

Gabriela Olędzka

Autoreferat

**Zakład Biologii Medycznej
Wydział Nauki o Zdrowiu
Warszawski Uniwersytet Medyczny**

Warszawa 2012

1. Imię i Nazwisko: Gabriela Olędzka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2002 - stopień dr n. biologicznych - Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii,
Uniwersytet Gdański,

Temat pracy „Biotechnologiczna produkcja i oczyszczanie termostabilnych proteaz
serynowych aqualizyny I i pyrolizyny”.

Promotor: prof. dr hab. Józef Kur.

Recenzenci: prof. dr hab. Stanisław Bielecki,
prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn.

1997 - dyplom magistra biologii - Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii,
Uniwersytet Gdański;

praca magisterska wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej,

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

03/2008 - nadal - **Adiunkt** Zakładu Biologii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

03/2005-03/2008 - **Asystent** Zakładu Biologii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

08/2002 – 12/2005 - **Postdoctoral Research**, Lincoln University, Nowa Zelandia

02/2002 -07/2002- **Pracownik Naukowy** Politechniki Gdańskiej Katedry Mikrobiologii

4. 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.):

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowanie habilitacyjnego stanowi cykl sześciu prac, których tematem jest „**Ocena skuteczności nowo-syntetyzowanych szczepionek, zawierających DNA wybranych antygenów *Toxoplasma gondii* oraz znaczenie monitorowania wektorów środowiskowych dla profilaktyki toksoplazmozy**”.

Ich łączna wartość bibliometryczna wynosi 118 pkt. MNiSzW oraz IF=10,299.

Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej:

1. **Ołędzka G.**, Li B., Kay G. W., Chomicz L., Stankiewicz M. 2007. Cloning, sequence analysis and expression of ovine CD154 (CD40 ligand). *Molecular Immunology*, 44, 741-746.
IF = 3,742, KBN/MNiSW = 32.
2. Hiszczyńska-Sawicka E., Li H., Xu J.B., **Ołędzka G.**, Kur J., Bickerstaffe R., Stankiewicz M. 2010. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. *Exp Parasitol*. 124:365-372.
IF = 1,869 KBN/MNiSW = 27.
3. Li B., **Ołędzka G.**, McFarlane R.G., Spellerberg M.B., Smith S.M., Gelder F.B., Kur J., Stankiewicz M., 2010. Immunological response of sheep to injections of plasmids encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes. *Parasite Immunol*. 32:671-683.
IF = 2,357, KBN/MNiSW = 27.
4. Hiszczyńska-Sawicka E., **Ołędzka G.**, Holec-Gąsior L., Li H., Xu J.B., Sedcole R., Kur J., Bickerstaffe R., Stankiewicz M., 2011. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*. 11: 281-289.
IF = 2,331, KBN/MNiSW = 32.
5. **Ołędzka G.**, Naprawska A, Padzik M, Grochecka M, Chruścikowska A, Chomicz L., 2010. The role of some arthropods in the transmission of the opportunistic protozoan *Toxoplasma gondii*. W: Buczek A., Błaszak C. (ed.), *Arthropods. Ekologiczne i patologiczne aspekty układu pasożyt-żywciciel*. Lublin, 165-174. (rozdział w monografii).
6. **Ołędzka G.**, Padzik M., Chruścikowska A., Snakowska P., Chomicz L. 2011. Risk of *Toxoplasma gondii* transmission by blow-flies, Calliphoridae (Insecta, Diptera), on the organic farms in Poland. W: Buczek A., Błaszak C. (ed.), *Arthropods. Human and animal parasites*. Lublin, 147-156. (rozdział w monografii).

Wykaz doniesień związanych z tematem rozprawy habilitacyjnej:

1. **Olędzka G.**, Chomicz L., Stankiewicz M., Konstrukcja plazmidowego DNA z genem owczego białka CD154 jako adiuwantu w immunizacji przeciw *Toxoplasma gondii* . II Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Aktualne Kierunki w Rozpoznawaniu i Leczeniu Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, 2. 10. 2006 Poznań.
2. **Olędzka G.**, Li B., Hiszczyńska-Sawicka E., McFarlane R., Chomicz L., Evaluation of the immune response induced by recombinant proteins from *Toxoplasma gondii* in sheep conjugated to muramyl dipeptide (MDP). RICT 2010 - 46th International Conference on Medicinal Chemistry, Reims, France, June 30 - July 2. 2010. Abstrakt Book, 66.
3. **Olędzka G.**, Li B., Hiszczyńska-Sawicka E., McFarlane R., Chomicz L., Evaluation of the immune response induced by GRA1, SAG1 and SAG2 recombinant proteins from *Toxoplasma gondii*, in sheep. XXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego. 1-3. 09. 2010 Puławy.

Wykaz używanych skrótów:

AIDS zespół nabytego niedoboru odporności (ang. acquired immunodeficiency syndrome)

ang. z angielskiego

CHO linia komórek eukariotycznych jajnika chomika chińskiego (ang. Chinese Hamster Ovary)

ConA konkanawalina A (ang. Concanavalin)

CpG niezmetylowane sekwencje nukleotydowe bogate w cytozynę i guaninę

DNA kwas deoksyrybonukleinowy

DDA bromek dimetylodioktodecyloamoniowy

DOPE dioleilofosfatydyloetanolaminy (ang. 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine)

DOTAP sól trimetyloamoniowa 1,2-dioleilopropanu; (z ang. 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane)

ELISA test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

GM-CSF czynnik wzrostu stymulujący rozwój kolonii granulocytów makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony stimulating factor).

IFN Interferon

Ig immunoglobulina

IL Interleukina

MHC główny układ zgodności tkankowej (ang. Major Histocompatibility Complex)

PCR łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)

pz par zasad

Tc limfocyt T cytotoksyczny

TCR receptor limfocyty T (ang. T Cell Receptor)

Th limfocyt T pomocniczy

TNF czynnik martwicy nowotworu (ang. Tumor Necrosis Factor)

Celem prac, prowadzonych przez dr G. Olędzką, było **dostarczenie nowych narzędzi profilaktyki toksoplazmozy ludzi i zwierząt poprzez konstrukcję szczepionek, opartych na DNA** wybranych antygenów *Toxoplasma gondii* oraz badanie wywoływanej przez nie odpowiedzi immunologicznej. Celem prac było również **zbadanie, z zastosowaniem technik biologii molekularnej, udziału stawonogów w dyspersji tej zoonozy w środowisku człowieka poprzez monitorowanie rozprzestrzeniania się *T. gondii* za pośrednictwem Calliphoridae, potencjalnych wektorów toksoplazmozy.**

Prace badawcze były prowadzone przy współudziale takich ośrodków jak: Lincoln University, New Zealand, Canterbury Health Laboratories, Immunology, New Zealand, Politechnika Gdańska oraz Warszawski Uniwersytet Medyczny i zaowocowały licznymi publikacjami i doniesieniami zjazdowymi przedstawianymi w polskim i zagranicznym środowisku naukowym.

