alergicznej [1] (ryc. 1).

Niepożądane reakcje na pokarm to określenie stosowane do opisywania różnych reakcji na spożywane produkty. Należą do nich reakcje immunologiczne, czyli IgE-zależne oraz IgE-niezależne, a także reakcje nieimmunologiczne, do których zalicza się nietolerancję pokarmową związaną na przykład z niedoborem enzymu laktazy u osób z nietolerancją laktozy, a także awersję pokarmową i zatrucie pokarmowe [6]. Nietolerancja pokarmowa jest zwykle reakcją powtarzalną, która pojawia się po spożyciu określonego pokarmu bądź jego składnika, niezależnie od tego, czy dana osoba jest świadoma jego spożycia [4]. Awersja pokarmowa to niechęć do spożywania pewnych produktów, a w konsekwencji ich unikanie. Mogą jej towarzyszyć takie objawy, jak wymioty i nudności, więc często jest mylona z alergią pokarmową [7]. Zatrucie pokarmowe najczęściej jest wywoływane przez bakterie, wirusy, pleśń, toksyny i inne substancje drażniące, które są obecne w spożywanych pokarmach [7]. W prawidłowych warunkach układ immunologiczny wykrywa i eliminuje obce antygeny, natomiast gdy dochodzi do nadmiernego i niewłaściwego reagowania na patogeny, alergeny pokarmowe i toksyny, prowadzi to do chorób alergicznych lub autoimmunologicznych.



**RYCINA 1.** Klasyfikacja niepożądanych reakcji na pokarm. Opracowanie własne na podstawie [4]

**REAKCJA ALERGICZNA ZALEŻNA OD PRZECIWCIAŁ IGE**

Alergia pokarmowa zależna od przeciwciał IgE dotyczy głównie osób dorosłych w wieku 20–50 lat [1]. Ten rodzaj alergii pokarmowej jest bardzo niebezpieczny, ponieważ niesie ryzyko wystąpienia uogólnionej reakcji anafilaktycznej zagrażającej wystąpieniem wstrząsu. Cechą reakcji zależnych od IgE jest krótki czas od zadziałania czynnika sprawczego – od kilku minut do 2 godzin [1]. Wśród tego typu reakcji wyróżnia się także zespół alergii jamy ustnej (*oral allergy syndrome* – OAS), który

charakteryzuje się świądem, obrzękiem lub pieczeniem w jamie ustnej [10]. Zespół dotyczy osób, u których występują także cechy alergii wziewnej. Może do niego dochodzić w wyniku reakcji krzyżowej alergenu wziewnego z pokarmowym [2]. Patomechanizm reakcji polega na wytworzeniu swoistych przeciwciał IgE skierowanych przeciwko alergenom pokarmowym i powstaniu komórek pamięci immunologicznej. Po ponownym kontakcie z alergenem następuje aktywacja reakcji, które prowadzą do degranulacji komórek efektorowych, takich jak mastocyty i bazofile [2]. Alergenowość cząsteczek zależy od liczby epitopów zdolnych do przyłączenia swoistych przeciwciał [8]. Epitop alergenu pokarmowego przyłącza się do cząsteczek IgE za pośrednictwem receptorów FcεRI znajdujących się na powierzchni tych komórek efektorowych [2]. Dalej następuje uwalnianie histaminy, która jest mediatorem zapalnym, oraz zostają uwolnione między innymi prozapalne leukotrieny, czynnik aktywujący płytki krwi (*platelet-activating factor* – PAF) i cytokiny prozapalne, takie jak interleukina 4 (IL-4), IL-5 oraz IL-13 [9].

