

Badanie przeciwapalnego potencjału pęcherzyków zewnątrzkomórkowych nicienia pasożytniczego *Anisakis simplex* w organoidach żołądkowych i jelitowych człowieka otrzymany z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych

W krajach uprzemysłowionych częstość występowania chorób zapalnych osiągnęła rozmiary epidemii. Według Światowej Organizacji Zdrowia przewlekłe choroby zapalne dotyczące dowolnego narządu organizmu stanowią największy problem zdrowotny i jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, przy czym ponad 50% wszystkich zgonów można przypisać schorzeniom związanym ze stanem zapalnym. Negatywna korelacja między infekcjami helmintami a stanami zapalnymi była szeroko dyskutowana. Hipoteza higieny i tzw. hipoteza starego przyjaciela, dobrze znane zarówno naukowcom, jak i ogółowi społeczeństwa, sugerują, że obserwowany ostatnio wzrost ilości zachorowań na choroby zapalne związany jest z brakiem ekspozycji na mikroorganizmy, zwłaszcza nicienie żołądkowo-jelitowe. Szczególnie hipoteza higieny sugeruje, że brak ekspozycji na nicienie żołądkowo-jelitowe w dzieciństwie osłabia niedojrzały układ odpornościowy, co skutkuje częstszym rozwojem zaburzeń zapalnych. Zdolność helmintów do manipulowania układem odpornościowym żywiciela jest dobrze udokumentowana, a w literaturze znajduje się wiele przykładów korzystnego działania helmintów w chorobach z komponentą zapalną. Istnieją dowody na to, że infekcje helmintami, zwłaszcza nicieniami żołądkowo-jelitowymi, mogą pomóc w regulacji niekontrolowanych odpowiedzi zapalnych związanych ze wspomnianymi wcześniej zaburzeniami zapalnymi u ludzi. Jednak stosowanie żywych pasożytów niesie ze sobą znane ryzyko. Odkrycie w ostatniej dekadzie, że nicienie żołądkowo-jelitowe uwalniają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs), które mogą dostać się do komórek żywiciela, było przełomowym odkryciem w badaniach nad pasożytami. Wiadomo, że pomimo niewielkich rozmiarów (50–2000 nm) pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawierają różne cząsteczki, m.in., kwasy nukleinowe, białka, lipidy lub metabolity. Uważa się, że kwasy nukleinowe, zwłaszcza miRNA oraz białka, odgrywają kluczową rolę w komunikacji pasożyt-żywiciel. Biorąc pod uwagę zdolność nicieni żołądkowo-jelitowych do osłabiania odpowiedzi immunologicznej, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i ich ładunek mogą odgrywać kluczową rolę w unikaniu układu odpornościowego żywiciela. Dlatego coraz bardziej prawdopodobne wydaje się wykorzystanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych helmintów w kontekście regulacji odpowiedzi zapalnych związanych z zaburzeniami zapalnymi.

Najnowszym trendem w badaniu molekularnych podstaw oddziaływania pasożytów na organizm żywiciela jest wykorzystanie kultur organoidów. Są to złożone, trójwymiarowe (3D) struktury złożone z wielu komórek, które służą jako reprezentatywne modele dla określonych narządów. Organoidy umożliwiają badanie aspektów ludzkiej fizjologii i chorób, których nie można odtworzyć u zwierząt ze względu na znaczne różnice między gatunkami. *Anisakis simplex*, jeden z najczęściej pojawiających się nicieni pasożytniczych w Europie, charakteryzuje się złożonym cyklem życiowym, w którym człowiek może stać się przypadkowym żywicielem. We wstępnych badaniach potwierdziliśmy, że larwy *A. simplex* wytwarzają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Anis-EVs), które wykazują działanie przeciwapalne na unieśmiertelnioną linię komórkową ludzkiego gruczołakoraka jelita grubego (CACO-2), w oparciu o profil wydzielania cytokin i analizę ekspresji genów. Scharakteryzowaliśmy również ładunek Anis-EVs: mikro RNA (Anis-miRNAs) i białka (Anis-PROTs). **Według naszej wiedzy nie ma badań opisujących wpływ Anis-EV i ich specyficznego ładunku na zmiany molekularne w organoidach żołądkowych i jelitowych człowieka objętych stanem zapalnym.**

Celem naszego projektu jest zbadanie bezpośredniego i pośredniego wpływu Anis-EVs (całe pęcherzyki oraz wybrane miRNA i białka) organoidy żołądkowe i jelitowe człowieka objęte stanem zapalnym. Aby osiągnąć ten cel, zastosowane zostanie podejście transkryptomiczne i fosfoproteomiczne z wykorzystaniem metod wysokoprzepustowych (sekwencjonowanie RNA i chromatografia cieczowa w połączeniu z tandemową spektrometrią mas), a Anis-EVs i ich specyficzny ładunek (Anis-miRNAs i Anis-PROTs) zostaną zastosowane z organoidami żołądka i jelita człowieka objętymi stanem zapalnym jako model badawczy. Ponadto zostanie określona rola Anis-EVs, Anis-miRNAs i Anis-PROTs w aktywacji zapalnych szlaków sygnałowych w organoidach objętych stanem zapalnym. Zbadany zostanie również wpływ Anis-EVs, Anis-miRNAs i Anis-PROTs na wybrane biomarkery stresu oksydacyjnego oraz na wydzielanie wybranych biomarkerów zapalnych (cytokin) w organoidach objętych stanem zapalnym.

Cel naukowy projektu jest ściśle powiązany z najnowszymi trendami w światowych badaniach mających na celu poznanie potencjału terapii helmintami w stanach zapalnych. **Wykorzystanie kompletnych EVs lub tylko niektórych zawartych w nich cząsteczek, w połączeniu z obecnie dostępnymi nowoczesnymi metodami badawczymi (hodowla organoidów, RNA-seq, nLC-MS/MS) mogłoby dostarczyć wielu naukowcom i ogółowi społeczeństwa dalszych danych dotyczących wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych nicieni pasożytniczych na stan zapalny.**