Prezentowana rozprawa habilitacyjna stanowi wkład w rozwój profilaktyki toksoplazmozy i jest całościowym podsumowaniem badań prowadzonych w latach 2002-2011 przez dr Gabrielę Olędzką, dotyczących możliwości szczepień przeciwko *T. gondii*, oraz inhibicji środowiskowych wektorów toksoplazmozy, w szczególności poprzez:

- konstruowanie adiuwantów biologicznych i chemicznych - substancji dodawanych do szczepionek w celu wzmocnienia procesu immunizacji,
- otrzymanie DNA plazmidów z sekwencjami DNA wybranych antygenów *T. gondii*,
- ustalenie najskuteczniejszego sposobu wzmacniania immunizacji,
- monitorowanie transmisji *T. gondii* przez wektory środowiskowe.

Wprowadzenie

Toksoplazmoza jest kosmopolityczną chorobą odzwierzęcą (zoonozą) szeroko rozpowszechnioną na całym świecie, wywoływaną przez wewnątrzkomórkowego pasożyta *Toxoplasma gondii*. Powszechnie występujące u ludzi zarażenia pierwotniakiem *T. gondii* związane są z jego znacznym rozpowszechnieniem w środowisku i wśród zwierząt. Ocenia się, iż w Europie Zachodniej i Środkowej zarażenie dotyczy znacznie ponad 60% ludzkiej populacji, natomiast w Polsce szacuje się je na 50% (Dzbeński 1992, Kazubski 1999). Częstość zarażenia jest uzależniona od wielu czynników, także takich jak klimat, zwyczaje żywieniowe, ogólny poziom higieny oraz warunki socjo-ekonomiczne regionu. Pomimo powszechnego występowania choroba ta jest rzadko rozpoznawana, ponieważ przeważnie przebiega bezobjawowo lub pod postacią łagodnych niespecyficzných objawów ogólnych, często grypopodobnych (Dubey i Beattie 1988, Kruszewski 2004). Toksoplazmoza stanowi jednak bardzo poważny problem kliniczny (Milewska-Bobula 1999; Cook i wsp. 2000); ta powszechnie występująca u człowieka inwazja pasożytnicza może bowiem przybierać bardzo ciężki przebieg kliniczny u osób ze znacznym osłabieniem funkcji układu immunologicznego, z wrodzonym

lub nabytym upośledzeniem odporności (Tenter i wsp. 2000) lub w przypadku jego niedojrzałości u płodów i noworodków (Semprini i Dunn 2000) - choroba oportunistyczna. Szczególnie niebezpieczna jest dla potomstwa kobiet, które toksoplazmozą zarażają się po raz pierwszy w życiu w czasie ciąży. Ryzyko zarażenia ciężarnych jest bardzo wysokie i skorelowane w dużej mierze z prawdopodobieństwem zarażenia się w danym rejonie geograficznym. Konsekwencje zarażenia mogą być bardzo poważne: utrata ciąży lub wielonarządowe uszkodzenia płodu, a nawet śmierć dziecka. Na świecie, częstość występowania pierwotnej toksoplazmozy podczas ciąży waha się od 0,1 do 1% ciąży (Remington i wsp. 2001; Petersen i Dubey 2001). W Polsce współczynnik ten osiąga około 0,1% (Paul i wsp. 2000, 2001) a odsetek kobiet seropozytywnych w wieku rozrodczym, posiadających swoiste przeciwciała przeciwko toksoplazmozie sięga 43 %. Na podstawie przeprowadzonych w Wielkopolsce w latach 1996–2000 masowych badań immunodiagnostycznych w populacji stwierdzono iż, seropozytywność kobiet rodzących, mieszkających na wsi jest statystycznie wyższa niż pacjentek pochodzących ze środowiska miejskiego (Paul i wsp. 2001). Te doniesienia potwierdzają dane Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie gdzie częstość pierwotnych zarażeń była istotnie wyższa u pacjentek pochodzących z terenów wiejskich (1,1%), niż mieszkających w miastach o 0,27% (Niemiec i wsp. 2002). Tendencja ta odzwierciedla naturalne zachowania żywiciela ostatecznego *T. gondii*, czyli kotowatych, które w środowisku naturalnym mają skłonność do wypróżniania się w piasku, nad wodą, w pomieszczeniach gospodarskich, zagrodach, gdzie kontakt wyrzucanych z odchodami kota oocyst pasożyta z kolejnym żywicielem jest ułatwiony (Dubey 2004, 2008).

Toksoplazmoza była opisywana zarówno u zwierząt hodowlanych; świń, owiec, kóz, królików, jak również u dzikich (dzików, jeleniowatych, niedźwiedzi). Toksoplazmoza w hodowli zwierząt stanowi ogromny problem weterynaryjny z powodu strat reprodukcyjnych, przede wszystkim u owiec, kóz oraz świń, u których w wyniku zarażenia dochodzi do poronień i rodzenia martwego potomstwa (Dubey i Beattie, 1988). U zwierząt zarażonych *T. gondii* występują niespecyficzne objawy kliniczne takie jak: utrata apetytu, biegunka i wymioty, co prowadzi do ogólnego osłabienia, a w konsekwencji do spadku masy ciała.

W szerzeniu się inwazji *T. gondii* znaczną rolę odgrywają również zwierzęta gospodarskie, zwłaszcza świnię, wśród których odsetek zarażonych zwierząt z małych gospodarstw, w porównaniu ze zwierzętami z hodowli wielkostadnej wynosił odpowiednio 16% i 5% (Pawłowski 1999).

Warto zwrócić uwagę na znaczny wzrost w ostatniej dekadzie sektora rolnictwa ekologicznego oraz tradycyjnego. Produkcja żywności na farmach ekologicznych sprzyja rozprzestrzenianiu się czynnika patogenego *T. gondii* ze względu na swój otwarty charakter, bliska odległość zabudowań gospodarskich, w tym hodowlanych, do siedzib ludzkich oraz niechęć rolników do stosowania chemicznych środków kontroli populacji owadów, w tym najczęstszych - much z rodziny Calliphoridae (Insecta, Diptera).

Wiele drobnoustrojów patogennych dla zwierząt i człowieka przenoszonych jest przy udziale stawonogów, które uczestniczą w transporcie patogenów jako wektory, a także stanowią ich naturalny rezerwuuar. Wśród stawonogów uczestniczących w transmisji *T. gondii* dużą rolę odgrywają muchy z rodziny Calliphoridae (Insecta, Diptera). Pewną rolę w dyspersji oocyst w środowisku przypisuje się innym bezkręgowcom: dżdżownicom, ślimakom, karaczanom (Sroka, 2008; Cook 2000). Nadal nie posiadamy dostatecznych informacji epidemiologicznych - na temat wpływu zagrożeń środowiskowych, w tym pasożytniczych, na zdrowie ludzi ani roli, jaką mogą odegrać stawonogi w ich dyspersji. Aktualizacja danych na temat stopnia zanieczyszczenia rejonów rolniczych *T. gondii* oraz sposobu rozprzestrzeniania się tego pasożyta, także przy udziale wektorów biologicznych i mechanicznych, jest niezwykle ważna dla oceny zagrożenia epidemiologicznego kobiet w ciąży, które stanowią najliczniejszą grupę podwyższonego ryzyka inwazji.

