AUTOREFERAT

Monika Derda

Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Nowe możliwości w wykrywaniu i zwalczaniu pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*”

Poznań, 2016

Autoreferat

1. **Imię i Nazwisko: Monika Derda**

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

1994 - Dyplom magistra analityki medycznej, Akademia Medyczna (obecnie Uniwersytet Medyczny) im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Farmacji, Oddział Analityki Medycznej. Praca magisterska pt.: „*Doświadczalna włośnica: proteazy i antyoksydanty pasożyta i żywiciela*". Opiekunem pracy magisterskiej był prof. dr hab. Edward Hadaś.

1998 - Tytuł doktora nauk biologicznych na podstawie rozprawy pt.: „Biochemiczne mechanizmy reakcji obronnych żywiciela w doświadczalnej włośnicy". Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. Edward Hadaś, natomiast recenzentem prof. dr hab. Andrzej Malczewski oraz prof. dr hab. Zbigniew Pawłowski.

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- od 01.10.1997 r. - do 30.09.2001 r. – asystent,- Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- od 01.10.2001 r. - do 30.09.2010 r. - adiunkt - Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (od 2007 zmiana nazwy na Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu)
- od 01.10.2010 r. - starszy wykładowca - Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

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.):**

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

„Nowe możliwości w wykrywaniu i zwalczaniu pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*”

b) wykaz publikacji:

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl 8 prac oryginalnych, dotyczących wykrywania i zwalczania pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*. W 7 pracach jestem pierwszym autorem, w ósmej pracy jestem wymieniona na drugim miejscu, ale jestem w tej pracy autorem korespondencyjnym i jednocześnie autorem równorzędnym z pierwszym autorem. Łączna wartość wskaźnika **IF** dla prezentowanego cyklu prac wynosi **11,201**; **punktacja MNiSW = 150,0.**

1). **Derda M.,** Winiecka-Krusnell J., Linder M.B., Linder E. Labeled *Trichoderma reesei* cellulase as a marker for *Acanthamoeba* cyst wall cellulose in infected tissues. Applied and Environmental Microbiology, 75 ,6827-6830, 2009

IF: 3.686	**punkty MNiSW: 32**	**liczba cytowań: 2**

2). **Derda M.,** Hadaś E. Wykorzystanie obecności celulozy w ścianie komórkowej cyst *Acanthamoeba* do celów diagnostycznych. Wiadomości Parazytologiczne, 55 (1), 47-51, 2009

	punkty MNiSW: 4	**liczba cytowań: 3**

3). **Derda M.,** Wojtkowiak-Giera A., Hadaś E. Comparative analyses of different genetic markers for the detection of *Acanthamoeba* spp. isolates. Acta Parasitologica, 59 (3), 472-477, 2014

IF: 0.965	**punkty MNiSW: 15**	**liczba cytowań: 3**

4). **Derda M.,** Hadaś E., Thiem B. Plant extracts as natural amoebicidal agents. Parasitology Research,104 (3), 705-708, 2009

IF: 1.721	**punkty MNiSW: 20**	**liczba cytowań: 15**

5). **Derda M.,** Hadaś E., Thiem B., Wojt W.J., Wojtkowiak-Giera A., Cholewiński M., Skrzypczak Ł. *Tanacetum vulgare* L. jako roślina o potencjalnych właściwościach leczniczych w *Acanthamoeba* keratitis. Nowiny Lekarskie, 620-625 (4), 311-314, 2012

punkty MNiSW: 4; liczba cytowań: 0

	punkty MNiSW: 4	**liczba cytowań: 0**

6). **Derda M.,** Thiem B., Budzianowski J., Hadaś E., Wojt W.J., Wojtkowiak-Giera A. The evaluation of the amebicidal activity of *Eryngium planum* extracts. Acta Poloniae Pharmaceutica– Drug Research, 70 (6), 1027-1034, 2013

IF: 0.683	**punkty MNiSW: 15**	**liczba cytowań: 2**

7). Kuźma Ł., **Derda M.,** Hadaś E., Wysokińska H. 2015. Abietane diterpenoids from *Salvia sclarea* transformed roots as growth inhibitors of pathogenic *Acanthamoeba* spp. Parasitology Research, 114 (1), 323-327

IF: 2.098	**punkty MNiSW: 30**	**liczba cytowań: 0**

8). **Derda M.,** Hadaś E., Cholewiński M., Skrzypczak Ł., Grzondziel A., Wojtkowiak-Giera A. 2016. *Artemisia annua* L. as a plant with potential use in the treatment of acanthamoebiasis. Parasitology Research, 115 (4), 1635-1639

IF: 2.098	**punkty MNiSW: 30**	**liczba cytowań: 0**

c) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* to organizmy występujące kosmopolitycznie w glebie, w powietrzu oraz w zbiornikach wody słodkiej i słonej. Uczestniczą one w obiegu pokarmowym i energetycznym redukując naturalne zanieczyszczenia biologiczne w zbiornikach wodnych oraz działają jako drapieżniki regulujące populacje bakterii.

W ich cyklu życiowym występują dwa stadia rozwojowe. Pierwsze z nich to stadium wegetatywne – trofozoit, drugie to stadium przetrwalnikowe – cysta, która umożliwia pełzakom przetrwać w warunkach niesprzyjających.

Pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* zaliczane są do tzw. pierwotniaków amfizoicznych. Najczęściej występują one w środowisku jako organizmy wolno żyjące, ale w sprzyjających warunkach mogą stać się pasożytami chorobotwórczymi. W latach 50-tych po raz pierwszy stwierdzono ich patogeniczność dla myszy, małp, a także dla mięczaków. W 1965 roku Fowler i Carter wykazali, że omawiane pełzaki wolno żyjące mogą być również pasożytami człowieka. Opisali oni pierwsze przypadki zapalenia opon mózgowych i mózgu wywołane przez pełzaki (Fowler i Carter, 1965). Szczegółowe badania doprowadziły do opisania ziarniniakowego zapalenia mózgu, tzw. GAE (granulomatous amebic encephalitis). GAE jest chorobą przewlekłą. Dotyczy ona najczęściej pacjentów z nieprawidłowo funkcjonującym systemem immunologicznym lub przyjmujących leki immunosupresyjne.

Pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* najczęściej dostają się do organizmu żywiciela drogą inhalacyjną lub przez uszkodzoną rogówkę oka. Prawdopodobnie mogą one dostać się do organizmu człowieka również drogą naczyń krwionośnych, wnikając przez uszkodzoną skórę. W inwazji ośrodkowego układu nerwowego do typowych objawów zaliczamy: ból głowy, gorączkę, zaburzenia wzrokowe, zaburzenia neurologiczne, halucynacje oraz dezorientację.