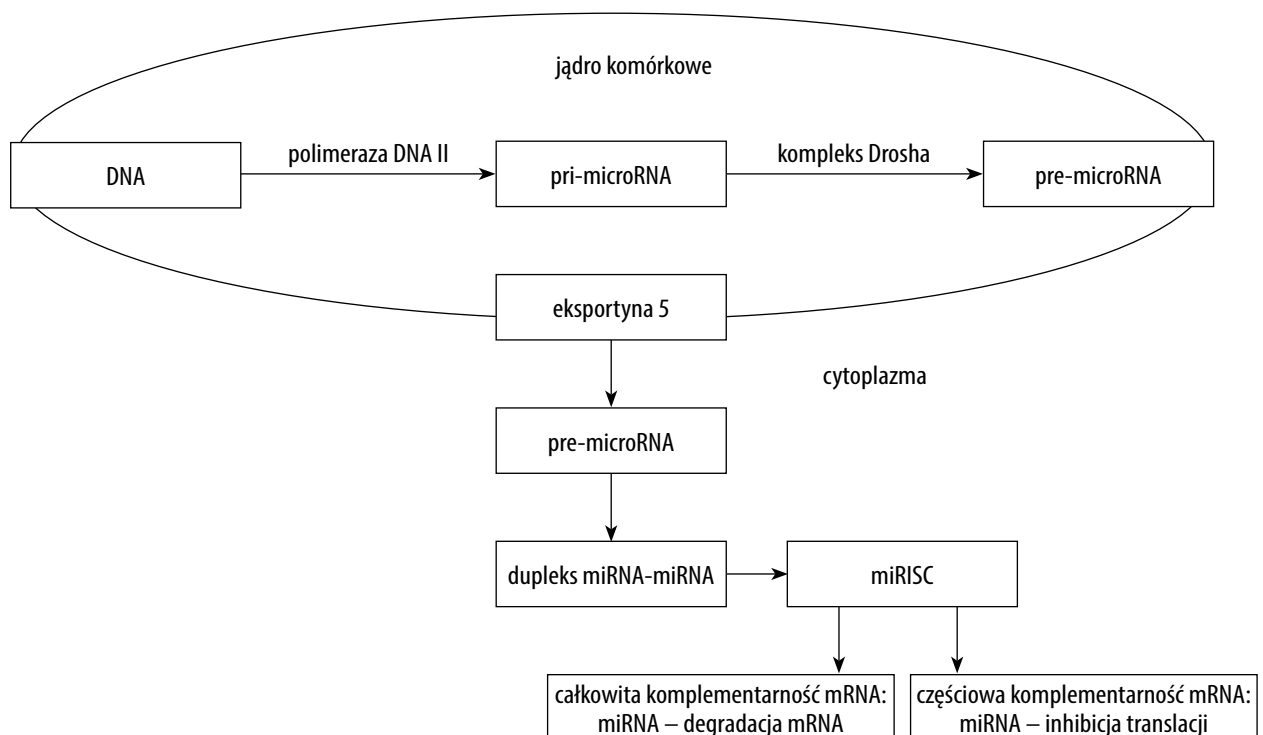
### REAKCJA ALERGICZNA NIEZALEŻNA OD PRZECIWCIAŁ IGE

Wśród tych reakcji wyróżnia się zapalenie okrężnicy, zapalenie jelita grubego oraz enteropatie wywołane białkiem znajdującym się w pożywieniu [2]. Ten rodzaj alergii dotyczy głównie noworodków i dzieci i zazwyczaj ustępuje

po 1–5 lat [2]. Mechanizm alergii pokarmowej niezależnej od przeciwciał IgE nie jest do końca poznany. Są publikacje, w których zakłada się, że w mechanizm tej reakcji są zaangażowane głównie limfocyty Th2, wydzielające cytokiny prozapalne, które są pobudzane po kontakcie z alergenem pokarmowym [3]. Dochodzi także do zwiększonej ekspresji czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oraz zmniejszonej ekspresji receptorów TNF- $\beta$  w błonie śluzowej jelit [3]. Zauważono wzrost ekspresji cytokiny prozapalnej IL-13 [4]. Prawdopodobnie cząsteczki te są zaangażowane w niszczenie jelitowych komórek nabłonka i powstawanie nacieku eozynofilów. Brak swoistych przeciwciał w surowicy w przebiegu alergii pokarmowej IgE niezależnej powoduje, że trudno jest ją zidentyfikować.

