

2015



**WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Katarzyna Dzitko

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**„Rola naturalnych oraz syntetycznych
związków w przebiegu zarażenia pasożytniczym
pierwotniakiem *Toxoplasma gondii*”**



Spis treści	strona
I. DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	3
II. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU	4
III. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	5
IV. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	6
V. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH PRZEDŁOŻONYCH DO OCENY	8
VI. OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	11
<u>Etap I.</u>	
Rola prolaktyny (PRL) w naturalnych mechanizmach ograniczających rozwój toksoplazmozy.	11
Cel 1:	
Wykazanie związku pomiędzy częstością zarażenia <i>T. gondii</i> a poziomem prolaktyny (PRL) u ludzi.	12
Cel 2:	
Wyjaśnienie, czy prolaktyna hamuje bezpośrednio czy pośrednio proces wewnątrzkomórkowej proliferacji pierwotniaka.	14
Cel 3:	
Wykazanie zdolności wiązania prolaktyny przez żywe tachyzoity <i>T. gondii</i> .	17
<u>Etap II.</u>	21
Potencjalne zastosowanie w terapii toksoplazmozy tiosemikarbazydów i triazoli.	
Cel 4:	
Ocena aktywności przeciwpasożytniczej 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu oraz s-triazoli wobec <i>T. gondii in vitro</i> .	21
VII. BIBLIOGRAFIA	26
VIII. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	27
1. PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH	27
2. PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH	28
2.1. SEROLOGICZNE MARKERY TOKSOPLAZMOZY	28
2.2. WIĄZANIE LUDZKICH TRANSFERYN PRZEZ <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	29
2.3. KONSTRUKCJA EKSPERYMENTALNYCH SZCZEPIONEK PRZECIWKO TOKSOPLAZMOZIE ORAZ OCENA ICH DZIAŁANIA	30
2.4. BEHAWIORALNE NASTĘPSTWA ZARAŻENIA <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	32
2.5. PROTEOMY BAKTERYJNE, GRZYBICZE I ROŚLINNE	33
2.6. BADANIA BIOLOGICZNE, CYTOTOKSYCZNOŚĆ, PROLIFERACJA	34
IX. DANE BIBLIOMETRYCZNE	35

I. DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

doktor nauk biologicznych
dyscyplina: biologia,
nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii
i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział
Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu
Łódzkiego,
Łódź, grudzień 2002

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Identyfikacja antygenów pasożyta *Toxoplasma gondii* oraz swoistych przeciwciał wytwarzanych przez jego żywicieli*”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Henryki Długońskiej

magister biologii
dyscyplina: biologia
specjalność: mikrobiologia

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział
Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu
Łódzkiego,
Łódź, czerwiec 1998

Tytuł pracy magisterskiej: „*Produkcja interferonu gamma (IFN- γ) i przeciwciał antykolagenowych u myszy C57BL/6 i DBA/2 szczepionych kolagenem typu II (CII)*”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Gościckiej

II. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU

1. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

adiunkt 2003 – obecnie	Zakład Immunoparazytologii Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki Łódź
asystent 2002 – 2003	Zakład Immunoparazytologii Instytut Mikrobiologii i Immunologii Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Łódzki Łódź
doktorant 1998 – 2002	Zakład Immunoparazytologii Instytut Mikrobiologii Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Łódzki Łódź

III. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

1. **Wskazanie osiągnięcia naukowego** * wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

* W przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstawanie (załącznik Z7a)

„Rola naturalnych oraz syntetycznych związków w przebiegu zarażenia pasożytniczym pierwotniakiem *Toxoplasma gondii*”

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl 8 **oryginalnych publikacji naukowych**, 2 **prac przeglądowych** oraz 2 **patentów**, których **sumaryczny IF** podany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi: **14,038**.

Suma punktów MNiSW podana zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych z dnia 17 grudnia 2013 / sumę punktów podanych zgodnie z ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych ogłoszonych w roku ukazania się publikacji wynosi:

195 / 169.

IV. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Lp.	Dane bibliograficzne (prace doświadczalne)	IF	punkty MNiSW
1.	Dzitko, K. , Malicki S., Komorowski J. Effect of hyperprolactinaemia on <i>Toxoplasma gondii</i> prevalence in humans. Parasitol Res 2008 ; 102:723-729.	1,473	15 ²⁰⁰⁸ 30 ²⁰¹³
2.	Dzitko, K. , Gatkowska, J., Lawnicka, H., Komorowski, J., Długoska, H. The relationship between the level of selected hormones in women sera and the frequency of <i>Toxoplasma</i> infection. Medimond S.r.l. 2007 ; 24-29.	-	-
3.	Dzitko, K. , Gatkowska, J., Płociński, P., Dziadek, B., Długońska, H. The effect of prolactin (PRL) on the growth of <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites <i>in vitro</i> . Parasitol Res 2010 ; 107:199-204. doi: 10.1007/s00436-010-1849-3.	1,872	20 ²⁰¹⁰ 30 ²⁰¹³
4.	Dzitko, K. , Dudzińska, D., Grzybowski, M., Długońska, H. The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted <i>in vitro</i> with <i>Toxoplasma gondii</i> . Wiadomości Parazytologiczne 2010 ; 56:145-152. (obecnie Annals of Parasitology)	-	6 ²⁰¹⁰ 5 ²⁰¹³
5.	Dzitko, K. , Ławnicka, H., Gatkowska, J., Dziadek, B., Komorowski, J., Długońska, H. Inhibitory effect of prolactin on <i>Toxoplasma</i> proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia. Parasite Immunol 2012 ; 34:302-311. doi: 10.1111/j.1365-3024.2012.01359.x.	2,288	25 ²⁰¹² 25 ²⁰¹³
6.	Dzitko, K. , Dziadek, B., Gatkowska, J., Długońska, H. <i>Toxoplasma gondii</i> binds sheep prolactin. Exp Parasitol 2013 ; 134:216-219. doi: 10.1016/j.exppara.2013.02.010	1,859	25 ²⁰¹³ 25 ²⁰¹³
7.	Dzitko, K. , Paneth, A., Plech, T., Pawełczyk, J., Stączek, P., Stefańska, J., Paneth, P. 1,4-Disubstituted thiosemicarbazide derivatives are potent inhibitors of <i>Toxoplasma gondii</i> proliferation. Molecules 2014 ; 19:9926-9943. doi: 10.3390/molecules19079926.	2,095	30 ²⁰¹³ 30 ²⁰¹³
8.	Dzitko, K. , Paneth, A., Plech, T., Pawełczyk, J., Węglińska, L., Paneth, P. Triazole-based compound as the candidate to develop a novel medicines to treat toxoplasmosis. Antimicrob Agents Chemother 2014 ; 58:7583-75835. doi: 10.1128/AAC.03832-14	4,451	40 ²⁰¹³ 40 ²⁰¹³

<p>9. Siwek, A. (50%), Dzitko, K. (50%) Zastosowanie medyczne pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu. zgłoszenie patentowe oznaczone numerem P.400583 z dnia 2012-08-30 nazwa urzędu rozpatrującego wniosek o udzielenie patentu: Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej data publikacji PUB: 2014-03-03</p>	patent	decyzja z dn. 03. 03. 2015 r.	
<p>10. Siwek, A. (50%), Dzitko, K. (50%) Zastosowanie medyczne 3-(tiofen-2-ylo)-1,2,4-triazolo-5-tionu. zgłoszenie patentowe oznaczone numerem P.400583 z dnia 2012-08-30 nazwa urzędu rozpatrującego wniosek o udzielenie patentu: Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej data publikacji PUB: 2014-03-03</p>	patent	decyzja z dn. 03. 03. 2015 r.	
Dane bibliograficzne (prace przeglądowe)		IF	punkty MNiSW
<p>11. Płociński, P., Dzitko, K., Długońska, H. Prolactin as a modulator of antiparasitic immunity [Prolaktyna jako modulator odporności przeciw pasożytniczej.] Wiadomości Parazytologiczne / Annals of Parasitology 2007; 53 (4), pp. 263-270</p>	-	4 ²⁰⁰⁷ 5 ²⁰¹³	
<p>12. Długońska, H., Dzitko, K. Hormones and immunity to parasitic apicomplexans [Hormony a odporność przeciw pasożytniczym pierwotniakom typu Apicomplexa.] Wiadomości Parazytologiczne / Annals of Parasitology 2009; 55 (2), pp. 101-108</p>	-	4 ²⁰⁰⁷ 5 ²⁰¹³	
<p>IF podane zgodnie z rokiem ukazania się publikacji Punkty MNiSW podane zgodnie z: ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych ogłoszonych w roku ukazania się publikacji / z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych z dnia 17 grudnia 2013</p>		14,038	169/195

Finansowanie i współpraca:

Prowadzone przeze mnie prace naukowe, stanowiące monotematyczny cykl publikacji, finansowane były przez Komitet Badań Naukowych w ramach kierowanego przeze mnie grantu pt. „Rola prolaktyny w odporności ludzi na zarażenie *Toxoplasma gondii*”, nr NN401 232334 (etap I) oraz częściowo współfinansowane (etap I) lub finansowane (etap II) w ramach działalności własnej i statutowej Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Interdyscyplinarny charakter prowadzonych przeze mnie badań wymagał nawiązania współpracy krajowej z różnymi ośrodkami badawczymi: Katedrą Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (prof. dr. hab. Janem Komorowskim, dr hab. Hanną Ławnicką), Katedrą i Zakładem Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (dr hab. n med. Agatą Paneth), Instytutem Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej (prof. dr hab. inż. Piotrem Panethem) oraz Polską Akademią Nauk (prof. dr. hab. Jarosławem Dziadkiem).

V. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH PRZEDŁOŻONYCH DO OCENY

WPROWADZENIE

Toksoplazmoza, to choroba wywołana przez kosmopolitycznego pierwotniaka z rodzaju *Toxoplasma*, obejmującego tylko jeden gatunek *Toxoplasma gondii*, u którego, tak jak u innych przedstawicieli podtypu Apicomplexa, można wyróżnić dwie fazy cyklu rozwojowego. Pierwsza nazywana jest płciową (sporogonia) i zachodzi w układzie pokarmowym wszystkich kotowatych (jedynych żywicieli ostatecznych). Druga natomiast jest bezpłciowa (schizogonia) i przebiega w organizmie różnych ptaków, ssaków oraz ludzi (żywicieli pośrednich) [1]. Toksoplazmoza pozostaje wciąż problemem globalnym, ze względu na wyjątkowo wysoką prevalencję stwierdzoną na podstawie badań serologicznych, zarówno u ludzi, jak i zwierząt hodowlanych [2]. Ta wysoka ekstensywność zarażenia jest skutkiem częstego kontaktu wszystkich stałocieplnych makroorganizmów z oocystami (zawierającymi sporozoity) wydalانymi przez koty do środowiska oraz cystami tkankowymi (wypełnionymi bradyzoitami) spożywanymi wraz z surowym mięsem lub przekazywanymi biorcy od zarażonego dawcy wraz z przeszczepem narządów (toksoplazmoza nabyta). Rzadziej dochodzi do zarażenia tachyzoitami, co zdarza się podczas przezłożyskowej transmisji *Toxoplasma* z matki na płód (toksoplazmoza wrodzona) oraz wyjątkowo rzadko w laboratorium.