Poza ośrodkowym układem nerwowym pełzaki mogą powodować zmiany w wielu narządach człowieka i zwierząt. Inwazje obserwowano między innymi w płucach, nadnerczach, skórze, uchu, żuchwie. Od pewnego czasu rośnie też liczba przypadków pełzakowego zapalenia rogówki oka (AK – *Acanthamoeba keratitis*). Pierwsze doniesienie dotyczące AK opublikowano w roku 1974. Większość współczesnych przypadków ma związek z noszeniem soczewek kontaktowych i używaniem skażonych roztworów do ich pielęgnacji. W nielicznych przypadkach zarażenie wiąże się z mechanicznymi urazami rogówki.

Diagnostyka laboratoryjna inwazji *Acanthamoeba* spp. oparta jest głównie na identyfikacji pasożyta w tkankach żywiciela. Chociaż zostały opisane różne techniki identyfikacji pełzaków, włączając w to metody immunocytologiczne i molekularne, to podstawową procedurą jest nadal hodowla na agarze. Ta metoda zwykle jest łączona z histopatologiczną oceną preparatu w celu potwierdzenia inwazji tkanki przez pasożyta.

Rozpoznanie pasożytów w preparatach z tkanek jest często trudne i zależy od wiedzy specjalistycznej z zakresu patomorfologii. Często w tradycyjnych metodach barwienia

histologicznego używa się specyficznych pasożytniczych przeciwciał, natomiast do wizualizacji pasożytów w preparatach tkankowych używa się kalkofluoru.

Leczenie akantamebozy jest bardzo trudne, długotrwałe i rzadko skuteczne. W celu terapeutycznym stosuje się głównie antybiotyki oraz leki zapobiegające dalszym następstwom uszkodzenia tkanki, które mają działanie pełzakobójcze lub pełzakostatyczne. Są to często substancje silnie drażniące, toksyczne oraz wywołujące szereg skutków ubocznych.

Przykładem stosowanych leków są pochodne chloroheksydyny, standardowo stosowane do dezynfekcji. Doniesienia o skutecznym leczeniu inwazji centralnego układu nerwowego lub gałki ocznej u chorych immunokompetentnych, zanotowano tylko w przypadku zastosowania terapii kombinowanej i rozpoczętej we wczesnym etapie choroby. W późnych stadiach zarażenia, leczenie zazwyczaj jest nieskuteczne. Z tych powodów poszukuje się alternatywnych metod leczenia, które nie wywoływałyby skutków ubocznych u pacjenta. Nowych leków najczęściej poszukuje się pośród substancji pochodzenia roślinnego.

Poza doborem odpowiednich leków, istotnym czynnikiem w leczeniu akantamobozy jest również jak najszybsze jej zdiagnozowanie oraz szybkie rozpoczęcie terapii.

Od wielu lat pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* stanowią przedmiot moich zainteresowań naukowych. Cykl przedstawionych przeze mnie prac dotyczy zarówno wykrywania pełzaków, jak również zwalczania ich poprzez stosowanie preparatów pochodzenia roślinnego.

Nowe metody diagnostyczne

Publikacja 1 i 2

W wyniku przeprowadzonych badań opracowałam kilka wariantów nowej metody służącej do identyfikacji cyst pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. Wyniki badań zostały przedstawione w pracach: „**Labeled *Trichoderma reesei* cellulase as a marker for *Acanthamoeba* cyst wall cellulose in infected tissues”** oraz **“Wykorzystanie obecności celulozy w ścianie komórkowej cyst *Acanthamoeba* do celów diagnostycznych”.** W metodzie tej wykorzystałam nietypową jak na pierwotniaka budowę chemiczną ściany cyst *Acanthamoeba* spp.

Wiele pasożytniczych pierwotniaków posiada zdolność tworzenia cyst jako stadiów przetrwalnikowych. Przeważnie głównym składnikiem ściany cyst jest chityna.

Acanthamoeba stanowi jeden z wyjątków wśród pierwotniaków, ponieważ w ścianie cyst zamiast chityny posiada celulozę. Celuloza składa się z cząstek D-glukozy połączonych wiązaniami 1,4-glikozydowymi. Chityna jest bardzo podobna do celulozy, ale zawiera monomery N-acetylo-D-glukozoaminy. Ponadto, oba wielocukry zawierają 1,4-heksozę, stąd też różnicowanie cytochemiczne między celulozą i chityną w mikroskopie świetlnym nie było dotychczas możliwe z powodu podobieństwa składowej szkieletu. Badania biochemiczne wykazały, że obecność celulozy, m.in. w tkankach roślinnych, ale również w ścianie cyst pierwotniaków można łatwo wykryć wykorzystując do tego celu specyficzną budowę celulaz (Linder i wsp., 2002; Shpigel i wsp., 1998). Większość celulaz składa się z dziedziny katalitycznej oraz dziedziny wiążącej celulozę (CBD - Cellulose- Binding Domain). Katalityczna dziedzina zawiera aktywne miejsce z pozostałością aminokwasu odpowiedzialną za mechanizmy hydrolityczne. Zadaniem CBD jest przyłączanie się do celulozy. Celuloza zawarta w ścianie komórkowej cyst może wiązać się z dziedziną wiążącą celulazy (CBD). Zdolność CBD do wiązania się z celulozą może być wykorzystywana w diagnostyce. Indywidualne typy CBD mogą różnić się znacząco w swoich własnościach, takich jak powinowactwo, preferencje do krystalicznej albo bezpostaciowej celulozy oraz krzyżowe reakcje z innymi, podobnymi węglowodanami.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach przygotowałam cztery różne koniugaty. Substancją wyjściową do uzyskania koniugatów była rekombinowana dimeryczna celulaza pozyskana z grzyba *Trichoderma reecei*. Trzy z tych koniugatów otrzymałam jako połączenie rekombinowanego białka z barwnikiem fluorescencyjnym. Zastosowałam trzy różne barwniki, ponieważ nie wiedziałam, z którym uzyskam najlepszy efekt barwny. Zastosowane barwniki to: Alexa Fluor® 350 (niebieski), Alexa Fluor® 488 (zielony) oraz Alexa Fluor® 568 (pomarańczowo-czerwony) z zestawu Protein Labeling Kit firmy Molecular Probes. Otrzymane koniugaty wykorzystałam do uzyskania reakcji widocznej w mikroskopie fluorescencyjnym.

Ponieważ nie wszystkie laboratoria dysponują mikroskopami fluorescencyjnymi opracowałam również koniugat, który pozwolił na uzyskanie reakcji barwnej widocznej w mikroskopie świetlnym. Koniugat ten otrzymałam przez znakowanie białka biotyną używając do tego celu EZ - Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce).

