

Received: 2015.02.04  
Accepted: 2015.08.25  
Published: 2016.09.13

## Rola zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych w interakcji pasożyt-żywiciel

### The role of extracellular vesicles in parasite-host interaction

Justyna Gatkowska, Henryka Długońska

Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

#### Streszczenie

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe (EVs, extracellular vesicles), początkowo uważane za elementy zniszczonych komórek, okazały się niezwykle istotnym sposobem przekazywania informacji między komórkami, bez ich bezpośredniego kontaktu. Ze względu na powszechne występowanie EVs w komórkach organizmów zarówno jedno-, jak i wielokomórkowych należących do różnych grup systematycznych oraz ze względu na pełnioną rolę w komunikacji międzykomórkowej stały się przedmiotem licznych badań i dyskusji. EVs są uwalniane przez komórki prokariotyczne, jak i eukariotyczne, zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Chociaż uzyskiwane frakcje EVs są zwykle mieszaniną różnorodnych struktur pochodzenia błonowego wprowadzono klasyfikację pęcherzyków przede wszystkim na podstawie ich wielkości i prawdopodobnego mechanizmu powstawania. EVs jako nośniki informacji zawierają różnorodny materiał komórkowy, a dzięki intensywnym pracom badawczym coraz więcej wiadomo o ich funkcji w różnego rodzaju procesach np. nowotworowych. W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat pęcherzyków błonowych biorących udział w szeroko pojętych interakcjach żywiciel-pasożyt, obejmujących inwazję i kolonizację żywiciela, ustalanie równowagi między partnerami czy modulację odpowiedzi immunologicznej żywiciela w czasie zarażenia. Poruszono kwestie potencjalnego wykorzystania pęcherzyków w immunoprofilaktyce oraz diagnostyce chorób inwazyjnych. Najwięcej miejsca poświęcono inwazjom spowodowanym przez pierwotniaki, ze szczególnym uwzględnieniem pasożytów o największym znaczeniu medycznym i społecznym w skali globalnej, co znajduje także swoje odzwierciedlenie w literaturze światowej. Zebrano także dość skąpe na razie doniesienia na temat udziału EVs w przebiegu inwazji wywoływanych przez gatunki pasożytnicze zaliczane do grupy helmintów.

Słowa kluczowe:

mikropęcherzyki • egzosomy • pasożyty • pierwotniaki • robaki pasożytnicze • żywiele

#### Summary

Extracellular vesicles (EVs), initially considered cell debris, were soon proved to be an essential tool of intercellular communication enabling the exchange of information without direct contact of the cells. At present EVs are the subject of extensive research due to their universal presence in single- and multi-cell organisms, regardless of their systematic position, and their substantial role in cell-to-cell communication. EVs seem to be released by both prokaryotic and eukaryotic cells under natural (*in vivo*) and laboratory (*in vitro*) conditions. Even purified fractions of isolated EVs comprise various membrane-derived structures. However, EVs can be classified into general groups based primarily on their size and origin. EVs may carry various materials, and ongoing research investigations give new insight into their potential

	participation in critical biological processes, e.g. carcinogenesis. This paper presents current knowledge on the EVs' involvement in host-parasite interactions including the invasion process, the maintenance of the parasite infection and modulation of the host immune response to parasite antigenic stimulation, as well as perspectives of the potential use of EVs as immunoprophylactic and diagnostic tools for controlling parasite infections. The most numerous literature data concern protozoan parasites, especially those of the greatest medical and social importance worldwide. However, available information about the EVs' contribution to helminth invasion has also been included.
<b>Key words:</b>	<b>microvesicles • exosomes • parasites • protozoans • helminths • hosts</b>
<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1218189">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1218189</a>
<b>Word count:</b>	2943
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	–
<b>References:</b>	54

**Adres autora:** dr Justyna Gatkowska, Zakład Immunoparazytologii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; email: gatjus@biol.uni.lodz.pl

**Wykaz skrótów:** **EEF1A1** – eukariotyczny czynnik elongacji translacji (eukaryotic translation elongation factor alpha1), **EVs** – zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe (extracellular vesicles), **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (mitogen-activated protein kinase), **MVs** – mikropęcherzyki błonowe (microvesicles), **miRNA** – mikroRNA (microRNA), **MVB** – ciało wielopęcherzykowe (multivesicular body), **PAMPs** – wzorce molekularne związane z patogenami (pathogen-associated molecular patterns), **PfPTP2** – białko *Plasmodium falciparum* odpowiedzialne za transport (*Plasmodium falciparum* trafficking protein), **siRNA** – mały interferujący RNA (small interfering RNA), **tsRNA** – mały RNA pochodzący z tRNA (tRNA-derived small RNA), **VSG** – zmienna powierzchniowa glikoproteina u *Trypanosoma* (variable surface glycoprotein).

## WSTĘP

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe (EVs, extracellular vesicles) stanowią podstawę komunikacji między komórkami, zarówno w systemach jedno-, jak i wielokomórkowych. Ze względu na uniwersalność i ogromne znaczenie biologiczne są przedmiotem dużego zainteresowania oraz intensywnych badań, czego wyrazem może być powstanie nowego czasopisma *Journal of Extracellular Vesicles*. EVs, traktowane początkowo tylko jako szczątki komórek (cellular debris), okazały się zasadniczym elementem horyzontalnego przekazywania informacji między różnymi komórkami, bez ich bezpośredniego kontaktu.