Toxoplasma gondii jest obligatoryjnym wewnątrzkomórkowym pasożytem, aktywnie i bardzo szybko penetrującym wszystkie jądrzaste komórki żywiciela, co sprzyja kolonizacji zasiedlanego organizmu. Wytworzona odpowiedź komórkowa i humoralna u osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym szybko ogranicza proces intensywnej proliferacji pasożyta, ale nie eliminuje go z organizmu żywiciela. Skutkuje to długotrwałym nosicielstwem objawiającym się obecnością cyst tkankowych, umiejscowionych głównie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), mięśniach i gałce ocznej. Nosicielstwo *T. gondii*, związane z długotrwałą obecnością pasożyta w OUN, koreluje prawdopodobnie z występowaniem poważnych chorób o podłożu nerwowym (schizofrenia, choroba Parkinsona czy epilepsja) oraz indukuje zmiany zachowania zarówno u ludzi, jak i zwierząt [3, 4]. Najpoważniejsze postaci choroby, a nawet zgon, pierwotniak ten powoduje u osób z obniżoną odpornością (np. chorych na AIDS, biorców przeszczepów tkankowych itp.). Dochodzi wówczas do niekontrolowanej proliferacji tachyzoitów (powstałych z uwolnionych z cyst bradyzoitów), podobnie

jak w przypadku płodów zarażonych *in utero* w pierwszym trymestrze ciąży, u matek z pierwotnym zarażeniem. Wywoływana przez tego pierwotniaka choroba, u ludzi może prowadzić do uszkodzenia wzroku czy słuchu, a u chorych na AIDS może przybrać ostrzejszą formę [5, 6].

Obecnie jedynymi, skutecznymi sposobami przeciwdziałania groźnym następstwom zarażenia *Toxoplasma* jest przede wszystkim profilaktyka, w tym zwiększenie świadomości kobiet planujących potomstwo oraz wczesna diagnoza ciężarnej i noworodka, gdyż nadal nie opracowano skutecznego leczenia i sposobu eradykacji pasożyta z organizmu. Niestety nie istnieje także skuteczna szczepionka chroniąca przed rozwojem zarażenia czy też reaktywacją uśpionych bradyzoitów. Jedynym zarejestrowanym w Wielkiej Brytanii oraz Nowej Zelandii (od 1992 roku) i sprzedawanym w krajach europejskich preparatem szczepionkowym stosowanym u owiec jest „Toxovax” zawierający atenuowane tachyzoity *T. gondii* zmutowanego szczepu S48. Niestety szczepionka ta nie zapobiega wertykalnej transmisji pasożyta, a jedynie przyczynia się do obniżenia częstości poronień [7].

W leczeniu toksoplazmozy używa się wielu leków (najczęściej z grupy antagonistów kwasu foliowego, – np. pirymetamina w skojarzeniu z sulfadiazyną), działających głównie na szybko namnażające się tachyzoity, a zatem zmniejszających jedynie stopień uszkodzenia tkanek w trakcie ostrej fazy inwazji [8]. Ponadto stosowane leki powodują szereg skutków ubocznych takich jak: reakcje uczuleniowe, leukopenia, niedokrwistość, trombocytopenia oraz zaburzenia rytmu serca, przewodzenia pokarmowego i pigmentacji skóry [9]. Coraz częściej obserwuje się zjawisko lekooporności na leki używane w terapii od wielu lat. Tak więc, poszukiwanie mniej toksycznych związków, skutecznie działających na wszystkie stadia rozwojowe pasożyta, jest kluczowe w zwalczaniu toksoplazmozy. Podejmowane są **starania służące opracowaniu swoistej immunoprofilaktyki** (szczepionki ochronnej wzbudzającej silną odpowiedź immunologiczną, skutecznie zabezpieczającą przed rozwojem toksoplazmozy) oraz **pozyskaniu nowych syntetycznych związków czy też alternatywnych, naturalnych preparatów leczniczych wyizolowanych z roślin**.

Obszar moich zainteresowań naukowo-badawczych, które znalazły swój wyraz w cyklu publikacji przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne obejmuje poszukiwanie nowych związków chemicznych (naturalnych i syntetycznych) o aktywności przeciw-*Toxoplasma gondii* wraz z oceną ich potencjalnego wykorzystania w leczeniu. Przesłanką do podjęcia takich badań było nie tylko wzrastające kliniczne i socjoekonomiczne znaczenie toksoplazmozy, ale również udokumentowany fakt braku w pełni skutecznych leków, działających na wszystkie stadia rozwojowe pierwotniaka i nietoksycznych dla komórek żywicielskich. Zatem poszukiwanie nowych, bardziej efektywnych chemioterapeutyków lub ich naturalnych zamienników jest aktualne, uzasadnione i ważne, zarówno

pod względem poznawczym, jak i potencjalnie aplikacyjnym. Badania prowadzono na odpowiednio dobranej populacji ludzi, wykorzystując jako materiał osocze, surowicę i komórki krwi, a także liniach komórkowych ludzkich i mysich oraz komórkach wyizolowanych bezpośrednio od myszy wsobnych ze zdeterminowaną naturalną wrażliwością na toksoplazmozę. Trzon pracy stanowi 6 publikacji oryginalnych oraz 2 prace przeglądowe, opisujące udział prolaktyny w przebiegu zarażenia *T. gondii*. W skład osiągnięcia naukowego wchodzi także 2 prace doświadczalne oraz 2 patenty wskazujące na możliwe zastosowanie w terapii toksoplazmozy tiosemikarbazydów i triazoli.

VI. OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(z podaniem, dla każdego etapu przedstawianej pracy celu, osiągnięć i możliwych zastosowań)

Etap I.

Rola prolaktyny (PRL) w naturalnych mechanizmach ograniczających rozwój toksoplazmozy.

Podatność na zarażenia *T. gondii* uzależniona jest przede wszystkim od stanu układu immunologicznego żywiciela oraz stężenia czynników modulujących funkcje układu hormonalnego i nerwowego. Jednym z takich modulatorów jest prolaktyna (PRL), której najbardziej oczywistym i prawdopodobnie głównym działaniem związanym z adaptacją organizmu matki do okresu ciąży jest pobudzenie laktacji w okresie poporodowym, dlatego też wysoki poziom tego hormonu obserwuje się we krwi kobiet ciężarnych i karmiących. Hormon ten wydzielany jest nie tylko przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej, ale także przez rozwijające się łożysko. Działając zwrotnie na komórki mózgu, PRL odpowiada za zmiany behawioralne w czasie ciąży takie jak: zmniejszenie lękliwości, zwiększenie agresywności w celu ochrony potomstwa czy radzenie sobie z wymogami metabolicznymi (zwiększenie apetytu, odkładanie tłuszczu). Wpływowi PRL przypisuje się wiele innych działań u ssaków obojga płci, jednak ich znaczenie fizjologiczne pozostaje niejasne. Z przeprowadzonych badań wynika ponad 300 czynności wiążących się z funkcją PRL, wśród różnych grup kręgowców [10, 11]. PRL jest syntetyzowana i wydzielana nie tylko przez komórki przysadki, ale również przez wiele innych komórek i tkanek. Ekspresję genu dla tego hormonu stwierdzono także w grasicy, śledzionie, limfocytach krążących, gruczole łzowym, szpiku kostnym i fibroblastach skóry [12, 13, 14]. Wykazano udział PRL w różnych etapach cyklu komórkowego (wzrost, różnicowanie, apoptoza), a także hematopoezie, angiogenezie czy krzepnięciu krwi. Dowiedziono ponadto, iż PRL pełni funkcję cytokiny, będąc istotnym regulatorem układu odpornościowego [15]. Wpływ PRL na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej organizmu wskazują, iż hormon ten może modulować odporność na zarażenia pasożytnicze czy bakteryjne. Poprzez aktywację wielu typów komórek PRL jest hipotetycznie w stanie ograniczyć rozwój infekcji i przyspieszyć proces zdrowienia.

Pomimo doniesień o potencjalnej aktywności przeciwpasożytniczej PRL [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22], w literaturze brak było artykułów naukowych poświęconych systematycznym badaniom biologicznym tego hormonu, a te dostępne skierowały moje poszukiwania naukowe do zgłębienia

wiedzy w celu pozyskania informacji, czy podwyższony poziom jednego z głównych hormonów ciążowych – PRL, może przyczyniać się do hamowania rozwoju zarażenia, reaktywacji czy reinwazji *T. gondii*. Badania z tego zakresu u ludzi są pionierskie w skali światowej, bowiem nie były i nie są prowadzone w innych jednostkach naukowych.

<p><u>Etap I.</u></p> <p>Cel 1:</p> <p>Wykazanie związku pomiędzy częstością zarażenia <i>T. gondii</i> a poziomem prolaktyny (PRL) u ludzi.</p>	<p>Medimond S.r.l. 2007;24-29.</p> <p>The relationship between the level of selected hormones in women sera and the frequency of <i>Toxoplasma</i> infection.</p> <p>Dzitko, K., Gatkowska, J., Lawnicka, H., Komorowski, J., Długowska, H.</p>	1
	<p>Parasitol Res (2008) 102:723–729 DOI 10.1007/s00436-007-0824-0</p> <p>ORIGINAL PAPER</p> <p>Effect of hyperprolactinaemia on <i>Toxoplasma gondii</i> prevalence in humans</p> <p>Katarzyna Dzitko · Sebastian Malicki · Jan Komorowski</p>	2

W celu weryfikacji postawionej hipotezy, że hormony mają istotne znaczenie w przebiegu zarażenia pasożytniczym pierwotniakiem *T. gondii* i mogą stanowić naturalny mechanizm ograniczający rozwój toksoplazmozy, w badaniach pilotażowych sprawdzono występowanie korelacji między częstością zarażenia *T. gondii* w populacji ludzkiej a poziomem: testosteronu (T), wolnego testosteronu (FT), białka transportowego SHBG (sex hormone binding globulin), progesteronu, hydroksykortyzonu, estradiolu, progesteronu, tyroksyny (FT4), trójjodotyroniny (FT3), hormonu stymulującego tarczycę (TSH), hormonu folikulotropowego (FSH), hormonu luteinizującego (LH), hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEA-S) [[publikacja nr 1](#) i [nr 2](#)] oraz prolaktyny (PRL) w surowicy [[publikacja nr 2](#)].

Wstępna analiza mająca na celu porównanie seroprewalencji *T. gondii* w populacji pacjentów z poziomem hormonów poniżej i powyżej normy (w stosunku do osób z fizjologicznym poziomem) wskazała, iż jedynie w grupie kobiet z hiperprolaktynemią i hipertestosteronemią procent zarażenia jest niższy niż w grupie kontrolnej. Podobnie, specyficzne przeciwciała przeciw-*T. gondii* występowały częściej w populacji kobiet z fizjologicznym poziomem białka transportowego SHBG oraz DHEA-S, w porównaniu z grupą kobiet z podwyższonym poziomem tych hormonów. Otrzymane wyniki oraz dane literaturowe [23, 24, 25] pozwoliły na wysunięcie wniosku o możliwej ochronnej roli ww. hormonów w przebiegu zarażenia *T. gondii*.