Najlepszym sposobem walki z toksoplazmozą są działania profilaktyczne. Sprawdzonej metodą zapobiegania wielu chorobom infekcyjnym są szczepienia.

Prace dotyczące otrzymywania szczepionki przeciwko toksoplazmozie prowadzone są w wielu ośrodkach badawczych na świecie od lat 90, ich rezultatem było stworzenie komercyjnie dostępnej szczepionki o nazwie „Toxovax” przeznaczonej dla owiec. Szczepionka Toxovax oparta na żywych atenuowanych tachyzoitach szczepu S48, który nie ma zdolności tworzenia cyst tkankowych zmniejszyła u owiec częstość poronień wywołanych wewnątrzmacicznym zarażeniem płodu (Buxton, 1993). Szczepionka atenuowana nie może być jednak stosowana w zapobieganiu toksoplazmozie u ludzi ze względu na możliwości rewersji pasożyta do postaci zjadliwej oraz nieprzewidywalne ryzyko wprowadzenia zmodyfikowanych toksoplazm do organizmu człowieka. Z tego powodu cały czas prowadzone są badania nad nowymi typami szczepionek opartych na białkach rekombinowanych produkowanych w komórkach bakterii i drożdży oraz szczepionek opartych na kwasach nukleinowych.

Najliczniejszą grupę przetestowanych dotąd szczepionek przeciwko toksoplazmowym stanowią szczepionki rekombinowane powstałe na bazie takich antygenów *T. gondii* jak powierzchniowy antygen SAG1, antygeny mikronem, organelli wydzielniczych (MIC), antygeny roptrii, ROP oraz antygeny granul o dużej gęstości, GRA. W doświadczeniach z użyciem tych antygenów jako materiału szczepionkowego testy wykonywano głównie na myszach, dla których toksoplazmoza jest letalna, a wyniki są często niejednoznaczne i trudne do interpretacji.

Ponieważ szczepionki oparte na antygenach rekombinowanych wywołują głównie odpowiedź zależną od limfocytów Th2, podczas gdy kluczową rolę w ochronie organizmu przed inwazją *T. gondii* odgrywa odpowiedź immunologiczna zależna od limfocytów Th1 - nie ustają próby z uzyskaniem szczepionki opartej na kwasach nukleinowych.

Szczepionki DNA oparte na antygenach SAG1 (Angus i wsp. 2000, Fachado i wsp. 2003), GRA1 (Vercammen i wsp. 2000), GRA4 (Desolme i wsp. 2000, Bivas-Benita i wsp. 2003), ROP1 i

ROP2 były testowane na myszach w warunkach laboratoryjnych, dając obiecujące wyniki: wydłużenie czasu życia zainfekowanych myszy, zmniejszenie ilości cyst w ośrodkowym układzie nerwowym oraz podwyższenie miana przeciwciał cytokinin w surowicy immunizowanych zwierząt (Leyva i wsp. 2001). Dodatkowo plazmidy, które wykorzystywane są do immunizacji mogą zawierać nie tylko geny pasożyta kodujące białka antygenowe, ale także geny kodujące białka zwiększające odporność poszczepienną, np. gen kodujący ligand CD40 (CD154) – przez błonową proteinę, należącą do rodziny TNF- α , która w następstwie wiązania się z jej receptorem CD40 zapoczątkowuje serię reakcji prozapalnych, czy też gen kodujący czynnik wzrostu, stymulujący rozwój kolonii granulocytów - makrofagów (GMCSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor).

Omówienie osiągnięcia naukowego zgłoszonego do postępowania habilitacyjnego

Główny nurt badań rozprawy habilitacyjnej stanowią prace związane z konstrukcją szczepionki przeciwko *T. gondii* jako jednego z elementów profilaktyki przeciw toksoplazmowej.

Na skuteczność szczepionek przeciw-pasożytniczych, wpływa wiele czynników. Najważniejsze z nich to: dobór odpowiednich antygenów, wybór optymalnego adiuwantu, ustalenie odpowiedniego protokołu immunizacji oraz testowego modelu zwierzęcego.

Modelowe duże zwierzęta doświadczalne - owce - pełnią istotną rolę w naukach biomedycznych. Owce były wykorzystywane w badaniach ludzkiego metabolizmu, rozwoju płodowego oraz odporności immunologicznej (Van den Broeke i Burny 2003). Istotnym czynnikiem przesądającym o wyborze tego modelu zwierzęcego był fakt iż toksoplazmoza wrodzona w swoim przebiegu, sposobie przenikania przez łożysko i wpływie na rozwijające się potomstwo u ludzi i owiec wykazuje wiele podobieństw. Ponieważ na świecie jest ponad 1 bilion owiec należących do ponad 1300 ras (Innes i Vermeulen 2006) a toksoplazmoza u tych zwierząt prowadzi do dużych strat ekonomicznych w hodowli, a także w powiązonym z nią przemyśle, wybór tego modelu do testów był podwójnie uzasadniony.

W prowadzonych badaniach użyto 2-3 letnich, *T. gondii* seronegatywnych owiec rasy Coopworth, które podczas eksperymentów przebywały w naturalnych warunkach, na izolowanych pastwiskach.

Wraz z ciągłym rozwojem immunologii i biologii molekularnej na coraz szerszą skalę prowadzone są badania nad szczepionkami DNA. Są one stabilne, mogą selektywnie wzbudzać odporność układu immunologicznego z udziałem limfocytów Th1 lub Th2. Szczepionki DNA o wysokiej skuteczności, potwierdzonej na modelu mysim, często wykazują dużo mniejszą efektywność po przeniesieniu na duże zwierzęta, czy człowieka (Babiuk i wsp. 1999). W celu poprawienia tej efektywności stosuje się różne metody, głównie oparte na doborze adiuwantów lub ich mieszanin. Rolą adiuwantów jest między innymi ochrona antygeny przed zbyt szybką jego degradacją w ustroju

poprzez stopniowe uwalnianie go z miejsca podania. Adiuwanty wpływają także na pobudzenie komórek układu immunologicznego oraz wydajniejsze pochłanianie i prezentację antygeny (Babiuk 2003, Greenland i Letvin 2007).

W publikacjach, wchodzących w skład niniejszej rozprawy habilitacyjnej, przedstawiono **konstrukcje wybranych adiuwantów biologicznych**: cytokiny CD154 oraz kostymulującej cząsteczki GM-CSF. Pokazano wpływ skonstruowanych adiuwantów biologicznych i **zsyntezowanych adiuwantów chemicznych** tj. liposomów, sekwencji CpG oraz muramylopolipeptydu (MDP) na skuteczność szczepień przeciwko *T. gondii*.