### MICRORNA

microRNA (miRNA) to grupa jednoniciowych cząsteczek o długości 19–25 nukleotydów, które pośredniczą w regulacji posttranskrypcyjnej wielu genów [10, 11]. Cząsteczkom tym przypisuje się udział w regulacji wielu procesów, m.in. różnicowania, proliferacji, angiogenezy, onkogenezy, a także w odpowiedzi immunologicznej [12]. Pojedyncze cząsteczki miRNA mogą kontrolować ekspresję wielu różnych genów [13]. miRNA może spełniać funkcję regulacyjną także poprzez wprowadzanie zmian epigenetycznych w docelowych genach, takich jak metylacja DNA, acetylacja histonów, a także przebudowa



**RYCINA 2.** Biogeneza microRNA. Opracowanie własne na podstawie [16]

chromatyny zależna od ATP [11]. Większość miRNA znajduje się wewnątrz komórek, a także jest obecne w surowicy, moczu i ślinie [14]. Zewnątrzkomórkowe miRNA są chronione przed RNAzami poprzez tworzenie eksosomów bądź kompleksów białkowo-lipidowych [15]. W surowicy miRNA tworzy kompleks z białkami Agronaute 2 (AGO2), co też zabezpiecza je przed degradacją [11]. W licznych publikacjach wykazano zwiększoną bądź zmniejszoną ekspresję miRNA w przebiegu wielu chorób, takich jak nowotwory, choroby układu oddechowego i choroby alergiczne. Szacuje się, że miRNA mają pod kontrolą ok. 60% genów kodujących białka u ludzi, co stanowi obiecujący cel terapeutyczny i interesujący przedmiot dalszych badań [7] (ryc. 2).

Na powstanie dojrzałego miRNA składa się kilka procesów. W pierwszym etapie w wyniku transkrypcji powstaje pierwotny transkrypt pri-miRNA (*primary miRNA*) przy udziale enzymu polimerazy RNA II [16, 17]. Następnie pri-miRNA są przekształcane w prekursor miRNA (*pre-miRNA*) o długości ok. 60 nukleotydów, które kształtem przypominają szpilkę do włosów [15]. Drugi etap powstawania miRNA jest przeprowadzany przy udziale kompleksu Drosha-DGCR8. W kompleksie tym DGCR8 odgrywa swoją rolę poprzez przyłączenie się do jednoniciowych końców pri-miRNA i aktywowanie domeny rybonukleazy, co powoduje powstawanie transkryptów pre-miRNA [12]. Powyższe etapy odbywają się w jądrze komórkowym, natomiast etap powstawania dojrzałych dwuniciowych miRNA przy udziale kompleksu Dicer zachodzi w cytoplazmie [17]. Transkrypty do cytoplazmy są przenoszone przy udziale białka eksportyny 5 (*Exp-5*) [17]. Powstają kompleksy miRNA-miRNA [12]. Jedną z nici jest nazywana wiodącą, natomiast druga pasażerską [12]. Aktywna postać miRNA powstaje po połączeniu się z kompleksem białkowym, tworząc kompleks miRISC (*microRNA induced silencing complex*) [15]. W wielu publikacjach stwierdzono, że miR hamuje ekspresję genów poprzez przyłączenie się do 3' końca regionu nieulegającego translacji w docelowym mRNA (3'-UTR) na zasadzie komplementarności zasad [11]. Gdy komplementarność zasad jest całkowita, wyciszenie ekspresji genu odbywa się poprzez degradację docelowego mRNA, natomiast gdy jest niecałkowita, wyciszenie odbywa się poprzez hamowanie translacji [11].

## ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE MIRNA JAKO BIOMARKER CHOROÓB ALERGICZNYCH

Dotychczasowe badania sugerują, że miRNA może odgrywać kluczową rolę w patogenezie chorób alergicznych. Ekspresja poszczególnych typów miRNA różni się zarówno pomiędzy typami komórek, jak i w prze-

biegu poszczególnych chorób alergicznych. miRNA są wykrywalne w surowicy, ślinie i moczu. Klaster miRNA-17-92 zawiera 6 typów miRNA: miRNA-17, miRNA-18a, miRNA-19a, miRNA-20a, miRNA-19b-1, miRNA-92a [18]. W badaniu na myszach z alergią pokarmową wykazano znacznie wyższy poziom miRNA-19a niż u myszy kontrolnych, natomiast poziomy pozostałych pięciu typów miRNA klastra miRNA-17-92 się nie różniły [18]. W innym badaniu na myszach z zespołem alergii ustno-jelitowej (*oral-intestinal allergy syndrome* – OIAS) stwierdzono, że ekspresja miRNA-98 była znacznie wyższa niż u myszy kontrolnych [19]. miRNA może więc być potencjalnym biomarkerem chorób alergicznych ze względu na specyficzną dysregulację ekspresji w stosunku do danej choroby, jak również dużą stabilność poprzez tworzenie m.in. form eksosomów.