Szczegółową analizę (ze względu na liczną grupę przypadków) przeprowadzono na surowicach uzyskanych od kobiet z hiperprolaktynemią. Fizjologiczny poziom, który dla kobiet waha się w zakresie od 2 do 23,5 ng/ml, był podstawą do wyznaczenia współczynnika różnicy pomiędzy ww. wartościami, na podstawie którego wydzielono 4 podgrupy pacjentek z 2-, 3-, 4- i 5x wartościami przekraczającymi zakres poziomu fizjologicznego. Wykazano, iż w tak wytyczonych grupach seroprewalencja toksoplazmozy spadała wprost proporcjonalnie w stosunku do wzrastającego poziomu hormonu, choć statystycznie znaczące wyniki uzyskano jedynie dla grupy kobiet (N=32) z bardzo wysokim poziomem PRL (>86 ng/ml). Wartość seroprewalencji w tej grupie wynosiła 12,5% w stosunku do grupy kontrolnej, w której zarejestrowano aż 45,58%. W celu zbadania etiologii hiperprolaktynemii w ww. grupie kobiet analizowano poziom PRL w 0, 60 i 120 min po doustnym podaniu blokera antydopaminergicznego, metyloklopramidu (MCP). U osób zdrowych wydzielanie hormonu nie jest wówczas hamowane przez dopaminę. W warunkach prawidłowych stężenie PRL wzrasta 2-5x po 60 min i wzrost w tych granicach utrzymuje się przez kolejną godzinę. W przypadku *prolactinoma* brak jest zwykle odpowiedzi na MCP lub jest ona niewielka. Zastosowanie tej nieinwazyjnej procedury diagnostycznej, w celu potwierdzenia lub wykluczenia guza przysadki jako przyczyny hiperprolaktynemii, pozwoliło ustalić, iż u 23 z 32 kobiet (71,9%) z bardzo wysokimi poziomami PRL (> 86 ng/ml) nie zaobserwowano wzrostu poziomu badanego hormonu po podaniu MCP, wskazując na obecność *macroprolactinoma* lub *microprolactinoma*. Przypuszczenia te zostały potwierdzone metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) lub tomografii komputerowej (CT). W pozostałych sześciu przypadkach MCP nie zahamował wydzielania PRL (> 150 ng/ml), co wskazywało, iż zwiększony poziom hormonu (przed podaniem blokera) spowodowany był innym czynnikiem niż *prolactinoma*. Dalsza analiza dokumentacji medycznej w sześciu przypadkach, o których mowa powyżej, wykazała zaburzenia czynnościowe spowodowane podawaniem leków antydepresyjnych (w dwóch przypadkach) i ciąży (jeden przypadek). Wśród tych 23 pacjentek, u których ze względu na *prolactinoma* występuje stały stymulujący wpływ PRL, seroprewalencja toksoplazmozy wynosiła 8,7%. Wiek kobiet w tej grupie wahał się od 21 do 69 lat. U pacjentek z grupy kontrolnej, z tego samego przedziału wiekowego seroprewalencja wynosiła 44,98% (p=0,02). Tylko u dwóch pacjentek z guzem przysadki wykryto przeciwciała przeciwko *T. gondii*, ale nawet u tych pacjentek nie można wykluczyć ochronnej roli PRL w przebiegu zarażenia *Toxoplasma*. Bardzo niski poziom przeciwciał IgG i IgM sugeruje przewlekły charakter choroby, a wysoki poziom awidności IgG wyklucza możliwość zarażenia w ciągu ostatnich 5 miesięcy. Zarażenie mogło się więc wydarzyć przed rozwojem guza, czyli przed znacznym wzrostem poziomu PRL.

Zmiany stężenia PRL w przebiegu różnych pasożytów wywołanych przez *Leishmania infantum* [19], *Neospora bovis* [22], *Plasmodium falciparum* [21], *Trypanosoma cruzi* [20], *Acanthamoeba castellanii* [18] lub *Toxoplasma gondii* [16, 17] zostały częściowo opisane, aczkolwiek bez dogłębnej analizy problemu, a jedynie jako pośrednie sugestie. Z przytoczonych danych jasno wynika, iż jednym z hormonów wykazujących bardzo szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym prawdopodobne efekty przeciwpasożytnicze, jest PRL. Nadal pozostaje zatem otwarte pytanie, czy wysoki poziom PRL wykazuje ochronną rolę podczas infekcji tak licznej grupy pierwotniaków pasożytujących we krwi i tkankach, w tym *T. gondii*.

<p>Etap I.</p> <p>Cel 2:</p> <p>Wyjaśnienie, czy prolaktyna hamuje bezpośrednio czy pośrednio proces wewnątrzkomórkowej proliferacji pierwotniaka.</p>	<p>Parasitol Res DOI 10.1007/s00436-010-1849-3</p> <p>SHORT COMMUNICATION</p> <p>The effect of prolactin (PRL) on the growth of <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites in vitro</p> <p>Katarzyna Dzitko · Justyna Gatkowska · Przemysław Płociński · Bożena Dziadek · Henryka Długońska</p>	3
	<p>Wiadomości Parazytologiczne 2010, 56(2), 145–152 Copyright© 2010 Polskie Towarzystwo Parazytologiczne</p> <p>The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted <i>in vitro</i> with <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites</p> <p>Katarzyna Dzitko, Dominika Dudzińska, Marcin Grzybowski, Henryka Długońska</p>	4
	<p>Parasite Immunology</p> <p><i>Parasite Immunology</i>, 2012, 34, 302–311 DOI: 10.1111/j.1365-3024.2012.01359.x</p> <p>Inhibitory effect of prolactin on <i>Toxoplasma</i> proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia</p> <p>K. DZITKO,¹ H. LAWNIKA,² J. GATKOWSKA,¹ B. DZIADEK,¹ J. KOMOROWSKI² & H. DLUGOŃSKA¹</p>	5

Opisana przeze mnie po raz pierwszy obserwacja dodatniej korelacji między podwyższonym poziomem PRL we krwi, a obniżoną seroprewalencją toksoplazmozy u ludzi była przesłanką do weryfikacji kolejnej postawionej hipotezy, że **PRL uniemożliwia bądź też hamuje proces wewnątrzkomórkowej replikacji pierwotniaka (bezpośrednio), oraz że jej działanie związane jest ze wzmożoną aktywnością mediatorów układu hormonalnego wobec komórek docelowych układu odpornościowego (pośrednio), prowadząc do stopniowej eradykacji pasożyta z organizmu.** Opisane w literaturze przedmiotu przykłady wpływu PRL na reakcje immunologiczne organizmu wskazują, iż hormon ten może istotnie modulować odporność w zarażeniach pasożytniczych. Poprzez aktywację wielu typów komórek, w tym komórek układu odpornościowego [10, 11], PRL może hipotetycznie

ograniczać rozwój infekcji i przyspieszać proces odnowy prawidłowej odpowiedzi immunologicznej, naruszonej przez inwazję pasożyta. W badaniach wykonanych na modelu doświadczalnej toksoplazmozy u myszy poznano niektóre wskaźniki biologiczne i immunologiczne aktywności przeciwprzywotniakowej PRL [16, 17]. Nie opisano natomiast, jaki był wpływ tego hormonu na odporność przeciw *T. gondii* u ludzi.

W celu uzyskania odpowiedzi na postawione pytanie, czy PRL działa bezpośrednio czy pośrednio na pasożyta zakłócając jego aktywność życiową, a w konsekwencji proces proliferacji i cykl rozwojowy wykonano szereg doświadczeń *in vitro* na liniach komórkowych ludzkich, jak i zwierzęcych charakteryzujących się brakiem receptora dla PRL [publikacja nr 3 i nr 4] oraz leukocytach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC), wyizolowanych od osób z hiperprolaktynemią czynnościową, a zatem w komórkach żywicielskich stymulowanych długotrwale hormonem w warunkach *in vivo* [publikacja nr 5]. W pierwszym etapie, po optymalizacji warunków hodowlanych, określono wpływ rekombinowanej ludzkiej prolaktyny (rhPRL) na przebieg zarażenia *T. gondii*. W drugim etapie natomiast oznaczono intensywność proliferacji tachyzoitów *T. gondii* w obecności egzogennej rhPRL i autologicznej tj. surowiczej prolaktyny (sPRL) oraz oceniono poziom cytokin charakterystycznych dla limfocytów Th1 (IFN- γ) versus Th2 (IL-10), mających antagonistyczny wpływ na różne aspekty sterowania mechanizmami odpornościowymi.

Uzyskane wyniki wskazały [publikacja nr 3 i nr 4], że rhPRL nie wpływa negatywnie na żywotność (określoną poprzez ich aktywność metaboliczną w stosunku do soli tetrazoliowej – MTT) ani tachyzoitów *T. gondii*, ani komórek żywicielskich linii L-929, HeLa i Hs27. Zaobserwowano natomiast, że już 30 minutowa wstępna inkubacja pasożyta w obecności rhPRL (20 ng/ml) istotnie hamuje intensywność jego namnażania w założonych hodowlach ciągłych. Czas ten był wystarczający do obniżenia stopnia proliferacji pierwotniaka i przedłużenie działania rhPRL nawet do 180 min nie skutkowało dalszym ograniczeniem tego procesu. Kolejne badania z użyciem fibroblastów ludzkich Hs27 pozwoliły ustalić, który etap namnażania jest punktem docelowym dla rhPRL. Stwierdzono, że hormon w stężeniu 20 i 100 ng/ml znacząco upośledza wnikanie pierwotniaka do komórek żywicielskich, niezależnie od czasu ekspozycji pasożyta na rhPRL (30-180 min), natomiast nie wpływa w istotny sposób na samo tempo wewnątrzkomórkowych podziałów wyrażone liczbą potomnych tachyzoitów przypadających na jedną zarażoną komórkę Hs27. Molekularne mechanizmy obserwowanego zahamowania wzrostu tachyzoitów *T. gondii* nie są znane. Być może podczas hipotetycznego wiązania się PRL z białkami powierzchniowymi tachyzoitów blokowane są receptory pasożyta, odpowiedzialne za rozpoznawanie ligandów komórek gospodarza, co w efekcie może

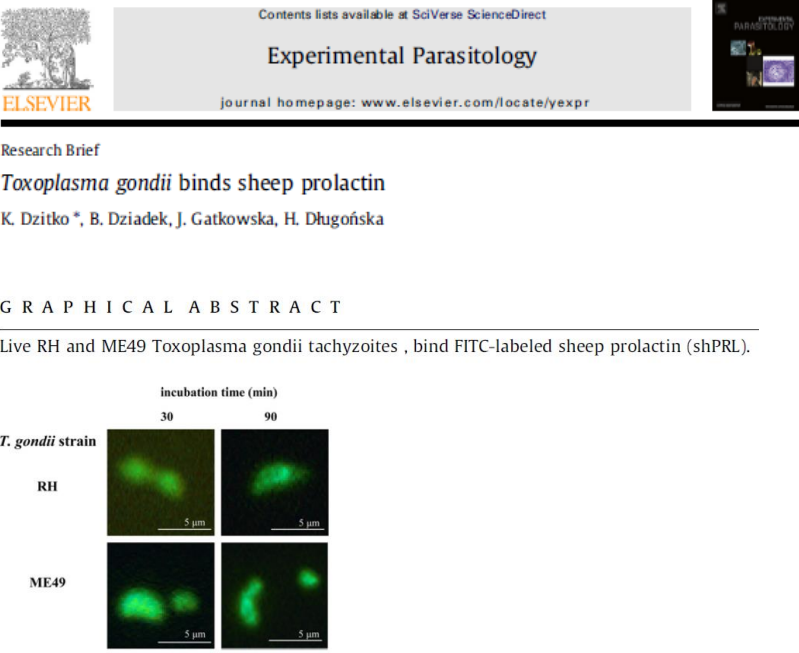
wpływać na proces adhezji, a następnie skutecznej penetracji do wnętrza atakowanej komórki. Specyficzne receptory dla PRL występujące na powierzchni komórek *T. gondii* nie zostały jeszcze opisane.