Podczas barwienia preparatów tkankowych, wystąpiła nieswoista reakcja z endogenną peroksydazą i endogenną biotyną. Reakcja ta wystąpiła zarówno w preparatach z tkanek, jak i preparatach zawierających cysty z hodowli aksenicznej. W celu zredukowania nieswoistej reakcji spowodowanej obecnością endogennej biotyny, preparaty inkubowałam ze

streptawidyną (białko wiążące biotynę) oraz z peroksydazą chrzanową (HRP – enzym o właściwościach katalitycznych). Do tego celu użyłam kompleksu streptawidyna - HRP (StreptABComplex / HRP firmy Dako).

W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy wykazały, że zastosowanie fluorescencyjnych koniugatów CBD pozwala na szybkie wykrywaniu cyst *Acanthamoeba* spp. Do identyfikacji cyst *Acanthamoeba* spp. pochodzących z hodowli mogą być wykorzystywane wszystkie opracowane przeze mnie koniugaty fluorescencyjne. Przy identyfikacji pasożytów w tkankach najlepsze efekty uzyskałam stosując koniugat CBD z Alexa Fluor® 568. W przypadku preparatów tkankowych reakcja barwna po zastosowaniu Alexa Fluor® 350 i Alexa Fluor ® 488 jest słabiej widoczna. Jasna autofluorescencja cyst *Acanthamoeba* w świetle UV przeszkadza w niebieskim zabarwieniu celulozy, gdy użyty jest Alexa Fluor® 350 i zielonym zabarwieniu celulozy, gdy użyty jest Alexa Fluor® 488. Czerwony fluorochrom w koniugacie z Alexa Fluorem® 568, daje możliwość rozróżnienia między autofluorescencją zewnętrznej ściany, a badaną reakcją w wewnętrznej ścianie, i pozwala dokładnie zlokalizować celulozę w cyście *Acanthamoeba* spp.

Wykazałam, że CBD przygotowane jako białko biotynylowane może zostać użyte do identyfikacji cyst *Acanthamoeba* spp. w mikroskopie świetlnym. Powinowactwo wiązania awidyna - biotyna jest powszechnie używane w metodach histochemicznych. Jednakże obecność biotyny endogennej w różnych komórkach i tkankach może spowodować fałszywe pozytywne wyniki (Wang i Pevsner, 1999). Przy badaniu preparatów z tkanek konieczne jest zniwelowanie ewentualnych fałszywie pozytywnych wyników. W tym celu do opracowanej przeze mnie metody wprowadziłam dodatkowo fazę blokowania endogennej biotyny, co znacząco zmniejszyło tło zanieczyszczające.

Wprowadzenie fazy blokowania endogennej biotyny wydłużyło nieco czas potrzebny do dokonania analizy próby, ale wywołało zadowalające efekty niwelujące zanieczyszczenia.

Badania opisane w pracy „**Labeled *Trichoderma reesei* cellulase as a marker for *Acanthamoeba* cyst wall cellulose in infected tissues”** bazowały na wykorzystaniu rekombinowaj dimerycznej celulazy pochodzącej z grzyba *Trichoderma reecei*. Celulazę tę pozyskałam w ramach współpracy z Profesorem Markusem B. Linderem z VTT Biotechnology, VTT Technical Research Centre of Finland, w Espoo w Finlandii. Dotychczas celulaza ta dostępna była tylko do celów badawczych w ramach współpracy naukowej.

Zachęcona uzyskanymi wynikami spróbowałam w badaniach zastąpić celulazę z *Trichoderma reecei*, celulazą dostępną na rynku. W dalszych badaniach wykorzystałam rekombinowane CBD pozyskane od celulolitycznych bakterii *Clostridium cellulovorans*,

sprzedawane przez Firmę Sigma. Badania te opisałam w publikacji **"Wykorzystanie obecności celulozy w ścianie komórkowej cyst *Acanthamoeba* do celów diagnostycznych".** Badania przeprowadzone z celulazą pozyskaną z *Clostridium cellulovorans* dały identyczne wyniki z opisanymi powyżej. Wykorzystanie celulazy dostępnej na rynku, pozwoli na łatwiejsze wykorzystanie metody do celów diagnostycznych.

Opisane przeze mnie koniugaty CBD są alternatywnymi narzędziami diagnostycznymi wykorzystywanymi do bezpośredniego barwienia cyst *Acanthamoeba* w próbach tkankowych pochodzących od pacjentów. Mogą one być również przydatnymi narzędziami do identyfikacji pełzaków pochodzących ze środowiska.

Publikacja 3

W diagnostyce chorób pasożytniczych coraz częściej stosuje się metody molekularne. Podstawową metodą jest reakcja PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy). W publikacjach naukowych opisano kilka różnych par starterów wykorzystywanych w technice PCR do identyfikacji pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba.*

W środowisku występuje szereg pełzaków wolno żyjących należących do rodzajów *Acanthamoeba, Balamuthia, Echinamoeba, Hartmannella, Naegleria, Mastigina, Sappinia, Vahlkampfia, Vannella* oraz *Vexillifer*. Potencjalnie najbardziej niebezpieczne dla ludzi są niektóre gatunki należące do rodzaju *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia* oraz *Sappinia.* Z tego też powodu istotna jest właściwa identyfikacja pełzaków wolno żyjących.

Zastosowanie techniki PCR nie zawsze pozwala na prawidłowe zidentyfikowanie pełzaków wolno żyjących. W reakcji PCR często powstają nieswoiste produkty.

Stąd też kolejnym etapem moich badań, było znalezienie jak najlepszej pary starterów wykorzystywanej w reakcji PCR do wykrywania pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. Moje badania opisane w pracy **„Comparative analyses of different genetic markers for the detection of *Acanthamoeba* spp. isolates"** dotyczyły efektywności techniki PCR w akantamebozie.

W pracy tej porównałam efektywność działania najpopularniejszych par starterów wykorzystywanych w reakcji PCR do identyfikacji pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. Zbadałam działanie następujących starterów: startery Aca 16S for i rev (Yagi et al., 2007), Nelson for i rev (Mathers et al., 2000), GP 1383 for i GP 1655 rev (Lehmann et al., 1998), Ac6/210 for i rev (Howe et al., 1997) oraz JDP1 i JDP2 (MacLean et al., 2007).