## MIRNA W ALERGII POKARMOWEJ

Na podstawie doświadczenia na myszach C57BL/6 wykazano, że klaster miRNA-17-92 oraz miRNA-98 odgrywają znaczącą rolę w patogenezie alergii pokarmowej [18]. W badaniu tym oceniano rolę miRNA-19a w hamowaniu ekspresji IL-10 przez limfocyty B pod wpływem działania IL-4, która jest cytokiną prozapalną. Interleukina 10 jest cytokiną przeciwzapalną produkowaną w organizmie człowieka głównie przez pobudzone limfocyty T, przede wszystkim Th2 oraz Treg, także przez limfocyty B, monocyty i komórki tuczne. Główną rolą IL-10 jest hamowanie odpowiedzi immunologicznej. Cytokina ta uczestniczy także w regulacji stanu zapalnego poprzez hamowanie ekspresji limfocytów Th1 produkujących IL-2, interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), hamuje uwalnianie cytokin prozapalnych przez makrofagi, takie jak IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ . W przebiegu wielu chorób alergicznych stwierdzono niedobór IL-10. W doświadczeniu u myszy wystąpiła alergja pokarmowa po dożołądkowym podaniu roztworu zawierającego albuminy jaja kurzego w dawce 1 mg, a także toksyny cholery w dawce 20  $\mu$ g w 0,3 ml soli fizjologicznej przez 4 tygodnie. W celu pomiaru stężenia IL-4 i przeciwciał IgE w surowicy pobrano próbki krwi od uśmierconych myszy. Wyizolowano surowicę przez odwirowanie i analizowano za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA. W wyciętych fragmentach jelita czczego analizowano naciek eozynofilów i obecność komórek tucznych w błonie śluzowej, a także poddano je ocenie pod kątem obecności specyficznych alergenowo limfocytów T CD4+. W tym celu komórki LPMC (*the lamina propria mononuclear cells*) oraz komórki dendrytyczne zostały wyizolowane poprzez magnetyczne sortowanie komórek MACS (*magnetic cell sorting*), a następnie analizowano je przy użyciu cytometrii przepływowej. Izolowano również limfocyty B

CD19+ przy użyciu MACS, które później zostały poddane analizie z wykorzystaniem RT-qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*) w celu wyizolowania całkowitego RNA, w tym miRNA. W doświadczeniu tym wykonano również test immunoprecypitacji chromatyny ChIP (*chromatin immunoprecipitation assay*). Limfocyty B inkubowano przez 15 minut z formaldehydem w celu uwolnienia DNA z chromatyny. Lizat komórkowy został oczyszczony z G-agarozy za pomocą inkubacji ze specyficznymi przeciwciałami lub izotopem przeciwciał IgG jako próba kontrolna. Oczyszczone DNA poddano analizie za pomocą qPCR. W eksperymencie tym zastosowanie western blottingu miało na celu ukazanie na sfotografowanych wynikach poziomu IL-10 po stymulacji solą fizjologiczną, lipopolisacharydem, IL-4 w limfocytach B. Wykazano, że u myszy z alergią pokarmową poziom miRNA-19a był istotnie wyższy niż u myszy kontrolnych, natomiast poziom IL-10 istotnie niższy. Stwierdzono także, że obecność IL-4 w hodowli komórkowej znacząco zwiększa ekspresję miRNA-19a. Zbadano też, czy niedobór miRNA-19a wpływa na hamowanie wydzielania IL-10 przy jednoczesnym poddaniu komórek działaniu IL-4. Wykazano, że leczenie LPS zwiększa ekspresję IL-10 u myszy dzikich i z niedoborem miRNA-19a, natomiast leczenie IL-4 spowodowało zahamowanie ekspresji IL-10 u myszy dzikich, ale nie u myszy z niedoborem miRNA-19a. Powyższe badania wskazują, że u myszy z alergią pokarmową ekspresja IL-10 była hamowana przez miRNA-19a w limfocytach B, a także przez IL-4, co sugeruje istotną rolę miRNA-19a w patogenezie chorób alergicznych.

