



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Autoreferat

Justyna Gatkowska

**Immunoprofilaktyka toksoplazmozy
w kontekście wpływu inwazji *Toxoplasma gondii*
na ośrodkowy układ nerwowy**

Łódź, 2018

IMIĘ I NAZWISKO

Justyna Gatkowska

POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

(z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu)

magistra	Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, biologia (mikrobiologia), czerwiec 2001
Tytuł pracy magisterskiej: "Przeżywalność szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> scv (small colony variants) u myszy, po podaniu preparatów farmakologicznych: menadion/hemina"	
doktora	Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, nauki biologiczne, specjalność immunologia, listopad 2005
Tytuł rozprawy doktorskiej: "Doświadczalna toksoplazmoza u myszy laboratoryjnych (<i>Mus musculus</i>) jako model do badań nad swoistą odpornością w zarażeniach <i>Toxoplasma gondii</i> "	

INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Zakład Immunoparazytologii	od 01.10.2005
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej	– stanowisko asystenta
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii	
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska	od 20.02.2006
Uniwersytet Łódzki	– stanowisko adiunkta

WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA* 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.):

TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

**„Immunoprofilaktyka toksoplazmozy w kontekście wpływu inwazji
Toxoplasma gondii na ośrodkowy układ nerwowy”**

Przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe obejmuje monotematyczny cykl 5 oryginalnych publikacji naukowych oraz 2 prac przeglądowych (Tabela 1 i 2). Sumaryczny IF ujętych prac, podany według roku ich publikacji wynosi: **12,738**, natomiast łączna suma punktów MNiSW podana zgodnie z rokiem ukazania się prac / aktualnym ujednoczonym wykazem czasopism punktowanych z dnia 9 grudnia 2016 wynosi: **175 / 180**.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Tabela 1. Prace oryginalne:

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Gatkowska J. , Gąsior A., Kur J., Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis. <i>Experimental Parasitology</i> , 2008, 118: 266-270.	1,751	20*
			25**
2.	Gatkowska J. , Wieczorek M., Dziadek B., Dzitko K., Długońska H. Behavioral changes in mice caused by <i>Toxoplasma gondii</i> invasion of brain. <i>Parasitology Research</i> , 2012, 111: 53–58.	2,852	25*
			30**
3.	Gatkowska J. , Wieczorek M., Dziadek B., Dzitko K., Długońska H. Sex-dependent neurotransmitter level changes in brains of <i>Toxoplasma gondii</i> infected mice. <i>Experimental Parasitology</i> , 2013, 133: 1-7.	1,859	25*
			25**
4.	Gatkowska J.M. , Dziadek B., Dziadek J., Dzitko K., Długońska H. Recombinant MAG1 protein of <i>Toxoplasma gondii</i> as a diagnostic antigen. <i>Polish Journal of Microbiology</i> , 2015, 64: 55-59.	0,750	15*
			15**
5.	Gatkowska J. , Wieczorek M., Dziadek B., Dzitko K., Dziadek J., Długońska H. Assessment of the antigenic and neuroprotective activity of the subunit anti- <i>Toxoplasma</i> vaccine in <i>T. gondii</i> experimentally infected mice <i>Veterinary Parasitology</i> , 2018, 254: 82-94.	2,356	40*
			40**

Tabela 2. Prace przeglądowe:

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Hiszczyńska-Sawicka E., Gatkowska J.M. , Grzybowski M.M., Długońska H. Veterinary vaccines against toxoplasmosis. <i>Parasitology</i> , 2014, 141: 1365-1378.	2,35	35*
			30**
2.	Gatkowska J. , Długońska H. The role of extracellular vesicles in parasite-host interaction. <i>Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej</i> , 2016, 70: 951-958.	0,82	15*
			15**

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe w formie monotematycznego cyklu publikacji	łącznie	
	<i>IF</i>	<i>Punkty MNiSW</i>
sumaryczny <i>IF</i> (podany zgodnie z rokiem wydania publikacji) oraz <i>punkty MNiSW</i> (*podane zgodnie z rokiem publikacji) (**podane zgodnie z listą z 2016 r.)	12,738	175*
		180**

FINANSOWANIE I WSPÓŁPRACA:

Wykonane przeze mnie prace badawcze, które wchodzą w skład monotematycznego cyklu publikacji były finansowane ze środków pochodzących z:

- Narodowego Centrum Nauki w ramach kierowanego przeze mnie projektu „Badanie immunogenne i neuroprotekcynne działania rekombinowanych szczepionek przeciw toksoplazmozie z użyciem mysiego modelu doświadczalnego” [N N302 636340],
- dofinansowania (MNiSW) badań naukowych młodych naukowców przyznanego na realizację projektu indywidualnego „Zmiany behawioralne u myszy zarażonych *T. gondii* – optymalizacja testu otwartego pola (OF)”,
- działalności własnej i statutowej Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Charakter wykonywanych doświadczeń obejmujących szeroki zakres zagadnień z różnych dziedzin wiedzy wymagał nawiązania współpracy naukowej z różnymi jednostkami naukowymi:

- z prof. dr. hab. Józefem Kurem z Katedry Mikrobiologii (obecnie Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii) Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej i jego zespołem (z dr inż. Elżbietą Hiszczyńską-Sawicką, dr hab. inż. Lucyną Holec-Gąsior, dr. inż. Arturem Gąsiorem, dr. inż. Bartłomiejem Ferrą),
- z dr. hab. Markiem Wieczorkiem, prof. nadzw. UŁ z Katedry Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego,
- oraz z prof. dr. hab. Jarosławem Dziadkiem z Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk i jego zespołem (z dr hab. Anną Brzostek).

OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO (osiągniętych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania)

Wprowadzenie

Toksoplazmoza, jedna z najbardziej powszechnych inwazji pasożytniczych na świecie, wywołwana jest przez kosmopolitycznego pierwotniaka *Toxoplasma gondii*. Pasożyt ten charakteryzuje się złożonym cyklem rozwojowym obejmującym żywiciela ostatecznego i różnych żywicieli pośrednich. Jedynymi znanymi żywicielami ostatecznymi *T. gondii* są kotowate (*Felidae*), u których pierwotniak przechodzi fazę płciową cyklu rozwojowego, w wyniku której w nabłonku jelita cienkiego żywiciela powstają wydalone na zewnątrz zakaźne formy środowiskowe – sporozycyty zamknięte w oocystach. Rolę żywicieli pośrednich pełnią różne gatunki zwierząt stałocieplnych, a także człowiek, w organizmach których pasożyt rozmnaża się na drodze bezpłciowej skutkującej zwykle stałym nosicielstwem pierwotniaka w postaci cyst tkankowych zawierających bradyzoity, zlokalizowanych głównie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i mięśniach poprzecznie prążkowanych [18, 21].

Wysoki odsetek nosicielstwa związany jest przede wszystkim z drogami transmisji pasożyta. Najczęstszym źródłem zarażenia *T. gondii* jest spożycie niewłaściwie obrobionego termicznie mięsa zawierającego cysty tkankowe lub produktów spożywczych (surowych owoców, warzyw) i wody skażonych obecnymi w glebie oocystami. Dodatkowo pasożyt zdolny jest do przenoszenia się w obrębie samej populacji ludzkiej drogą przezłożyskową od pierwotnie zarażonej kobiety ciężarnej do płodu (toksoplazmoza wrodzona), przez transfuzję krwi oraz poprzez przeszczep tkankowy organu od nosiciela pasożyta [18, 21].

W wyniku dostania się do organizmu form zakaźnych pierwotniaka – bradyzoitów (z cyst tkankowych), sporozycytów (z oocyst) lub tachyzoitów (toksoplazmoza wrodzona) rozwija się toksoplazmoza, w trakcie której pierwotniak intensywnie namnaża się w różnych komórkach i tkankach, posiada bowiem zdolność inwazji właściwie każdej komórki jądrowej. Intensywna proliferacja pasożyta prowadzi do uruchomienia najpierw wrodzonej, a następnie nabytej odpowiedzi odpornościowej, której presja powoduje konwersję tachyzoitów do bradyzoitów i przejście fazy ostrej toksoplazmozy w przewlekłą związaną z obecnością cyst tkankowych w organizmie żywiciela [10, 35].

Toksoplazmoza, z reguły bezobjawowa u osób immunokompetentnych, może mieć burzliwy a nawet śmiertelny przebieg u osobników z osłabionym (biorcy przeszczepów, pacjenci z AIDS) lub niedojrzałym (płody) układem odpornościowym. Dodatkowo toksoplazmoza stanowi nie tylko zagrożenie życia i zdrowia ludzi, ale powoduje rocznie duże straty hodowlane wynikające z konsekwencji zarażenia, takich jak poronienia, u zwierząt gospodarskich [9, 18].

Przez wiele lat uważano, że przewlekła toksoplazmoza jest stanem podklinicznym niewywołującym żadnych negatywnych skutków u immunokompetentnych nosicieli. Ten pogląd został zakwestionowany gdy odkryto, iż pierwotniak zdolny jest do manipulacji zachowaniem żywicieli pośrednich. Liczne badania eksperymentalne, głównie z użyciem mysiego i szczurzego modelu doświadczalnego, doprowadziły do sformułowania tzw. „hipotezy manipulacji”, w myśl której pasożyt w sposób celowy i ukierunkowany zmienia zachowanie żywiciela pośredniego w taki sposób, by zwiększyć szansę dostania się do organizmu żywiciela ostatecznego, u którego przebiega rozmnażanie płciowe stanowiące podstawę zmienności [42]. Liczne badania ankietowe pozwoliły na zaobserwowanie wpływu inwazji *T. gondii* na zachowanie ludzi [13], a niedawno udowodniono także, iż zarażenie *T. gondii* zmienia w istotny sposób zachowanie szympanów [33]. Ponadto, istnieje wiele doniesień na temat potencjalnego związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy nosicielstwem pierwotniaka, a zwiększonym ryzykiem rozwoju poważnych chorób i zaburzeń OUN takich jak schizofrenia [15]. Do dziś mechanizm obserwowanych zmian neurologicznych nie został dokładnie poznany.