Akronim EVs oznacza heterogenną populację pęcherzyków, w większości kulistych, uwalnianych z komórek prokariotycznych i eukariotycznych, w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Podstawą klasyfikacji EVs może być ich wielkość, gęstość, metoda izolacji czy obecność typowych markerów, jednak nawet oczyszczone frakcje EVs są mieszaniną różnorodnych pęcherzykowatych struktur pochodzenia błonowego. Biorąc pod uwagę wielkość i przypuszczalne szlaki biogenezy wyróżniono trzy klasy EVs:

- ciała apoptotyczne (800-5000 nm, uwalniane podczas programowanej śmierci komórek),

- mikropęcherzyki zwane też ektosomami (50-1000 nm, formowane przez pączkowanie błony, zależne od  $Ca^{2+}$ ) i

- egzosomy (40-100 nm, najprawdopodobniej pochodzenia endocytarnego).

Pęcherzyki niosą różnorodny materiał komórkowy, który krąży w makroorganizmie w bardzo stabilnej postaci subkomórkowej. Elementami budulcowymi są peptydy, białka, miRNA, mRNA, DNA i lipidy. Ich kompozycja jest bardzo zróżnicowana, zależna od rodzaju komórki, co wykazano m.in. na podstawie profili RNA [12]. Budowę, mechanizm powstawania, wielorakie funkcje EVs, a zwłaszcza ich rolę w chorobach nowotworowych, omówiono już wcześniej w 2014 r. [54].

Szczególnie interesujący aspekt funkcji EVs dotyczy ich udziału w budowaniu złożonych relacji pasożyt-żywcicieli i tym właśnie zagadnieniom, w odniesieniu do wybranych pasożytniczych pierwotniaków i robaków (helminatów), poświęcono niniejszy artykuł. Typowymi cechami inwazji pasożytniczych jest ich przewlekły charakter, co wskazuje, że układ odpornościowy żywicieli nie jest w stanie wyeliminować pasożytów, które stosują różne i bardzo wyrafinowane metody modyfikowania aktywności obronnej żywicieli, klasyfikowane jako unik odpornościowy,

wyzysk molekularny i molekularne piractwo [13]. W wyniku wieloletniej koewolucji pasożytów i ich żywicieli wytworzyły się skomplikowane wzajemne relacje, a w ich ukształtowaniu pierwszorzędą rolę odgrywają właśnie EVs, ponieważ są nośnikiem m.in. czynników zjadliwości i immunomodulatorów [2,49]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku wewnątrzkomórkowych patogenów, których bezpośredni kontakt z układem odpornościowym jest ograniczony.

## PIERWOTNIKI

*Plasmodium* (typ Apicomplexa), zarodek malarii, atakuje człowieka i liczne gatunki zwierząt. Malaria pozostaje od lat najgroźniejszą chorobą pasożytniczą ludzi. Dane CDC (<http://www.cdc.gov/malaria/about/facts.html>) w Atlancie wskazują, że tylko w 2013 r. zanotowano na świecie 627 000 przypadków śmiertelnych, a ponad 3 mld osób żyje na terenach endemicznych tej parazytozy. Objawy ciężkich postaci malarii u ludzi, w tym malarii mózgowej, wiążą się bezpośrednio z silną indukcją odpowiedzi prozapalnej i zwiększonym uwalnianiem mikropecherzyków przez komórki krwi zarażonych osób. Zaobserwowano, że u osób zarażonych *P. vivax* na terenie brazylijskiej Amazonii poziom tych struktur w osoczu podczas ostrej fazy choroby był znacząco wyższy niż w wiekowej zgodnej grupie osób zdrowych. Ponadto stwierdzono wyraźną liniową korelację między intensywnością uwalniania mikropecherzyków przez płytki krwi a falą gorączki i długością fazy objawowej. Spadek poziomu krążących MVs okazał się także czułym biomarkerem skuteczności prowadzonej chemioterapii [8]. Mikropecherzyki, głównie pochodzenia erytrocytarnego, wyizolowane od zarażonych myszy powodowały *in vitro* silną stymulację makrofagów, wyrażoną wzrostem ekspresji cząsteczek CD40 i wytwarzaniem TNF [10]. Aktywacja makrofagów nie angażowała jednak ani receptora TL4, ani cząsteczki adaptorowej MyD88. Nie jest też znany mechanizm uwalniania pęcherzyków, ponieważ dojrzałe erytrocyty nie mają żadnych wewnętrznych błon i maszynerii uczestniczącej w procesach egzo- i endocytozy. Sugeruje się udział w wydzielaniu mikropecherzyków struktur cytoplazmatycznych wewnątrz erytrocytów zwanych szczelinami Maurera, które oddzielają się od błony wakuoli pasożytniczej [47]. Badania ilościowe wykazały, że erytrocyty zarażone *Plasmodium* wytwarzają 10-krotnie więcej EVs niż niezarażone, a maksimum uwalniania przypada na krótko przed opuszczeniem erytrocytów przez pasożyty [32]. W tym samym czasie znikają też szczeliny Maurera [24].

EVs uwalniane przez erytrocyty zarażone *P. falciparum* (zwane też egzosomopodobnymi) są narzędziem komunikowania się pasożytów, umożliwiając im synchronizację i zamknięcie złożonego cyklu rozwojowego, obejmującego fazę bezpłciową i płciową, którym towarzyszą zmiany form rozwojowych. Punktem wyjścia do sformułowania tego wniosku była obserwacja, że zarażone *Plasmodium* erytrocyty pochłaniają EVs i kierują je do cytosolu pasożytów [32]. Pęcherzyki egzosomopodobne, powstające w odpowiedzi na niekorzystne warunki mikrośrodowi-

ska u żywiciela (np. stres wywołany przez leki), promują przekształcenie komórek stadium krwinkowego pasożyta do postaci płciowych (gametocytów męskich i żeńskich), które są pobierane przez komary. Analiza proteomu EVs wykazała, że zawierają składniki pochodzące z komórek pasożyta (np. białka biorące udział w inwazji do erytrocytów żywiciela) [32,41]. Zidentyfikowano białko efektorowe PfPTP2, które odpowiada za komunikację, a konkretnie za transport innego ważnego białka pasożyta, białka zjadliwości PfEMP1 [41].