Po stwierdzeniu hamującego działania rhPRL na wnikanie *Toxoplasma* do komórek żywiciela sprawdzono, jak na wzrost pasożyta wpływa autologiczna, surowicza prolaktyna (sPRL) [[publikacja nr 5](#)]. W tym celu izolowano komórki jednojądrzaste (PBMC) z pełnej krwi obwodowej pacjentek, u których jednocześnie oznaczano poziom PRL oraz obecność swoistych przeciwciał przeciw-*T. gondii* w surowicy. Stężenie sPRL (użytej w testach *in vitro*) oznaczano w krwi pobranej w 0. oraz w 120. min, po doustnym podaniu MCP (wyłącznie pacjentkom ze zdiagnozowaną hiperprolaktynemią czynnościową, u których nie następowało zahamowanie wyrzutu PRL do surowicy), otrzymując w ten sposób dwie równoległe próbki surowicy ze znanym, wzrastającym poziomem sPRL. Następnie określono wpływ egzogennej rhPRL i autologicznej sPRL na namnażanie się pierwotniaka w PBMC. Uzyskane wyniki wskazują, że niezależnie od statusu serologicznego pacjentek, dodatek egzogennej rhPRL (100 ng/ml) skutkowało statystycznie znamionym ($p < 0,01$) ograniczeniem (~20%) intensywności namnażania pasożyta w komórkach PBMC. W celu wyjaśnienia, czy sPRL wywiera podobny efekt jak egzogenna rhPRL, założono hodowle PMBL od wszystkich pacjentów z dodatkiem autologicznych surowic. Wykazano, iż dodatek inaktywowanych autologicznych surowic pochodzących od pacjentek *Toxo*-ujemnych i *Toxo*-dodatnich o wzrastającym poziomie PRL (>50 ng/ml) powodował wprost proporcjonalny spadek intensywności namnażania osiągając przy stężeniach PRL >100 ng/ml odpowiednio, 59,6% i 66,2%. Ponadto stwierdzono, że łączny dodatek autologicznej sPRL i egzogennej rhPRL (> 200 ng/ml) działał znacznie skuteczniej, jeszcze bardziej ograniczając replikację *T. gondii*. Szczegółowa analiza danych wykazała dodatnią korelację ($r = 0,861$ w przypadku pacjentek *Toxo*-ujemnych i $r = 0,617$ u pacjentek *Toxo*-dodatnich) pomiędzy spadającą liczbą potomnych tachyzoitów a wzrastającym poziomem PRL.

Ochronna komórkowa odpowiedź immunologiczna organizmu zarażonego patogenami wewnątrzkomórkowymi, w tym *Toxoplasma*, opiera się między innymi na syntezie IFN- γ . Z kolei cytokiną o szerokiej immunoregulacyjnej aktywności, działającej antagonistycznie w stosunku do IFN- γ , jest IL-10 [26]. Biorąc pod uwagę istotną fizjologiczną rolę IL-10 w hamowaniu rozwoju nadmiernej patologicznej reakcji zapalnej związanej z produkcją wysokich stężeń cytokin typu Th1 (IFN- γ), w pracy badano modulatorowy wpływ PRL na poziom produkcji ww. cytokin przez ludzkie jednojądrzaste leukocyty krwi obwodowej zarażone tachyzoitami *T. gondii*, w obecności rhPRL i sPRL. Nie zaobserwowano wpływu PRL na poziom wydzielanego IFN- γ , aczkolwiek był on

podwyższony w stosunku do hodowli niezarażonych pasożytem. W przeciwieństwie do syntezy IFN- γ uwalnianie IL-10 przez zarażone leukocyty rośnie wprost proporcjonalnie wraz ze wzrostem poziomu sPRL pacjentów ($r = 0,821$), zarówno w hodowlach *in vitro* niestymulowanych rhPRL (kontrola), jak również w tych stymulowanych rhPRL (100 ng /mL). Istotny statystycznie wzrost wydzielania IL-10 obserwowano również w hodowlach PBMC (założonych jedynie z komórek izolowanych od pacjentów seronegatywnych) w obecności wzrastającego stężenia autologicznej sPRL lub tej samej surowicy z dodatkiem 100 ng /mL rhPRL. Takiej korelacji nie zaobserwowano w hodowlach założonych z PBMC pochodzących od osób *Toxoplasma* seropozytywnych.

Otrzymane wyniki wspierają dodatkowo wstępne obserwacje (Cel 1) i weryfikują postawioną hipotezę o ochronnej roli jednej ze składowych układu hormonalnego – PRL, w przebiegu zarażenia *T. gondii*. Uzyskane wyniki stanowiły dobry punkt wyjścia do dalszych badań mających na celu wykazanie zdolności i specyficzności wiązania PRL przez żywe tachyzoity *Toxoplasma*.

<p>Etap I.</p> <p>Cel 3: Wykazanie zdolności wiązania prolaktyny przez żywe tachyzoity <i>T. gondii</i>.</p>	 <p>Contents lists available at SciVerse ScienceDirect</p> <p>Experimental Parasitology</p> <p>journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr</p> <p>Research Brief</p> <p><i>Toxoplasma gondii</i> binds sheep prolactin</p> <p>K. Dzitko *, B. Dziadek, J. Gatkowska, H. Długońska</p> <p>G R A P H I C A L A B S T R A C T</p> <p>Live RH and ME49 <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites , bind FITC-labeled sheep prolactin (shPRL).</p> <p>incubation time (min)</p> <p>30 90</p> <p><i>T. gondii</i> strain</p> <p>RH</p> <p>ME49</p> <p>5 µm 5 µm</p>	<p>6</p>
---	---	----------

Biorąc pod uwagę dane przedstawione powyżej, w kolejnym zadaniu badawczym realizowanym w ramach przedstawianego cyklu publikacji postanowiono **sprawdzić zdolność tachyzoitów *T. gondii* do wiązania owczej PRL**. Zastosowanie metody cELISA (z użyciem biotynylowanej PRL; shPRL-BT) i techniki immunofluorescencji (z użyciem PRL sprzężonej z izotiocjanianem fluoresceiny; shPRL-FITC) umożliwiło wykazanie wiązania tego hormonu

laktotropowego przez tachyzoity pasożyta zarówno szczepu RH (genotyp I, LD₁₀₀ dla myszy < 10 tachyzoitów, niecystotwórczy), jak i szczepu ME49 (genotyp II, LD₁₀₀ dla myszy > 1000 tachyzoitów, cystotwórczy). Dodatkowo zanotowano, iż intensywność wiązania PRL wzrastała wprost proporcjonalnie do jej stężenia. W toku prowadzonych doświadczeń, stosując test homologicznej kompetycji, potwierdzono także swoistość wiązania owczej PRL przez tachyzoity *T. gondii* (zahamowanie wiązania shPRL-BT przez nadmiar nieznakowanego homologicznego białka), natomiast w heterologicznej teście kompetycji z użyciem ludzkiej albuminy i laktoferyny oraz bydłowej laktoferyny nie zaobserwowano zahamowania wiązania shPRL-BT przez użyte w teście heterologiczne białka. Udokumentowane w przeprowadzonych badaniach swoiste wiązanie owczej PRL wskazuje na obecność specyficznego receptora na powierzchni komórek *T. gondii*. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej receptora PRL (PRL-R) z bazą sekwencji białkowych ToxoDB wykazała kilka hipotetycznych, potencjalnie funkcjonalnych peptydów *T. gondii*, wykazujących miejscowe podobieństwo sekwencji aminokwasowych do zewnątrzkomórkowej domeny PRL-R. Wytypowano dwa regiony domeny PRL-R (2-37 i 127-162 pozycja aminokwasu) o najwyższym podobieństwie (53%) i identyczności (odpowiednio, 37 i 42%) z sekwencjami aminokwasowymi białek *Toxoplasma*. Wyniki te sugerują, że istnieją pewne białka *T. gondii*, które mogą pełnić funkcję receptora (ów) dla PRL, choć potwierdzenie tej sugestii wymaga bardziej szczegółowej analizy biochemicznej. Hipotetyczna obecność takiego receptora (ów) może pełnić istotną rolę biologiczną w inwazji komórek gospodarza, a w konsekwencji w wewnątrzkomórkowej proliferacji pasożyta. Prolaktyna, wiążąc się z powierzchniowymi białkami pierwotniaka, może blokować ligandy *T. gondii*, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie białek receptorowych żywiciela, odpowiedzialnych za adhezję, a następnie wnikanie pasożyta do wnętrza komórki. Podsumowując, zarówno dane literaturowe, jak i uzyskane wyniki wskazują, iż PRL może działać dwukierunkowo: z jednej strony poprzez białka receptorowe komórek gospodarza, wzbudzając uwalnianie cytokin takich jak IL-12 czy IFN- γ , które ograniczają rozprzestrzenianie się pasożyta, zaś z drugiej - poprzez blokowanie jego powierzchniowych receptorów i zakłócenie procesu przenikania do komórki żywiciela.

Osiągnięcia etapu I:

1. Wytypowanie prolaktyny, testosteronu, wolnego testosteronu, białka transportującego testosteron – SHBP oraz siarczanu dehydroepiandrosteronu jako hormonów o potencjalnej ochronnej roli w przebiegu zarażenia *T. gondii*.
2. Wykazanie zależności pomiędzy hiperprolaktynemią a seroprewalencją *T. gondii*.
3. Wskazanie fizjologicznego wzrostu stężenia prolaktyny u kobiet ciężarnych jako naturalnego mechanizmu zmniejszającego ryzyko rozwoju zarażenia *T. gondii*.
4. Wykazanie, że PRL upośledza wnikanie pierwotniaka do komórek ciągłych linii żywicielskich, a tym samym wpływając na liczbę komórek potomnych.
5. Wykazanie *in vitro* hamującego działania zarówno rekombinowanej, jak i autologicznej surowiczej, prolaktyny na proces namnażania się *T. gondii* w ludzkich leukocytach jednojądrzastych krwi obwodowej.
6. Potwierdzenie modulacyjnego wpływu prolaktyny na produkcję IL-10, cytokiny regulatorowej o istotnym znaczeniu w hamowaniu rozwoju nadmiernej patologicznej reakcji zapalnej.
7. Wykazanie po raz pierwszy zdolności wiązania owczej prolaktyny przez tachyzoity *T. gondii*.
8. Wykazanie swoistości wiązania owczej prolaktyny przez *T. gondii* wraz z sugestią obecności u tego pasożyta swoistego białka/białek receptorowych wiążących ww. hormon.
9. Wytypowanie regionów w białkach *Toxoplasma* hipotetycznie zdolnych do wiązania prolaktyny.

Możliwe zastosowanie:

1. Identyfikacja białka/białek receptorowych *T. gondii* zaangażowanych w wiązanie ludzkiej i owczej prolaktyny.
2. Badanie mechanizmów wiązania ludzkiej i owczej prolaktyny.
3. Identyfikacja epitopów antygenów *T. gondii* wiążących prolaktynę.
4. Konstrukcja analogów PRL jako potencjalnych narzędzi terapeutycznych ograniczających inwazję komórek żywiciela przez *T. gondii*.
5. Opracowanie nowych metod terapeutycznych interferujących z wiązaniem przez *T. gondii* prolaktyny, będącej istotnym modulatorem aktywności układu hormonalnego i odpornościowego.