Wyniki badań nad otrzymaniem uniwersalnego adiuwantu, opartego na cytokinie CD154, odgrywającej znaczącą rolę w stymulacji odpowiedzi immunologicznej humoralnej i komórkowej, zawarto w **publikacji nr 1**. Wcześniejsze badania (Tripp i wsp. 2000) wykazały, że użycie mysiego CD154 jako adiuwantu, w postaci plazmidu, na modelu mysim zwiększało znacznie rozwój odporności poszczepiennej. Analiza nukleotydowej sekwencji otrzymanego owczego CD154 wykazała znaczne podobieństwo do bydłowej (97%), świńskiej (89%) i ludzkiej (88%) sekwencji nukleotydowej dostępnej w Banku Genów. Ustalona aminokwasowa sekwencja oCD154 w 97% była podobna do sekwencji bydłowej, w 91% do sekwencji świńskiej i w 87% do ludzkiej. Ten oczekiwany poziom homologii wynika z faktu iż oCD154 należy do grupy białek z grupy cytokin TNF (tumor necrosis factor). Wszystkie białka należące do tej rodziny (tj TNF- α , ligand Fas, Apo2L), które posiadają w swojej strukturze domenę TNF, stanowiącą aż 54% całej sekwencji oCD154 wykazują wysokie procentowe podobieństwo. Ten poziom homologii sugeruje iż owczy CD154 może być użyty jako adiuwant również w przypadku innych gatunków zwierząt i człowieka. Potwierdza to wysoka reaktywność immunologiczna w przeprowadzonej analizie Western Blott oCD154 i mysich przeciwciał skierowanych w kierunku ludzkiego białka CD154. Również we wcześniejszych badaniach na owcach (Manoj i wsp. 2003) zaszczepionych plazmidem kodującym bydłowy CD154 obserwowano wzrost humoralnej odpowiedzi immunologicznej na użytą szczepionkę DNA, co wskazuje na znaczne podobieństwo strukturalne tych cytokin. CD154 użyty samodzielnie, bądź w ko-ekspresji z czynnikiem wzrostu stymulującym rozwój kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor) może znacznie zwiększyć odpowiedź immunologiczną przeciwko szczepionce DNA (Burger i wsp. 2001). Duże znaczenie w stymulowaniu odporności przeciwko *T. gondii* ma również adiuwantowe działanie niemetylowanych par zasad CpG (El-Malky i wsp. 2005). Przedstawione w **publikacji nr 4** wyniki szczepień z użyciem sekwencji CpG pokazały znaczny wzrost interferonu IFN γ w grupie kontrolnej owiec zaszczepionych plazmidem pVAX1 + CpG w porównaniu z kontrolą ujemną (bufor PBS). Jednakże w grupie owiec zaszczepionych plazmidowym DNA kodującym antygen SAG1 nie obserwowano tej reakcji, podobnie jak to opisali Saavedra i wsp. (2004) w odniesieniu do myszy. Zjawisko to może świadczyć o ograniczonej przydatności sekwencji CpG do wybranych kompozycji szczepionek jako

konsekwencja zjawiska współzawodnictwa pomiędzy antygenami w szczepionkach złożonych (O'Hagan i wsp. 2001). W **publikacji nr 4** przedstawiono między innymi: konstrukcję plazmidowego adiuwantu opartego na owczej sekwencji GM-CSF (oGM-CSF) oraz rezultat porównania efektywności szczepień z użyciem obu adiuwantów: CpG i GM-CSF; rola CpG jako adiuwantu w immunizacji przeciwko *T. gondii* wymaga dalszych badań.

Silne właściwości adiuwantowe mają liposomy, które pobudzają odporność humoralną i komórkową (Chodaczek 2004). W **publikacji nr 2** porównano odpowiedź owiec na szczepionkę DNA kodującą antygen *T. gondii* GRA7 stosując trzy różne protokoły immunizacji. Po raz pierwszy wykazano iż szczepionka DNA oparta na antygenie GRA7 jest w stanie aktywować zarówno humoralną jak i komórkową odpowiedź u owiec.

Na skuteczność szczepień ma również wpływ cały **protokół immunizacji**, na który składa się między innymi: ilość podanej szczepionki, miejsce iniekcji oraz rodzaj dawki przypominającej. W szczepieniach opisanych w **publikacji nr 4**, z udziałem antygeny SAG1 dla dwóch grup owiec użyto w dawce przypominającej rekombinowanego białka SAG1. Schemat szczepień obejmował przetestowanie zarówno rodzaju dawki przypominającej (DNA/DNA lub DNA/białko) jak i rodzaju adiuwantu.

Wybór antygeny do szczepień stanowi kluczowe wyzwanie w przypadku produkcji DNA szczepionek. Stosowanie antygenów specyficznych tylko dla określonego stadium pasożyta (np. tachyzoitów lub bradyzoitów) może ograniczyć znacząco przydatność takiej szczepionki. Dlatego duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem w szczepionkach białek roptrii (ROP) oraz białek granul o dużej gęstości (GRA), które występują u wszystkich form inwazyjnych *T. gondii* (Długońska 2008). Wiele przeprowadzonych eksperymentów immunizacji myszy z użyciem DNA szczepionek opartych na antygenach białek granul o dużej gęstości (GRA1, GRA4, GRA7) potwierdziło ich zdolność do aktywacji odpowiedzi immunologicznej opartej na limfocytach Th1 (Desolme i wsp. 2000, Vercammen i wsp. 2000, Jongert 2007). W **publikacji nr 3** przedstawiono wyniki badań odpowiedzi immunologicznej owiec na domięśniową immunizację DNA szczepionką opartą na antygenach GRA1, GRA4, GRA6 i GRA7 *T. gondii*. Po raz pierwszy dla wiedzy użyto do immunizacji szczepionki DNA opartej na antygenie GRA6 *T. gondii*. Wcześniej antygen GRA6 został wykorzystany do konstrukcji białkowej szczepionki rGRA6 i przetestowany na modelu mysim przez Golkar i współpracowników (Golkar i wsp. 2007). Przedstawione wyniki immunizacji owiec szczepionką DNA (pGRA6) opartą na tym antygenie pokazują umiarkowaną odpowiedź immunologiczną w porównaniu z owcami, które otrzymały pGRA1 i pGRA4. Skonstruowana szczepionka oparta na antygenie GRA4 u owiec nie wzbudzała produkcji IFN- γ , natomiast po podaniu dawki przypominającej zaobserwowano, podobnie jak w przypadku pGRA1, wzrost miana przeciwciał IgG1 i IgG2. W przeprowadzonych immunizacjach owiec najlepsze rezultaty otrzymano przy użyciu szczepionki pGRA7, która indukowała znaczną odpowiedź układu immunologicznego

poprzez produkcję zarówno IFN- γ jak i IgG2. Jednakże otrzymane wyniki wzbudzania odpowiedzi immunologicznej powinny być w dalszej kolejności potwierdzone przez efekt ochronny uzyskany w skutek zarażenia *T. gondii* owiec.