Celem pracy było opracowanie szybkiej metody wykrywania i identyfikacji pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* spp. Do badań wykorzystałam szczepy wzorcowe pełzaków:

Acanthamoeba castellanii – 309 (Kasprzak and Mazur 1972), *A. polyphaga* – 298 (Kasprzak and Mazur 1972), *A. rhysodes* – Chang (Pussard and Pons 1977), *Hartmannella vermiformis* – ATCC 50256 oraz izolaty pełzaków pochodzące z wody wodociągowej, z gejzera Strokkur na Islandii oraz z jeziora Malta w Poznaniu.

Wszystkie szczepy pełzaków poddałam identyfikacji przy użyciu tradycyjnych metod stosowanych w diagnostyce akantamebozy tj.: założyłam hodowle na podłożu agarowym, a następnie hodowle akseniczne na podłożu płynnym, wykonałam preparaty barwione, dokonałam pomiaru cyst, w przypadku pełzaków z rodzaju *Naegleria* wykonałam również test flagellacji. W przypadku wszystkich prób wykonałam testy na zwierzętach doświadczalnych w celu zbadania patogeniczności pełzaków. Z badanych pełzaków wyizolowałam DNA, a następnie wykonałam reakcje PCR.

Startery, które wykorzystałam w swoich badaniach były wcześniej opisane przez różnych autorów jako swoiste do wykrywania pełzaków z rodzaju *Acanthamoebae.* Niestety moje badania nie potwierdziły ich swoistości. Większość zbadanych przeze mnie par starterów okazała się nieswoista dla *Acanthamoeba*. Próby wykorzystania ich do identyfikacji pełzaków z prób środowiskowych okazały się niezadawalające. Przy ich zastosowaniu można było błędnie identyfikować jako *Acanthamoeba* również pełzaki innych rodzajów, jak np. *Hartmanella,* czy *Neagleria*.

Z pięciu przebadanych par starterów tylko jedna okazała się swoista do wykrywania *Acanthamoeba* i pozwoliła na rozróżnienie szczepów *Acanthamoeba* od innych pełzaków wolno żyjących. Są to startery Aca 16S. Najmniej przydatna okazała się para starterów GP, przy pomocy której można było wykryć tylko w niektórych pozytywnych (potwierdzonych tradycyjnymi metodami) próbach pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*. Pozostałe startery były zbyt mało swoiste ponieważ oprócz *Acanthamoeba* wykrywały również pełzaki z rodzaju *Hartmanella* lub *Naegleria.*

Na podstawie badań, stwierdziłam, że cztery z pięciu przebadanych par starterów (ACA 16S, AC 6/210, JDP, Nelson) mogą być zaledwie pomocne w identyfikacji pełzaków wolno żyjących, a tylko jedna z nich jest swoista dla rodzaju *Acanthamoeba*. Wykazałam, że dzięki zastosowaniu techniki PCR, z wykorzystaniem starterów Aca 16S, można w krótkim czasie wykryć i rozpoznać w badanym materiale obecność pojedynczych trofozoitów lub cyst pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*.

Terapia doświadczalna w akantamebozie

Akantameboza jest rzadką, ale bardzo trudną w leczeniu chorobą pasożytniczą. Jak już wcześniej wspomniałam w terapii akantamebozy stosuje się zazwyczaj leczenie kompleksowe z wykorzystaniem antybiotyków i środków dezynfekcyjnych. Są to często substancje silnie drażniące i toksyczne dla pacjenta. Z tych też powodów co raz częściej poszukuje się nowych leków, zwłaszcza co raz popularniejszych środków pochodzenia roślinnego. W terapii akantamebozy zbadano dotychczas możliwość zastosowania ekstraktów z *Buddleia cordata, Pterocaulon polystachyum, Arachis hypogaea, Curcuma longa, Pancratinum maritimum, Peucedanum caucasicum, P. palimbioides, P. chryseum, P. longibracteolatum, Pouzolzia indica, Teucrium polium, T. chamaedrys, Croton pallidulus, C. ericoides, C. isabelli* i innych. Większość ze zbadanych dotychczas roślin, to rośliny występujące w strefie tropikalnej lub subtropikalnej. W przypadku niektórych z nich stwierdzono obiecujące efekty terapeutyczne.

Zastosowanie fitoterapii w zwalczaniu chorób pasożytniczych, a szczególnie w terapii akantamebozy, to kolejny temat moich zainteresowań naukowych. Celem moich badań stało się znalezienie naszych rodzimych roślin, które podobnie jak już opisane rośliny tropikalne mogłyby znaleźć zastosowania w leczeniu akantamebozy. Efektem moich badań jest cykl prac dotyczących terapii doświadczalnej. W/w prace to „Plant extracts as natural amoebicidal agents", "The evaluation of the amebicidal activity of *Eryngium planum* extracts", "*Tanacetum vulgare* L. jako roślina o potencjalnych właściwościach leczniczych w *Acanthamoeba* keratitis", „Abietane diterpenoids from *Salvia sclarea* transformed roots as growth inhibitors of pathogenic *Acanthamoeba* spp." oraz „*Artemisia annua* L. as a plant with potential use in the treatment of acanthamoebiasis".

Publikacja 4

Celem pracy **„Plant extracts as natural amoebicidal agents"** było zbadanie pełzakobójczego lub pełzakostatycznego działania ekstraktów roślinnych uzyskanych z *Solidago virgaurea* L. (nawłoć pospolita), *Solidago graminifolia* L. (nawłoć wąskolistna), *Pueraia lobata* (Wild.) (ołownik łatkowaty) oraz *Rubus chamaemorus* L.(malina moroszka). Badania opisane w powyższej publikacji przeprowadziłam we współpracy z Katedrą i Zakładem Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Materiałem roślinnym stosowanym do sporządzenia ekstraktów były nadziemne części roślin wraz z kwiatami z *S. virgaurea* i *S. graminifolia*, korzenie z *P. lobata* oraz liście z *R. chamaemorus*.

Badane ekstrakty roślinne były analizowane fitochemicznie na obecność flawonoidów w *S. virgaurea* i *S. graminifolia*, kwasu elagowego w *R. chamaemorus* i izoflawonów w *P. lobata*. Badania fitochemiczne wyciągów przeprowadzano metodami chromatografii kolumnowej, chromatografii cienkowarstwowej preparatywnej i HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa).

Materiałem badanym były również czyste substancje chemiczne pochodzenia roślinnego, takie jak kwas ellagowy (Fluka), którego jednym ze źródeł są liście *R. chamaemorus* i pueraryna (Sigma), główny z izoflawonów obecnych w *P. lobata*.