W kolejnej publikacji autorzy sprawdzali, czy klastr miRNA-17-92 hamuje ekspresję trombospondyny 1 w jelitowych limfocytach B CD35+ [20]. Trombospondyna 1 (TSP-1) jest białkiem adhezyjnym, które znajduje się w płytkach krwi, jest nazywana także czynnikiem aktywującym płytki krwi. Jako glikoproteina adhezyjna wiąże się z fibrynogenem, fibronektyną, lamininą, kolagenem typu V i integrzyną  $\alpha V\beta 1$ , odgrywając istotną rolę w angiogenezie, procesach nowotworzenia, a także jest zaangażowana w agregację płytek krwi i w proces zapalny. Opublikowane dane wskazują, że TSP-1 odgrywa ważną rolę w regulacji układu odpornościowego. W doświadczeniu tym wykorzystano szczep myszy BALB/c. Myszom podawano dożołądkowo albuminę jaja kurzego i toksynę cholery raz w tygodniu przez 5 kolejnych dni. Dzień po ostatniej prowokacji antygenem myszy zostały uśmiercone, pobrano od nich krew, wyizolowano z niej surowicę, a także pobrano fragmenty jelit w celu oceny ekspresji IL-4, IL-5, IL-13 za pomocą testu ELISA. Z pobranych fragmentów jelit wyizolowano LPMC i za pomocą MACS otrzymano limfocyty B CD35+ oraz CD19+. W doświadczeniu tym oceniano obecność specyficznych alergenowo

limfocytów T CD4+ oraz liczbę eozynofiliów i komórek tucznych w błonie śluzowej jelit. Za pomocą RT-PCR oceniono ekspresję TSP-1 oraz klastra miRNA-17-92 w limfocytach B. W badaniach wykazano podwyższony poziom swoistych przeciwciał IgE w surowicy, a także zwiększone stężenie cytokin charakterystycznych dla limfocytów Th2, naciek eozynofiliów oraz komórek tucznych w błonie śluzowej jelit. U myszy z alergią pokarmową zauważono zwiększoną ekspresję miRNA-19a w jelitowych limfocytach B CD35+ w porównaniu z myszami kontrolnymi. Ekspresja TSP-1 w limfocytach B pobranych od myszy z alergią pokarmową była znacznie niższa niż u myszy kontrolnych. Dane te wskazują, że w przebiegu chorób alergicznych zwiększa się poziom miRNA-19a w limfocytach B, co wpływa na poziom trombospondyny 1 w tych komórkach. W badaniu sprawdzono także wpływ cytokin wydzielanych przez limfocyty Th2 na regulację ekspresji miRNA-19a w limfocytach B poprzez poddanie ich działaniu IL-4, IL-5 oraz IL-13. Otrzymane wyniki sugerują, że ekspozycja jedynie na IL-4 spowodowała istotnie zwiększoną ekspresję miRNA-19a. Wykazano także zwiększoną ekspresję receptorów dla IL-4 u myszy z alergią pokarmową. Następnie zbadano wpływ IL-4 na ekspresję trombospondyny 1 w jelitowych limfocytach B. W hodowli z LPS odnotowano zwiększoną ekspresję TSP-1. Wyniki wskazują, że zwiększona ekspresja TSP-1 mogłaby zostać zniesiona przez ekspozycję na IL-4. miRNA-19a odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji zaangażowanej w odpowiedź immunologiczną TSP-1 w jelitowych limfocytach B. Podsumowując – u myszy z alergią pokarmową stwierdzono zmniejszoną liczbę limfocytów B CD35+ produkujących IL-10 i TSP-1 oraz nadekspresję miRNA-19a. Zwiększony poziom miRNA-19a w limfocytach B CD35+ może wpływać na zmniejszoną ekspresję trombospondyny 1 oraz IL-10, które odgrywają rolę w hamowaniu alergii pokarmowej.

Inni autorzy badali wpływ galektyny 1 na hamowanie OIAS [19]. Galektyna 1 to wielofunkcyjne białko należące do rodziny lektyn [21]. Charakteryzuje się obecnością domeny rozpoznającej węglowodany, wiążącej B-galaktozydazy [21]. Galektyna 1 odgrywa ważną rolę w adhezji komórkowej, apoptozie, nowotworzeniu, a także w procesach zapalnych i regulacji układu odpornościowego [22–25]. Stwierdzono, że galektyna 1 hamuje odpowiedź immunologiczną poprzez promowanie wydzielania limfopoetyny zrębu grasicy (*thymic stroma lymphopoietin* – TSLP), naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), IL-10, IL-25, a także transformującego czynnika wzrostu  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) przez komórki nabłonka jelitowego. Zespół alergii ustno-jelitowej jest powszechny i charakteryzuje się świądem oraz obrzękiem ust, podniebienia i języka, zwykle po spożyciu niektórych pokarmów. W niektórych przypadkach obrzęk gardła może spowodować trudności