Dużym problemem w eradykacji malarii jest szybko narastająca lekooporność pasożyta. Nawet w przypadku skojarzonej chemioterapii, z włączeniem artemizyny jako pierwszorzędowego leku, obserwowano lekooporne epizody, stąd stale trwają prace nad opracowaniem nowych leków [16]. Proces uwalniania EVs może służyć do prowadzenia badań podstawowych z zakresu mechanizmu i skuteczności działania leków antymalarycznych. Wykazano na przykład, że pochodne indolu, indukujące powstawanie długo utrzymujących się rodników tlenowych, wzmagają zależne od dawki leku wytwarzanie EVs, a wrażliwą postacią docelową pasożyta okazały się jego postaci pierścieniowate [39]. Reaktywne formy tlenu destabilizują błonę zewnętrzną erytrocytów, obniżają oporność mechaniczną erytrocytów, przez co stają się mniej przyjaznym środowiskiem do dojrzewania pasożytów.

Zarodźce gatunku *P. vivax* i *P. yoelli* zarażają preferencyjnie lub nawet wyłącznie młode postaci erytrocytów, retykulocyty. Egzosomy uwolnione z retykulocytów myszy BALB/c zarażonych *P. yoelli* okazały się bardzo skutecznym materiałem szczepionkowym. Podane z adiuwantem CpG (niemetylowane motywy cytozyna-guanina) wzbudzały silną odpowiedź odpornościową z udziałem limfocytów Th1, czego wyrazem było wysokie stężenie swoistych przeciwciał podklas IgG2a i IgG2b. Wytworzona odporność poszczepienna chroniła aż 83% myszy przed śmiertelną dawką pasożyta [36].

*Leishmania*. Pasożyty rodzaju *Leishmania* (typ Kinetoplastida) są czynnikami etiologicznymi leiszmaniozy skórnej (np. *L. major*), trzewnej (np. *L. donovani*) i skórno-śluzówkowej (*L. brasiliensis*). Są to choroby endemiczne występujące w strefie klimatu sub- i tropikalnego oraz na terenie południowej Europy, zagrażające około 350 mln zamieszkujących tam ludzi. Liczba nowo rozpoznanych przypadków wynosi prawie 2 mln rocznie, a istotnym rezerwuarem tych pasożytów na terenach miejskich są psy [18,29]. Leiszmanioza jest przenoszona na człowieka z udziałem muchówek z rodzaju *Phlebotomus* i *Lutzomyia*. To one wprowadzają do skóry promastigoty, które po sfagocytowaniu przez makrofagi przekształcają się w nieruchliwe amastigoty, umiejscowione w fagolizosomach. Silverman i wsp. [42] wykazali, że uwalnianie egzosomów u hodowanych postaci promastigota *Leishmania donovani* to ich główny mechanizm sekrecyjny. Egzosomopodobne struktury są uwalniane z błony plazmatycznej i z kieszonki wici (w tym drugim przypadku za pośrednictwem ciała wielopęcherzykowego). Analiza proteomu EVs wykazała

obecność aż 329 białek, co stanowi ponad 52% sekretomu tego pasożyta [43]. Obecność EVs wykryto także wewnątrz makrofagów zarażonych *Leishmania*. Wykazano, że niezarażone makrofagi pobierają egzozomy ze środowiska zewnętrznego, co selektywnie wzbudza wydzielanie IL-8. Obserwacje wskazują, że egzozomy są narzędziem komunikacji między makrofagami żywiciela i pasożytami. Wydzielona IL-8 przyciąga neutrofile, które są pośrednimi komórkami żywicielskimi. Apoptotyczne neutrofile mogą być wykorzystywane do przenoszenia postaci promastigoty do wnętrza docelowych komórek żywicielskich (makrofagów), za pośrednictwem tzw. „cichej fagocytozy”, tj. bez aktywacji tych komórek [51]. Podobnie jak w przypadku innych wewnątrzkomórkowych patogenów, przeżycie i namnażanie *Leishmania* w tak skrajnych warunkach jak wewnątrz makrofagów wymaga z pewnością modyfikacji przekazywania sygnałów w komórkach żywicielskich. Zaobserwowano, że zewnątrzkomórkowe promastigoty *Leishmania* „wysyłają” mikropecherzyki zawierające m.in. główny czynnik wirulencji *Leishmania*, tj. metaloproteazę gp63 (leiszmanolizynę) oraz EF1- $\alpha$  (elongation factor-1 alpha), które przygotowują makrofagi na „przyjęcie” pasożyta („functional priming”). Czynniki aktywują fosfatazy makrofagowe, a te powodują defosforylację składowych szlaku sygnałowego IFN- $\gamma$ /Jak-STAT1. W wyniku zablokowania transdukcji sygnału, makrofagi tracą zdolność wytwarzania pasożytoobójczych cząsteczek efektorowych (NO, TNF- $\alpha$  i reaktywnych form tlenu), stając się potem przyjaznym mikrośrodowiskiem dla pasożyta [46]. Mutanty gp63-defektywne wytwarzały EVs o odmiennym składzie białkowym i słabszym działaniu przeciwzapalnym, w porównaniu ze szczepem dzikim pasożyta, co sugeruje udział metaloproteazy gp63 w sortowaniu białek egzosomalnych. Wykazano, że podczas infekcji zmianie ulega ekspresja genów metabolizmu lipidów spowodowana bezpośrednio lub pośrednio przez miRNA. Metaloproteaza gp63, zawarta w egzozomach wydzielanych przez leiszmanie, reaguje z enzymem Dicer1, powodując obniżenie stężenia miRNA-122 w hepatocytach oraz cholesterolu w osoczu krwi, co koreluje z nasileniem namnażania pasożyta [23]. Opisane badania wskazują, że w wyniku koewolucji *Leishmania* wypracowała zróżnicowane i wyrafinowane strategie obronne, które pozwalają jej unikać eradykacji z organizmu żywiciela [30]. Egzozomy *Leishmania* podane myszom C57Bl/6 wykazały działanie propasożytnicze, wzmagając wytwarzanie IL-10 w śledzionie i nasilając infekcję [44]. Jest interesującym to, że szczep typu knockout w zakresie Hsp100 wytwarzał egzozomy o przeciwstawnej aktywności, stymulowały bowiem różnicowanie się limfocytów CD4+ i wytwarzanie IFN- $\gamma$  w śledzionie, co wzbudziło nadzieję, że wprowadzenie ich z efektywnym adiuwantem typu Th1 może doprowadzić do wytworzenia odporności ochronnej. Pierwsze próby z użyciem nowego lipidowego adiuwantu CAF01 przyniosły obiecujące wyniki i być może zapoczątkują opracowanie skutecznej szczepionki przeciw leiszmaniozie [30].