Obecnie leczenie toksoplazmozy opiera się na stosowaniu chemioterapeutyków o aktywności przeciw pasożytniczej, które choć ograniczają namnażanie szybko dzielących się tachyzoitów to zwykle nie są skuteczne w eliminacji zamkniętych w cystach tkankowych bradyzoitów odpowiedzialnych za przewlekłą inwazję i zmiany behawioralne u nosicieli [18, 21]. Dlatego najbardziej korzystnym rozwiązaniem byłoby opracowanie skutecznej immunoprofilaktyki zarażenia *T. gondii* zarówno dla ludzi, jak i zwierząt. W chwili obecnej jedyną dostępną szczepionką przeciw toksoplazmozie zawiera żywe atenuowane tachyzoity pierwotniaka, niezdolne do tworzenia cyst tkankowych i oocyst, i z tego względu jest stosowana w ograniczonym zakresie jedynie w celu zmniejszenia częstości poronień u owiec. Ryzyko rewersji szczepu atenuowanego do formy zjadliwej sprawia, iż szczepionka nie może

być stosowana u ludzi. Dlatego nadal trwają intensywne badania służące opracowaniu skutecznej immunoprofilaktyki/immunoterapii toksoplazmozy o możliwie szerokim i uniwersalnym zastosowaniu [22, 23].

Niedostatkom terapii i immunoprofilaktyki toksoplazmozy towarzyszą komplikacje związane z wykrywaniem inwazji i określaniem jej fazy, co może mieć istotne znaczenie dla stawianej diagnozy warunkującej podjęcie wczesnego i nierzadko koniecznego leczenia w przypadku np. osób z obniżoną odpornością albo kobiet ciężarnych. Diagnostyka toksoplazmozy opiera się głównie na testach serologicznych takich jak test immunoenzymatyczny ELISA, służących wykrywaniu swoistych immunoglobulin syntetyzowanych w organizmie w odpowiedzi na inwazję *T. gondii*. Niemniej jednak, zbyt niski poziom przeciwciał u osób z obniżoną odpornością lub możliwość utrzymywania się przeciwciał klasy IgM w fazie przewlekłej zarażenia może uniemożliwić trafne rozpoznanie samej parazytozy bądź jej fazy [28]. Dlatego diagnostykę podstawową niejednokrotnie uzupełnia się dodatkowymi testami np. na awidność antygenowo swoistych immunoglobulin IgG i wciąż poszukuje się nowych, bardziej czułych i precyzyjnych narzędzi diagnostycznych pozwalających na jednoczesne wykrycie inwazji *T. gondii* i określenie jej fazy u możliwie jak najszerszej grupy pacjentów.

Zaakcentowane nurty badawcze – potrzeba opracowania skutecznej immunoprofilaktyki toksoplazmozy i udoskonalenia wykorzystywanych metod diagnostycznych oraz poznanie podstaw manipulacji zachowaniem żywicieli pośrednich – znalazły wyraz w przedłożonym do oceny cyklu publikacji stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego. Wszystkie opisane zagadnienia pozostają nadal ważne i aktualne oraz są ze sobą ściśle powiązane. Skuteczna immunoprofilaktyka toksoplazmozy oznacza ograniczenie liczby nowych przypadków klinicznych, ale nie rozwiązuje problemu diagnostyki u nosicieli pierwotniaka, zwłaszcza wśród osób z obniżoną odpornością, u których aktywna toksoplazmoza jest najczęściej rezultatem reaktywacji przewlekłego zarażenia *T. gondii*. Z kolei narzędzia wykorzystywane do opracowywania nowych metod diagnostycznych znalazły zastosowanie przy konstruowaniu potencjalnych preparatów szczepionkowych, a wiele silnie immunogennych białek pasożyta wytypowanych w badaniach nad immunoprofilaktyką toksoplazmozy sprawdzało się również w testach z zakresu diagnostyki inwazji *T. gondii*. Już udowodniony (zmiany behawioralne) i domniemany (poważne

zaburzenia neurologiczne), negatywny wpływ pasożyta na OUN uzasadnia dążenie do bardziej precyzyjnej diagnostyki, a przede wszystkim do skutecznej immunoprofilaktyki, które mogą w istotny sposób przyczynić się do szybszego wykrywania zarażenia i przeciwdziałania rozwojowi poważnych chorób i zaburzeń związanych z inwazją *T. gondii* do OUN.

OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

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

Celem przedstawionego osiągnięcia naukowego było opracowanie skutecznej i bezpiecznej szczepionki doświadczalnej przeciw inwazji *Toxoplasma gondii* oraz jej wszechstronne badanie pod kątem immunogenności i aktywności protekcyjnej z wykorzystaniem modelu eksperymentalnej toksoplazmozy u myszy laboratoryjnych. Pomimo wielu lat badań, zarażenia pasożytnicze, w tym inwazja *T. gondii*, wciąż stanowią istotny problem medyczny, którego nadal nie udało się rozwiązać z pomocą skutecznej immunoprofilaktyki. Potrzeba opracowania szczepionki, która znalazłaby zastosowanie zarówno w medycynie, jak i weterynarii jest tym bardziej uzasadniona, iż coraz więcej danych pokazuje nie tylko istotny wpływ pierwotniaka na zachowanie żywicieli pośrednich, ale co niepokojące, prace dotyczące nosicielstwa pasożyta u ludzi wskazują na jego potencjalny związek przyczynowo-skutkowy ze zwiększonym ryzykiem rozwoju poważnych zaburzeń i schorzeń ośrodkowego układu nerwowego takich jak schizofrenia, choroba Parkinsona lub epilepsja, [15, 27, 37]. Ponadto, postuluje się, iż stała obecność pasożyta w OUN może przyczyniać się do skłonności samobójczych, depresji a nawet bólów głowy [6, 20, 34]. Biorąc pod uwagę te fakty, najbardziej nowatorska i unikatowa część osiągnięcia obejmuje testowanie skuteczności potencjalnego doświadczalnego preparatu immunoprofilaktycznego w zapobieganiu, indukowanym obecnością pasożyta, zmianom w obrębie OUN definiowanym na podstawie uznawanych za najbardziej swoiste w przebiegu toksoplazmozy parametrów behawioralnych i neurochemicznych.

Na realizację postawionego celu badawczego składało się kilka poszczególnych zadań badawczych.

Etap 1**Opracowanie modelu doświadczalnego do badań z zakresu immunoprofilaktyki toksoplazmozy**

Pierwszym etapem doświadczalnym było opracowanie i optymalizacja modelu badawczego umożliwiającego wiarygodne testowanie potencjalnych preparatów szczepionkowych, jako że były to pierwsze badania tego typu prowadzone w Zakładzie Immunoparazytologii UŁ przy współpracy z Katedrą Mikrobiologii (obecnie Katedrą Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii) Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej (praca doświadczalna 1). Podstawowym problemem potencjalnej immunoprofilaktyki zarażeń *T. gondii* jest złożony, także pod względem antygenowym, cykl życiowy pierwotniaka, przez co z reguły najsilniejszą protekcję generują pełnokomórkowe preparaty szczepionkowe takie jak *Toxovax* zawierający żywe atenuowane tachyzoity szczepu S48 [3, 22]. Oczywiście względy bezpieczeństwa związane z możliwością rewersji organizmu szczepionkowego do formy zjadliwej (w przypadku szczepionek żywych atenuowanych), lub też poważnymi skutkami ubocznymi wynikającymi z nie w pełni zdefiniowanej, bardzo złożonej struktury antygenowej (w przypadku preparatów pełnokomórkowych inaktywowanych) powodują, że obecnie przy opracowywaniu różnorodnych szczepionek poszukuje się znacznie bezpieczniejszych, a równie immunogennych komponentów. Włączając się w ten nurt sprawdzono potencjalną użyteczność immunoprofilaktyczną fimbrii *E. coli* typu Dr posiadających w swej strukturze epitopy białek istotnych dla procesu inwazji oraz wewnątrzkomórkowej replikacji pasożyta, SAG1, GRA1 i MAG1. Antygen SAG1 jest głównym białkiem powierzchniowym tachyzoitów stanowiącym niemal 5% puli białek pierwotniaka zaangażowanym w proces adhezji do komórki żywicielskiej, który jest warunkiem koniecznym inwazji *T. gondii*. GRA1 to kolejne istotne dla inwazji białko wydzielane z wyspecjalizowanych organelli pierwotniaka - granul o dużej gęstości elektronowej, niezbędne dla wewnątrzkomórkowego przeżycia pasożyta i stanowiące 2% frakcji białek *T. gondii*. Ostatni z wybranych antygenów, choć podlegający ekspresji także w stadium tachyzoitu, powszechnie wiązany jest z formą bradyzoitu stanowiąc integralne białko budujące cystę tkankową umożliwiającą wieloletnie bytowanie pierwotniaka w organizmie żywiciela [12, 24, 29]. Wszystkie ww. białka są silnie immunogenne i mają

zdolność wzbudzania swoistej odpowiedzi odpornościowej [30, 31, 32, 39]. Jednocześnie sprawdzono także potencjalną przydatność szczepionkową rekombinowanych białek SAG1, GRA1 i MAG1 jako kolejnej bezpiecznej, w pełni zdefiniowanej i już stosowanej w dostępnej komercyjnie immunoprofilaktyce innych jednostek chorobowych, alternatywy dla preparatów pełnokomórkowych. Kontrolę pozytywną wzbudzającą silną swoistą odporność anty-*T. gondii* stanowił lizat tachyzoitów pasożyta, będący źródłem licznych antygenów głównie cytoplazmatycznych i wydzielniczych (TLA). Do doświadczeń wybrano myszy C3H/HeJ o naturalnej, genetycznie determinowanej, średniej podatności na toksoplazmozę i mniejszej, w porównaniu do innych szczepów myszy, wrażliwości na lipopolisacharyd obecny w preparacie fimbrii, ze względu na spontaniczną mutację w genie kodującym TLR4. Zastosowano kalendarz szczepień obejmujący trzy dawki badanych antygenów podawanych w dwutygodniowych odstępach czasu. Ze względu na charakter badań służących również optymalizacji warunków prowadzonych doświadczeń użyto jako adiuwantu – adiuwantu Freund'a, będącego sprawdzonym i powszechnie stosowanym narzędziem doświadczalnym wzmacniającym immunogenność antygenów. U immunizowanych i kontrolnych myszy wywoływano eksperymentalną toksoplazmozę w celu określenia aktywności protekcyjnej badanych preparatów oraz sprawdzono poziom swoistych przeciwciał wytworzonych w odpowiedzi na bodziec antygenowy, w surowicach izolowanych przed podaniem pierwotniaka. Analiza uzyskanych wyników z zakresu odpowiedzi humoralnej wskazała, iż rekombinowane fimbrie, choć silnie immunogenne, nie wzbudzały znaczącej produkcji przeciwciał przeciw obecnym w ich strukturze epitopom wybranych białek pasożyta, natomiast zarówno białka rekombinowane, jak i natywne (TLA) były zdolne do indukcji syntezy znacznych ilości antygenowo swoistych immunoglobulin. Wyniki oznaczania liczby cyst u immunizowanych zwierząt jednoznacznie wykazały na duży potencjał protekcyjny preparatu natywnego (redukcja liczby cyst o 96%) oraz białek rekombinowanych (redukcja liczby cyst o 89%).