Prezentacja wyników:

Wyniki przedstawione w etapie I prezentowane były w postaci doniesień ustnych, jak i prezentacji plakatów na 6 konferencjach krajowych i 2 konferencjach międzynarodowych:

1. **Dzitko K., Komorowski J., Długońska H.**
*Poziom prolaktyny (PRL) w surowicach a częstość zarażenia *Toxoplasma gondii* u ludzi.*
Międzyzdroje **2007**, 21. Zjazd Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego
2. **Dzitko K., Płociński P., Długońska H.**
*Wpływ prolaktyny na wewnątrzkomórkową replikację *Toxoplasma gondii*.*
Łódź **2007**, 46. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej
3. **Dzitko K., Dziadek B., Gatkowska J., Ławnicka H., Komorowski J., Długońska H.**
*Poziom wybranych hormonów a częstość zarażenia *Toxoplasma gondii* u ludzi.*
Łódź **2008**, 47. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej
4. **Dzitko K., Dudzińska D., Gatkowska J., Dziadek B., Długońska H.**
*Prolaktyna a *Toxoplasma gondii* – badanie *in vitro* wpływu hormonu na tachyzoity pasożyta.*
Łódź **2009**, 48. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej
5. **Dzitko K., Ławnicka H., Gatkowska J., Dziadek B., Komorowski J., Długońska H.**
*Wpływ rekombinowanej i surowiczej prolaktyny na wzrost *Toxoplasma gondii* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej ludzi.*
Łódź **2011**, Jubileuszowy Ogólnopolski Zjazd, 50. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej
6. **Dzitko K., Dziadek B., Gatkowska J., Długońska H.**
**Toxoplasma gondii*: wiązanie ludzkiej i owczej prolaktyny.*
Łódź **2013**, Ogólnopolski Zjazd 52. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej i IX Ogólnopolskie Sympozjum „Ekologia Człowieka Współczesnego”
7. **Dzitko K., Gatkowska J., Ławnicka H., Komorowski J., Długońska H.**
*The relationship between the level of selected hormones in women sera and the frequency of *Toxoplasma* infection.*
Paris (Francja) **2008**, X European Multicolloquium of Parasitology
8. **Dzitko K., Dziadek B., Gatkowska J. and Dlugonska H.**
*Prolactin binding by *Toxoplasma gondii* belonging to type I and type II.*
Oxford **2013**, 12th International Congress on Toxoplasmosis

Kontynuacja badań:

W chwili obecnej kontynuuję opisany powyżej temat badawczy, dążąc do identyfikacji białka/białek wiążących owczą i ludzką prolaktynę. Opracowanie i optymalizacja warunków metody izolacji białek błonowych *Toxoplasma* oraz techniki chromatografii powinowactwa przy użyciu złoża opłaszczanego ligandem (owczą i ludzką prolaktyną) umożliwiło mi wyizolowanie trzech białek zdolnych do wiązania prolaktyny (wyniki przedstawione na International Congress on Toxoplasmosis - Oxford). Określenie sekwencji aminokwasowej przy użyciu techniki spektrometrii masowej ESI/MS/MS jako metody analitycznej oraz analiza porównawcza otrzymanych sekwencji z dostępnymi bazami danych pozwoli zidentyfikować wyizolowane białka.

Etap II.**Potencjalne zastosowanie w terapii toksoplazmozy tiosemikarbazydów i triazoli.**

Poszukiwanie nowych leków wykazujących wysoką skuteczność oraz wysoką selektywność wobec *T. gondii* jest tematem wiodącym w wielu laboratoriach o profilu chemicznym i parazytologicznym. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat rozwój nauki przyczynił się do rozszerzenia panelu inhibitorów procesu wnikania i namnażania się *T. gondii*, wykazujących jednocześnie niską toksyczność dla komórek żywicieli. Niewątpliwą szansą na poprawę warunków leczenia toksoplazmozy jest projektowanie nowych chemioterapeutyków. Do grupy tej między innymi należą: pirymidyny, skondensowane pirymidyny, salicyloanilidy, triklosan, artemizyna, oryzalina, fluorochinolony, naftochinony, chinazoliny, chinoliny, bisfosfoniany, puryny, tiosemikarbazyony, tiosemikarbazydy i tiazolidinediony, berberyony, tryptantryny czy tiocyjaniany [27, 28, 29].

Brak 100% skuteczności działania leków stosowanych w terapii toksoplazmozy, ich liczne efekty uboczne, a także problem narastającej lekooporności pasożytów skłoniły nas do poszukiwania nowych syntetycznych związków, które mogłyby być zastosowane w przyszłości do walki z tym powszechnym pasożytem. Doniesienie o przeciwpasożytniczej aktywności pochodnych tiosemikarbazydu [30] było inspiracją do podjęcia dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmów zaangażowanych w proces hamowania namnażania się *T. gondii* w obecności innych, nowo zsyntetyzowanych pochodnych, należących do tej samej grupy związków. Drugą grupą związków, nieopisanych wcześniej w literaturze, których aktywność przeciw *Toxoplasma* także została poddana analizie, były pochodne s-triazolu.

<p>Etap II.</p> <p>Cel 4:</p> <p>Ocena aktywności przeciwpasożytniczej 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu oraz s-triazoli wobec <i>T. gondii</i> in vitro.</p>	<p style="text-align: right;"><i>molecules</i> ISSN 1420-3049 www.mdpi.com/journal/molecules</p> <p><i>Molecules</i> 2014, 19, 9926-9943; doi:10.3390/molecules19079926</p> <p><i>Article</i></p> <p>1,4-Disubstituted Thiosemicarbazide Derivatives are Potent Inhibitors of <i>Toxoplasma gondii</i> Proliferation</p> <p>Katarzyna Dzitko ^{1,*}, Agata Paneth ^{2,3}, Tomasz Plech ², Jakub Pawelczyk ⁴, Paweł Stączek ⁵, Joanna Stefańska ⁶ and Piotr Paneth ³</p>	7
	<p style="text-align: center;">Zastosowanie medyczne pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu</p> <p>zgłoszenie patentowe oznaczone numerem P.400583 z dnia 2012-08-30</p> <p>Dzitko K. (50%), Siwek A. (50%)</p>	9

	 <p><i>Antimicrob. Agents Chemother.</i> 2014, 58(12):7583. DOI: 10.1128/AAC.03832-14. Published Ahead of Print 6 October 2014.</p> <p>Triazole-Based Compound as a Candidate To Develop Novel Medicines To Treat Toxoplasmosis</p> <p>Katarzyna Dzitko,^a Agata Paneth,^{b,c} Tomasz Plech,^d Jakub Pawelczyk,^d Lidia Węglińska,^d Piotr Paneth^e</p>	8
<p>Purine nucleoside phosphorylase as probable target for anti-<i>Toxoplasma</i> activity of 3-(thiophen-2-yl)-1,2,4-triazole-5-thione.</p>	<p>Zastosowanie medyczne 3-(tiofen-2-ylo)-1,2,4-triazolo-5-tionu</p> <p>zgłoszenie patentowe oznaczone numerem P.400584 z dnia 2012-08-30</p> <p>Siwek A. (50%), Dzitko K. (50%)</p>	10

Przed przystąpieniem do badania aktywności substancji hamujących proliferację pierwotniaka *in vitro*, spośród 85 nowo zsyntetyzowanych związków będących pochodnymi 4-arylotiosemikarbazydu i 1,2,4-triazolu wyselekcjonowano te, które charakteryzowały się dobrą rozpuszczalnością i stabilnością w niskich stężeniach rozpuszczalnika oraz wykazywały wyższą skuteczność w porównaniu do standardowych chemioterapeutyków – pirymetaminy i sulfadiazyny. Określano także cytotoksyczność wszystkich testowanych związków wobec linii żywicielskich wyznaczając wartości dawek cytotoksycznych (CC₃₀ – cytotoxic concentration). Do dalszego etapu badań zakwalifikowano jedynie te pochodne, w obecności których morfologia komórek linii ciągłych nie ulegała zmianom, a żywotność wynosiła >70%. Zbadano również wpływ pochodnych tiosemikarbazydu i s-triazolu na zewnątrzkomórkowe tachyzoity *T. gondii*. Nie wykazano znaczącego obniżenia żywotności zewnątrzkomórkowych form pierwotniaka, co sugerowało, iż hamowanie proliferacji tachyzoitów *T. gondii* w hodowlach komórkowych jest skutkiem działania testowanych związków na proces wewnątrzkomórkowego namnażania.

Analiza zależności bioaktywności od struktury molekularnej 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu (SAR) oraz próba wytypowania potencjalnego celu molekularnego dla wyselekcjonowanych w badaniach wstępnych pochodnych s-triazolu poprzedzona była wyznaczeniem wartości stężeń hamujących (IC₅₀ – inhibitory concentration) proces namnażania się toksoplazm. W tym celu tachyzoity szczepu RH hodowano *in vitro* w obecności pięciu pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu i dwóch pochodnych s-triazolu oraz sulfadiazyny (jako kontroli), a następnie określano pulę potomnych tachyzoitów przy użyciu dwóch niezależnych metod: inkorporacji [³H] uracylu do DNA pasożyta oraz ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy DNA w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że cztery spośród pięciu pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu, czyli pochodne 4-arylotiosemikarbazydu, wykazywały silne właściwości przeciwpasożytnicze, a wartości IC_{50} były niższe od 5 do 15 razy niż wartość IC_{50} wyznaczona dla sulfadiazyny ($IC_{50} >500 \mu\text{g/ml}$). Najsilniejszą aktywność przeciw-*T. gondii* ($IC_{50} 33,17 \mu\text{g/mL}$) wykazała pochodna zawierająca w swojej strukturze pierścień tiofenu. Aktywność biologiczna pozostałych trzech pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu, wyrażona jako IC_{50} , wynosiła odpowiednio: dla furano-tiosemikarbazydu – $59,00 \mu\text{g/mL}$, dla tiadiazolo-tiosemikarbazydu podstawionego w pozycji N4 pierścieniem 2-bromofenylowym – $74,93 \mu\text{g/mL}$, zaś dla tiadiazolo-tiosemikarbazydu podstawionego w pozycji N4 pierścieniem 2,4-difluorofenylowym – $92,28 \mu\text{g/mL}$. Najłabsze właściwości przeciwpierwotniakowe zanotowano dla furano-tiosemikarbazydu z podstawnikiem etylowym w pozycji N4 ($IC_{50} 191,04 \mu\text{g/mL}$).

Analiza zależności bioaktywności od struktury molekularnej pozwoliła na wysunięcie bardzo wstępnego założenia, w myśl którego obecność pięcioczłonowego pierścienia heterocyklicznego (tiofenu lub furanu) w pozycji N1 szkieletu tiosemikarbazydu oraz podstawnika arylowego w pozycji N4 bezpośrednio korelują ze zdolnością pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu do hamowania proliferacji *Toxoplasma*. Ponadto, rezultaty podjętych badań kwantowo-mechanicznych na poziomie teorii funkcjonału gęstości elektronowej (DFT) wskazały na istnienie zależności pomiędzy (i) momentem dipolowym, (ii) rozkładem potencjału elektrostatycznego wokół cząsteczki tiosemikarbazydu oraz (iii) położeniem podstawnika obecnego w pierścieniu heterocyklicznym, a aktywnością przeciwpierwotniakową. Wyniki badań mechanistycznych stanowią cenne wskazówki w planowaniu syntezy kolejnych pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu jako potencjalnych farmaceutyków skutecznych w zwalczaniu toksoplazmozy.