W prowadzonych badaniach nad konstrukcją przeciwtoksoplazmowej szczepionki DNA podjęto próbę stworzenia **szczepionki jedno i wielogenowej** (koktajlowej) opartej na antygenach SAG1 i ROP1. Odpowiedź immunologiczna owiec była testowana w sześciu różnych kombinacjach plazmidowego DNA, rekombinowanego białka, użytego jako dawko przypominająca i rodzaju adiuwantu (**publikacja nr 4**).

W **publikacji nr 4** pokazano że szczepionka oparta na antygenie ROP1 stymuluje silnie zarówno odpowiedź komórkowa jak i humoralną owiec. Zaobserwowano wzrost specyficznych anty-*T. gondii* przeciwciał IgG1 i IgG2 w surowicy immunizowanych zwierząt. Po podaniu plazmidu pROP1, we krwi owiec, wykryto limfocyty typu CD4 i CD8 oraz IFN- γ , pewne markery odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Drugim badanym antygenem było białko SAG1 (surface antigen 1, P30), główny powierzchniowy antygen tachyzoitów *T. gondii* i jeden z najczęściej wykorzystywanych antygenów do konstrukcji szczepionek. W przeprowadzonych na myszach testach skuteczności szczepionek opartych na białku powierzchniowych (SAG1), stwierdzano wytworzenie odporności typu komórkowego i humoralnego, redukcję cyst w mózgu żywiciela oraz skuteczną ochronę przed rozwojem zarażenia (Angus i wsp. 2000; Couper i wsp. 2003). W prowadzonych badaniach, w **pracy nr 4**, nie zaobserwowano odpowiedzi immunologicznej owiec na podaną szczepionkę opartą na antygenie SAG1. Celem prowadzonych eksperymentów było również porównanie skuteczności szczepionki opartej na mieszance plazmidów ROP1 i SAG1 w stosunku do szczepionek monogeneowych. Podanie mieszanki plazmidów z wbudowanym genem SAG1 i ROP2 okazało się skuteczną ochroną dla myszy, zarażonych letalną dawką *T. gondii* RH, podczas gdy każdy z tych genów podany osobno takiej aktywności nie wykazał (Fachado i wsp. 2003). W **pracy nr 4** obserwowano słabszą odpowiedź immunologiczną u owiec immunizowanych mieszanką plazmidów SAG1 i ROP1, niż w grupach, które otrzymały każdy z tych plazmidów osobno.

Mechanizm działania szczepionki DNA zależy głównie od rodzaju antygeny i dawki DNA, ale również od rodzaju adiuwantu i **dawki przypominającej**. Doświadczenia z użyciem antygenów rekombinowanych, jako materiału szczepionkowego dawki przypominającej, są dość liczne. W badaniach nad szczepionką przeciwko *Schistosoma mansoni* prowadzonych przez Da'Dara (Da'Dara i wsp. 2003) ustalono, że podanie jako pierwszej dawki antygeny w formie cDNA, a kolejnej w formie rekombinowanego antygeny białkowego może wywołać wyższy poziom odporności na zarażenie niż dwukrotne podanie antygeny w tej samej formie.

W prowadzonych badaniach podjęto próbę ustalenia najkorzystniejszej **strategii immunizacji**: podania DNA/DNA lub DNA/białko jako sposobu wzmacniania efektu immunizacji. Model ten testowano na grupie owiec, które otrzymały DNA szczepionkę opartą na antygenie SAG1, a

w dawce przypominającej plazmid z DNA antygeny SAG1 bądź białko rekombinowane białko rSAG1. Otrzymane wyniki pokazały iż użycie białka rSAG1 w drugiej dawce znacząco poprawiło odpowiedź immunologiczną owiec na podaną szczepionkę (pSAG1). Dalsze prace nad poprawą wydajności odpowiedzi immunologicznej powinny być prowadzone z uwzględnieniem również tej strategii.

Należy podkreślić, że w naturalnych zarażeniach *T. gondii* istnieje zawsze ryzyko reinwazji z form przetrwałych w organizmie, wobec czego skonstruowanie szczepionki, zabezpieczającej w pełni przed inwazją i tym samym późniejszą reinwazją, szczególnie u ludzi, będzie procesem długim i trudnym. Profilaktyka ludzkiego zdrowia powinna obejmować więc także badania epidemiologiczne, pozwalające na wytypowanie środowisk i ludzi szczególnie narażonych na inwazję *T. gondii* oraz badania dróg rozprzestrzeniania się tego pasożyta w środowisku, szczególnie tym bliskim ludzkich siedzib.

Wyniki badań dyspersji toksoplazmozy w środowisku człowieka z udziałem wektorów z zastosowaniem technik biologii molekularnej zawarto w **publikacjach 5 i 6**. Piśmiennictwo dotyczące tego zagadnienia jest niezwykle ubogie, a nieliczne opublikowane dotychczas prace wskazują, na większy niż dotąd sądzono udział stawonogów w transmisji form inwazyjnych *T. gondii* w środowisku człowieka. *T. gondii* może być przenoszona przez muchy (*Diptera*), karaluchy (*Blattaria*), chrząszcze (*Cloeoptera*), wszy (*Pediuculus humanus*), kleszcze (*Acarina*) i komary (*Culicidae*) na żywicieli oraz do środowiska zewnętrznego; stawonogi te mogą więc być źródłem toksoplazmozy człowieka. Muchy z rodziny Calliphoridae (Insecta, Diptera), bytujące najbliżej ludzkich siedzib, są szeroko rozpowszechnione w środowisku wiejskim, które charakteryzuje się najwyższą liczbą zachorowań na toksoplazmozę (Sroka i wsp. 2010). Wyniki własne dotyczące Calliphoridae bytujących w gospodarstwach ekologicznych rejonu Małopolski wykazały obecność DNA *T. gondii* u kilkunastu procent badanej populacji much. Ze względu na znaczenie epidemiologiczne w dalszych badaniach należałoby więc podjąć próbę oceny udziału tych wektorów w dyspersji toksoplazmozy w otoczeniu człowieka, w szczególności na terenie gospodarstw ekologicznych.