Osiągnięcia:

1. Opracowanie i zoptymalizowanie modelu doświadczalnego dla dalszych prac z zakresu immunoprofilaktyki toksoplazmozy.

2. Wykazanie, że krótkie fragmenty nawet silnie immunogennych białek występujące w niewielkiej liczbie kopii w strukturze nośnika (rekombinowane fimbrie) nie stanowią dostatecznie silnego bodźca antygenowego, by wzbudzić silną protekcyjną odpowiedź u immunizowanych myszy.
3. Stwierdzenie iż, białka natywne pasożyta, choć najbardziej efektywne w indukcji odporności protekcyjnej (skutkującej redukcją liczby cyst tkankowych obecnych w mózgowiu myszy), ze względu na nie do końca zdefiniowany i kontrolowany skład białkowy nie mogą stanowić podstawy potencjalnej szczepionki ale wskazują, iż preparaty wieloantygenowe mają większe szanse na wzbudzenie silnej swoistej odpowiedzi ochronnej.
4. Udowodnienie, że antygeny rekombinowane jako w pełni zdefiniowany i powtarzalny materiał badawczy stanowią doskonały materiał szczepionkowy do dalszych prac nad skuteczną immunoprofilaktyką toksoplazmozy.

Możliwe zastosowanie:

1. Synteza innych kluczowych dla inwazji i przeżycia pasożyta białek typowych dla różnych form rozwojowych pierwotniaka, jako składników potencjalnych narzędzi immunoprofilaktycznych.
2. Konstrukcja nowych wieloantygenowych preparatów szczepionkowych opartych na białkach rekombinowanych podawanych z bezpiecznymi adiuwantami zdolnymi do ukierunkowania odpowiedzi immunologicznej w kierunku szlaków Th1 związanych z eliminacją patogenów wewnątrzkomórkowych, w tym *T. gondii*.

Uzupełnieniem tej części badań jest praca przeglądowa (praca przeglądowa 1) opisująca aktualny stan wiedzy dotyczący prób opracowania skutecznej immunoprofilaktyki toksoplazmozy u zwierząt gospodarskich będących źródłem zarażenia dla ludzi, przede wszystkim, przez zawierające cysty pasożyta produkty mięsne oraz kotów, żywicieli ostatecznych pierwotniaka, odpowiedzialnych za obecność oocyst w środowisku, które stanowią zagrożenie zarówno dla ludzi, jak i zwierząt, w tym hodowanych w celach konsumpcyjnych.

Etap 2**Określenie wpływu inwazji *Toxoplasma gondii* na zachowanie oraz aktywność neurochemiczną myszy (żywicieli pośrednich pasożyta)**

Jak wspomniałam we wprowadzeniu, ze względu na brak oczywistych klinicznych objawów nosicielstwa *T. gondii* u większości osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym toksoplazmozę uważano za bezobjawową i niewpływającą w znaczący sposób na homeostazę ustroju żywiciela. Ten pogląd zaczął być kwestionowany, kiedy stwierdzono u zarażonych pasożytem szczurów i myszy zmiany behawioralne i sformułowano tzw. „hipotezę manipulacji”, w myśl której pasożyt w sposób celowy i ukierunkowany zmienia zachowanie żywicieli pośrednich w taki sposób, by częściej padali oni ofiarami żywiciela ostatecznego i by w ten sposób pierwotniak mógł ukończyć cykl życiowy i przejść fazę rozmnażania płciowego [42]. Dodatkowo badania na ochotnikach będących nosicielami pasożyta pozwoliły na stwierdzenie, iż obecność *T. gondii* w OUN wpływa także na zachowanie ludzi definiowane poprzez wybrane cechy osobowości [13]. Te niezwykle intrygujące dane skłoniły mnie do podjęcia dalszych badań zmierzających do poznania podłoża biologicznego manipulacji zachowaniem żywiciela oraz przeciwdziałania jego możliwym długoterminowym skutkom u nosicieli *T. gondii*.

Biorąc pod uwagę nadrzędny cel osiągnięcia w konfrontacji z fragmentarycznymi i często sprzecznymi doniesieniami literaturowymi, obejmującymi różne modele zwierzęce, szczepy pasożyta i przedziały czasowe fazy przewlekłej toksoplazmozy [19, 42], konieczne było opracowanie i zoptymalizowanie modelu doświadczalnej toksoplazmozy u myszy jako podstawy do badań z zakresu neurobiologii, obejmujących analizę zachowania zarażonych myszy oraz aktywność głównych systemów neurotransmisyjnych ośrodkowego układu nerwowego (praca doświadczalna 2 i 3). W tym celu nawiązałam współpracę z Katedrą Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Ze względu na dane literaturowe o preferencyjnej lokalizacji cyst pierwotniaka w obrębie ciał migdałowatych u szczurów z doświadczalną toksoplazmozą [41] postanowiono zweryfikować obserwację z użyciem samców myszy szczepu C57BL/6 naturalnie podatnego na toksoplazmozę (praca doświadczalna 2), co przejawia się formowaniem dużej, w porównaniu do innych szczepów myszy, liczby cyst w mózgowiu.

Ponadto, opisywane w literaturze zmiany behawioralne u gryzoni obserwowano w fazie przewlekłej inwazji, czasem nawet 12 miesięcy od wywołania eksperymentalnej toksoplazmozy [17]. Te interesujące doświadczenia wydawały się nieadekwatne do sformułowanej „hipotezy manipulacji”, szczególnie biorąc pod uwagę, iż szacowany średni czas przeżycia dzikiej myszy nie przekracza 2 miesięcy [14]. Zatem jeśli zmiana zachowania żywiciela ma faktycznie istotną biologicznie rolę w cyklu życiowym pierwotniaka, to powinna ujawniać się wcześniej w trakcie inwazji tak by rzeczywiście zwiększać transmisję *T. gondii* w środowisku. W celu weryfikacji postawionej hipotezy, po raz pierwszy przeprowadziliśmy analizę zachowania zarażonych pasożytem myszy w późnej fazie ostrej toksoplazmozy (3 tygodnie po zarażeniu) oraz wczesnej fazie przewlekłej (6 tygodni po zarażeniu). Do badań zastosowano test otwartego pola (OF), który umożliwia śledzenie szeregu parametrów związanych z aktywnością eksploracyjną i stanem emocjonalnym zwierząt. Wybrano czas 3 tygodni po zarażeniu ponieważ odpowiada on momentowi przechodzenia fazy ostrej inwazji w przewlekłą, co wiąże się z powstawaniem cyst tkankowych w mózgowiu, których ilościowe oznaczenie było jednym z celów badawczych pracy. Określano liczbę cyst pierwotniaka w formacji hipokampa i ciałach migdałowych jako strukturach głównie zaangażowanych w naturalne mechanizmy obronne podlegające manipulacji w przebiegu inwazji *T. gondii* [5]. Uzyskane wyniki nie ujawniły istotnego statystycznie tropizmu pasożyta do jednej z badanych struktur mózgowia, choć pomiary uzupełnione analizą zdjęć mikroskopowych skrawków tkankowych barwionych eozyną i hematoksyliną bezspornie wykazały obecność cyst w ośrodkach mózgowych ważnych z punktu widzenia naturalnych zachowań emocjonalno-obronnych myszy tj. ciałach migdałowych i formacji hipokampa. Ponadto, pokazano istotny statystycznie wpływ inwazji pierwotniaka na wybrane parametry behawioralne, z których najistotniejszym była zwiększona aktywność ruchowa. Wyższa aktywność lokomotoryczna w przebiegu inwazji *T. gondii* dobitnie świadczy o celowej manipulacji pasożyta, ponieważ jest ona sprzeczna z naturalnym zachowaniem zwierząt w trakcie ostrej fazy choroby o charakterze infekcyjnym – „*sickness behavior*”, gdy podstawą działania jest oszczędność energii niezbędnej do rekonwalescencji. Ponadto, koty, żywicieli ostateczni pasożyta, z natury wykazują zainteresowanie ruchomymi obiektami, zatem szczególnie ta zmiana zachowania gryzoni jest zgodna z hipotezą manipulacji [16, 42]. Najbardziej interesującym aspektem pracy jest poczyniona po raz pierwszy obserwacja, iż

większość zmian behawioralnych była najsilniej zaznaczona w fazie ostrej inwazji *T. gondii*, w porównaniu do fazy przewlekłej toksoplazmozy. Dodatkowo, wybrany w oparciu o cel naukowy pracy i dane literaturowe model zwierzęcy wskazał jak duże znaczenie w rozwoju obserwowanych zjawisk ma podatność żywiciela na zarażenie pasożytem.

Osiągnięcia:

1. Opracowanie i zoptymalizowanie modelu doświadczalnego dla dalszych badań z zakresu analizy parametrów behawioralnych u myszy zarażonych *T. gondii*.
2. Wykazanie, po raz pierwszy, istotnego wpływu inwazji pasożyta na zachowanie zwierząt już w późnej fazie ostrej toksoplazmozy, w porównaniu do fazy przewlekłej.
3. Pokazanie losowego rozmieszczenia cyst pasożyta w obrębie mózgowia myszy bez wyraźnego tropizmu do konkretnej struktury zaangażowanej w naturalne zachowania emocjonalno-obronne.
4. Stwierdzenie, iż przy analizie zachowań zwierząt, zwłaszcza w fazie ostrej inwazji, istotne znaczenie ma naturalna podatność żywiciela na toksoplazmozę.

Możliwe zastosowanie:

1. Dalszy wkład w poznanie mechanizmu leżącego u podstaw obserwowanych u zwierząt i ludzi zmian behawioralnych wywołanych inwazją *T. gondii*.
2. Zastosowanie opracowanego modelu doświadczalnego obejmującego zoptymalizowany test behawioralny, zdefiniowane przedziały czasowe i naturalną podatność żywiciela na toksoplazmozę w dalszych badaniach behawioralnych i neurochemicznych.

