

Ewolucyjnie konserwatywne białka odgrywają fundamentalną rolę w procesach fizjologicznych, ich struktura jest niezmienna, a funkcje podobne w różnych typach i gromadach królestwa zwierząt. Wykazują małą swoistość i szerokie spektrum aktywności wobec: układu odpornościowego, hormonalnego, nerwowego i mikrobiomu jelit. Doskonałym przykładem takiego białka jest laktoferyna, choć uznawana za atrybut ssaków, występuje też u ptaków. Biologicznie aktywne peptydy także nie są swoiste gatunkowo, jak kolostrylina obecna w sianie i mleku ssaków; izolowana od owiec czy krów działa u tak odległych gatunków jak mysz, człowiek czy kura. Kolejnym ewolucyjnie „starym” białkiem jest witellogenina obecna w żółtku jaj ptaków. Produktami jej enzymatycznego rozpadu są aktywne peptydy, m.in. foswityna i yolkina. Analiza właściwości biologicznych yolkiiny będzie przedmiotem niniejszego wniosku grantowego.

Mimo licznych badań, wiedza o roli białek jaja w rozwoju zarodka ptaków wciąż jest niepełna. W odróżnieniu od ssaków, organizmy matki i zarodka u ptaków i innych zwierząt jajorodnych nie są bezpośrednio powiązane, co sugeruje, że jajo powinno zawierać wszystkie składniki budulcowe, regulacyjne i ochronne niezbędne dla rozwijającego się zarodka. Znaczenie niektórych białek, jak owotransferyna, witellogenina, immunoglobulina Y (IgY) czy foswityna, w rozwoju zarodka ptaka jest już w dużej części znane. Brak jednak pełnych danych o roli innych białek/peptydów jaja, w tym yolkiiny. Dotychczasowe badania na zwierzętach i ludziach wykazały jej korzystny wpływ na procesy poznawcze, co może sugerować udział w rozwoju układu nerwowego zarodka. Uzyskane przez nas, wstępne wyniki badań na myszach sugerują także wpływ yolkiiny na dojrzewanie i różnicowanie komórek odpornościowych. Celem projektu są dalsze badania działania yolkiiny na układ immunologiczny: dojrzewanie i aktywność limfocytów zaangażowanych w odpowiedź humoralną i komórkową u osesków, w warunkach przewlekłego stresu psychicznego, w immunosupresji po zastosowaniu cytostatyków, podczas zakażenia i zapalenia oraz w czasie ciąży. Nieswoista natura starego ewolucyjnie białka, jakim jest yolkina, umożliwi przeprowadzenie testów na łatwo dostępnych i sprawdzonych modelach doświadczalnych na myszach. Ich wyniki pozwolą wnioskować o jej roli w rozwoju zarodka ptasiego, a szczególnie jego układu odpornościowego.

W projekcie badać będziemy aktywność yolkiiny (mieszaniny kilku peptydów/białek o małej masie molekularnej) izolowanej z żółtek kurzych jaj. Przewidujemy użycie testów *in vivo/ex vivo* oraz *in vitro*. W pierwszych ocenimy wpływ yolkiiny na odpowiedź immunologiczną typu humoralnego i komórkowego w różnych stanach fizjologicznych, a w testach *in vitro* molekularny mechanizm jej działania. •Na wstępie ocenimy zdolność yolkiiny do przyspieszania dojrzewania układu odpornościowego u osesków. •U myszy poddanych długotrwałemu stresowi psychicznemu (test unieruchomienia) zbadamy jej wpływ na odnowę komórkowej odpowiedzi immunologicznej zahamowanej przez endogenne sterydy. •Ponadto określimy wpływ yolkiiny na odnowę komórek odpornościowych w immunosupresji po podaniu cyklofosfamidu, cytostatyku niszczącym neutrofile i limfocyty, ale nie komórki macierzyste szpiku kostnego. •Kolejne testy określą przeciwzapalne właściwości yolkiiny w modelu endotoksemii po podaniu endotoksyny bakteryjnej oraz •ochronny wpływ w zakażeniu bakteryjnym (*Escherichia coli*). •W modelu myszy CBA/J×DBA/2J, podatnych na poronienia (resorpcję płodów) ocenimy wpływ yolkiiny na utrzymanie ciąży poprzez korektę równowagi immunologicznej. W części opisanych testów dodatkowo określimy liczbę i udział poszczególnych typów komórek immunologicznych w organach limfatycznych myszy (oceniając fenotyp komórek, czyli obecność charakterystycznych markerów na ich powierzchni). Wykonamy także analizę histopatologiczną tkanek objętych zapaleniem. W opisanych modelach doświadczalnych yolkina podawana będzie dootrzewnowo lub doustnie w wodzie pitnej. Podanie per os zastosujemy przewidując w przyszłości możliwe użycie yolkiiny jako składnika odżywek w profilaktyce i leczeniu zaburzeń pracy układu immunologicznego zwierząt i ludzi. Doustna aplikacja zapewnia interakcję biologicznie aktywnego białka bądź peptydów z receptorami komórek odpornościowych błony śluzowej jamy ustnej, gardła i jelit, co potwierdzono podczas stosowania laktoferyny i kolostryliny w nutraceutykach i suplementach diety.

W testach *in vitro* (w hodowlach komórkowych) zbadamy wpływ yolkiiny na wytwarzanie mediatorów reakcji odpornościowych (cytokin) przez komórki mysich narządów limfatycznych (grasicy, śledziony i węzłów chłonnych) stymulowanych mitogenem (substancją wywołującą podziały komórkowe). Ocenimy też molekularny mechanizm działania yolkiiny, badając jej wpływ na ekspresję białek szlaków sygnałowych w komórkach izolowanych z organów limfatycznych myszy oraz liniach komórkowych. Zbadamy wpływ yolkiiny na poziom cyklooksygenazy-2 (COX-2), enzymu odpowiedzialnego za syntezę prostaglandyn – ważnych mediatorów reakcji zapalnych. Ponadto ocenimy aktywność przeciwwirusową yolkiiny.

Uzyskane wyniki pozwolą ocenić przydatność yolkiiny w modulacji wrodzonej (nieswoistej) i nabytej (swoistej) odporności oraz wskażą możliwy mechanizm jej działania. Szczególnie istotna jest rola yolkiiny w dojrzewaniu/odnowie komórek odpornościowych, z uwagi na ich zasadnicze znaczenie m.in. w ochronie przed infekcjami wirusowymi, bakteryjnymi czy poronieniem. Uzyskane wyniki dostarczą wiedzy nie tylko o roli yolkiiny w rozwoju zarodka ptasiego, ale także pozwolą w przyszłości zastosować ją w prewencji i leczeniu różnych chorób, w tym zakażeń wirusowych i bakteryjnych, także u pacjentów w immunosupresji.