Dodatkowo przebadałam frakcje chloroformowe i eterowe metanolowego wyciągu z kwiatów i liści *Solidago graminifolia*. We frakcjach tych wykazano obecność szeregu lipofilnych flawonoidów. Z wybranej do dalszych badań frakcji chloroformowej z kwiatostanów, w wyniku chromatografii kolumnowej i chromatografii cienkowarstwowej preparatywnej wyodrębniono najbardziej lipofilny flawonoid. Na podstawie analizy spektralnej w nadfiolecie (UV) wysunęłam wniosek, że związek ten jest pochodną flawonu lub flawonolu. Dalsze badania wyodrębnionych flawonoidów polegały na ich oczyszczeniu na kolumnach z zastosowaniem celulozy, poliamidu i Sephadexu LH20. Otrzymaną mieszaninę lipofilnych flawonoidów rozdzielono metodą chromatografii preparatywnej na poliamidzie na 10 związków, które ostatecznie oczyszczono na Sephadexie LH-20. Trzy związki spośród najbardziej lipofilnych składników zidentyfikowano przy pomocy metod spektralnych i spektroskopii UV. Zidentyfikowano następujące substancje: 5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tetrametoxyflawon; 5,7-dihydroxy-6,3',4'-trimetoxyflawon oraz 5,7,4'-trihydroxy-6,8,3',5'-tetrametoxyflawon.

Głównym związkiem fenolowym występującym w ekstraktach z liści gatunku *Rubus chamaemorus* L. jest kwas elagowy, który jest prawdopodobnie odpowiedzialny za działanie ekstraktu. Metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oznaczono ilość wolnego i całkowitego (uwolnionego przez hydrolizę) kwasu elagowego w *R. chamaemorus*. Ponadto metodę chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono w ekstraktach obecność kwasu galusowego i małe ilości flawonów.

W ekstrakcie z liści *Pueraria lobata*, głównymi metabolitami są związki należące do grupy izoflawonów: daidzeina, genisteina i formononetyna. W młodych korzeniach *P. lobata*,

metodą chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono także obecność izoflawonu – pueraryny.

Wpływ substancji leczniczych uzyskanych z roślin testowałam *in vitro* na szczepie 309 *Acanthamoeba castellanii* (patogeniczny dla myszy, izolowany ze środowiska; Kasprzak i Mazur 1972), oraz szczepie „Ograbek" *Acanthamoeba* sp. (patogenicznym dla człowieka, izolowanym z przypadku *Acanthamoeba* keratitis – szczep własny nieopisany).

Szczepy wzrastały aksenicznie na podłożu płynnym opisanym przez Červę (1969). Do aksenicznej hodowli pełzaków ($5x10^4$ komórek/ml) dodawałam ekstrakty roślinne w stężeniach od 0,01 mg/ml do 1,5 mg/ml. Przyrost liczby pełzaków badałam w odstępach 24 godzinnych, stosując komorę Thoma. Kontrolę stanowiła hodowla pełzaków bez środków leczniczych. Przeprowadziłam również badania wpływu ekstraktów roślinnych na przebieg zarażenia u zwierząt. Zarażonym myszom codziennie przez 3 dni podawałam dootrzewnowo sterylnie przygotowane roztwory ekstraktów roślinnych w stężeniach od 0,1 do 0,5 mg suchego ekstraktu na 1 g wagi myszy.

Następnie wyznaczyłam współczynnik IC_{50} (najniższe stężenie badanej substancji, które hamuje wzrost pełzaków w 50%), LD_{50} (dawka powodująca zgon 50% populacji myszy), ED_{50} (dawka przy której 50% badanych osobników wykazuje oczekiwany efekt terapeutyczny) oraz TI (indeks terapeutyczny - stosunek dawki leku wywołującej objawy toksyczne do dawki wywołującej efekt terapeutyczny).

Przeprowadzone przeze mnie badania po raz pierwszy wykazały, że ekstrakty z *Solidago virgaurea, Solidago graminifolia, Pueraia lobata* oraz *Rubus chamaemorus* wykazują działanie pełzakobójcze zarówno w warunkach *in vitro,* jak również w warunkach *in vivo.* Ekstrakty z *S. virgaurea* i *P. lobata* oraz substancje czyste, takie jak kwas ellagowy i pueraryna mają właściwości pełzakobójcze w warunkach *in vitro* już w stężeniach poniżej 0,01 mg/ml, natomiast ekstrakty z *S. graminifolia* oraz *R. chamaemorus* w stężeniu ok. 0,05 mg.ml.

Najwyższy indeks terapeutyczny TI stwierdzono w przypadku ekstraktów z *R. chamaemors* i wynosi on 20; dla *S. virgaurea* indeks terapeutyczny wynosi 7,5.

Badania wykazały, że preparaty lecznicze przygotowane z przebadanych przeze mnie ekstraktów mogłyby być stosowane w kombinowanej terapii z antybiotykami. W przypadkach zarażenia ludzi *Acanthamoeba* spp., kombinowana terapia w połączeniu z antybiotykami będzie bardziej skuteczna niż terapia samym, pojedynczym lekiem.

Wykorzystanie właściwości pełzakobójczych zbadanych przeze mnie ekstraktów może być bardzo istotne ze względu na fakt iż wiele stosowanych obecnie leków posiada właściwości pełzakostatyczne, lecz nie posiada właściwości pełzakobójczych.

Publikacja 5

Tanacetum vulgare L. (wrotycz pospolity) to roślina należący do rodziny astrowatych. Występuje w całej Europie i na obszarach Azji o umiarkowanym klimacie, a co ważniejsze jest gatunkiem bardzo pospolitym w Polsce. Jest to roślina od dawna stosowana w medycynie ludowej, ale **po raz pierwszy podjęłam próbę wykorzystania jej w terapii akantamebozy**. Wyniki moich badań opisałam w pracy **"*Tanacetum vulgare* L. jako roślina o potencjalnych właściwościach leczniczych w *Acanthamoeba* keratitis"**.

Wykazałam, że ekstrakty uzyskane z *Tanacetum vulgare* wykazują silne działanie pełzakostatyczne. Surowcem leczniczym są części nadziemne rośliny – ziele i kwiaty. Ziele wrotyczu zawiera do 0.6% olejku lotnego, a kwiaty od 1 do 1,5%. Głównym składnikiem olejku jest toksyczny β-tujon (około 70%), kamfora, borneol, α-pinen, 1,8-cyneol, sabinen. Pozostałe składniki to terpenoidy, steroidy oraz flawonoidy, pochodne kwercetyny i luteoliny oraz akacetyna, kwas kawowy, garbniki, kwas askorbinowy i sole mineralne. Lecznicze działanie tej rośliny związane jest przede wszystkim z obecnością β- tujonu oraz laktonów seskwiterpenowych. Badania wykazały, że ekstrakty sporządzone już z około 25 mg suchej masy rośliny na 1 ml roztworu, wykazują silne właściwości terapeutyczne przeciw pełzakom *Acanthamoeba* spp. Niestety badania przeprowadzone na myszach wykazały, że substancje te działają toksyczne nie tylko na pełzaki, ale i na zwierzęta. Ze względu na potencjalnie silne właściwości toksyczne wrotyczu, preparaty uzyskane z tej rośliny prawdopodobnie będzie można stosować tylko zewnętrznie np. w AK.