Chociaż zmiany behawioralne u zarażonych *T. gondii* żywicieli pośrednich są dość dobrze udokumentowane ich mechanizm nadal nie został poznany. Szereg danych literaturowych sugeruje możliwy udział układów neurotransmisyjnych OUN w rozwoju obserwowanych zjawisk [15, 40], stąd też kolejnym etapem realizacji postawionych celów badawczych było określenie aktywności systemów monoaminergicznych w przebiegu eksperymentalnej toksoplazmozy u myszy. Wykorzystując doświadczenia zdobyte w trakcie badań behawioralnych postanowiliśmy zmienić model zwierzęcy na szczep wsobny C3H/HeJ,

o średniej, warunkowanej genetycznie, naturalnej podatności na zarażenie pierwotniakiem, tak by jak najbardziej zminimalizować możliwe nieswoiste dla *T. gondii* objawy inwazji u myszy (praca doświadczalna 3). Jednocześnie średnia podatność wybranego szczepu myszy umożliwiała wiarygodne określenie obecności cyst pasożyta w ich mózgowiu po wywołaniu doświadczalnej toksoplazmozy. Ponadto do doświadczeń wybrano szczep Me49 *T. gondii* klasyfikowany jako średnio zjadliwy, ale silnie cystotwórczy, tak by inwazja pasożyta prowadziła do powstawania wystarczająco dużej liczby cyst, by możliwe było oznaczenie ich obecności nawet w objętych badaniami pojedynczych strukturach mózgowia. Pomimo sugerowanego udziału związków neurotransmisyjnych w rozwoju zmian behawioralnych w przebiegu inwazji *T. gonii*, dostępne bardzo nieliczne i fragmentaryczne dane obejmowały jedynie badania na całych mózgowiach i skupiały się na bezwzględnych poziomie neurotransmiterów, co nie oddaje faktycznej aktywności badanych układów sygnałowych w obszarach emocyjnych mózgowia i ich ewentualnego udziału w obserwowanych zjawiskach [36]. Dodatkowo, większość prac dotyczących wpływu pasożyta na zachowanie zwierząt prowadzona jest tylko na osobnikach jednej płci, bez uwzględnienia fundamentalnych różnic aktywności neurotransmisyjnej pomiędzy samicami i samcami [4]. Z tego względu zdecydowano się na przeprowadzenie szczegółowej, wielokierunkowej analizy, która po raz pierwszy obejmowała określenie indeksów utylizacyjnych monoamin w obrębie struktur mózgowia zaangażowanych w naturalne zachowania obronne, przetwarzanie emocji i integrację bodźców ruchowych zarówno u samic, jak i u samców w fazie ostrej (3 tygodnie po zarażeniu) i przewlekłej (6 tygodni po zarażeniu) toksoplazmozy. Uzyskane dane ponownie ujawniły, iż zmiany aktywności badanych systemów monaminergicznych były szczególnie silnie zaznaczone w fazie ostrej inwazji, której towarzyszyły przede wszystkim spadek indeksów utylizacyjnych noradrenaliny u samic i ich wzrost w niektórych strukturach mózgowia samców oraz wzrost aktywności serotonergicznej u samców. Jednakże najbardziej interesującym spostrzeżeniem był wzrost uwalniania dopaminy u samców z ostrą toksoplazmozą. Spekuluje się, że to głównie ten neurotransmitter związany jest z obserwowanymi tak u ludzi, jak i zwierząt zmianami zachowania podczas inwazji *T. gondii* do OUN [15, 40] m.in. z wykazaną w poprzedniej pracy zwiększoną aktywnością lokomotoryczną.

Osiągnięcia:

1. Opracowanie i zoptymalizowanie modelu doświadczalnego dla dalszych badań z zakresu analizy parametrów neurochemicznych u zarażonych *T. gondii* myszy.
2. Wykazanie, po raz pierwszy, istotnego wpływu inwazji pasożyta na aktywność monoaminergiczną wybranych struktur mózgowia zaangażowanych m.in. w naturalne zachowania obronne u zarażonych *T. gondii* myszy obu płci.
3. Pokazanie, po raz pierwszy, iż wpływ pasożyta na aktywność neurotransmisyjną jest widoczny już w fazie ostrej toksoplazmozy.
4. Stwierdzenie, iż płeć zwierząt ma fundamentalny wpływ na aktywność neurochemiczną w obrębie wybranych struktur mózgowia.
5. Zanotowanie, po raz pierwszy, wzrostu aktywności dopaminergicznej u samców myszy w ostrej fazie inwazji *T. gondii* i tym samym potwierdzenie możliwego udziału tego neurotransmitera w powstawaniu zmian behawioralnych u zarażonych osobników płci męskiej.

Możliwe zastosowanie:

1. Dalszy wkład w poznanie mechanizmu leżącego u podstaw obserwowanych u zwierząt i ludzi zmian behawioralnych wywołanych inwazją *T. gondii*.
2. Zastosowanie opracowanego modelu doświadczalnego w dalszych badaniach behawioralnych i neurochemicznych będących istotną częścią testowania przydatności potencjalnych preparatów szczepionkowych.

Uzupełnieniem dotychczas przedstawionych części osiągnięcia jest praca przeglądowa (praca przeglądowa 2) dotycząca udziału zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych w komunikacji wewnątrzgatunkowej i międzygatunkowej w trakcie inwazji pasożytów, w tym *T. gondii*. Omówiony został uniwersalny charakter i znaczenie pęcherzyków błonowych jako starego ewolucyjnie i powszechnego mechanizmu wymiany informacji pomiędzy komórkami. Przedstawiono udział zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych w interakcjach żywiciel-pasożyt, obejmujących m.in. inwazję i zasiedlenie organizmu żywiciela, ustalanie równowagi między partnerami oraz modulację odpowiedzi immunologicznej zarażonego ustroju w trakcie inwazji. Ponadto, wspomniano

o potencjalnym wykorzystaniu pęcherzyków w immunoprofilaktyce oraz diagnostyce chorób inwazyjnych.

Etap 3

Produkcja i określenie właściwości antygenowych białka MAG1 jako kluczowego składnika potencjalnej szczepionki przeciw toksoplazmozie

Doświadczenie własne zdobyte podczas realizacji zadań badawczych z użyciem rekombinowanych fimbrii pozwoliło mi na udział w dalszych badaniach z zakresu immunoprofilaktyki toksoplazmozy, prowadzonych w Zakładzie Immunoparazytologii, które doprowadziły do wytypowania trzech silnie immunogennych, obiecujących antygenów rekombinowanych pierwotniaka: ROP2, ROP4 i SAG1 [11]. Pomimo wysokich współczynników protekcji zastosowana doświadczalna szczepionka triwalentna nie skutkowała pełną ochroną przed inwazją *T. gondii*. Z tego względu postanowiono podjąć prace zmierzające do zwiększenia potencjału ochronnego preparatu i zdecydowano, iż zostanie on uzupełniony o kolejne białko rekombinowane pasożyta. Biorąc pod uwagę wcześniejsze próby szczepionkowe zdecydowano się na produkcję antygenu MAG1 w postaci znacznie dłuższego fragmentu cząsteczki obejmującego całe białko natywne bez sekwencji liderowej (praca doświadczalna 4). Przy współpracy z Instytutem Biologii Medycznej PAN wyprodukowano białko rekombinowane MAG1 wykorzystując system ekspresyjny *Escherichia coli*. Należy pamiętać, że istotną z punktu widzenia immunoprofilaktyki cechą antygenów szczepionkowych jest zdolność wzbudzenia odpowiedzi odpornościowej, która okaże się skuteczna w konfrontacji z właściwym czynnikiem zakaźnym. To z kolei w bezpośredni sposób wiąże się z budową białka rekombinowanego i stopniem podobieństwa do natywnego odpowiednika. Dlatego postanowiono sprawdzić reaktywność formy rekombinowanej białka MAG1 z przeciwciałami obecnymi w surowicach ludzkich i mysich powstałymi w toku inwazji *T. gondii* czyli w wyniku stymulacji natywnym białkiem MAG1. Tym samym podjęto prace nad określeniem potencjalnej przydatności diagnostycznej uzyskanego rekombinowanego białka MAG1 toksoplazmy. W tym celu określono reaktywność surowic od osobników zarażonych *T. gondii* z uzyskanym białkiem (MAG1)

stosując jako kontrolę pozytywną antygen natywny TLA i, w przypadku ludzi, porównując wyniki oznaczeń do tych uzyskanych w testach komercyjnych. Do badań wybrano surowice ludzkie pochodzące od osób *T. gondii* - seronegatywnych i *T. gondii* - seropozytywnych, przy czym te ostatnie zakwalifikowano odpowiednio do grupy z ostrą lub przewlekłą toksoplazmozą na podstawie wartości awidności antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgG. Do badań włączono także surowice mysie uzyskane w fazie ostrej i przewlekłej doświadczalnej inwazji *T. gondii* u myszy szczepów wsobnych o naturalnej różnej podatności na zarażenie pasożytem (C57BL/6 o naturalnej, warunkowanej genetycznie wysokiej podatności i BALB/c o naturalnej, warunkowanej genetycznie niskiej podatności na toksoplazmozę). Porównanie otrzymanych wyników testów immunoenzymatycznych z zastosowaniem wyprodukowanego białka rekombinowanego MAG1 jako antygeny diagnostycznego z natywnym antygenem poliwalentnym TLA oraz testami komercyjnymi, będącymi podstawą klasyfikacji użytych w testach surowic ludzkich stwierdzono, iż otrzymany preparat antygenowy (reMAG1) jest bardzo czułym markerem zarażenia toksoplazmą, ponieważ jest on rozpoznawany przez swoiste przeciwciała klasy IgG obecne w surowicach zarówno doświadczalnie zarażonych myszy (reaktywność 100%), jak i naturalnie zarażonych ludzi (reaktywność 97%). Uzyskane dane nie tylko świadczą o możliwości wykorzystania testowanego antygeny MAG1 w diagnostyce jako alternatywy i/lub uzupełnienia dla lizatu tachyzoitów, ale dowodzą, iż otrzymane białko rekombinowane jest rozpoznawane przez przeciwciała syntetyzowane w odpowiedzi na inwazję pasożyta czyli po stymulacji układu odpornościowego natywnym białkiem MAG1 *T. gondii*.