Podsumowanie wyników

1. Otrzymany adiuwant, oparty na owczej cytokinie CD154, wykazał znaczne podobieństwo sekwencji nukleotydowej i wydedukowanej sekwencji aminokwasowej do bydłowej, świńskiej i ludzkiej sekwencji CD154, może być więc użyty jako uniwersalny adiuwant
2. Wykazano adiuwantowe działanie niemetylowanych par zasad CpG na – po raz pierwszy badanym pod tym względem - modelu owczym, jednakże nie obserwowano efektu stymulacji odpowiedzi immunologicznej przy zastosowaniu tego adiuwantu i szczepionek, zawierających DNA wybranych antygenów *T. gondii*. Rola CpG jako adiuwantu w immunizacji przeciwko toksoplazmowej pozostaje niewyjaśniona.
3. Po raz pierwszy dla wiedzy wykazano iż szczepionka DNA oparta na antygenie GRA7 jest w stanie aktywować zarówno humoralną jak i komórkową odpowiedź u owiec.
4. Wykazano, iż domięśniowa immunizacja owiec szczepionką DNA z adiuwantem liposomowym była w stanie aktywować komórkową odpowiedź immunologiczną.
5. W niniejszych badaniach wykazano, że dobrze poznane i opisane szczepionki oparte na antygenie SAG1, skuteczne u myszy, nie stymulują odpowiedzi immunologicznej owiec w badanym modelu testowym.
6. Podanie mieszanki plazmidów z wbudowanym DNA antygenów SAG1 oraz ROP1, daje słabszą odpowiedź immunologiczną niż podanie tych plazmidów osobno, najprawdopodobniej na skutek efektu kompetycji antygenowej.
7. Nowo-skonstruowana szczepionka, oparta na antygenie ROP1, stymuluje silnie zarówno odpowiedź komórkową jak i humoralną owiec. Została ona wytypowana do dalszych zakrojonych na szeroką skalę między-ośrodkowych badań nad praktycznym wdrożeniem szczepionki przeciw *T. gondii*.
8. Wykazano, z zastosowaniem technik biologii molekularnej, znaczący udział Calliphoridae w dyspersji *T. gondii*, w szczególności w rejonach rolniczych. W świetle tych danych prewencyjne monitorowanie transmisji *T. gondii* przez wektory środowiskowe w celu ograniczenia dyspersji toksoplazmozy jest niezwykle ważne dla zmniejszenia zagrożenia kobiet w ciąży, które stanowią najliczniejszą grupę podwyższonego ryzyka inwazji.

Piśmiennictwo:

1. Angus CW, Klivington-Evans D, Dubey JP & Kovacs JA. 2000. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J Infect Dis*; 181: 317–324
2. Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den, H., and Babiuk, S. L. 1999. Immunization of animals: from DNA to the dinner plate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72(1–2), 189–202.
3. Babiuk, L.A., Gomis, S., and Hecker, R. 2003. *Molecular Approaches to Disease Control.* Poultry Science. 82: 870-875.
4. Bivas-Benita M, Laloup M, Versteheyhe S, et al. 2003. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. *Int J Pharm*; 266: 17–27.
5. Burger J.A., Mendoza R.B., Kipps T.J., 2001. Plasmids encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and CD154 enhance the immune response to genetic vaccines. *Vaccine.* 28:2181-2189.
6. Buxton D., 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today.* 9:335-337.
7. Chodaczek G., Adiuwany jako czynniki podnoszące skuteczność szczepionek. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58:47-59.
8. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a European multicentre case-control study. *Br Med J* 15: 142-147.
9. Couper KN, Nielsen HV, Petersen E, Roberts F, Roberts CW., Alexander J. DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission. *Vaccine* 2003; 21: 2813–2820.
10. Da’Dara AA, Skelly PJ, Walker CM & Harn DA. A DNAPrime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasite Immunol* 2003; 25: 429–437.
11. Desolme, B., Mévélec, M.N., Buzoni-Gatel, D., Bout, D., 2000. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine* 18, 2512-2521.
12. Długońska H. 2008. *Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immuno prevention of toxoplasmosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* ID 632424: 1–7.
13. Dubey J.P., 2004. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, 126, 57-72.
14. Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man.* CRC Press Inc., Boca Raton; p. 173-213.
15. Dubey, J.P., Jones, J.L., 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 38: 1257-1278.
16. Dzbeński T.H., 1992. Profilaktyka toksoplazmozy. W: Milewska-Bobula B, red. Toksoplazmoza. Wybrane zagadnienia. Wyd. Warszawa, CZD;56-60.
17. El-Malky M., Shaohong L., Kumagai T., Yabu Y., Noureldin M.S., Saady N., Maruyama H., Ohta N. 2005. Protective effect of vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen and CpG as an adjuvant against *Toxoplasma gondii* in susceptible C57BL/6 mice. *Microbiol Immunol*; 49(7):639-46.
18. Fachado A., Rodriguez A., Angel S.O., Pinto D.C., Vila I., Acosta A., Amendoeira R.R., Lannes-Vieira J. 2003. Protective effect of naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 21:1327–1335.
19. Golkar M., Shokrgozar M.A., Rafati S., Musset K., Assmar M., Sadaie R., Cesbron-Delauw M.F., Mercier C., 2007. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine.* 22:4301-4311.
20. Greenland J.R., Letvin N.L. 2007. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine*;25(19):3731-41.

21. Innes, E.A., Vermeulen, A.N., 2006. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Parasitology*. 133, S145-168.
22. Jongert, E., de Craeye, S., Dewit, J., Huygen, K., 2007. GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 29, 445–453.
23. Kazubski S.L., 1999. *Toxoplasma gondii* — budowa i biologia. [W:] Toksoplazmoza. Milewska-Bobula B. (red.). Wydawnictwo CHRIS-COMP, Warszawa, 9–14
24. Kruszewski, J., Miller, A. Toksoplazmoza. *Alergia*. 2004. 30-37.
25. Leyva R, Herion P & Saavedra R. 2001. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*; 87: 70–79.
26. Manoj S., Griebel P.J., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S. 2003. Targeting with bovine CD154 enhances humoral immune responses induced by a DNA vaccine in sheep. *J Immunol*.170(2):989-96.
27. Milewska-Bobula B., 1999. Toksoplazmoza wrodzona. [W:] Toksoplazmoza. Milewska-Bobula B. (red.). Wydawnictwo CHRIS-COMP, Warszawa, 52–59.
28. Niemiec K.T., Raczyński K., Markiewicz K., Leibschang J, Ceran A., 2002. Częstość występowania zarażeń pierwotniakiem *Toxoplasma gondii* u 2016 kobiet ciężarnych oraz ich dzieci urodzonych w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie. *Wiad. Parazytol.* 48, 293–299.
29. O'Hagan D.T., MacKichan M.L., Singh M.: 2001. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol. Eng*, 18, 69-85.
30. Paul M., Petersen E., Pawłowski Z. S., Szczapa J., 2000. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in the Poznań region of Poland by analysis of *Toxoplasma gondii* — specific IgM antibodies eluted from filter-paper blood spots. *J. Ped. Infec. Dis.* 19, 30–36.
31. Paul M., Petersen E., Szczapa J., 2001. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznań region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii* — specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1912–1916.
32. Pawłowski Z., 1999. Toksoplazmoza wrodzona. [W:] Toksoplazmoza. Milewska-Bobula B. (red.). Wydawnictwo CHRIS-COMP, Warszawa, 15-23.
33. Petersen E., Dubey J.P. 2001. Biology of toxoplasmosis. In: *Toxoplasmosis. A comprehensive clinical guide*. Joynson D.H.M, Wreghitt T.G. (red.). Cambridge University Press, Cambridge, 1-42.
34. Remington J. S., Mcleod R., Thulliez P., Desmots G., 2001. *Toxoplasmosis*. [W:] *Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant*. Remington J. S., Klein J. O. (red.). Saunders, Philadelphia, 205–346.
35. Saavedra R, Leyva R, Tenorio EP, Haces ML, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI, Héron P., 2004. CpG-containing ODN has a limited role in the protection against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 26:67-73.
36. Semprini, A .E., Dunn, D. T. 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Br. Med. J.* 15: 142-147.
37. Sroka J. 2008. Występowanie *Toxoplasma gondii* u zwierząt gospodarskich – artykuł przeglądowy. *Medycyna Weterynaryjna* 64,1, 27- 30.
38. Sroka J, Wojcik-Fatla A, Szymanska J, Dutkiewicz J, Zajac V, Zwolinski J. 2010. The occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in people and animals from rural environment of Lublin region - estimate of potential role of water as a source of infection. *Ann Agric Environ Med Jun*;17(1):125-32.
39. Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258.
40. Tripp R.A., Jones L., Anderson L.J., Brown M.P. 2000. CD40 ligand (CD154) enhances the Th1 and antibody responses to respiratory syncytial virus in the BALB/c mouse. *J Immunol.* 164(11):5913-21.
41. Van den Broeke A., Burny A. (2003). Retroviral vector biosafety: lessons from sheep. *J Biomed Biotech* 1:9-12.
42. 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.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Działalność naukowa podczas pracy w Katedrze Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej skoncentrowana była wokół dwóch grup zagadnień.