Publikacja 6

Efektem moich dalszych badań jest praca **"The evaluation of the amebicidal activity of *Eryngium planum* extracts".** Badania opisane w powyższej publikacji przeprowadziłam we współpracy z Katedrą i Zakładem Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, z Zakładem Biochemii i Jakości Plonów IUNG w Puławach oraz z Laboratorium Kontroli Jakości w Phytopharm Klęka S.A.

Celem badań było zbadanie pełzakobójczego i pełzakostatycznego działania ekstraktów etanolowych otrzymanych z liści odziomkowych i korzeni *Eryngium planum* L. (mikołajek płaskolistny). Rośliny zostały zebrane z naturalnego stanowiska, na Kujawach.

Wykonano analizę fitochemiczną ekstraktów przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej TLC oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Następnie w wyniku rozdziału ekstraktów metodą chromatografii kolumnowej otrzymano szereg frakcji. W badaniach wykorzystałam sześć frakcji tj.: flawonoidową, flawonoidowo-saponinową, saponinową oraz kwasów fenolowych uzyskane z liści oraz saponinową i kwasów fenolowych z korzeni.

Na podstawie chromatogramów HPLC oraz profili MS stwierdzono, że frakcje saponinowe otrzymane z etanolowych ekstraktów z liści i korzenia *E. planum* zawierały saponiny triterpenowe. Natomiast frakcja kwasów fenolowych z liści i korzeni zawierała głównie: kwas rozmarynowy, kwas chlorogenowy, kwas kawowy oraz heksozyd kwasu rozmarynowego.

Działanie pozyskanych frakcji testowałam w warunkach *in vitro* na patogenicznym szczepie *Acanthamoeba castellanii* 309 (Kasprzak i Mazur 1972). Pełzaki pochodziły z hodowli aksenicznej na podłożu płynnym Červy (Červa 1969). Przyrost liczby pełzaków badałam w odstępach 24 godzinnych, stosując komorę Thoma.

Przeprowadzone przeze mnie badania działania pełzakobójczego oraz pełzakostatycznego wybranych frakcji z *E. planum* wykazały, że zarówno frakcje saponinowe, jak i frakcje kwasów fenolowych pozyskane z liści i korzeni działają pełzakostatycznie na pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba.* Najefektywniejsze działanie stwierdziłam w zakresie stężeń od 1mg/ml do 5 mg/ml hodowli pełzaków. Najwyższy spadek liczby trofozoitów obserwowano po podaniu frakcji saponinowej z liści w stężeniu 1 mg/ml. **Stwierdziłam, że zarówno frakcje saponinowe, jak i frakcje kwasów fenolowych mogłyby znaleźć zastosowanie w fitoterapii akantamebozy. Pozostałe frakcje (flawonoidowo-saponinowa i flawonoidowa) są nieprzydatne w terapii akantamebozy.** Frakcja flawonoidowo-saponinowa hamuje wzrost trofozoitów już w stężeniu 2 mg/ml, ale równocześnie indukuje encystację pełzaków. Natomiast frakcja flawonoidowa z liści *E. planum* pobudza pełzaki do wzrostu.

Publikacja 7

Dzięki współpracy z panią prof. dr hab. Haliną Wysokińską i dr n. farm. Łukaszem Kuźmą z Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi powstała kolejna moja publikacja pt.**: „Abietane diterpenoids from *Salvia sclarea* transformed roots as growth inhibitors of pathogenic *Acanthamoeba* spp.”.**

Celem badań opisanych w tej pracy było zbadanie pełzakobójczego i pełzakostatycznego działania diterpenów wyizolowanych z *Salvia sclarea* (szałwia muszkatałowa). W badaniach wykorzystaliśmy cztery diterpeny: salvipison, aethiopinon, 1 xoethiopinon i ferruginol. Substancje te uzyskano z kultur korzeni transgenicznych (włośnikowych) transformowanych genetycznie przy pomocy *Agrobacterium rhizogenes*. Do ich identyfikacji oraz oczyszczenia zastosowano cienkowarstwową chromatografię cieczową (TLC).

Działanie diterpenów testowałam w warunkach *in vitro* na patogenicznym szczepie *Acanthamoeba*. Pełzaki podobnie jak w innych eksperymentach hodowałam w płynnych kulturach aksenicznych.

Wykazałam, że ferruginol wykazuje aktywność pełzakostatyczną już w stężeniach 0,01 - 0,5 mg/ml, natomiast salvipison i aethiopinon wykazują podobne działanie dopiero w stężeniach 1 - 5 mg/ml. W najwyższych stężeniach uzyskałam zahamowanie wzrostu pełzaków nawet do 97%. Najsłabsze działanie stwierdziłam w przypadku zastosowania 1 oxoethiopinonu, który wykazywał bardzo słabe działanie pełzakostatyczne.

Publikacja 8

Kolejną rośliną, która wzbudziła moje zainteresowanie jest *Artemisia annua* L. (bylica roczna). Działanie tej rośliny opisałam w pracy **„*Artemisia annua* L. as a plant with potential use in the treatment of acanthamoebiasis”**.

A. annua jest jednoroczną rośliną, która występuje dziko w Azji oraz Europie południowej. Została ona również zawleczona do Polski, Danii, Holandii, Francji, Włoch, Lichtensteinu oraz Austrii.

A. annua uważana jest za roślinę leczniczą, ale w literaturze zielarskiej wymienia się ją sporadycznie (Wąsowicz 2004). Dotychczas za najważniejsze uznawano wykorzystanie jej właściwości leczniczych w malarii (De Donno et al. 2012; Ho et al. 2013). Roślina działa również na niektóre płazińce, grzyby, bakterie oraz wirusy.

Celem moich badań było zbadanie, czy wykazuje ona działanie pełzakobójcze i/lub pełzakostatyczne.

W badaniach wykorzystałam ekstrakty metanolowe i chloroformowe z części nadziemnych rośliny, napar z rozdrobnionego materiału roślinnego, suchy ekstrakt z *A. annua* 10:1 produkcji Chińskiej (Magiczny Ogród, Poland) rozpuszczany na gorąco w wodzie destylowanej oraz czystą artemizyninę (firmy Sigma Chemical Company).