Osiągnięcia:

1. Uzyskanie pełnej długości rekombinowanego białka MAG1 *Toxoplasma gondii*.
2. Wszechstronne zbadanie potencjalnej przydatności uzyskanego antygeny (reMAG1) w diagnostyce toksoplazmozy poprzez równoczesne określenie jego reaktywności zarówno z surowicami ludzkimi, jak i mysimi pochodzącymi od osobników szczepów o różnej naturalnej podatności na toksoplazmozę.
3. Wykazanie, iż uzyskane białko rekombinowane (reMAG1) jest rozpoznawane przez przeciwciała syntetyzowane *in vivo* w odpowiedzi na natywny antygen MAG1 *T. gondii*.

Możliwe zastosowanie:

1. Dalsze udoskonalenie dostępnych metod diagnostycznych poprzez wykorzystanie pełnej długości białka MAG1 jako alternatywy i/lub uzupełnienia dla lizatu tachyzoitów (TLA).
2. Możliwość zastosowania różnej długości fragmentów białka rekombinowanego MAG1 do równoczesnego wykrywania inwazji *T. gondii* i różnicowania faz zarażenia (w oparciu o własne doświadczenia i dane literaturowe).
3. Wykorzystanie uzyskanego antygenu reMAG1 jako składnika potencjalnej szczepionki przeciw toksoplazmozie.

Etap 4**Określenie aktywności immunogennej i neuroprotektoryjnej wytypowanej szczepionki przeciw inwazji *T. gondii***

Osiągnięcia wszystkich opisanych powyżej nurtów badawczych zostały skonsolidowane w ostatniej ujętej w osiągnięciu naukowym pracy doświadczalnej, w której po raz pierwszy podjęto próbę wielopłaszczyznowego przetestowania potencjalnego preparatu immunoprofilaktycznego opartego na białkach rekombinowanych *T. gondii* ROP2, ROP4, SAG1 i MAG1 (praca doświadczalna 5). Zaplanowano nie tylko testy immunologiczne, ale także doświadczenia neurobiologiczne obejmujące wybrane parametry behawioralne i neurochemiczne. Biorąc pod uwagę zdobyte na wcześniejszych etapach realizacji zadań badawczych doświadczenia szczegółowo zaplanowano zakres i sposób wykonania opisanych w pracy oznaczeń. Ze względu na zaobserwowane wcześniej różnice międzypłciowe, dotyczące zarówno zachowania jak i aktywności monoaminergicznej, zdecydowano się na równoczesne objęcie badaniami zarówno samic, jak i samców myszy. By jeszcze bardziej ograniczyć nieswoiste dla inwazji *T. gondii* objawy, szczególnie w fazie ostrej toksoplazmozy, wybrano szczep DX pierwotniaka o niższej, w porównaniu do Me49, zjadliwości (szczep klasyfikowany jako nisko zjadliwy ale silnie cystotwórczy), a jego zastosowanie sprawdzono w testach wstępnych. Ponadto poprzednie próby szczepionkowe opierały się na zastosowaniu powszechnie używanego, silnego adiuwantu, jakim jest niekompletny

adiuwant Freunda. Preparat ten jest bardzo przydatnym narzędziem doświadczalnym natomiast nie nadaje się do zastosowania w szczepionce komercyjnej. Dlatego zdecydowano się na użycie mieszanki dwóch znanych, bezpiecznych i stosowanych w dopuszczonych do użycia u ludzi dostępnych komercyjnie szczepionkach, adiuwantów – monofosforylowanego lipidu A (MPL) i wodorotlenku glinu (alhydrożel) [8]. MPL jako pochodna lipopolisacharydu wykazuje silne właściwości adiuwancyjne i polaryzuje odpowiedź immunologiczną w kierunku szlaku Th1 kluczowego w eliminacji *T. gondii*, natomiast alhydrożel pobudza syntezę przeciwciał pełniących drugorzędną lecz niezastąpioną rolę we wspomaganie walki z pasożytem. Oba adiuwanty wykazują synergistyczne działanie *in vivo* przejawiające się m.in. optymalną aktywacją komórek prezentujących antygeny oraz pobudzeniem komórek pamięci immunologicznej [25], przy czym zastosowanie MPL prowadzi do aktywacji antygenowo swoistych limfocytów T i produkcji cytokin, zaś użycie alhydrożelu, przedłużającego kontakt komponentów układu odpornościowego z antygenami obecnymi w preparacie szczepionkowym, skutkuje dłuższym czasem syntezy cytokin w miejscu iniekcji [7]. Ze względu na wybór MPL jako adiuwantu zmieniono podszczęp myszy w obrębie szczepu C3H na C3H/HeO_uJ, ponieważ mając funkcjonalny gen warunkujący ekspresję receptora TLR4 są zdolne do odpowiedzi na LPS. Wreszcie w oparciu o własne doświadczenia i hipotezę manipulacji wybrano najbardziej swoiste dla inwazji *T. gondii* parametry behawioralne związane z manipulacją żywicielem tj. aktywność ruchową definiowaną przebyta w teście otwartego pola drogą (mierzoną w cm) oraz zainteresowanie zapachem kota, pozostające w sprzeczności z naturalnym zachowaniem gryzoni. Jak już wspomniano, koty zwracają szczególną uwagę na poruszające się obiekty, ponadto w doświadczeniach z użyciem modeli zwierzęcych (głównie myszy i szczurów) bezsprzecznie dowiedziono, iż zajęcie OUN przez pierwotniaka zaburza naturalne mechanizmy obronne, co przejawia się zwiększonym, nienaturalnym zainteresowaniem zarażonych gryzoni zapachem kotowatych [2]. W myśl hipotezy manipulacji gryzonie wykazujące anormalne zachowanie mają częściej padać łupem kotowatych i przyczyniać się do skuteczniejszej transmisji pierwotniaka w środowisku. W celu odtworzenia naturalnych warunków, w których dochodzi do kontroli zachowania żywiciela jakim jest mysz domowa wybrano jako źródło zapachu mocz kota domowego, ponieważ szacuje się, iż nawet do 74% bezpańskich kotów jest zarażonych *T. gondii* [38] i to głównie te zwierzęta są odpowiedzialne za obecność oocyst w środowisku

stanowiących rezerwuar pasożyta i potencjalne źródło inwazji m.in. dla zwierząt gospodarskich [26]. Odnosząc się do naturalnego zachowania kota, jako nośnika zapachu użyto bezzapachowego żwirku. W zakresie parametrów neurochemicznych, kierując się uzyskanymi wcześniej wynikami, oznaczano aktywność układu noradrenergicznego jako istotnego indykatora stanu emocjonalnego oraz dopaminergicznego wymienianego pośród możliwych czynników leżących u podstaw obserwowanych zmian w zachowaniu zwierząt.

Otrzymane dane doświadczalne ujawniły, iż badana eksperymentalna szczepionka podjednostkowa oparta na czterech antygenach rekombinowanych *T. gondii* wzbudzała silną odpowiedź humoralną i komórkową u immunizowanych zwierząt. Zaobserwowano produkcję swoistych immunoglobulin rozpoznających zarówno komponenty antygenowe szczepionki, jak i białka natywne pasożyta (TLA), a analiza mian przeciwciał izotypów IgG1 i IgG2a wskazała na mieszaną odpowiedź typu Th1/Th2 z przewagą podklasy IgG1 typowej dla szlaku Th2. Ponadto, w doświadczeniach *in vitro* odnotowano syntezę kluczowych cytokin charakterystycznych dla odpowiedzi Th1 (IFN- γ i IL-2) i Th2 (IL-10, cytokina regulatorowa oznaczana jako wskaźnik odpowiedzi Th2) po stymulacji splenocytów białkami rekombinowanymi i natywnymi. Chociaż nie zaobserwowano istotnych różnic w intensywności odpowiedzi immunologicznej pomiędzy osobnikami różnej płci, to stwierdzono, iż immunizacja skutkuje wyższym stopniem protekcji u samców myszy, zwłaszcza w ostrej fazie inwazji *T. gondii*, i to zarówno w odniesieniu do całego mózgowia, jak i do poszczególnych struktur zaangażowanych m.in. w naturalne zachowania emocjonalno-obronne. Analiza wyników testów behawioralnych pokazała, iż wzbudzana podaniem doświadczalnej szczepionki odporność prowadziła do przesunięcia w czasie, z fazy ostrej na przewlekłą toksoplazmozy, pojawienia się obserwowanych po inwazji *T. gondii* zmian behawioralnych. Ponownie zauważono istotne różnice między płciami myszy. Chociaż odnotowano opóźnienie w utracie naturalnej awersji do zapachu kota u immunizowanych zwierząt niezależnie od płci, to obniżenie nienaturalnej aktywności ruchowej zaobserwowano tylko u szczepionych samic. Uzupełniające całość badań oznaczenia neurochemiczne najbardziej dobitnie podkreśliły różnice międzypłciowe w funkcjonowaniu OUN. Stwierdzono, że pojawiające się po immunizacji dopiero w fazie przewlekłej zmiany behawioralne korelują ze zwiększoną aktywnością noradrenergiczną i dopaminergiczną, jednak wyłącznie u szczepionych samców.

Pomimo że, testowana szczepionka nie generowała pełnej ochrony przed inwazją, to jej zastosowanie skutkowało statystycznie znamionym opóźnieniem momentu wystąpienia zmian behawioralnych u zarażonych myszy, a uzyskane dane stanowią cenne podłoże dla dalszych badań zmierzających zarówno do opracowania skutecznej immunoprofilaktyki toksoplazmozy, jak i wyjaśnienia mechanizmu leżącego u podstaw manipulacji zachowaniem żywicieli pośrednich w przebiegu inwazji *T. gondii*.

Osiągnięcia:

1. Zastosowanie nowatorskiego podejścia do zagadnienia testowania skuteczności potencjalnych szczepionek anty-*T. gondii* uwzględniającego, poza parametrami immunologicznymi, także aktywność neuroprotekcijną oraz naturalne różnice międzypłciowe w funkcjonowaniu OUN.
2. Wykazanie, po raz pierwszy, iż immunizacja wybranymi białkami rekombinowanymi *T. gondii* prowadzi do opóźnienia w występowaniu indukowanych inwazją pierwotniaka zmian behawioralnych u myszy.
3. Stwierdzenie, po raz pierwszy, że pojawiające się po immunizacji dopiero w fazie przewlekłej zmiany w zachowaniu korelują ze zwiększoną aktywnością dopaminergiczną u samców, co po raz kolejny wyraźnie wskazuje na możliwy udział tego neurotransmitera w etiologii manipulacji żywicielem przez *T. gondii*.
4. Wskazanie, że utrata naturalnej awersji do zapachu kota jest bezpośrednio związana z intensywnością inwazji, jako że immunizacja skutkująca znacznym zmniejszeniem liczby pasożytów zasiedlających OUN prowadzi do opóźnienia wystąpienia zmian behawioralnych u zarażonych myszy.