1. Badania nad strukturą molekularną genu glukozamino-6-fosforanu (GFA1) *Histoplasma capsulatum*, enzymu biosyntezy ściany komórkowej, obiecującego celu molekularnego chemioterapii grzybic układowych. Grzybice układowe są wciąż nierozwiązanym i narastającym problemem medycznym, stąd konieczność poszukiwania nowych chemioterapeutyków przeciwgrzybowych. Poznanie sekwencji i struktury genu GFA1 *H. capsulatum* jest etapem niezbędnym dla zaprojektowania optymalnego inhibitora tego enzymu. W trakcie tych badań zastosowano nowatorski sposób optymalizacji profilu termicznego reakcji amplifikacji PCR, oparty na wykorzystaniu zdegenerowanych starterów reakcji. Wyniki tych badań zawarto w pracach oryginalnych, opublikowanych w angielskich czasopismach międzynarodowych o IF 0.94.

2. Badania nad otrzymaniem nowych, wydajnych systemów biotechnologicznej produkcji białek termostabilnych oraz doboru optymalnego sposobu oczyszczania tych białek.

Hypertermostabilne proteazy to enzymy, które wzbudzają coraz więcej uwagi ze względu na szerokie możliwości ich zastosowania, między innymi w diagnostyce medycznej. W wyniku tych badań uzyskano sekwencje nukleotydową genu *pls* archeona *Pyrococcus woesei*, kodującego termostabilną proteazę serynową pyrolizynę oraz sekwencję genu beta-galaktozydazy również *Pyrococcus woesei*. Obie nowo odkryte sekwencje opublikowano w banku genów pod numerami AF239672.1 i AF043283.1. Rezultaty badań z tego okresu, przedstawione w formie komunikatu podczas międzynarodowego XXIV Congress Polish Society of Microbiologists w Białymstoku, zawarte zostały następnie w pracach, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, IF 3.0.

Studia doktoranckie zakończyły się obroną w 2002r. pracy doktorskiej p. t. „Biotechnologiczna produkcja i oczyszczanie termostabilnych proteaz serynowych aqualizyny I i pyrolizyny”.

Działalność naukowa realizowana podczas stażu zagranicznego, odbywanego od 2002r. w Lincoln University, Nowa Zelandia pod kierunkiem prof. Mirosława Stankiewicza: w ramach tej działalności stażystce powierzono zaprojektowanie pracowni biologii molekularnej oraz koordynację prac zespołu - w tym opartych na własnej koncepcji dr G. Olędzkiej - prowadzącego badania z użyciem modelowych zwierząt GMO w poszukiwaniu perspektywnych szczepionek przeciw patogenom pasożytniczym. W tym czasie dr Gabriela Olędzka uczestniczyła także w projekcie, prowadzonym we współpracy z **USC Neuromuscular Center, Department of Neurology, University of Southern California Keck School of Medicine, Good Samaritan Hospital (Los Angeles, USA)**. Projekt ten dotyczył badań nad obecnością miostatyny w komórkach mięśni osób chorych na wtórne zapalenie mięśni (IBM, *inclusion body myositis*), choroby z grupy miopatii

zapalnych pochodzenia autoimmunologicznego z cechami zwyrodnieniowo-zapalnymi, o nieznanym etiologii. Wyniki tych badań przedstawiono później w oryginalnej pracy naukowej, opublikowanej w międzynarodowym czasopiśmie anglojęzycznym o IF 2,8.

Działalność naukowa w Zakładzie Biologii Medycznej Wydziału Nauki o Zdrowiu Akademii Medycznej w Warszawie, obecnie Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, prowadzona przez dr G.Olędzką od 2005r., stanowiła kontynuację wcześniejszych zainteresowań, dotyczących wykorzystania biotechnologii białek i kwasów nukleinowych w aspekcie praktycznym dla ludzkiego zdrowia oraz wpływu czynników endo - i egzogennych na transmisję patogenicznych drobnoustrojów w środowisku człowieka.

Spśród zagadnień, związanych m. innymi z udziałem w badaniach, prowadzonych pod kierunkiem prof. Lidii Chomicz przez zespół Zakładu w ramach zadań statutowych i współpracy z różnymi klinikami i zakładami Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz innymi ośrodkami krajowymi i zagranicznymi należy wymienić:

1. wielospecjalistyczne porównawcze badania ontocenozy jamy ustnej pacjentów zabiegowych, z różnych grup populacyjnych, z zaburzeniami ogólnoustrojowymi. Przedmiotem badań była ocena dynamiki infekcji/inwazji różnych kategorii drobnoustrojów oportunistycznych: bakterii, grzybów i pierwotniaków i ryzyka rozwoju chorób o ciężkim przebiegu powodowanych przez te drobnoustroje. Wyniki tych badań, analizowane w aspekcie prewencji powikłań około- i po-zabiegowych, lokalnych i ogólnoustrojowych, opublikowano w dwóch oryginalnych pracach na ten temat, przedstawiono także w doniesieniu zjazdowym;

2. badania nad bąblowicami, prowadzone we współpracy, między innymi z klinikami/oddziałami chirurgii Warszawskiego oraz Poznańskiego Uniwersytetu Medycznego. Znaczenie tych interdyscyplinarnych badań wzrasta w obliczu nasilającego się w Polsce i w Europie problemu bąblowicy wielojamowej (alweokokozy) u ludzi. Wyniki badań morfologicznych materiału uzyskanego śródoperacyjnie mają wymiar praktyczny, zarówno dla ostatecznego potwierdzenia / weryfikacji rozpoznania, jak i oceny zmian w strukturze zajętego narządu. Część badań, dotyczących tej grupy zagadnień, prowadzona była z udziałem dr Gabrieli Olędzkiej, a ich wyniki zaprezentowano podczas Ogólnopolskiej Konferencji Naukowo- Szkoleniowej w 2008 w Poznaniu „Choroby tropikalne i pasożytnicze” oraz na XXII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego w Puławach;

3. badania z użyciem szczepów modelowych ameb i rzęsistków, dotyczące oporności/wrażliwości na substancje antyseptyczne i leki stosowane dotychczas oraz ich pochodne nowosyntetyzowane.