w oddychaniu, a nawet prowadzić do uduszenia się. Należy on do alergii pokarmowych zależnych od IgE i może stanowić wynik reakcji krzyżowej pomiędzy alergenem wziewnym a pokarmowym. W doświadczeniu wykorzystano szczep myszy BALB/c. Myszy uczulono poprzez podanie w błonę śluzową jamy ustnej mieszaniny zawierającej ekstrakt z orzechów oraz toksynę, jednocześnie w grupie badanej podawano galektynę 1. W 15. dniu myszom podano dożołądkowo mieszaninę ekstraktu z orzechów w soli fizjologicznej w dawce 5 mg na osobnika. Po 4 godzinach myszy uśmiercono i pobrano od nich krew, błonę śluzową jamy ustnej, a także fragmenty jelit w celu przeprowadzenia dalszych badań. Określano stężenie histaminy i poziom swoistych przeciwciał IgE w surowicy, a także IL-4, wykorzystując test ELISA. Pod mikroskopem oglądano fragmenty jelit i błon śluzowych w celu oceny nacieku eozynofików i komórek tucznych. Komórki także inkubowano ze znakowanymi fluorochromem przeciwciałami bądź z izotopem przeciwciała IgG. W celu wybarwienia wnętrza komórek inkubowano je z paraformaldehydem i saponiną, a następnie z przeciwciałem znakowanym fluorochromem lub izotopem przeciwciała IgG. Następnie komórki analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Poziomy IL-10 oraz miRNA-98 oceniono z zastosowaniem RT-qPCR. Zbadano także interferencyjny RNA. W tym celu komórki CD14+ wyizolowano z LPMC za pomocą MACS. Komórki CD14+ przetworzono na CD45 shRNA zawierające lentiwirusy i niespecyficzne shRNA zawierające lentiwirusy. Wpływ interferencyjnego RNA zmierzono metodą western blotting. Wykazano, że u myszy z OIAS po podaniu galektyny 1 oraz mieszaniny zawierającej ekstrakt z orzechów ekspresja IL-10 w jelitowych komórkach CD14+ wyniosła 7,13%, w grupie kontrolnej ok. 5,17%, a u myszy z OIAS bez podania galektyny 1 jedynie 1,12%. Dane te świadczą o tym, że galektyna 1 zwiększa ekspresję IL-10 przez jelitowe komórki CD14+. Zbadano także zależność pomiędzy ekspresją miRNA-98 i IL-10 w jelitowych limfocytach B CD14+. Poziom miRNA-98 był istotnie większy u myszy z alergią niż w grupie kontrolnej. W grupie myszy, którym podawano galektynę-1 oraz ekstrakt z orzechów bądź samą galektynę 1, nie stwierdzono zwiększonej ekspresji miRNA-98 w limfocytach B CD14+, natomiast poziom IL-10 był znacznie niższy u myszy uczulonych. Dane te wskazują, że miRNA-98 hamuje ekspresję IL-10. Oceniano także wpływ IL-4 na ekspresję miRNA-98 w limfocytach B CD14+. Wraz ze wzrostem stężenia IL-4 zwiększała się ekspresja miRNA-98. W kolejnym kroku przeprowadzono analizę dotyczącą zależności pomiędzy działaniem galektyny 1 a hamowaniem ekspresji miRNA-98 w limfocytach B CD14+. Potwierdzono, że galektyna 1 zmniejsza poziom miRNA-98. W dalszej analizie wykazano, że wraz

ze wzrostem stężenia galektyny 1 zwiększała się ekspresja IL-10. Przeprowadzono także analizę dotyczącą oddziaływania galektyny 1 na ekspresję miRNA-98 oraz IL-10 poprzez CD45. CD45 jest receptorem dla galektyny 1. Dlatego też limfocyty B CD14+ zostały przetworzone na komórki CD14+ z deficytem receptorów CD45. Wykazano, że komórki pozbawione receptorów CD45 nie reagowały na działanie galektyny 1. Galektyna 1 pośredniczy w regulacji ekspresji miRNA-98 oraz IL-10 w limfocytach B CD14+ poprzez łączenie się ze swoistym receptorem CD45. Podsumowując – u myszy z OIAS poziom IL-10 jest znacznie niższy niż u myszy w grupie kontrolnej. Ponadto u myszy poddanych sensytyzacji zwiększa się ekspresja miRNA-98, co sugeruje, że w przebiegu alergii pokarmowej dochodzi do nadekspresji miRNA-98, które może hamować ekspresję IL-10. Wykazano również, że galektyna 1 hamuje ekspresję miRNA-98, co powoduje zahamowanie OIAS u myszy.