Możliwe zastosowanie:

1. Wykorzystanie uzyskanych wyników do dalszego udoskonalania potencjalnych preparatów szczepionkowych w immunoprofilaktyce toksoplazmozy u ludzi i zwierząt.
2. Potencjalne wykorzystanie opracowywanych szczepionek do zapobiegania rozwojowi zmian behawioralnych i neurologicznych po inwazji *T. gondii*.

3. Dalszy wkład w poznanie i wyjaśnienie mechanizmu manipulacji żywicielem przez *T. gondii* z uwzględnieniem obecności samego pasożyta w OUN, zmian aktywności neurotransmisyjnej oraz udziału czynników immunologicznych.

PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Bardzo interesujące dane opisane w stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego pracach stanowią znakomitą przesłankę do kontynuowania rozpoczętych badań.

W chwili obecnej prowadzone są, przy współpracy z Katedrą Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, doświadczenia zmierzające do określenia przydatności białek fuzyjnych *T. gondii* jako potencjalnych narzędzi w immunoprofilaktyce toksoplazmozy u ludzi i zwierząt oraz wytypowania najbardziej immunogennych, wzbudzających najsilniejszą odpowiedź o charakterze ochronnym zestawień antygenów rekombinowanych pasożyta.

Przedstawione wyniki prac nad wpływem pasożyta na zachowanie zarażonych myszy bardzo dobitnie podkreśliły zasadnicze różnice związane z płcią wybranych do doświadczeń zwierząt. Można przypuszczać, że zaobserwowana różna reakcja samic i samców na inwazję tego samego szczepu *T. gondii* jest związana z naturalnym poziomem istotnych hormonów. Spekulacje te potwierdzone są przez udowodnione wzajemne ścisłe relacje pomiędzy układami: hormonalnym, odpornościowym i nerwowym [1]. Dlatego też ostateczne wyjaśnienie mechanizmu kontroli zachowania żywicieli pośrednich przez *T. gondii* powinno także obejmować badania zmian neuroendokrynych oraz aktywności innych, niż monoaminergiczne, układów neurotransmisyjnych ośrodkowego układu nerwowego, co będzie przedmiotem dalszych prac badawczych.

Bibliografia:

1. Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Flores-Gutierrez EO, Garcés-Alvarez ME, de la Cruz-Aguilera DL, Medina-Rivero E, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabián S, Pavón L (2016) Immunomodulatory effects mediated by dopamine. *J Immunol Res* 2016:3160486.
2. Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW (2000) Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc Biol Sci* 267:1591–1594.
3. Boothroyd JC (2009) *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol* 39:935-946.
4. Cosgrove KP, Mazure CM, Staley JK (2007) Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiatry* 62:847–855.
5. da Silva RC, Langoni H (2009) *Toxoplasma gondii*: host–parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Res* 105:893–898.
6. Dalimi, A., Abdoli, A., 2012. Latent toxoplasmosis and human. *Iran J. Parasitol.* 7, 1-17.
7. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, Kielland A, Vosters O, Vanderheyde N, Schiavetti F, Larocque D, VanMechelen M, Garçon N (2009) AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 183:6186–6197.
8. Dubensky TW Jr, Reed SG (2010). Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol* 22:155–161.
9. Dubey JP (2008) The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 55(6):467-75.
10. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11(2):267-99.
11. Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Grzybowski M, Długowska H (2011) Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis. *Vaccine* 29:821–830.
12. Ferguson DJ, Parmley SF (2002) *Toxoplasma gondii* MAG1 protein expression. *Trends Parasitol* 18(11):482.
13. Flegr J (2007) Effects of *Toxoplasma* on human behavior. *Schizophr Bull* 33:757.
14. Flegr J (2010) Influence of latent toxoplasmosis on the phenotype of intermediate hosts. *Folia Parasitol (Praha)* 57:81–87.
15. Flegr J (2013) How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends Parasitol* 29:156-163.
16. Hay J, Aitken PP, Arnott MA (1985) The influence of congenital *Toxoplasma* infection on the spontaneous running activity of mice. *Z Parasitenkd* 71:459–462.
17. Hermes G, Ajioka JW, Kelly KA, Mui E, Roberts F, Kasza K, Mayr T, Kirisits MJ, Wollmann R, Ferguson DJ, Roberts CW, Hwang JH, Trendler T, Kennan RP, Suzuki Y, Reardon C, Hickey WF, Chen L, McLeod R (2008) Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection. *J Neuroinflammation* 5:48.
18. Hill D and Dubey JP (2002) *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8:634–640.
19. Holliman RE (1997) Toxoplasmosis, behaviour and personality. *J Infect* 35(2):105-10.
20. Hsu PC, Groer M, Beckie T (2014) New findings: depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. *J Am Assoc Nurse Pract* 26:629-637.
21. Innes EA (2010) A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoo Pub Health* 57:1–7.
22. Innes EA, Bartley PM, Maley S, Katzer F (2009) Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:246-251.
23. Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Förster-Waldl E, Petersen E (2009) Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:252-266.

24. Lekutis C, Ferguson DJP, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC (2001) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol* 31:1285-92.
25. MacLeod MK, McKee AS, David A, Wang J, Mason R, Kappler JW, Marrack P (2011) Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:7914–7919.
26. Mateus-Pinilla NE, Hannon B, Weigel RM (2002) A computer simulation of the prevention of the transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms using a feline *T. gondii* vaccine. *Prev Vet Med* 55:17–36.
27. Miman O, Kusbeci OY, Aktepe OC, Cetinkaya Z (2010) The probable relations between *Toxoplasma gondii* and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 475:129–131.
28. Montoya JG (2002) Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 185: 73–82.
29. Nam HW (2009) GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions cross the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol* 47:29-37.
30. Nielsen HV, Di Cristina M, Beghetto E, Spadoni A, Petersen E, Gargano N (2006) *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts. *Exp Parasitol* 112:274–279.
31. Nielsen HV, Lauemoeller SL, Christiansen L, Buus S, Fomsgaard A, Petersen E (1999) Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with plasmid encoding SAG1 gene. *Infect Immun* 67:6358–6363.
32. Parmley S, Slifer T, Araujo F (2002) Protective effects of immunization with recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Infect Dis* 185:S90–S95.
33. Poirotte C, Kappeler PM, Ngoubangoye B, Bourgeois S, Moussodji M, Charpentier MJ (2016) Morbid attraction to leopard urine in *Toxoplasma*-infected chimpanzees. *Curr Biol* 26(3):R98-9.
34. Prandota J, Gryglas A, Fuglewicz A, Ześlawska-Faleńczyk A, Ujma-Czapska B, Szenborn L, Mierzwa J (2014) Recurrent headaches may be caused by cerebral toxoplasmosis. *World J Clin Pediatr* 3:59-68.
35. Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG (2010) *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* 107(2):253-60.
36. Stibbs HH (1985) Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Ann Trop Med Parasitol* 79:153–157.
37. Stommel EW, Seguin R, Thadani VM, Schwartzman JD, Gilbert K, Ryan KA, Tosteson TD, Kasper LH (2001) Cryptogenic epilepsy: an infectious etiology? *Epilepsia* 42:436–438.
38. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217–1258.
39. Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, Verschueren H (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun* 68:38–45.
40. Vyas A (2015) Mechanisms of host behavioral change in *Toxoplasma gondii* rodent association. *PLoS Pathog* 11:e1004935.
41. Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM (2007) Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6442–6447.
42. Webster JP (2007) The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophr Bull* 33:752–756.

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH**1. Charakterystyka szczepów gronkowca złocistego wyizolowanych od pacjentów z mukowiscydozą**

W ramach przygotowań do realizacji zadań badawczych ujętych w pracy magisterskiej, realizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Różalskiej i opieką dr hab. Beaty Sadowskiej, prof. nadzw. Uł z Pracowni Biologii Zakażeń (dawniej Zakładu Biologii Infekcyjnej) Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, dotyczącej szczepów *scv Staphylococcus aureus* ("Przeżywalność szczepów *Staphylococcus aureus* scv (small colony variants) u myszy, po podaniu preparatów farmakologicznych: menadion/hemina") zostałam włączona w nurt badawczy służący scharakteryzowaniu kolekcji szczepów gronkowca złocistego pochodzących od pacjentów z mukowiscydozą. Bakterie charakteryzowano pod względem szeregu cech fenotypowych takich jak produkcja śluzu, hydrofobowość powierzchni komórki czy oporność na metycylinę a analizę fenotypową uzupełniono badaniami genetycznymi. Uzyskane wyniki stały się podstawą pracy doświadczalnej, włączonej do oceny moich osiągnięć w czasie studiów, na podstawie których, zostałam wyróżniona Stypendium Ministra Edukacji Narodowej na czas realizacji pracy magisterskiej.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki:***Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora******Prace oryginalne:***

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Sadowska B., Cochard T., Poutrel B., Pytlos M., Bonar A., Gatkowska J. , Rudnicka W., Polak J., Bielecki S., Siwińska-Gołębiowska H., Różalska B. Characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from cystic fibrosis patients by conventional and molecular typing. <i>Acta Microbiologica Polonica</i> , 2001, 50: 251-261.	-	5* 15**

*punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji*

***podane zgodnie z listą z 2016 r.*

2. Markery serologiczne i komórkowe inwazji *Toxoplasma gondii*

W celu realizacji zadań stanowiących podstawę nagrodzonej rozprawy doktorskiej "Doświadczalna toksoplazmoza u myszy laboratoryjnych (*Mus musculus*) jako model do badań nad swoistą odpornością w zarażeniach *Toxoplasma gondii*" realizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Henryki Długońskiej z Zakładu Immunoparazytologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego podjęto dwa główne nurty badawcze. Obejmowały one scharakteryzowanie swoistej odpowiedzi odpornościowej myszy szczepów wsobnych różniących się naturalną podatnością na toksoplazmozę (BALB/c o naturalnej, warunkowanej genetycznie niskiej podatności na toksoplazmozę oraz C57BL/6 o naturalnej wysokiej podatności na zarażenie *T. gondii*) po inwazji różnych szczepów pasożyta o odmiennej zjadliwości oraz poszukiwanie swoistych markerów serologicznych i komórkowych toksoplazmozy o największej przydatności w diagnostyce zarażenia u ludzi i zwierząt. Przesłanką do przeprowadzenia zaproponowanych doświadczeń była próba ulepszenia istniejących narzędzi diagnostycznych toksoplazmozy tak by możliwe było jednoczesne wykrycie inwazji *T. gondii* i zróżnicowanie jej fazy z uwzględnieniem naturalnej podatności i statusu immunologicznego żywiciela. Realizacja postawionych założeń obejmowała m.in. szczegółową charakterystykę modelu doświadczalnego, wykrywanie w surowicy zarażonych zwierząt rozpuszczalnych antygenów pierwotniaka oraz swoistych immunoglobulin produkowanych przez żywiciela w odpowiedzi na stymulację antygenami pasożyta, a także badanie markerów komórkowych w przebiegu toksoplazmozy takich jak aktywność proliferacyjna splenocytów i ich zdolność do produkcji wybranych cytokin *in vitro*. Ponadto, określano reaktywność surowic mysich z różnych faz inwazji z wybranymi, zarówno natywnymi jak i rekombinowanymi, preparatami antygenowymi. Ta część doświadczeń została wykonana przy współpracy z zespołem prof. dr hab. Józefa Kura z Katedry Mikrobiologii (obecnie Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii) Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, z której pochodziły poddane analizie białka rekombinowane *T. gondii*. Podjęto także próbę określenia markerów reinwazji / reaktywacji latentnego zarażenia toksoplazmą u myszy z wywołanym podaniem cyklofosfamidu stanem obniżenia odporności. Doświadczenia dotyczące omawianej tematyki były kontynuowane także już po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.