Badania przeprowadziłam w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Do badań wykorzystałam szczep 309 *Acanthamoeba castellanii* - patogenicznym dla myszy, izolowanym ze środowiska (Kasprzak and Mazur 1972), oraz szczepie Ac32 *Acanthamoeba* sp. - patogenicznym dla człowieka, izolowanym z przypadku *Acanthamoeba* keratitis, genotyp T4 (numer akcesyjny KP184479). Pełzaki hodowałam w płynnych kulturach aksenicznych oraz na podłożu stałym NN (non-nutrient agar). Badania wpływu ekstraktów z *Artemisia annua* na przebieg zarażenia pełzakami testowałam na myszach szczepu BALB/c.

Moje badania wskazały, że zarówno ekstrakty wodne, alkoholowe, chloroformowe z ziela *A. annum* L. oraz czystej artemizyniny działają pełzakobójczo i pełzakostatycznie. Użycie niskich stężeń preparatów (już ok. 5 mg/ml) powodowało zahamowanie wzrostu pełzaków, a ponadto powiększenie objętości pełzaków i ich silną wakuolizację. Pełzaki zwakuolizowane nie przekształcały się w cysty, a po kilku dniach ulegały rozpadowi.

W przypadku zwierząt doświadczalnie zarażonych pełzakami z rodzaju *Acanthamoeba*, stosowanie ww. preparatów znacznie wydłuża przeżywalność zarażonych zwierząt.

Uzyskane wyniki są najlepsze ze wszystkich dotychczas badanych substancji roślinnych.

Podsumowanie

Moje osiągnięcia naukowe dotyczą przede wszystkim opracowania nowej metody diagnostycznej pozwalającą na wykrywanie pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. Metodą tą można wykrywać cysty *Acanthamoeba* spp. w materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów oraz w próbach środowiskowych. Opracowałam kilka wariantów tej metody. Dzięki zaprojektowaniu różnych koniugatów umożliwiłam wykrywanie celulozy w ścianie cyst *Acanthamoeba* w świetle widzialnym oraz UV.

Ponadto porównałam efektywność działania najpopularniejszych par starterów opisanych w literaturze do identyfikacji techniką PCR pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. Dzięki temu znalazłam parę starterów, która jest najbardziej swoista do wykrywania *Acanthamoeba* i pozwala na rozróżnienie szczepów *Acanthamoeba* od innych pełzaków wolno żyjących.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach po raz pierwszy zajęłam się możliwością wykorzystania rodzimych roślin w fitoterapii akantamebozy. Zbadałam działanie ekstraktów

roślinnych z kilku bardzo popularnych w Polsce roślin tj. *Solidago virgaurea* L. (nawłoć pospolita), *Solidago graminifolia* L. (nawłoć wąskolistna), *Pueraia lobata* (Wild.)(ołownik łatkowaty), *Rubus chamaemorus* L.(malina moroszka)., *Tanacetum vulgare* L. (wrotycz pospolity), *Eryngium planum* L. (mikołajek płaskolistny), *Artemisia annua* L. (bylica roczna), jak również wielu substancji z nich pozyskanych. Badania te mogą pomóc w znalezieniu nowych leków, które będą skuteczne w terapii akantamebozy i jednocześnie nie będą wywoływały reakcji niepożądanych dla pacjenta.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Podczas mojej wieloletniej pracy w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej uczestniczyłam i nadal uczestniczę w licznych pracach badawczych.

W dotychczasowej mojej działalności naukowej można wyróżnić kilka głównych kierunków badań. Przede wszystkim równolegle z badaniami opisanymi w cyklu habilitacyjnym od 20 lat prowadzę badania, których obiektem jest nicień *Trichinella spiralis*. Prowadzone przeze mnie badania dotyczą:

- **biochemicznych mechanizmów obronnych zachodzących w układzie pasożyt-żywiciel w przebiegu doświadczalnej trichinellozy;**
- **udziału antyoksydantów enzymatycznych i nieenzymatycznych w mechanizmach obronnych żywiciela;**
- **roli tlenku azotu w procesach obronnych żywiciela w przebiegu doświadczalnej włośnicy;**
- **udziału transferazy-S-glutationowej w procesach detoksykacyjnych;**
- **roli receptorów toll-podobnych w odpowiedzi żywiciela na inwazje pasożytnicze**.

Wyniki badań dotyczących mechanizmów obronnych zostały zawarte w 12 pracach oryginalnych, których jestem współautorem. Biochemiczne mechanizmy obronne żywiciela były przez nas badane w fazie jelitowej i mięśniowej włośnicy. W przeprowadzonych badaniach stwierdziliśmy wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich, jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa i transferaza glutationowa oraz wzrostu poziomu antyoksydantów nieenzymatycznych (TAS – całkowitego stężenia antyoksydantów). Aktywność wzrastała zarówno w mięśniach szkieletowych, jak i we krwi myszy zarażonych *T. spiralis*. Zaobserwowany przez nas wzrost aktywności badanych enzymów oraz TAS świadczy o udziale tych antyoksydantów w biochemicznych mechanizmach obronnych

żywiciela powiązanych z wolnymi rodnikami tlenowymi (Derda i Hadaś, 2000; Derda i wsp. 2004).

Równolegle badałam wpływ różnych grup leków stosowanych w leczeniu włośnicy na poziom antyoksydantów w tkankach żywiciela. Badanymi lekami były: metyloprednizolon - lek z grupy glikokortykoidów o przedłużonym działaniu przeciwzapalnym, lewamizol – lek immunomodulujący oraz albendazol - anthelmintyk z grupy benzimidazoli. W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że metyloprednizolon normalizował podwyższoną aktywność peroksydazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej w tkance żywiciela w fazie mięśniowej włośnicy. Natomiast albendazol wyraźnie indukował aktywność transferazy glutationowej w mięśniach myszy zarażonych *T. spiralis* (Boczoń i wsp. 1996; Wandurska-Nowak i wsp. 1998).

Należy podkreślić nowatorski charakter tych badań. Aktualnie rozważa się bowiem koncepcję wielofunkcyjnego mechanizmu działania anthelmintyków, w tym również benzimidazoli. Obecnie uważa się, że cechą charakterystyczną wielu leków przeciwpasożytniczych jest wielokierunkowość ich działania. Poza tym, prawdopodobnie skuteczność terapii anthelmintykami może być dodatkowo wzmocniona przez ich oddziaływanie na mechanizmy obronne żywiciela.