W szczególności, zagrożenia ludzkiego zdrowia, powodowane przez pełzaki amfizoiczne z rodzaju *Acanthamoeba*, stanowią stosunkowo nowy problem medyczny, nierozpoznany z epidemiologicznego punktu widzenia. Ciężkie stany zapalne rogówki powodowane przez te ameby, trudno poddają się leczeniu; w ponad 80% dotyczą osób, stosujących soczewki kontaktowe. Pomimo postępów w terapii rezultaty leczenia są często niezadowalające, nierzadko rozwija się lekooporność. Badania koncentrowały się na ocenie przeciw-amebowej aktywności różnych pochodnych benzimidazolowych i nitroimidazolowych, zarówno dotąd stosowanych, jak też nowo-syntetyzowanych we współpracy Zakładu Biologii Medycznej WUM z Instytutem Chemii SGGW oraz Instytutem –Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej. Nowe dla wiedzy dane z tych badań prezentowane były na konferencjach i zjazdach krajowych i zagranicznych oraz zawarte zostały w publikacjach oryginalnych.

Aktualnie dr Gabriela Olędzka uczestniczy w realizacji projektu, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2010-2012) „Ocena skuteczności przeciw-amebowej środków dezynfekujących oraz leków stosowanych w okulistyce” - kierownik projektu- prof. L.Chomicz, dr Gabriela Olędzka –współwykonawca;

4. badania zagrożenia epidemiologicznego, powodowanego przez hematofagiczne i synantropijne stawonogi- wektory stadiów inwazyjnych i dyspersyjnych drobnoustrojów patogenicznych oraz oportunistycznych. Wykazano, że w środowisku człowieka, między innymi w rejonach przyszpitalnych, wektory te w znaczącym stopniu mogą uczestniczyć w dyspersji bakterii oraz grzybów pleśniowych i drożdżopodobnych, w tym potencjalnych czynników rozwoju infekcji wtórnych u już hospitalizowanych pacjentów. Wykrycie zagrożenia dyspersji przez wektory drobnoustrojów chorobotwórczych w środowisku przyszpitalnym zwróciło uwagę na konieczność lepszego przestrzegania zasad prewencji, w tym owadoszczelności obiektów szpitalnych. Wyniki i wnioski z tych badań przedstawiono podczas konferencji krajowych i międzynarodowych, zawarto w rozdziałach monografii oraz w pracach poglądowych.

Udział w projektach badawczych:

- Ocena skuteczności przeciwamebowej środków dezynfekujących oraz leków stosowanych w okulistyce – projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego 2010-2012. Nauki Kliniczne Niezabiegowe (402), 375438. Nr rejestru ID: 67542.

Kierownik projektu: prof. L. Chomicz; współwykonawca projektu: dr Gabriela Olędzka; projekt w realizacji.

- Badania wielospecjalistyczne in vivo oraz in vitro nad dynamiką i morfofizjologią stadiów inwazyjnych/dyspersyjnych drobnoustrojów i helmintów patogenicznych dla człowieka oraz ich przydatność dla weryfikacji diagnostyki oraz profilaktyki. - Temat statutowy w WUM w Warszawie;

Nr rejestru w Dziale Nauki NZI/N/2009. Kierownik projektu: prof. L. Chomicz, współwykonawca - dr Gabriela Olędzka; projekt zakończony.

- Wielospecjalistyczne badania nad stadiami troficznymi i dyspersyjnymi wybranych patogenów zwierząt i człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem oceny substancji o działaniu przeciw-inwazyjnym. - Temat statutowy w WUM w Warszawie; Nr rejestru w Dziale Nauki NZI/N/2008.

Kierownik projektu: prof. L.Chomicz, współwykonawca projektu - dr Gabriela Olędzka, projekt zakończony.

- Badania nad stadiami inwazyjnymi i dyspersyjnymi helmintów, transmitowanych drogą pokarmową. - Temat statutowy w AM w Warszawie; Nr rejestru w Dziale Nauki NZI/N/2006. Kierownik projektu: prof. L. Chomicz, współwykonawca projektu - dr Gabriela Olędzka. projekt zakończony.

- Produkcja i oczyszczanie rekombinowanej pyrolizyny ze szczepu termofilnego *Pyrococcus woesei* - Temat statutowy Politechniki Gdańskiej 2000.

Kierownik projektu - dr G. Olędzka; projekt zakończony.

- Klonowanie i ekspresja ludzkiej proinsuliny w *Pichia pastoris*. Temat statutowy Politechniki Gdańskiej 1999. współwykonawca projektu - dr Gabriela Olędzka..

- Produkcja i oczyszczanie rekombinowanej aqualizyny I ze szczepu termofilnego *Thermus aquaticus* w komórkach *Escherichia coli* i *Pichia pastoris*. Grant KBN/1999.

Kierownik projektu dr G. Olędzka; projekt zakończony.

Opublikowane sekwencje nukleotydowe:

- *Ovis aries* CD40 ligand (CD154) mRNA, complete cds, **GenBank: DQ054533.1**,
- *Pyrococcus woesei* beta-galactosidase gene, complete cds, **GenBank: AF043283.1**,
- *Pyrococcus woesei* pyrolysin gene, complete cds, GenBank: **AF239672.1**

Otrzymane nagrody:

2008 Zespołowa, naukowa nagroda Rektora WUM trzeciego stopnia za badania modelowe nad potencjalną aktywnością przeciwpatogeniczną/terapeutyczną wybranych czynników chemicznych, z zastosowaniem nowych syntez, technik immunocytochemicznych i molekularnych.

2011 Zespołowa, naukowa nagroda Rektora WUM drugiego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących wielospecjalistycznych badań in vitro oraz in vivo nad oportunistycznymi Protozoa w poszukiwaniu molekularnych inhibitorów inwazji - z użyciem związków nowosyntetyzowanych, prospektywnych szczepionek DNA i białkowych

Dorobek dr Gabrieli Ołędzkiej obejmuje: **28 publikacji naukowych**; łączna wartość **IF =20,077**, **KBN/MNiSW=241**. Analiza publikacji na podstawie pakietu Web of Science wykazała **55 cytowań bez autocytowań**. Na zjazdach i sympozjach naukowych krajowych i zagranicznych przedstawionych zostało **21 doniesień naukowych**. Indeks cytowań Hirscha, **index h=3** (wg bazy Scopus).

Gabriela Ołędzka

20.09.2012