Celem wskazania potencjalnego mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw zdolności pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu do hamowania proliferacji *T. gondii*, wykonane zostały symulacje sposobu ich oddziaływań z resztami aminokwasowymi kieszeni wiążących następujących enzymów: fosforylasy nukleozydów purynowych, kinazy adenozynowej, kinazy kalmodulinowej, reduktoizomerazy 5-fosforanu 1-deoksyksylulozy oraz reduktazy enoilo-ACP, które to enzymy zostały opisane w literaturze przedmiotu jako cele molekularne w zwalczaniu zarażenia *T. gondii*, a których struktury krystaliczne, odpowiednio wysokiej jakości, zostały zdeponowane w bazie PDB pod kodami dostępu 3MB8, 1LII, 4M84, 3AU9 oraz 2O2S. Choć uzyskane wyniki dokowań nie pozwoliły wyprowadzić zależności jakościowych ani ilościowych pomiędzy aktywnością biologiczną pochodnych tiosemikarbazydu, a ich aktywnością inhibicyjną wobec testowanych białek,

to jednak umożliwiły wskazanie kierunku przyszłych badań empirycznych mających na celu określenie molekularnych podstaw aktywności inhibicyjnej pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu wobec *T. gondii*.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki (IC_{50} s-triazolu 37,33 ug/ml versus IC_{50} sulfadiazyny 1217,62 ug/ml) wykonano także symulacje sposobu oddziaływania 3-(tiofen-2-ylo)-1,2,4-triazolo-5-tionu z resztami aminokwasowymi kieszeni wiążących następujących, znanych w zwalczaniu zarażenia *T. gondii*, enzymatycznych celi molekularnych: fosforylasy nukleozydów purynowych, kinazy adenozykowej, kinazy kalmodulinowej, reduktoizomerazy 5-fosforanu 1-deoksyksylulozy oraz reduktazy enoilo-ACP. Symulacje dokowań molekularnych dla 3-(tiofen-2-ylo)-1,2,4-triazolo-5-tionu oraz nieaktywnej pochodnej s-triazolu, którą stanowił 4-etylo-3-(4-metylo-1,2,3-tiadiazolo-5-ylo)-1,2,4-triazolo-5-tion zostały wykonane przy użyciu programu FlexX, z wykorzystaniem struktur krystalicznych białek zdeponowanych w bazie PDB (Protein Data Bank), oznaczonych kodami 3MB8, 1LII, 4M84, 3AU9, 2O2S. Uzyskane wyniki pozwoliły wskazać na trzy enzymy, to jest reduktoizomerazę 5-fosforanu 1-deoksyksylulozy, kinazę kalmodulinowej oraz fosforylazę nukleozydów purynowych jako potencjalne punkty uchwytu dla cząsteczek 3-(tiofen-2-ylo)-1,2,4-triazolo-5-tionu, przy czym reduktoizomeraza 5-fosforanu 1-deoksyksylulozy wydaje się stanowić najbardziej prawdopodobny cel molekularny dla aktywności przeciwprzywrotniakowej pochodnej s-triazolu wobec *T. gondii*. Związek ten w centrum aktywnym ww. enzymu lokuje się w pobliżu reszt Cys268, Ser269, Ser270, Trp296 oraz Lys312, a jego obecność jest stabilizowana obecnością trzech wiązań wodorowych pomiędzy atomem siarki pierścienia tiofenowego, a resztami serynowymi Ser269 i Ser270 oraz trzech wiązań wodorowych pomiędzy atomami azotu pierścienia triazolowego, a resztami aminokwasowymi Ser270, Glu233 i Trp296.

Osiągnięcia etapu II:

- 1. Wskazanie kierunku poszukiwań nowych, skutecznych farmaceutyków przeciwko toksoplazmozie w grupie pochodnych tiosemikarbazydu i s-triazolu.**
- 2. Opracowanie zależności typu struktura–aktywność.**
- 3. Wskazanie kierunku badań empirycznych mających na celu określenie molekularnych podstaw aktywności inhibicyjnej pochodnych 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu wobec *T. gondii*.**
- 4. Wytypowanie potencjalnego celu molekularnego dla aktywności przeciwprzywrotniakowej pochodnej s-triazolu wobec *T. gondii*.**

Możliwe zastosowanie:

1. Wyprowadzone zależności struktura-aktywność przyczyniły się do racjonalnego planowania syntez kolejnych pochodnych tiosemikarbazydu oraz triazolu (wpływ podstawników, rozpuszczalność), co pozwoli na obniżenie kosztów związanych z syntezą i badaniami *in vitro*.
2. Wskazanie potencjalnych celów molekularnych dla aktywności przeciwprzywrotniakowej pochodnych tiosemikarbazydu i triazolu pozwoli na podjęcie ukierunkowanych badań empirycznych, co bezpośrednio wpłynie na obniżenie kosztów wynikające z wyeliminowania zakupu tych enzymów, co do których nie ma żadnych przesłanek wskazujących, iż stanowią one cel molekularny terapii.

Prezentacja wyników:

Wyniki uzyskane w etapie II prezentowane były na 1 konferencji krajowej:

Dzitko K., Ruszczak A., Siwek A., Długowska H.

1. [Nowo zsyntetyzowane tiosemikarbazydy i tiadiazole jako potencjalne leki przeciw toksoplazmozie.](#)

Łódź 2012, 51. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej

Kontynuacja badań:

Dzięki współpracy ze specjalistą w dziedzinie chemii dr hab. n. farm. Agatą Paneth z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie kontynuuję zapoczątkowany temat badawczy dotyczący syntezy potencjalnych leków przeciw toksoplazmozie. Nowe pochodne tiosemikarbazydów, triazoli i tiadiazoli stanowią obecnie przedmiot pogłębionych badań biologicznych. Mam nadzieję, że zaowocują one w przyszłości licznymi patentami i artykułami naukowymi oraz znajdą uznanie recenzentów przygotowanego wspólnie z dr hab. Agatą Paneth wniosku grantowego. Ponadto nowo zsyntetyzowane tiosemikarbazydy stały się ostatnio przedmiotem rozprawy doktorskiej pt. „Synteza pochodnych tiosemikarbazydu oraz ocena ich aktywności wobec kosmopolitycznego pierwotniaka *Toxoplasma gondii*” mgr Lidii Węglińskiej z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, w której jestem promotorem pomocniczym.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, 104:133-48.
2. Tenter AM. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* **2000**, 30:1217-1258.
3. Torrey EF. et al. *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Emerg Infect Dis* **2003**, 9:1375-1380.
4. Miman O. et al. The probable relation between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **2010**, 475:129-131.
5. Robert-Gangneux F. et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a three-year multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol* **2015** Mar 11. pii: JCM.03282-14.
6. de Azevedo KML. et al. Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. *Braz J Infect Dis* **2010**, 14:186-189.
7. Weiss LM. and Kim K. *Toxoplasma Gondii*. (Second Edition), Copyright © **2013** Elsevier
8. Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol* **2009**, 39: 935–946.
9. Dibbern Jr DA, Montanaro A. Allergies to sulfonamide antibiotics and sulfur-containing drugs. *Ann Allergy Asthma Immunol* **2008**, 100:91-100.
10. Skwarlo-Sonta K. Prolactin as an immunoregulatory hormone in mammals and birds. *Immunol Lett* **1992**, 33:105–121
11. Ben-Jonathan N. et al. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* **1996**, 17:639–669.
12. Russell DH. et al. Prolactin receptors on human lymphocytes and their modulation by cyclosporine. *Biochem Biophys Res Commun* **1984**, 29:899–906.
13. Gerlo S. et al. Modulation of prolactin expression in humans T lymphocytes by cytokines. *J Neuroimmunol* **2005**, 162:190–193.
14. Sun R. et al. Expression of prolactin receptors and response to prolactin stimulation of human NK cell lines. *Cell Res* **2004**, 14:67–73.
15. Berczi I. The role of growth and lactogenic hormone family in immune function. *Neuroimmunomodulation* **1994**, 1:201–216
16. Benedetto N, Folgore A. Effect of prolactin, rIFN- γ or TNF- α in murine toxoplasmosis. *Pathol Biol* **1995**
17. Benedetto N, Folgore A. Effects of cytokines and prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in murine microglia. *Eur Cytokine Netw* **2002**
18. Benedetto N, Auriault C. Prolactin-cytokine network in the defence against *Acanthamoeba castellanii* in murine microglia [corrected]. *Eur Cytokine Netw* **2002**; 13: 447-55.
19. Gómez-Ochoa P. et al. Lactating females Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) show protection against experimental *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol* **2003**; 116: 61-4.
20. Corrêa-de-Santana E. et al. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in *Trypanosoma cruzi* infected mammosomatotrophic cells. *Neuroimmunomodulation* **2009**; 16: 208-12.
21. Bayoumi NK. et al. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol* **2009**; 103: 111-117.
22. García-Ispuerto I. et al. Factors affecting plasma prolactin concentrations throughout gestation in high producing dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* **2009**; 36: 57-66.
23. Langraft B. et al. Parasite density of *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence of influence of sex hormones. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1994**, 88:73–74.
24. Leenstra T. et al. Dehydroepiandrosterone sulfate levels associated with decreased malaria parasite density and increased hemoglobin concentration in pubertal girls from western Kenya. *J Infect Dis* **2003**, 188:297–304.
25. Zhang X et al. Two case reports of pituitary adenoma associated with *Toxoplasma gondii* infection. *J Clin Pathol* **2002**, 55:965–966
26. Sturge CR, Yarovinsky F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* **2014**, 82:3090-3097.
27. Krivogorsky B. et al. Tryptanthrin derivatives as *Toxoplasma gondii* inhibitors—structure-activity relationship of the 6-position. *Bioorg Med Chem Lett* **2013**, 23:1032–1035.
28. Rosso VS. et al. Synthesis and biological evaluation of new 2-alkylaminoethyl-1,1-bisphosphonic acids against *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* targeting farnesyl diphosphate synthase. *Bioorg Med Chem* **2011**, 19:2211–2217.
29. Hencken CP. et al. Thiazole, oxadiazole, and carboxamide derivatives of artemisinin are highly selective and potent inhibitors of *Toxoplasma gondii*. *J Med Chem* **2010**, 53:3594-601.
30. Liesen AP. Et al. Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *Eur J Med Chem* **2010**, 45:3685–3691.

VIII. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

1. PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH

W ramach studiów doktoranckich zajmowałam się identyfikacją antygenów *Toxoplasma gondii* oraz swoistych przeciwciał wytwarzanych przez myszy wsobne oraz kobiety ciężarne i noworodki. Kierunek badawczy realizowałam poprzez wzbogacenie zasobu wiedzy na temat proteomu pasożyta tj. puli białek kodowanych przez genom *Toxoplasma*, ze zwróceniem szczególnej uwagi na białka związane ze zjadliwością (PROTEOMIKA) oraz określenie swoistej reaktywności humoralnej żywicieli zarażonych *Toxoplasma* (SEROLOGIA). Głównym osiągnięciem prowadzonych badań było sporządzenie pierwszej mapy antygenów sekrecyjnych ESA *Toxoplasma gondii* (<http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~hfisher> lub <http://www.expasy.ch>). Prowadzone przeze mnie badania finansowane były przez Komitet Badań Naukowych w ramach grantu „Młody badacz” nr 6 P05A 043 20, pt. „Badanie struktury antygenowej *Toxoplasma gondii*” realizowanego w 2001 roku, którego byłam kierownikiem. Opiekunem naukowym grantu była prof. dr hab. Henryka Długońska. Podczas realizacji pracy doktorskiej odbyłam także staż naukowy w Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie w Düsseldorfie (Niemcy), w zespole badawczym kierowanym przez doc. dr hab. Hansa-Georga Fischera. Otrzymane wyniki zostały przedstawione w wyróżnionej i nagrodzonej dysertacji doktorskiej pt.: „Identyfikacja antygenów pasożyta *Toxoplasma gondii* oraz swoistych przeciwciał wytwarzanych przez jego żywicieli” oraz opublikowane w latach 2000-2001 jako prace doświadczalne i przeglądowe.