Różne egzogenne bodźce, w tym czynniki infekcyjne, np. wirusy, wewnątrzkomórkowe bakterie i pierwotniaki, stymulują także wydzielanie egzozomów z komórek makro-

organizmu, który zasiedlają. Analiza porównawcza proteomu egzozomów uwalnianych przez makrofagi linii J774, niestymulowane i stymulowane (LPS albo promastigotami *L. mexicana*), wykazała, że jest on zależny od stymulatora, chociaż ponad połowa składu (głównie białka błony zewnętrznej, opiekuńcze i metabolizmu) była identyczna. Metaloproteazę gp63 znaleziono jednak wyłącznie w egzozomach makrofagów stymulowanych *L. mexicana*. Egzozomy te indukowały wytwarzanie cząsteczek sygnalizacyjnych i czynników transkrypcyjnych w niestymulowanych makrofagach [27]. Zaobserwowano także bardzo silny wzrost ekspresji receptora adenozyнового. Przypuszcza się, że jest wykorzystywany przez *Leishmania* w tłumieniu reakcji zapalnej, ułatwiając pasożytowi zasiedlenie sąsiednich makrofagów.

*Trypanosoma* (typ Kinetoplastida) to grupa pasożytniczych pierwotniaków dwużywielskich (kręgowiec i owady dwuskrzydłe, kleszcze oraz pijawki) o dużym znaczeniu medycznym, weterynaryjnym i ekonomicznym, zwłaszcza w krajach klimatu gorącego [11,19]. To pasożyty krwi, które wytworzyły wiele skomplikowanych metod unikania reakcji układu odpornościowego swoich żywicieli, m.in. przez hiperzmiennosć glikoproteiny powierzchniowej VSG (Variable Surface Glycoprotein, ponad 2000 wariantów antygenowych). Badanie sekretomu *T. brucei* (czynnika etiologicznego śpiączki afrykańskiej, endemicznej w Afryce Subsaharyjskiej) wykazało obecność aż 444 białek, z których bardzo znaczna część nie zawierała peptydu sygnałowego. Białka były wydzielane z komórek *Trypanosoma* za pośrednictwem egzocytozy, w mikropecherzykach o średnicy 50-100 nm uwalnianych z błony zewnętrznej świdrowca [22]. Wykazano ponadto, że zarówno nieinwazyjne epimastigoty, jak i inwazyjne metacykliczne trypomastigoty uwalniają białka sekretoryjne przynajmniej na dwa sposoby: pączkowania błony zewnętrznej (większe EVs zwane mikropecherzykami) i egzocytozy zawartości ciała wielopecherzykowego w kieszonce wici (mniejsze EVs, czyli egzozomy) [3]. Mikropecherzyki uwalniane przez metacykliczne trypomastigoty mogą dostarczać swoją zawartość do komórek żywicielskich endocytozy, a te zainfekowane komórki – również wydzielają EVs.

U jednokomórkowych organizmów np. *Trypanosoma*, kanoniczny model regulacji potranskrypcyjnej genów (interferencja RNA z użyciem siRNA) nie występuje lub jest obecny w uproszczonej formie. Jest zastąpiony przez homogenne populacje małych cząsteczek RNA, pochodzących z tRNAi rRNA, które są wydzielane na zewnątrz komórek w egzozomach. Egzozomy wytwarzane przez postaci epimastigotyczne pasożyta, zawierają tsRNA i są narzędziem komunikowania się pasożytów (indukcja przemiany w inwazyjne formy metacykliczne), jak również komórkę pasożyta i komórkę żywiciela (potwierdzenie ich wrażliwości na infekcję) [20]. Kardiomiopatie to typowy objaw przewlekłej trypanosomozy amerykańskiej. Iniekcja EVs przed doświadczalnym zarażeniem myszy *T. cruzi* nasilała parazytemię, zmiany patologiczne w sercu i reakcję zapalną, której towarzyszył wzrost biosyntezy IL-4 i IL-