Włączyłam się także w prace nad poszukiwaniem markerów inwazji *Toxoplasma gondii* u ludzi obejmujące analizę, techniką immunoblotu, swoistych przeciwciał w surowicach osób uznawanych za seropozytywne na podstawie wyników komercyjnych oznaczeń w kierunku *T. gondii*.

Po rozpoczęciu studiów doktoranckich odbyłam staż naukowy w Instytucie Mikrobiologii Lekarskiej i Wirusologii w Düsseldorfie (Niemcy) w zespole badawczym zajmującym się biologią *Toxoplasma gondii* kierowanym przez doc. dr. hab. Hansa-Georga Fischera. W trakcie stażu zdobyłam doświadczenie laboratoryjne niezwykle przydatne w trakcie realizacji badań ujętych w rozprawie doktorskiej.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki:

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Prace oryginalne:

<i>Lp.</i>	<i>Dane bibliograficzne</i>	<i>IF</i>	<i>Punkty MNiSW</i>
1.	Dytnerska K., Gatkowska J. , Dziadek B., Długońska H. Analiza swoistości ludzkich przeciwciał IgM anty - <i>Toxoplasma gondii</i> przy użyciu metody immunoblotu. <i>Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2003: 58-61.</i>	-	_*
			_**
2.	Dytnerska K., Gatkowska J. i 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], 2004, 50: 411-416.</i>	-	4*
			15**
3.	Dytnerska-Dzitko K., Gatkowska J. i Długońska H. Laboratory recognition of <i>Toxoplasma gondii</i> reinfection. <i>Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2004: 67-69.</i>	-	_*
			_**
4.	Gatkowska J. M. , Długońska H. Down-regulation of T-cell response in acute toxoplasmosis. <i>Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2004: 70-72.</i>	-	_*
			_**

*punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji*

***podane zgodnie z listą z 2016 r.*

Prace przeglądowe:

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Gatkowska J.M. Organelle wydzielnicze <i>Toxoplasma gondii</i> – ich rola w procesie penetracji i zasiedlania komórek żywiciela. <i>Postępy Biologii Komórki</i> , 2003, 30: 515-524.	-	_*
			5**

punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji

**podane zgodnie z listą z 2016 r.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora**Prace oryginalne:**

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Dzitko K., Stączek P., Gatkowska J. , Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : serological recognition of reinfection. <i>Experimental Parasitology</i> , 2006, 112: 134-137	1,108	20*
			25**
2.	Gatkowska J. , Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J., Holec L., Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : An evaluation of diagnostic value of recombinant antigens in a murine model. <i>Experimental Parasitology</i> , 2006, 114: 220-227.	1,108	20*
			25**
3.	Gatkowska J. , Długońska H. IFN- γ as a marker of <i>Toxoplasma gondii</i> invasion. <i>Wydawnictwo SGGW</i> , Warszawa, 2006: 49-52.	-	_*
			_**

punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji

**podane zgodnie z listą z 2016 r.

Prace przeglądowe:

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Gatkowska J. Różnorodne aspekty aktywności biologicznej IL-1. I. Rola IL-1 w inwazjach pasożytniczych [Various aspects of IL-1 biological activity. I. The role of IL-1 in parasitic infections]. <i>Wiadomości Parazytologiczne [Annals of Parasitology]</i> , 2009, 55: 109-114.	-	4*
			15**

punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji

**podane zgodnie z listą z 2016 r.

3. Aktywność immunogenna i protekcyjna wybranych antygenów rekombinowanych *Toxoplasma gondii*

Uczestniczyłam także w prowadzonych w Zakładzie Immunoparazytologii pracach zmierzających do opracowania skutecznej szczepionki przeciw inwazji *T. gondii* opartej na wybranych białkach rekombinowanych pasożyta. Doświadczenia te obejmowały wytypowanie składu antygenowego potencjalnych preparatów immunoprofilaktycznych, produkcję antygenów rekombinowanych pasożyta w gwarantujących najwyższą wydajność systemach ekspresyjnych oraz ich testowanie na modelu mysiej doświadczalnej toksoplazmozy. W pierwszym etapie opisywanych badań określano właściwości immunogenne oraz protekcyjne doświadczalnej szczepionki podjednostkowej, w skład której wchodziły dwa rekombinowane, wydzielnicze antygeny *T. gondii* rROP2 i rROP4. Białka te wytypowano na podstawie wcześniejszych doświadczeń, w których udowodniono iż są one zdolne do swoistego wiązania ludzkiej laktoferyny. Choć testowana kompozycja okazała się silnie immunogenna, co przejawiało się pobudzeniem antygenowo swoistych humoralnych i komórkowych mechanizmów odpornościowych to jej aktywność ochronna, definiowana obniżeniem liczby tworzonych cyst tkankowych u immunizowanych zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej, wynosiła 46%. Badane białka zostały także przetestowane pod kątem ich przydatności do wykrywania zarażenia *T. gondii* u myszy z doświadczalną toksoplazmozą.

W oparciu o uzyskane dane podjęto dalsze próby zwiększenia aktywności protekcyjnej doświadczalnej szczepionki podjednostkowej opartej na antygenach rROP2 i rROP4 poprzez dodanie kolejnego białka rekombinowanego *T. gondii* rGRA4 i/lub rSAG1 uzyskując w ten sposób preparaty triwalentne. Doświadczenia nad aktywnością immunogenną i ochronną zaproponowanych kompozycji antygenowych prowadzono na trzech szczepach myszy C57BL/6, C3H/HeJ oraz BALB/c o różnej, odpowiednio: wysokiej, średniej i niskiej, determinowanej genetycznie, podatności na zarażenie pasożytem. Badane preparaty triwalentne okazały się silnie immunogenne a najwyższe wskaźniki protekcji uzyskano przy zastosowaniu kombinacji białek rROP2+rOP4+rSAG1, choć otrzymywane wyniki aktywności protekcyjnej były uzależnione od wybranego do doświadczeń szczepu myszy i jego naturalnej wrażliwości na inwazję pasożyta.

Kontynuacją prac nad immunoprofilaktyką toksoplazmozy, z wykorzystaniem białek roptrii, było testowanie rekombinowanych antygenów ROP5 i ROP18, jako białek niezwykle

istotnych z punktu widzenia procesu inwazji i zjadliwości *T. gondii*. Uczestniczyłam w badaniach mających na celu określenie antygenowości otrzymanych białek rekombinowanych ROP5 i ROP18 poprzez zbadanie ich zdolności do reakcji z przeciwciałami obecnymi w surowicach myszy i ludzi zarażonych doświadczalnie/naturalnie pasożytem oraz w testach nad potencjałem szczepionkowym badanych antygenów. Prace z zakresu immunoprofilaktyki przyniosły dość nieoczekiwane rezultaty bowiem, choć oba białka wykazywały dużą aktywność immunogenną określoną na podstawie zdolności do wzbudzania swoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej, to nie generowały wysokiej protekcji przed inwazją *T. gondii* u immunizowanych myszy. Ponadto zaobserwowano, że każdy z użytych do badań szczepów wsobnych myszy, BALB/c i C3H/HeOuj, inaczej reagował na konkretne białko/białka rekombinowane obecne w preparacie szczepionkowym. Ponownie stwierdzono, że poziom syntezy antygenowo swoistych przeciwciał *in vivo* i kluczowych cytokin *in vitro* oraz zależny od wzbudzonej odpowiedzi odpornościowej stopień protekcji przed rozwojem ostrej i przewlekłej toksoplazmozy były zależne od zastosowanego szczepu myszy. Wyniki te dobitnie podkreśliły jak trudne jest opracowanie potencjalnej skutecznej szczepionki przeciw toksoplazmozie w związku z problemami w doborze białek pasożyta zdolnych do wzbudzenia swoistej odporności o charakterze ochronnym. Otrzymane dane jednoznacznie wskazały, że nawet wybór białek warunkujących zjadliwość pierwotniaka, a zatem także jego zdolność do wywołania inwazji nie gwarantuje uzyskania zadowalających rezultatów przy opracowywaniu immunoprofilaktyki toksoplazmozy.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki:

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Prace oryginalne:

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Dziadek B. , Gatkowska J. , Brzostek A., Dziadek J., Dzitko K. Długoska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. <i>Experimental Parasitology</i> , 2009,123: 81-89.	1,773	20* 25**