PUBLIKACJE HABILITANTA DOTYCZĄCE TEJ TEMATYKI

I.p.	Dane bibliograficzne	IF	MNiSW
1.	Dytnerka K., Stączek P., Długońska, H. <i>Toxoplasma gondii</i> – Cosmopolitan parasite expressing low genetic diversity [<i>Toxoplasma gondii</i> - Kosmopolityczny pasożyt o małym zróżnicowaniu genetycznym] <i>Potępy Mikrobiologii / Advances in Microbiology</i> 2004; 43 (2), pp. 141-154	-	4
2.	Długońska H., Dytnerka K. <i>Toxoplasma gondii</i> proteome [Proteom <i>Toxoplasma gondii</i> .] <i>Wiadomości Parazytologiczne / Annals of Parasitology</i> 2003; 49 (1), pp. 3-10	-	4
3.	Długońska H., Dytnerka K., Golińska D., Kurnatowska A. Serodiagnostics of <i>Toxoplasma gondii</i> invasions. <i>Wiadomości Parazytologiczne / Annals of Parasitology</i> 2001; 47 Suppl 1 , pp. 39-44	-	4

3.	Nischik N., Schade B., Dytnerska K. , Długońska H., Reichmann G., Fischer H.-G. Attenuation of mouse-virulent <i>Toxoplasma gondii</i> parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. <i>Microbes and Infection</i> 2001; 3 (9), pp. 689-699	1,960	11
5.	Długonska H., Dytnerska K. , Reichmann G., Stachelhaus S., Fischer H.-G. Towards the <i>Toxoplasma gondii</i> proteome: Position of 13 parasite excretory antigens on a standardized map of two-dimensionally separated tachyzoite proteins. <i>Parasitology Research</i> 2001; 87 (8) , pp. 634-637	1,025	16
6.	Długońska, H., Dytnerska K. Identification of <i>Toxoplasma gondii</i> antigens recognized by specific T lymphocytes [Identyfikacja antygenów <i>Toxoplasma gondii</i> rozpoznawanych przez swoiste limfocyty T.] <i>Wiadomości Parazytologiczne / Annals of Parasitology</i> 2000; 46 (4), pp. 455-458	-	4
7.	Długońska H., Dytnerska K. Antigens of <i>Toxoplasma gondii</i> [Antygeny <i>Toxoplasma gondii</i> .] <i>Wiadomości Parazytologiczne / Annals of Parasitology</i> 2000; 46 (3), pp. 327-334	-	4

2. PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH

2.1. SEROLOGICZNE MARKERY TOKSOPLAZMOZY

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych kontynuowałam badania nad pasożytniczym pierwotniakiem *T. gondii* rozszerzając swój warsztat badawczy. Prace prowadzone w latach 2004-2005 w ramach projektu badawczego KBN (nr 2 P05A 048 26), w którym byłam kierownikiem, miały na celu wytypowanie swoistych serologicznych markerów toksoplazmozy na mysim modelu doświadczalnym.

PUBLIKACJE HABILITANTA DOTYCZĄCE TEJ TEMATYKI

I.p.	Dane bibliograficzne	IF	MNIŚW
1.	Dzitko K. , Stacek P., Gatkowska J., Długonska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : Serological recognition of reinfection. <i>Experimental Parasitology</i> 2006; 112 (2), pp. 134-137	1,108	20
2.	Dytnerska K. , Gatkowska J., Długońska H. Specific anti- <i>Toxoplasma gondii</i> antibodies produced in inbred mice differing in their natural resistance to toxoplasmosis. <i>Wiadomości Parazytologiczne / Annals of Parasitology</i> 2004; 50 (3), pp. 411-416	-	4
3.	Dytnerska K. , Gatkowska J., Dziadek B., Długońska H. Analiza swoistości ludzkich przeciwciał IgM anty- <i>Toxoplasma gondii</i> przy użyciu metody immunoblotu. Wydawnictwo SGGW. 2003;58-61.	-	-
4.	Dytnerska K. , Kurnatowska A., Nowakowska D. Porównanie profilu przeciwciał antytoksoplazmozowych u matek i ich dzieci metodą immunoblotu. Wydawnictwo SGGW. 2003;62-65	-	-

2.2. WIĄZANIE LUDZKICH TRANSFERYN PRZEZ *TOXOPLASMA GONDII*

W latach 2004-2007 uczestniczyłam także w badaniach zmierzających do określenia interakcji żywych tachyzoitów *Toxoplasma* z ludzką transferyną i laktoferyną. Przeprowadzone badania własne wykazały, iż zarażenie *T. gondii* prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji receptorów dla transferyny obecnych na makrofagach, a wysokie stężenia tego białka ograniczają wewnątrzkomórkowy wzrost pasożyta. Przeprowadzone doświadczenia (grant KBN 2 P04C 014 26; wykonawca) pozwoliły także stwierdzić, iż tachyzoity *T. gondii* wiążą ludzką laktoferynę, natomiast nie wykazują zdolności wiązania ani ludzkiej holotransferyny, ani apotransferyny. Ponadto zaobserwowano, iż ilość związanej laktoferyny jest zależna od i wprost proporcjonalna do stężenia tego białka w próbce badanej. Stosując test kompetycji udokumentowano także swoistość wiązania ludzkiej laktoferyny przez żywe tachyzoity pierwotniaka. W toku prowadzonych doświadczeń, jako źródło natywnych białek tachyzoitów pasożyta wykorzystano surowy preparat TLA potwierdzając wyniki uzyskane w badaniach z żywymi komórkami *Toxoplasma*. Zastosowanie w dalszych etapach prowadzonych prac techniki chromatografii powinowactwa doprowadziło do identyfikacji białek roptrii ROP2 i ROP4 *T. gondii* jako ligandów dla ludzkiej laktoferyny. Prace te zaowocowały wytypowaniem komponentów białkowych pasożyta, które zostały użyte w dalszych badaniach (2.3.) do opracowania preparatów szczepionkowych przeciw toksoplazmozie.

PUBLIKACJE HABILITANTA DOTYCZĄCE TEJ TEMATYKI

l.p.	Dane bibliograficzne	IF	MNIŚW
1.	Dzitko K., Dziadek B., Dziadek J., Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : Inhibition of the intracellular growth by human lactoferrin. <i>Polish Journal of Microbiology</i> 2007; 56 (1), pp. 25-32	-	9
2.	Dziadek B., Dzitko K., Długonska H. <i>Toxoplasma gondii</i> binds human lactoferrin but not transferrin. <i>Experimental Parasitology</i> 2005; 110 (2), pp. 165-167	1,306	20
3.	Długonska H, Dziadek B, Dzitko K. Pobieranie żelaza przez pasożytnicze pierwotniaki: receptory dla białek wiążących żelazo. <i>Post Biol Kom.</i> 2005;32(2):169-180.	-	5
4.	Dziadek B., Dytnerska-Dzitko K., Długońska, H. The modulation of transferrin receptors level on mouse macrophages and fibroblasts by <i>Toxoplasma gondii</i> . <i>Polish Journal of Microbiology</i> 2004; 53, pp. 75-80	-	10

2.3. KONSTRUKCJA EKSPERYMENTALNYCH SZCZEPIONEK PRZECIWKO TOKSOPLAZMOZIE ORAZ OCENA ICH DZIAŁANIA

W latach 2008-2012 uczestniczyłam także w pracach doświadczalnych prowadzonych w Zakładzie Immunoparazytologii UŁ, mających na celu skonstruowanie rekombinantowej, podjednostkowej szczepionki przeciwko *T. gondii* (grant KBN N N302 3196 33).

W pierwszym etapie prowadzonych badań, z zastosowaniem modelu doświadczalnej, przewlekłej toksoplazmozy u myszy laboratoryjnych, określono właściwości immunogenne i immunoprotekcyjne dwuskładnikowej, doświadczalnej szczepionki, w której jako antygeny użyte zostały rekombinantowe formy białek roptrii rROP2 i rROP4 *T. gondii*. Wykorzystanie antygenów ROP2 i ROP4 do opracowania testowanej szczepionki wynikało z wcześniejszego udokumentowania, w badaniach własnych, zdolności tych dwóch białek do swoistego wiązania ludzkiej hololaktoferyny, sugerującego ich potencjalne zaangażowanie w pobieranie żelaza w organizmie zarażonego gospodarza. W toku prowadzonych doświadczeń wykazano, iż dwuskładnikowa szczepionka rROP2+rROP4 charakteryzowała się silnym działaniem immunogennym przejawiającym się w stymulowaniu antygenowo swoistych humoralnych (synteza immunoglobulin IgG1 i IgG2a) i komórkowych (*in vitro* produkcja cytokin typu Th1, IFN- γ i IL-2) mechanizmów odpornościowych. Ponadto, u zwierząt immunizowanych doświadczalnym preparatem rROP2+rROP4 stwierdzono jego umiarkowane działanie ochronne przed zarażeniem cystotwórczym szczepem DX *T. gondii*, manifestujące się jako 46% obniżenie liczby cyst pasożyta w mózgach zwierząt immunizowanych, w porównaniu do ich liczby określonej u zwierząt kontrolnych.

W celu nasilenia działania immunoprotekcyjnego badanej doświadczalnej szczepionki, postanowiono wzbogacić preparat zawierający antygeny rROP2 i rROP4 w rekombinantowe formy białek rGRA4 i/lub rSAG1 *Toxoplasma*. W związku z tym w kolejnych etapach prowadzonych badań oceniano właściwości immunogenne i ochronne trzech trójskładnikowych szczepionek podjednostkowych zawierających jako antygeny szczepionkowe rekombinantowe formy białek: rROP2+rGRA4+rSAG1, rROP2+rROP4+rGRA4, rROP2+rROP4+rSAG1. Dodatkowo, badania tego etapu przeprowadzono z zastosowaniem trzech szczepów myszy, C57BL/6 (haplotyp H-2^b), C3H/HeJ (haplotyp H-2^k) i BALB/c (haplotyp H-2^d), o różnicowanej, determinowanej genetycznie, odpowiednio, wysokiej, średniej i niskiej wrażliwości na zarażenie *T. gondii*. Na podstawie wykonanych doświadczeń wykazano, iż potencjał immunogenny i immunoprotekcyjny badanych, doświadczalnych szczepionek przeciwko toksoplazmozie zależny był nie tylko od ich składu antygenowego, ale także od wrodzonej wrażliwości zwierząt laboratoryjnych na toksoplazmozę.

Najsilniejszym działaniem ochronnym spośród badanych podjednostkowych preparatów rekombinantowych charakteryzowała się szczepionka rROP2+rROP4+rSAG1. U zwierząt immunizowanych tą kompozycją białek zaobserwowano 90% (myszy szczepu C57BL/6), 71% (myszy szczepu C3H/HeJ) i 77% (myszy szczepu BALB/c) redukcję liczby cyst *T. gondii* DX w mózгах, w porównaniu do liczby cyst określonej dla zwierząt kontrolnych. Ten silny, choć nadal częściowy, efekt ochronny szczepionki rROP2+rROP4+rSAG1 skorelowany był z indukcją u zwierząt immunizowanych antygenowo swoistej humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej, ocenianej, odpowiednio, w oparciu o wytwarzanie antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgG1 i IgG2a lub IgG2c oraz *in vitro* syntezę cytokin typu Th1.

Prace z moim współautorstwem dotyczące tej tematyki oraz wykorzystania antygenów rekombinowanych jako antygenów diagnostycznych są nadal kontynuowane w Zakładzie Immunoparazytologii UŁ.