10 oraz przyspieszona i zwiększona śmiertelność zwierząt [50]. Jeżeli kardiomocyty czy fibroblasty zaadsorbują EVs stają się tarczą dla krążących swoistych przeciwciał antypasożytniczych. Trypomastigoty *T. cruzi* stymulują także wydzielanie EVs z monocytów i limfocytów, opłaszczają się nimi, a zawarty wewnątrz pęcherzyków TGF- $\beta$  inaktywuje konwertazę C3 komplementu, chroniąc w ten sposób pasożyty przed naturalnymi mechanizmami odporności wrodzonej (unik odpornościowy), a ostatecznie przed lizą [9,33]. Wszystkie te obserwacje wyraźnie wskazują, że EVs uczestniczą w modulowaniu reakcji odpornościowych żywiciela i patogenezie trypanosomozy.

*Toxoplasma gondii* (typ Apicomplexa) jest powszechnym pasożytem zwierząt endotermicznych i człowieka. Ekstensywność zarażenia w populacji ludzkiej ocenia się na prawie 2 miliardy. Inwazja pasożyta ma przeważnie charakter asymptomatyczny, a burzliwy i zagrażający życiu przebieg obserwuje się u osobników z osłabioną odpornością (płody, chorzy na AIDS, biorcy przeszczepów traktowani immunosupresorami itp.). Dożywność nosicielstwo pasożyta (przewlekła, subkliniczna toksoplazmoza), okupującego preferencyjnie komórki układu nerwowego, wiąże się jednak ze zmianami behawioralnymi żywicieli, co wykazano w licznych badaniach przeprowadzonych u gryzoni [17,21]. Mechanizm patologicznego oddziaływania toksoplazmy na komórki zarażonego osobnika jest niewyjaśniony, ale można przypuszczać, że biorą w nim udział egzosomy samego pasożyta lub wytwarzane przez komórki żywicielskie. Warto podkreślić, że pionierskie badania nad możliwością wykorzystania egzosomów w profilaktyce chorób pasożytniczych wykonano na modelu *Toxoplasma gondii*. Ponieważ komórki dendrytyczne są profesjonalnymi i bardzo efektywnymi prezynterami antygenów [14] stymulowano linię komórek dendrytycznych mysich DC2.4 (H-2b) rozpuszczalnymi antygenami *T. gondii* i w podłożu pochodzącym metodą elektonomikroskopii wykazano obecność struktur typowych dla egzosomów („cup-shaped”) [1]. Po iniekcji dożylniej myszom C57Bl/6 (H-2b), egzosomy kierowały się preferencyjnie do śledziony („homing”) i wzbudzały silną uogólnioną odpowiedź immunologiczną komórkową z udziałem swoistych limfocytów Th1, która chroniła myszy przed rozwojem zarówno ostrej, jak i przewlekłej toksoplazmozy. Obserwowano przedłużenie czasu przeżycia myszy o 67%, w porównaniu do 20% u myszy kontrolnych szczepionych komórkami DC2.4 „niepulsowanymi” antygenem. Zanotowano także spadek liczby wytwarzanych cyst tkankowych pasożyta w mózgowiu o 75%. Wskazuje to, że egzosomy są bardzo skutecznym, bezkomórkowym materiałem szczepionkowym, łączącym funkcje antygeny i adiuwantu. Mechanizm stymulacji limfocytów T jest jednak niejasny. Egzosomy mogą bezpośrednio prezentować antygeny swoistym limfocytom T, ale nie można wykluczyć, że mogą być najpierw pobierane przez APC, w których bodziec: peptyd antygenowy-prezentująca cząsteczka MHC ulega wzmocnieniu [48]. Dalsze badania na modelu mysiej doświadczalnej toksoplazmozy wykazały, że egzosomy uwalniane przez komórki dendrytyczne indukują ochronę nie tyl-

ko w układzie syngenicznym, ale i allogenicznym [5]. W drugim przypadku, egzosomy są prawdopodobnie najpierw pobierane przez APC (pośrednia droga prezentacji antygeny). Stopień uzyskanej ochrony korelował z wytworzeniem dużego stężenia przeciwciał surowicznych IgG oraz wydzielniczych IgA w ślinie przewodu pokarmowego. Splenocyty stymulowane antygenami odpowiadały intensywnej proliferacją i wytwarzaniem IFN- $\gamma$ , a więc głównej ochronnej cytokiny w inwazji *T. gondii*. Uwzględniając szczególnie tragiczne skutki infekcji wewnątrzmacicznej *T. gondii*, spróbowano także zastosować egzosomy wydzielone z komórek dendrytycznych do profilaktyki toksoplazmozy wrodzonej [4]. Na myślim modelu doświadczalnym wykazano, że zwierzęta szczepione egzosomami były bardziej płodne niż szczepione rozpuszczalnym antygenem pasożyta. Podobnie korzystnie kształtowały się inne parametry, takie jak masa ciała i przeżywalność potomstwa. Zanotowano także, że wskutek szczepienia matek liczba cyst u noworodków obniżyła się o 65% w stosunku do grupy kontrolnej, nieszczepionej. Powyższe dane wskazują, że egzosomy uwalnione ze stymulowanych antygenem komórek dendrytycznych, wolne od DNA, mogą być rozważane jako szczepionka przeciw wrodzonej toksoplazmozie.