2.	Gatkowska J. , Dziadek B., Brzostek A., Dziadek J., Dzitko K., Długońska H. Determination of <i>Toxoplasma gondii</i> recombinant ROP2 and ROP4 antigens diagnostic value on mouse experimental model. <i>Polish Journal of Microbiology</i> , 2010, 59: 137-141.	0,66	9*
			15**
3.	Dziadek B., Gatkowska J. , Brzostek A., Dziadek J., Dzitko K., Grzybowski M., Długońska H. Evaluation of protective and immunogenic effects 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: 821-30.	3,766	35*
			30**
4.	Dziadek B., Gatkowska J. , Grzybowski M., Dziadek J., Dzitko K., Długońska 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: 133–138.	2,154	25*
			25**
5.	Grzybowski M.M., Dziadek B., Dziadek J., Gatkowska J. , Dzitko K., Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> : Cloning, expression and immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens. <i>Experimental Parasitology</i> , 2015, 150C: 1-6.	1,623	25*
			25**
6.	Grzybowski M.M., Gatkowska J. , Dziadek B., Dzitko K., Długońska H. Human toxoplasmosis: a comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant <i>Toxoplasma gondii</i> ROP5 and ROP18 antigens. <i>Journal of Medical Microbiology</i> , 2015, 64: 1201-1207.	2,269	25*
			20**
7.	Grzybowski M.M., Dziadek B., Gatkowska J. , Dzitko K., Długońska H. Towards vaccine against toxoplasmosis: evaluation of the immunogenic and protective activity of recombinant ROP5 and ROP18 <i>Toxoplasma gondii</i> proteins. <i>Parasitology Research</i> , 2015, 114: 4553-4563.	2,027	30*
			30**

punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji

**podane zgodnie z listą z 2016 r.

Prace przeglądowe:

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Długońska H., Gatkowska J. , Kur J., Gąsior A. Szczepionki przeciw toksoplazmozie – aktualny stan badań [The vaccines against toxoplasmosis – current status of the studies]. <i>Wiadomości Parazytologiczne [Annals of Parasitology]</i> , 2007, 53: 195-201.	-	4*
			15**

2.	Długońska H., <u>Gatkowska J.</u> Exosomes in the context of <i>Toxoplasma gondii</i> – host communication. <i>Annals of Parasitology</i> , 2016, 62: 169–174.	-	15*
			15**

punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji

**podane zgodnie z listą z 2016 r.

4. Wpływ wybranych hormonów na inwazję *Toxoplasma gondii*

Brałam również udział w prowadzonych w Zakładzie Immunoparazytologii pracach nad wpływem wybranych hormonów na przebieg inwazji *Toxoplasma gondii*, podstawą których była zaobserwowana odwrotna korelacja pomiędzy poziomem prolaktyny, a częstością zarażenia *T. gondii*, definiowaną na podstawie obecności swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych w surowicy. Należy pamiętać, że prolaktyna jako hormon wykazuje dużą aktywność biologiczną m.in. w stosunku do układu odpornościowego jako immunoregulator. Dlatego podjęto dalsze badania służące określeniu działania prolaktyny na pasożytniczego pierwotniaka *T. gondii* oraz zdefiniowaniu interakcji hormonu z komórkami pasożyta. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na stwierdzenie, że prolaktyna wywiera hamujący wpływ na proces inwazji komórek żywicielskich przez pierwotniaka w warunkach *in vitro*. Ponadto wykazano, że obecność prolaktyny, zarówno egzogennej jak i endogennej, skutkuje hamowaniem proliferacji tachyzoitów *T. gondii* w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej pochodzących od pacjentek z hiperprolaktynemią. Poczynione obserwacje mogą wskazywać na istotną rolę prolaktyny w czasie ciąży jako czynnika wspomagającego naturalną ochronę przed rozwojem zarażenia *T. gondii*. Dalsze badania nad interakcją pasożyta z hormonem udowodniły zdolność tachyzoitów *T. gondii* szczepów o różnej zjadliwości (RH – szczep silnie zjadliwy, Me49 – szczep średnio zjadliwy, cystotwórczy) do wiązania owczej i ludzkiej prolaktyny. Podobnie jak prolaktyna także fitoekdysteroidy charakteryzują się dużą aktywnością w stosunku do komórek ssaków przejawiającą się m.in. zdolnością do pobudzania mechanizmów odpornościowych w przebiegu inwazji pasożytniczych. Z tego względu podjęto próbę określenia wpływu wybranych fitoekdysteroidów na namnażanie się tachyzoitów *T. gondii* w warunkach *in vitro* przy użyciu komórek żywicielskich izolowanych od ludzi i myszy szczepów wsobnych o różnej naturalnej

podatności na toksoplazmozę. Wyniki przeprowadzonych testów wskazały, iż obecność fitoekdysteroidów promuje namnażanie się pasożyta zarówno w ludzkich jak i mysich komórkach, a zatem wbrew oczekiwaniom, związki te nie powinny być rozpatrywane przy poszukiwaniu nowych komponentów o aktywności przeciwtoksoplazmowej.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki:

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Prace oryginalne:

<i>Lp.</i>	<i>Dane bibliograficzne</i>	<i>IF</i>	<i>Punkty MNiSW</i>
1.	Dzitko K., <u>Gatkowska J.</u> , Lawnicka H., Komorowski J., Długowska H. The relationship between the level of selected hormones in women sera and the frequency of <i>Toxoplasma</i> infection. <i>Medimond S.r.l.</i> , 2007: 24-29.	-	_*
			10**
2.	Dzitko K., <u>Gatkowska J.</u> , Płociński P., Dziadek B., Długońska H. The effect of prolactin (PRL) on the growth of <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites <i>in vitro</i> . <i>Parasitology Research</i> , 2010, 107: 199-204.	1,812	20*
			30**
3.	Dzitko K., Lawnicka H., <u>Gatkowska J.</u> , Dziadek B., Komorowski J., Długońska H. Inhibitory effect of prolactin on <i>Toxoplasma</i> proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia. <i>Parasite Immunology</i> , 2012, 34: 302–311.	2,208	25*
			20**
4.	Dzitko K., Dziadek B., <u>Gatkowska J.</u> , Długońska H. <i>Toxoplasma gondii</i> binds sheep prolactin. <i>Experimental Parasitology</i> , 2013, 134: 216-219.	1,859	25*
			25**
5.	Dzitko K., Grzybowski M.M., Pawełczyk J., Dziadek B., <u>Gatkowska J.</u> , Stączek P., Długońska H. Phytoecdysteroids as modulators of the <i>Toxoplasma gondii</i> growth rate in human and mouse cells. <i>Parasites & Vectors</i> , 2015, 8: 422.	3,234	35*
			35**

*punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji*

***podane zgodnie z listą z 2016 r.*

5. Ocena biokompatybilności biomateriałów jako potencjalnych narzędzi wspomagających regenerację nerwów obwodowych

Dzięki zdobytym umiejętnościom i doświadczeniu w zakresie prowadzenia hodowli komórek pochodzących z różnych tkanek i narządów oraz znajomości testów służących ocenie ich morfologii, żywotności i aktywności proliferacyjnej nawiązałam współpracę z dr inż. Katarzyną Nawrotek z Katedry Termodynamiki Procesowej Wydziału Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska Politechniki Łódzkiej oraz dr Karoliną Rudnicką z Pracowni Gastroimmunologii i dr. hab. Markiem Wieczorkiem, prof. nadzw. UŁ z Katedry Neurobiologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Celem współpracy było określenie biokompatybilności, uzyskanych na Politechnice Łódzkiej implantów, mających wspomagać regenerację nerwów, wobec komórek zwierzęcych (mysie: fibroblasty i komórki nerwowe pochodzące z formacji hipokampa). Uszkodzenia obwodowej części układu nerwowego w wyniku różnego rodzaju urazów stanowią nie tylko istotny problem zdrowotny dla pacjentów ale przede wszystkim są dużym wyzwaniem dla medycyny. Proces regeneracji tkanki nerwowej jest bardzo złożony pod względem biologicznym, a stosowane obecnie metody neurochirurgiczne służące rekonstrukcji nerwów wymagają ogromnego doświadczenia i precyzji. Z tego względu poszukuje się nowych bardziej efektywnych i obarczonych mniejszym ryzykiem niepowodzenia metod terapeutycznych takich jak implanty stanowiące rusztowanie i osłonę dla regenerujących się włókien nerwowych. Podjęte doświadczenia doskonale wpisują się w nurt badań nad regeneracją nerwów, których pierwszym etapem jest szczegółowe zbadanie biokompatybilności implantów z komórkami, w tym nerwowymi, co stanowi warunek konieczny przed przeprowadzeniem prób nad ich przydatnością terapeutyczną w warunkach *in vivo*.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki:**Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora****Prace oryginalne:**

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Nawrotek K., Tylman M., Rudnicka K., Gatkowska J. , Balcerzak J. Tubular electrodeposition of chitosan-carbon nanotube implants enriched with calcium ions. <i>Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials</i> , 2016, 60: 256-266.	2,876	30*
			30**
2.	Nawrotek K., Tylman M., Decherchi P., Marqueste T., Rudnicka K., Gatkowska J. , Wieczorek M. Assessment of degradation and biocompatibility of electrodeposited chitosan and chitosan-carbon nanotube tubular implants. <i>Journal of Biomedical Materials Research Part A</i> , 2016, 104: 2701-2711.	3,263	35*
			35**
3.	Nawrotek K., Tylman M., Rudnicka K., Gatkowska J. , Wieczorek M. Epineurium-mimicking chitosan conduits for peripheral nervous tissue engineering. <i>Carbohydrate Polymers</i> , 2016, 152: 119-128.	4,219	40*
			40**

*punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji
**podane zgodnie z listą z 2016 r.*

6. Rośliny jako potencjalni producenci białek rekombinowanych

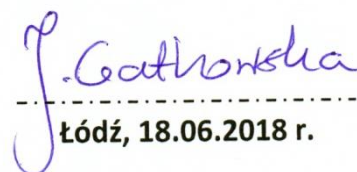
Wiedza i doświadczenie zdobyte w czasie prowadzenia doświadczeń z użyciem modeli zwierzęcych, w szczególności umiejętność zaplanowania i wykonania immunizacji oraz uzyskania, oczyszczenia i przetestowania swoistych immunoglobulin zaowocowały współpracą z dr Katarzyną Hnatuszko-Konka z Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz wspólną publikacją dotyczącą optymalizacji warunków produkcji rekombinowanej stafylokinazy z wykorzystaniem roślinnego systemu ekspresyjnego *Arabidopsis thaliana*.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki:***Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora******Prace oryginalne:***

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Hnatuszko-Konka K., Łuchniak P., Wiktorek-Smagur A., Gerszberg A., Kowalczyk T., Gatkowska J. , Kononowicz A.K. The pharmaceuticals from the foreign empire: the molecular pharming of the prokaryotic staphylokinase in <i>Arabidopsis thaliana</i> plants. <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , 2016, 32: 113.	1,532	20* 20**

punkty MNiSW *podane zgodnie z rokiem publikacji

**podane zgodnie z listą z 2016 r.



Łódź, 18.06.2018 r.