PUBLIKACJE HABILITANTA DOTYCZĄCE TEJ TEMATYKI

I.p.	Dane bibliograficzne	IF	MNIS W
1.	Gatkowska J., Dziadek B., Dziadek J., Dzitko K. , Długońska H. Recombinant MAG1 Protein of <i>Toxoplasma gondii</i> as a Diagnostic Antigen. Polish Journal of Microbiology 2015, Vol. 64, No 1, 55–59	0,871	15
2.	Grzybowski MM, Dziadek B, Dziadek J, Gatkowska J, Dzitko K. , Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : Cloning, expression and immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens. Exp Parasitol. 2015 Jan 12;150C:1-6.	1,859	25
3.	Dziadek B., Gatkowska J., Grzybowski M., Dziadek J., Dzitko K. , Długonska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : The vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. <i>Experimental Parasitology</i> 2012; 131 (1), pp. 133-138	2,154	25
4.	Dziadek B., Gatkowska J., Brzostek A., Dziadek J., Dzitko K. , Grzybowski M., Długonska H. Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of <i>Toxoplasma gondii</i> in murine models of experimental toxoplasmosis. <i>Vaccine</i> 2011; 29 (4), pp. 821-830	3,766	32
5.	Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K. , Długonska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. Exp Parasitol. 2009 Sep;123(1):81-9.	1,773	27
6.	Gatkowska J., Dziadek B., Brzostek A., Dziadek J., Dzitko K. , Długońska H. Determination of diagnostic value of <i>Toxoplasma gondii</i> recombinant ROP2 and ROP4 antigens in mouse experimental model. <i>Polish Journal of Microbiology</i> 2010; 59 (2), pp. 137-141	0,660	9

2.4. BEHAWIORALNE NASTĘPSTWA ZARAŻENIA *TOXOPLASMA GONDII*

Od roku 2011 uczestniczę także w badaniach mających na celu określenie behawioralnych skutków zarażenia *Toxoplasma gondii*. Przez lata uważano, że inwazja tym pierwotniakiem może stanowić poważne zagrożenie przede wszystkim dla osobników o obniżonej odporności, których osłabiony układ immunologiczny nie jest w stanie skutecznie ograniczyć ekspansji szybko namnażających się tachyzoitów, co w konsekwencji prowadzi do poważnych uszkodzeń tkanek. Jednocześnie zakładano, że u osób o sprawnej odporności krótkotrwała i często bezobjawowa faza ostra zarażenia przechodzi szybko w przewlekłą, charakteryzującą się obecnością cyst tkankowych m.in. w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), w trakcie której pasożyt nie wpływa znacząco na homeostazę ustroju żywiciela. Jednakże w świetle coraz większej liczby doniesień literaturowych, pogląd ten ulega weryfikacji, ze względu na możliwą korelację pomiędzy nosicielstwem pasożyta, a zwiększonym ryzykiem występowania różnych chorób neurologicznych, zaburzeń psychicznych i zmian nastroju leżących u podstaw tak poważnych chorób jak schizofrenia, choroba Parkinsona itp. Ponadto, wykazano bezsprzecznie ukierunkowany wpływ pasożyta na zachowanie żywicieli pośrednich. Dowiedziono bowiem, że pierwotniak jest nie tylko modulatorem naturalnych zachowań obronnych u gryzoni, ale także zanotowano statystycznie większą częstość występowania określonych cech osobowości u ludzi zarażonych *T. gondii*. Chociaż opisane zjawiska są przedmiotem licznych dyskusji, ich dokładny mechanizm pozostaje nadal nieznan. Włączając się w nurt prowadzonych na świecie badań zmierzających do wyjaśnienia podłoża zmian indukowanych przez pasożyta, wykonano testy behawioralne z wykorzystaniem modelu doświadczalnej toksoplazmozy u myszy laboratoryjnych. Ponadto, biorąc pod uwagę, że zaburzenia w prawidłowym stężeniu kluczowych neuroprzekaźników mogą znacząco wpływać na zachowanie zwierząt określono także aktywność monoaminergicznych systemów neurotransmisyjnych w strukturach anatomicznych mózgowia myszy zaangażowanych w naturalne zachowania obronne oraz odpowiedzialnych za kontrolę stanów emocjonalnych i integrację bodźców (grant NCN nr N N302 636340; wykonawca). Uzyskane wyniki stanowią wstęp do dalszych badań nad poznaniem i wyjaśnieniem negatywnych skutków inwazji *T. gondii* do OUN u ssaków.

Prace z moim współautorstwem dotyczące tej tematyki, są nadal kontynuowane w Zakładzie Immunoparazytologii UŁ.

PUBLIKACJE HABILITANTA DOTYCZĄCE TEJ TEMATYKI

I.p.	Dane bibliograficzne	IF	MNiSW
1.	Gatkowska J., Wieczorek M., Dziadek B., Dzitko K. , Długowska H. Sex-dependent neurotransmitter level changes in brains of <i>Toxoplasma gondii</i> infected mice. <i>Experimental Parasitology</i> 2013; 133(1), pp. 1-7	1,859	25
2.	Gatkowska J., Wieczorek M., Dziadek B., Dzitko K. , Długowska H. Behavioral changes in mice caused by <i>Toxoplasma gondii</i> invasion of brain. <i>Parasitology Research</i> 2012; 111 (1), pp. 53-58	2,852	25

2.5. PROTEOMY BAKTERYJNE, GRZYBICZE I ROŚLINNE

Doświadczenie naukowe, jakie nabyłam podczas realizacji pracy doktorskiej związanej z otrzymywaniem map białkowych oraz podjęta własna współpraca z prof. dr hab. Jarosławem Dziadkiem z Instytutu Biologii Medycznej PAN, prof. dr hab. Małgorzatą Posmyk z Katedry Ekofizjologii i Rozwoju Roślin UŁ oraz dr. Rafałem Szewczykiem z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ, zaowocowały opracowaniem (po optymalizacji warunków metody 2D SDS-PAGE w każdym przypadku) **proteomu: bakteryjnego *Mycobacterium tuberculosis*** (umowa UŁ 501/040057 „Kompleksowe badania interakcji wybranych białek ostrej fazy oraz cytokin z komórkami oraz antygenami komórkowymi *Mycobacterium tuberculosis*” 2. 11. 2011 – 31. 10. 2012, w ramach InterMolMed, POIG.01.01.02-10-107/09, ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, „Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki – patogen – czynniki środowiska”: 2007-2013; wykonawca), **nasion *Cucumis dativeus* L.** kondycjonowanych z melatoniną (grant NCN nr N N310 111940; wykonawca) oraz **grzyba *Metarhizium robertsii*** (grant NCN UMO-2011/01/B/NZ9/02898).

PUBLIKACJE HABILITANTA DOTYCZĄCE TEJ TEMATYKI

I.p.	Dane bibliograficzne	IF	MNiSW
1.	Szewczyk R., Soboń A., Różalska S., Dzitko K. , Waidelich D., Długoński J. Intracellular proteome expression during 4-n-nonylphenol biodegradation by the filamentous fungus <i>Metarhizium robertsii</i> . <i>Inter. Biodeter. Biodegra.</i> 2014 Sept 93, 44–53.	2,235	30
2.	Kołodziejczyk I., Dzitko K. , Szewczyk R., Posmyk M.M. I. Impact of hydropriming supplemented with melatonin on corn (<i>Zea mays</i> L.) seed protein profiles during germination under optimal temperature conditions. <i>J. Pineal. Res.</i> 2015 - praca w recenzji.	7.812	40

3.	Kołodziejczyk I., Dzitko K. Szewczyk R. Posmyk M.M. II. Impact of hydopriming supplemented with melatonin on corn (<i>Zea mays</i> L.) seed protein profiles during germination under chilling stress conditions. <i>J. Pineal. Res.</i> 2015 - praca w recenzji.	7.812	40
----	---	-------	----

2.6. BADANIA BIOLOGICZNE, CYTOTOKSYCZNOŚĆ, PROLIFERACJA

Umiejętność prowadzenia hodowli różnych pierwotnych i ciągłych linii komórkowych oraz wiedza i znajomość testów mających na celu ocenę morfologii, żywotności i intensywności proliferacji komórek, a także umiejętność posługiwania się technikami immunoenzymatycznymi i immunofluorescencyjnymi oraz podjęta współpraca z prof. dr hab. Przemysławem Lewkowiczem z Katedry Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i dr hab. n. farm. Agatą Paneth (A. Siwek) z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie zaowocowała licznymi publikacjami, których jestem współautorem.

PUBLIKACJE HABILITANTA DOTYCZĄCE TEJ TEMATYKI

I.p.	Dane bibliograficzne	IF	MNISW
1.	Paneth A, Plech T, Kaproń B, Hagel D, Kosikowska U, Kuśmierz E, Dzitko K. , Paneth P. Design, synthesis and biological evaluation of 4-benzoyl-1-dichlorobenzoylthiosemicarbazides as potent Gram-positive antibacterial agents. <i>J Enz Inhib Med Chem.</i> 2015 DOI:10.3109/14756366.2015.1036050	2,383	25
2.	Paneth A, Stączek P, Plech T, Strzelczyk A, Dzitko K. , Wujec M, Kuśmierz E, Kosikowska U, Grzegorzczak A, Paneth P. Biological evaluation and molecular modelling study of thiosemicarbazide derivatives as bacterial type IIA topoisomerases inhibitors. <i>J Enz Inhib Med Chem.</i> 2015 DOI: 10.3109/14756366.2014.1003214.	2,383	25
3.	Siwek A., Plech T., Trotsko N., Kosikowska U., Malm A., Dzitko K. , Paneth P. Conformational Preference of Potassium Salts of N-Acylhydrazinecarbodithioates with Antifungal Activity. Combined Experimental and Theoretical Approach. <i>Curr Comput Aided Drug Des.</i> 2014 May 21	1,942	25
4.	Kuśmierz E., Siwek A., Kosikowska U., Malm A., Stefańska J., Dzitko K. and Wujec M. Antibacterial activity and structure-activity relationship studies of 4-aryl/alkyl-1-(diphenylacetyl)thiosemicarbazides. <i>Letters in Drug Design & Discovery</i> 2013; 10(8):748-757.	0,961	15
5.	Kuśmierz E., Siwek A., Kosikowska U., Malm A., Stefańska J., Dzitko K. and Wujec M. Antibacterial activity and structure-activity relationship studies of 4-substituted-5-(diphenylmethyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones <i>Letters in Drug Design & Discovery</i> 2013; 10(2):95-101.	0,961	15
6.	Siwek A., Stefańska J., Dzitko K. , Ruszczak A. Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against <i>Candida</i> species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives. <i>J Mol Model.</i> 2012 Sep;18(9):4159-70.	2,055	25

7.	Lewkowicz N., Lewkowicz P., Dzitko K. , Kur B., Tarkowski M., Kurnatowska A., Tchórzewski H. Dysfunction of CD4+CD25high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. <i>J Oral Pathol Med.</i> 2008 Sep;37(8):454-61.	1,630	27
8.	Lewkowicz P., Tchórzewski H., Dytnerka K. , Banasik M., Lewkowicz N. Epidermal growth factor enhances TNF-alpha-induced priming of human neutrophils. <i>Immunol Lett.</i> 2005 Jan 31;96(2):203-10.	2,301	20

IX. Dane bibliometryczne

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe w formie monotematycznego cyklu publikacji	Punkty MNiSW *	IF*
10 publikacji:	169	14,038
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)		
A. Przed uzyskaniem stopnia doktora (2 publikacje):	27	2,985
B. Po uzyskaniu stopnia doktora (19 publikacji):	430	35,059
21 publikacji:	457	38,044
Autorstwo lub współautorstwo monografii, publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR, o których mowa w p. 2.1.		
A. Przed uzyskaniem stopnia doktora (3 publikacje):	12	-
B. Po uzyskaniu stopnia doktora (6 publikacji + 2 publikacje w Zeszytach Zjazdowym):	36	-
11 publikacji:	48	-
Liczba publikacji:	RAZEM = 42	674
Liczba cytowań (Web of Science) bez autocytaowań: 01. 04. 2015	220	
Index Hirscha (Web of Science): 01. 04. 2015	10	
Liczba patentów:	2	
Liczba projektów badawczych: (w 4 – kierownik, w 5 - wykonawca)	9	

* IF i punkty MNiSW podane zgodnie z rokiem ukazania się publikacji.

Katarzyna
Dzitko

Łódź, 1. 04. 2015 r.