W związku z neurotropizmem i neuropatogennością *T. gondii* interesujące są wyniki wstępnych badań Pope i Läslera [40]. Zarazili oni *in vitro* komórki nabłonkowe linii HFF szczepem Prugniaud *T. gondii* i po 24-72 godz. w płynie pochodzącym stwierdzili obecność pęcherzyków o wielkości typowej dla egzosomów (< 100 nm). Używając do kontroli hodowli komórek HFF niezarażonych, ale stymulowanych do uwalniania egzosomów przez umieszczenie w pożywce bezsurowiczej, porównali profil mRNA i miRNA w wytwarzanych EVs. Infekcja powodowała bardzo znaczący (od kilku do kilkadziesiąt razy) wzrost stężenia mRNA dla czterech czynników o aktywności neurologicznej: Rab-13, EEF1A1 (eukaryotic translation elongation factor alpha1), tymozyny  $\beta$ 4 i homologa białka LLP, a wśród miRNA zanotowano wzrost miR-23 $\beta$ , który reguluje aktywność IL-17. Intrygującym pozostaje związek między powyższymi zmianami molekularnymi a zmianami behawioru zwierząt zarażonych *T. gondii*. Egzosomy pasożytniczych pierwotniaków, „eksportujące” ich białka na zewnątrz, mogą spowodować tolerancję pasożyta przez tłumienie odporności żywiciela lub przeciwnie, wzbudzać patologiczne reakcje zapalne [43,45].

## HELMINTY

Helminy to heterogenna grupa pasożytów, do której zaliczane są przywry, tasiemce, obleńce oraz pijawki i kolecogłowy. Częstość zarażeń pasożytami z tej grupy wśród ludzi jest bardzo duża, szacuje się bowiem, iż co czwarty mieszkaniec globu jest nosicielem co najmniej jednego gatunku helmita. Do najczęściej notowanych parazytoz powodowanych przez robaki zalicza się glistnicę (askariozę), schistosomozę (bilharczozę), trichuriozę oraz filariozę. Dane epidemiologiczne wskazują, że zarażenie tylko glistą ludzką (*Ascaris lumbricoides*)

dotyczy około 1,2-1,5 miliarda ludzi, żyjących głównie w rozwijających się krajach tropikalnych i subtropikalnych o niskich standardach higienicznych. Ponadto, inwazja *A. lumbricoides* powoduje około 60000 zgonów rocznie, przede wszystkim wśród dzieci, często wskutek towarzyszących tej pasożytozie poważnych komplikacji obejmujących najczęściej układ oddechowy lub pokarmowy [15,26,31].

O EVs pasożytniczych robaków wiadomo stosunkowo niewiele; pierwsze wzmianki pojawiły się wprawdzie już w latach 80. XX w. i dotyczyły np. *Taenia solium* [53], a potem *Hymenolepis di minima* [38] i *Echinococcus multilocularis* [28], ale dopiero w 2012 r. wykazano, że przywry (Trematoda) dwóch gatunków: *Echinostoma caproni* i *Faciola hepatica* uwalniają egzozomopodobne struktury, które mogą odgrywać zasadniczą rolę w komunikacji pasożyt-żywiela, bo są pobierane przez żywe komórki nabłonka jelitowego żywiciela [35]. Białka pęcherzyków są gatunkowo swoiste, ale zawierają domieszkę białek żywiciela. Mechanizm wydzielania EVs może tłumaczyć występowanie w preparatach ESP (excreted/secreted proteins) uzyskanych z helmintów, białek nietypowych, pozbawionych sekwencji sygnałowych, np. enolaza u przywry *Echinostoma caproni* [34] czy białko serpinopodobne u glisty świnińskiej *Ascaris suum* [52]. Obecność egzozomopodobnych pęcherzyków stwierdzono także u motyliczki wątrobowej *Dicrocoelium dendriticum* [6]. Wykazano wówczas po raz pierwszy, że EVs tego pasożyta zawierają oprócz licznych białek także miRNA. Enkapsulacja do białkowych pęcherzyków otoczonych lipidową błoną chroni cząsteczki miRNA przed działaniem nukleaz w płynach ustrojowych i warunkuje ich skuteczne oddziaływanie na organizm żywiciela przez potranskrypcyjną regulację aktywności jego genów, jak sugerują m.in. Hansen i wsp. [25] w odniesieniu do inwazji pasożytniczym nicieniem *Trichuris suis* u świń. Buck i wsp. [7], na modelu jelitowego nicienia *Heligmosomoides polygyrus* zaobserwowali, że egzozomy tego paso-

żyta zawierają, oprócz miRNA, pełnej długości Y RNA oraz białko Argonaute, wchodzące w skład kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex – kompleks wyciszający indukowany przez RNA), który bierze udział w wyciszaniu lub wyłączaniu ekspresji genów. Wprowadzenie donosowe takich egzozomów myszom hamowało wrodzone reakcje odpornościowe typu 2 na antygeny pleśni *Alternaria* i napływ eozynofili. Znacznie obniżoną ekspresję zauważono w przypadku mysiego genu *Dusp1*, głównego regulatora szlaku sygnałowego z udziałem MAPK (mitogen-associated protein kinase) oraz genu *IL-33R*, kodującego podjednostkę receptora *IL-33*, głównej cytokiny promującej rozwój swoistych limfocytów Th2 i odporności ochronnej w inwazjach wielokomórkowymi pasożytami.

Przyszłe badania powinny odpowiedzieć, czy EVs mogą być strukturami tarczowymi przy opracowywaniu nowych strategii diagnostyki, profilaktyki i terapii pasożytoz spowodowanych przez helminty.