W innym badaniu oceniano wpływ temperatury stosowanej w procesie przetwarzania na występowanie miRNA w próbkach mleka. W tym celu zebrano próbki mleka z trzech różnych gospodarstw i przechowywano je w temperaturze 1°C do czasu przetwarzania w celu zminimalizowania wzrostu liczby bakterii. Próbki mleka z każdego gospodarstwa poddano procesom przetwarzania, które różniły się zastosowaną temperaturą, ciśnieniem oraz czasem trwania. Jedną próbkę mleka przetwarzano przy bardzo wysokiej temperaturze, kolejną próbkę poddano separacji, czyli oddzieleniu frakcji tłustej, a także homogenizacji, gotowaniu i pasteryzacji. Próbki natychmiast po tym zamrożono w temperaturze -20°C. Zamrożono także próbkę mleka surowego, które nie zostało poddane żadnemu procesowi. W doświadczeniu tym wyizolowano całkowite RNA z próbek mleka pochodzących z trzech różnych gospodarstw. Czystość RNA mierzono spektrofotometrycznie. Wykonano także łańcuchową reakcję polimeryzacji (PCR) i otrzymane produkty poddano elektroforezie w żelu agarozowym w celu rozdzielenia produktów pod względem ich rozmiarów. Wyniki wskazują, że zastosowanie wyższych temperatur w przetwórstwie mleka wpływa na zmniejszenie liczby miRNA. Długość miRNA we wszystkich próbkach mleka, z wyjątkiem próbki, która została poddana obróbce wysoką temperaturą, wyniosła ok. 22 nukleotydy, czyli jest to prawidłowa długość miRNA. Próbka mleka, która została przetworzona w wysokiej temperaturze, zawierała krótsze odcinki miRNA. Wśród odczytów najczęstszą sekwencję (36%) stanowiło miRNA-148a. W badaniu wykryto różnicę w ekspresji 52 typów miRNA pomiędzy mlekiem pasteryzowanym a mlekiem poddanym działaniu wysokiej temperatury, a także różnicę w ekspresji 25 różnych miRNA pomiędzy mlekiem pasteryzowanym a surowym. Wyniki wykazały, że w mleku pasteryzowanym poziom miRNA był

wyższy niż w pełnym mleku surowym. Ponadto oddzielenie frakcji tłuszczu w jednej z próbek mleka spowodowało, że poziom miRNA był wyższy niż w mleku pełnym. Dane wskazują, przetwarzanie mleka w niższych temperaturach, czyli w procesie pasteryzacji lub także homogenizacji, powoduje, że eksosomy, które chronią miRNA przed degradacją, są dalej nienaruszone. W publikacji wskazuje się na ochronny wpływ cząsteczek miRNA zawartych w mleku w przebiegu chorób alergicznych.

## PODSUMOWANIE

Powyższe dane wskazują, że w przebiegu alergii pokarmowej występuje zmniejszona ekspresja IL-10, a także nadekspresja mediatorów zapalnych, takich jak IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 oraz IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Ponadto wykazano istotną rolę w patogenezie alergii pokarmowej cząsteczek miRNA, takich jak miRNA-19a oraz miRNA-98, których nadekspresja hamowała wydzielanie IL-10. Zmniejszona ekspresja trombospondyny 1, która odgrywa rolę w alergii pokarmowej poprzez regulację układu odpornościowego, jest spowodowana zwiększonym poziomem miRNA-19a w limfocytach B. Cząsteczka galektyny 1 hamuje OIAS, co może być przedmiotem przyszłych badań nad lekiem dla pacjentów z alergią pokarmową. miRNA-19a oraz miRNA-98 stanowią interesujący cel dalszych badań ze względu na zwiększoną ekspresję tych cząsteczek w patogenezie alergii pokarmowej. Badania pozwalające na wykrycie tych typów miRNA w surowicy osób z alergią pokarmową mogą ułatwić diagnostykę tej choroby. Cząsteczki miRNA mogą także chronić przed występowaniem alergii. miRNA zawarte w mleku, zwłaszcza miRNA-148a, ulega degradacji podczas jego przetwarzania wysokich temperaturach. Niższe temperatury stosowane w procesach przetwarzania mleka chronią miRNA przed degradacją. U osób spożywających mleko surowe zaobserwowano złagodzenie objawów astmy, co powoduje, że miRNA zawarte w mleku może wpływać na występowanie alergii.

## KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

## PIŚMIENICTWO

- Nowak-Węgrzyn A, Szajewska H, Lack G. Food allergy and the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 241-57.
- Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 751-65.
- Ebisawa M, Ito K, Fujisawa T. Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergol Int* 2017; 66: 248-64.
- Robinson F. FLAIR-FLOW 4: synthesis report on food allergy for health professionals. *Nutr Bull* 2002; 27: 85-92.
- Tang MLK, Mullins R J. Food allergy: is prevalence increasing? *Intern Med J* 2017; 47: 256-61.
- Turnbull JL, Adams HN, Gorard DA. Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 41: 3-25.
- Gawęcki J. Apetyt. *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*. Warszawa 2010; 6.2: 82-7.
- Fal AM. Alergia, choroby alergiczne, astma. Tom II. *Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków* 2011.
- Santos AF, Brough HA. Making the most of in vitro tests to diagnose food allergy. *J Allergy Clin Immunol Practice* 2017; 5: 237-48.
- Moriyama T. Diversity of food allergy. *J Nutr Sci Vitaminol* 2015; 61 Suppl: S106-8.
- Lu TX, Rothenberg ME. Diagnostic, functional and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 3-13.
- Grenda A, Budzyński M, Filip A. Biogenesis of microRNAs and their role in the development and course of selected hematologic disorders. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2013; 67: 174-85.
- Philip A, Ferro VA, Tate RJ. Determination of the potential bio-availability of plant microRNAs using a simulated human digestion process. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59: 1962-72.
- Rebane A. microRNA and allergy. In: *microRNA: Medical Evidence: From Molecular Biology to Clinical Practice*. Santulli G (eds). Springer International Publishing. Cham 2015; 331-52.
- Pua HH, Ansel KM. MicroRNA regulation of allergic inflammation and asthma. *Curr Opin Immunol* 2015; 36: 101-8.
- Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. MicroRNAs in breastmilk and the lactating breast: potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12: 13981-4020.
- Noronha Fernandes-Brum C, Marinho Rezende P, Cherubino Ribeiro TH, et al. A genome-wide analysis of the RNA-guided silencing pathway in coffee reveals insights into its regulatory mechanisms. *PLoS One* 2017; 12: e0176333.
- Liu ZQ, Yang G, Geng XR, et al. Micro RNA-17-92 cluster mediates interleukin-4-suppressed IL-10 expression in B cells. *Am J Transl Res* 2016; 8: 2317-24.
- Xie RD, Xu LZ, Yang LT, et al. Galectin-1 inhibits oral-intestinal allergy syndrome. *Oncotarget* 2017; 8: 13214-22.
- Yang LT, Li XX, Qiu SQ, et al. Micro RNA-19a suppresses thrombospondin-1 in CD35+ B cells in the intestine of mice with food allergy. *Am J Transl Res* 2016; 8: 5503-11.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006; 16: 137R-57R.
- Yang H, Lan Q, Liu R, et al. Characterization of galectin-1 from Chinese giant salamanders *Andrias davidianus* and its involvements during immune response. *Developm Comp Immunol* 2017; 70: 59-68.
- Happel CS, Stone KD, Freeman AF, et al. Food allergies can persist after myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in dedicator of cytokinesis 8-deficient patients. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 1895-8.e5.
- Crawford G, Enders A, Gileadi U, et al. DOCK8 is critical for the survival and function of NKT cells. *Blood* 2013; 122: 2052-61.
- Tangye SG, Pillay B, Randall KL, et al. Dedicator of cytokinesis 8-deficient CD4+ T cells are biased to a Th2 effector fate at the expense of Th1 and Th17 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139: 933-49.