## PODSUMOWANIE

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe są zróżnicowaną grupą struktur wydzielanych przez komórki prokariotów i eukariotów. Ich uwalnianie z komórek jest uniwersalnym mechanizmem komunikacji międzykomórkowej, ważnym zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patogenezie chorób o różnej etiologii, w tym w chorobach pasożytniczych. Szczególnie interesującym aspektem funkcji EVs jest ich rola w modulowaniu reakcji odpornościowych makroorganizmu na inwazje pasożytów [37]. Intensywne badania mechanizmu złożonych relacji pasożyt-żywiela, w których pierwszorzędną rolę pełnią EVs, doprowadziły nie tylko do poznania podstaw patogenezy chorób pasożytniczych, ale także do identyfikacji cząsteczek pasożytów (tj. powierzchniowych i wydzielniczo-wydalniczych białek), które mogą być wykorzystane jako molekularne tarcze w diagnostyce, profilaktyce i terapii chorób pasożytniczych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Aline F., Bout D., Amigorena S., Roingeard P., Dimier-Poisson I.: *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 4127-4137
- [2] Barteneva N.S., Maltsev N., Vorobjev I.A.: Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2013; 3: 49
- [3] Bayer-Santos E., Aguilar-Bonavides C., Rodrigues S.P., Cordero E.M., Marques A.F., Varela-Ramirez A., Choi H., Yoshida N., da Silveira J.F., Almeida I.C.: Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J. Proteome Res.*, 2013, 12, 883-897
- [4] Beauvillain C., Juste M.O., Dion S., Pierre J., Dimier-Poisson I.: Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*, 2009; 27: 1750-1757
- [5] Beauvillain C., Ruiz S., Guiton R., Bout D., Dimier-Poisson I.: A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microb. Infect.*, 2007; 9: 1614-1622
- [6] Bernal D., Trelis M., Montaner S., Cantalapiedra F., Galiano A., Hackenberg M., Marcilla A.: Surface analysis of *Dicrocoelium dendriticum*. The molecular characterization of exosomes reveals the presence of miRNAs. *J. Proteomics*, 2014; 105: 232-241
- [7] Buck A.H., Coakley G., Simbari F., McSorley H.J., Quintana J.F., Le Bihan T., Kumar S., Abreu-Goodger C., Lear M., Harcus Y., Ceroni A., Babayan S.A., Blaxter M., Ivens A., Maizels R.M.: Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat. Commun.*, 2014; 5: 5488
- [8] Campos F.M., Franklin B.S., Teixeira-Carvalho A., Filho A.L., de Paula S.C., Fontes C.J., Brito C.F., Carvalho L.H.: Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria J.*, 2010; 9: 327
- [9] Cestari I., Ansa-Addo E., Deolindo P., Inal J., Ramirez M.I.: *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J. Immunol.*, 2012; 188: 1942-1952

- [10] Couper K.N., Barnes T., Hafalla J.C.R., Combes V., Ryffel B., Secher T., Grau G.E., Riley E.M., de Souza J.B.: Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog.*; 2010; 6: e1000744
- [11] Coura J.R.: Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2013; 108: 962-967
- [12] Crescitelli R., Lässer C., Szabó T.G., Kittel A., Eldh M., Dianzani I., Buzás E.I., Lötvall J.: Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles*, 2013; 2: 20677
- [13] Damian R.T.: Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology*, 1997; 115, suppl.: S169-S175
- [14] Dimier-Poisson I., Aline F., Mevelec M.-N., Beauvillain C., Buzoni-Gatel D., Bout D.: Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 5254-5265
- [15] Dold C., Holland C.V.: *Ascaris* and ascariasis. *Microbes Infect.*, 2011; 13: 632-637
- [16] Dondorp A.M., Yeung S., White L., Nguon C., Day N.P., Socheat D., von Seidlein L.: Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010; 8: 272-280
- [17] Flegr J.: How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends Parasitol.*, 2013; 29: 156-163
- [18] Foroughi-Parvar F., Hatam G.: Vaccines for canine leishmaniasis. *Adv. Prev. Med.*, 2014; 2014: 569193
- [19] Franco J.R., Simarro P.P., Diarra A., Jannin J.G.: Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin. Epidemiol.*, 2014; 6: 257-275
- [20] Garcia-Silva M.R., Cabrera-Cabrera F., das Neves R.F., Souto-Padrón T., de Souza W., Cayota A.: Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. *BioMed Res. Int.*, 2014; 2014: 305239
- [21] Gatkowska J., Wiecezorek M., Dziadek B., Dzitko K., Dlugonska H.: Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. *Parasitol. Res.*, 2012; 111: 53-58
- [22] Geiger A., Hirtz C., Bécue T., Bellard E., Centeno D., Gargani D., Rossignol M., Cuny G., Peltier J.B.: Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiol.*, 2010; 10: 20
- [23] Ghosh J., Bose M., Roy S., Bhattacharyya S.N.: *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell Host Microbe*, 2013; 13: 277-288
- [24] Grüning C., Heiber A., Kruse F., Ungefehr J., Gilberger T.W., Spielmann T.: Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nat. Commun.*, 2011; 2: 165
- [25] Hansen E.P., Kringel H., Williams A.R., Nejsum P.: Secretion of RNA-containing extracellular vesicles by the porcine whipworm, *Trichuris suis*. *J. Parasitol.*, 2015; 101: 336-340
- [26] Harhay M.O., Horton J., Olliario P.L.: Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2010; 8: 219-234
- [27] Hassani K., Olivier M.: Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013; 7: e2185
- [28] Ito A., Kanazawa T., Nakao M., Sako Y., Ishikawa Y., Nakaya K.: Comparison of the antigenicity of protoscoleces and microvesicles of *Echinococcus multilocularis* prepared from rats. *J. Helminthol.*, 2001; 75: 355-358
- [29] Kumar R., Engwerda C.: Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin. Transl. Immunology*, 2014; 3: e13
- [30] Lambertz U., Silverman J.M., Nandan D., McMaster W.R., Clos J., Foster L.J., Reiner N.E.: Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *J. Leuk. Biol.*, 2012; 91: 887-899
- [31] Li Q.Y., Zhao D.H., Qu H.Y., Zhou C.N.: Life-threatening complications of ascariasis in trauma patients: a review of the literature. *World J. Emerg. Med.*, 2014; 5: 165-170
- [32] Mantel P.Y., Hoang A.N., Goldowitz I., Potashnikova D., Hamza B., Vorobjev I., Ghiran I., Toner M., Irimia D., Ivanov A.R., Barteneva N., Marti M.: Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe*, 2013; 13: 521-534
- [33] Mantel P.Y., Marti M.: The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell. Microbiol.*, 2014; 16: 344-354
- [34] Marcilla A., Perez-Garcia A., Espert A., Bernal D., Muñoz-Antoli C., Esteban J.G., Toledo R.: *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Exp. Parasitol.*, 2007; 117: 57-64
- [35] Marcilla A., Trelis M., Cortés A., Sotillo J., Cantalapiedra F., Minguez M.T., Valero M.L., Sánchez del Pino M.M., Muñoz-Antoli C., Toledo R., Bernal D.: Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*, 2012; 7: e45974
- [36] Martin-Jaular L., Nakayasu E.S., Ferrer M., Almeida I.C., del Portillo H.A.: Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One*, 2011; 6: e26588
- [37] Montaner S., Galiano A., Trelis M., Martin-Jaular L., del Portillo H.A., Bernal D., Marcilla A.: The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 433
- [38] Oaks J.A., Holy J.M.: *Hymenolepis diminuta*: two morphologically distinct tegumental secretory mechanisms are present in the cestode. *Exp. Parasitol.*, 1994; 79: 292-300
- [39] Pantaleo A., Ferru E., Vono R., Giribaldi G., Lobina O., Nepveu F., Ibrahim H., Nallet J.P., Carta F., Mannu F., Pippia P., Campanella E., Low P.S., Turrini F.: New antimalarial indolone-N-oxides, generating radical species, destabilize the host cell membrane at early stages of *Plasmodium falciparum* growth: role of band 3 tyrosine phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 52: 527-536
- [40] Pope S.M., Lässer C.: *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J. Extracell. Vesicles*, 2013; 2: 22484
- [41] Regev-Rudzki N., Wilson D.W., Carvalho T.G., Sisqueira X., Coleman B.M., Rug M., Bursac D., Angrisano F., Gee M., Hill A.F., Baum J., Cowman A.F.: Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell*, 2013; 153: 1120-1133
- [42] Silverman J.M., Chan S.K., Robinson D.P., Dwyer D.M., Nandan D., Foster L.J., Reiner N.E.: Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.*, 2008; 9: R35
- [43] Silverman J.M., Clos J., de Oliveira C.C., Shirvani O., Fang Y., Wang C., Foster L.J., Reiner N.E.: An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J. Cell Sci.*, 2010; 123: 842-852
- [44] Silverman J.M., Clos J., Horakova E., Wang A.Y., Wiesgigl M., Kelly I., Lynn M.A., McMaster W.R., Foster L.J., Levings M.K., Reiner N.E.: *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.*, 2010; 185: 5011-5022
- [45] Silverman J.M., Reiner N.E.: Exosomes and other microvesicles in infection biology: Organelles with unanticipated phenotypes. *Cell. Microbiol.*, 2011; 13: 1-9
- [46] Silverman J.M., Reiner N.E.: *Leishmania* exosomes deliver pre-emptive strikes to create an environment permissive for early in-

fection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012; 1: 26

[47] Spycher C., Rug M., Klonis N., Ferguson D.J., Cowman A.F., Beck H.P., Tilley L.: Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 2006; 26: 4074-4085

[48] Thery C., Duban L, Segura E., Veron P., Lantz O., Amigorena S.: Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 1156-1162

[49] Torrecilhas A.C., Schumacher R.I., Alves M.J., Colli W.: Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microb. Infect.*, 2012; 14: 1465-1474

[50] Trocoli Torrecilhas A.C., Tonelli R.R., Pavanelli W.R., da Silva J.S., Schumacher R.I., de Souza W., E Silva N.C., de Almeida Abrahamsohn I., Colli W., Manso Alves M.J.: *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect.*, 2009; 11: 29-39

[51] van Zandbergen G., Klinger M., Müller A., Dannenberg S., Ge-

bert A., Solbach W., Laskay T.: Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.*, 2004; 173: 6521-6525

[52] Wang T., Van Steendam K., Dhaenens M., Vlamincck J., Deforce D., Jex A.R., Gasser R.B., Geldhof P.: Proteomic analysis of the excretory-secretory products from larval stages of *Ascaris suum* reveals high abundance of glycosyl hydrolases. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013; 7: e2467

[53] Willms K., Merchant M.T.: The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. *Parasite Immunol.*, 1980; 2: 261-275

[54] Wójtowicz A., Baj-Krzyworzeka M., Baran J.: Charakterystyka i znaczenie biologiczne mikropęcherzyków błonowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 1421-1432

---

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.