Badania udziału i roli wolnych rodników oraz antyoksydantów w biochemicznych mechanizmach obronnych żywiciela są nadal aktualnym kierunkiem badań. Mogą się one przyczynić do dokładniejszego wyjaśnienia patomechanizmu zaburzeń we włośnicy.

Celem dalszych badań, dotyczących biochemicznych mechanizmów obronnych powiązanych z wolnymi rodnikami, było określenie udziału wolnych rodników azotowych w procesach obronnych żywiciela. Przedmiotem naszych badań był udziału tlenku azotu (NO) i indukowalnej syntazy NO (iNOS) w procesach obronnych żywiciela w przebiegu doświadczalnej włośnicy u myszy. Od niedawna wiadomo, że tlenek azotu jest wszechstronnym regulatorem wielu procesów zachodzących w żywych organizmach, a najważniejszą funkcją NO syntetyzowanego przez iNOS jest udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, stymulowanej przez limfocyty Th1. Podjęta przez nas tematyka badawcza z pogranicza biochemii i immunologii dotyczy mechanizmów zmian patologicznych w tkankach żywiciela, wywołanych obecnością pasożyta. W tkankach myszy zarażonych *T. spiralis* stwierdzono podwyższony poziom tlenku azotu, co świadczy o udziale NO produkowanego przez iNOS w biochemicznych procesach obronnych żywiciela. Podanie zarażonym zwierzętom albendazolu wywołało dodatkową stymulację poziomu NO w tkankach żywiciela, co wskazuje, że ten lek może również poza bezpośrednią aktywnością

przeciwpasożytniczą przyczyniać się do intensyfikacji biochemicznych procesów obronnych żywiciela (Wandurska-Nowak i wsp. 2003). Sprawdziliśmy również jaki efekt może wywołać podawanie endogennego NO w trakcie inwazji pasożytniczej. Podawaliśmy zarażonym zwierzętom leki biorące udział w uwalnianiu egzogennego NO, takie jak: Nitrogliceryna, Izosorbid, Nitrendypina, Sildenafil oraz Pentaerythritol. Wykazaliśmy, że podawanie przez dłuższy czas w trakcie włośnicy dużych dawek egzogennego NO, w postaci niektórych powszechnie stosowanych leków uwalniających NO, przyczynia się do nasilenia intensywności zarażenia larwami włośnia (Hadaś i wsp. 2002).

W ostatnich latach brałam również udział w badaniach roli transferaz-S-glutationowych (GST) w mechanizmach obronnych. Transferazy –S-glutationowe to grupa wielofunkcyjnych enzymów, które odgrywają kluczową rolę w detoksykacji komórek. W naszych badaniach zajmowaliśmy się udziałem GST w biochemicznej obronie przed zarażeniem *Trichinella spiralis.* Jednym z naszych celów było zbadanie wpływu inwazji *T. spiralis* na całkowitą aktywność GST oraz zbadanie właściwości kinetycznych cytozolowej GST w jelicie oraz w mięśniach szkieletowych myszy. Badaliśmy kinetykę reakcji enzymatycznych zachodzących w przebiegu fazy jelitowej i mięśniowej włośnicy. Stworzyliśmy wykres Lineweavera–Burka, a następnie wyznaczyliśmy stałą Michaelisa (Km) dla przebiegu reakcji enzymatycznej. Przedstawiał on kinetykę GST nasycenia substratu w jelitach i mięśniach myszy zarażonych *T. spiralis*. Substratem w tej reakcji była Zredukowana forma glutationu GSH. Wyniki nasze wykazały statystycznie znamienny wzrost aktywności całkowitej GST w jelicie cienkim i grubym u myszy. Ponadto stwierdziliśmy, że inwazja *Trichinella* wywołuje w jelicie cienkim 12-krotny spadek wartości Km w niskim stężeniu substratu i sześciokrotny wzrost wartości w wysokim zakresie Km. W jelicie grubym inwazja wywołuje jedynie pięciokrotny spadek wartości Km w niskich stężeniach substratu, podczas gdy wartość Km w wysokich stężeniach substratu , pozostaje bez zmian. Wyniki te sugerują że GST z jelita cienkiego myszy może uczestniczyć w usuwaniu produktów wydalniczo-wydzielniczych pasożyta do jelita żywiciela podczas włośnicy. Wyniki badań sugerują, że obecność pasożyta i prawdopodobnie jego produktów wydalniczo-wydzielniczych w jelicie zarażonej myszy, silnie stymuluje całkowitą aktywność GST. Jednocześnie modyfikuje to kinetyka tego enzymu zmieniając jego właściwości katalityczne (Wojtkowiak-Giera i wsp. 2011). Dokonaliśmy również oceny wpływu albendazolu na kinetykę cytozolowej GST w mięśniach szkieletowych. Uzyskane przez nas wyniki wykazały w trzecim tygodniu po zarażeniu, 2,3- krotny wzrost Km w wysokich stężeniach substratu oraz ponad 2,8-krotny spadek Km w niskich stężeniach substratu.

W szóstym tygodniu po zarażeniu Km w wysokich stężeniach substratu nie uległo zmianie, natomiast w niskich stężeniach wzrosło 2,3-krotnie. Ponadto wyniki naszych badań wskazują na dodatkowe zmiany w kinetyce nasycenia substratu GST w mięśniach myszy zarażonych *T. spiralis* i leczonych albendazolem (Wojtkowiak-Giera i wsp. 2007). Badaliśmy również wpływ albendazolu na cytoplazmatyczną transferazę-S-glutationową oraz zmiany aktywności GST przed i po leczeniu lewamizolem. Po leczeniu albendazolem stwierdzono dwukrotną stymulację GST w mięśniach, w drugim tygodniu od zarażenia oraz w fazie mięśniowej (6-7 tydzień). Podczas leczenia lewamizolem szczyt stymulacji GST przypadał na 2 i 4 tpz. Żaden z leków nie wywoła zmian aktywności GST w surowicy. Wynik te sugerują, że oba leki zwiększają całkowitą aktywność GST biorącej udział w biochemicznych mechanizmach obronnych z wolnymi rodnikami tlenowymi (Derda i wsp. 2003). Zbadaliśmy również wpływ albendazolu na transferazę glutationową w jelitach. Uzyskane wyniki wykazały statystycznie znamienny spadek aktywności całkowitej GST w jelicie cienkim i grubym myszy zarażonych *T. spiralis* i leczonych albemdazolem, w porównaniu z myszami nieleczonymi. Ponadto stwierdziliśmy, że podawanie albendazolu modyfikuje kinetykę nasycenia substratem GST w jelitach, ponieważ lek zmienia wartości stałej Michaelisa tego enzymu. Na podstawie naszych badań możemy przypuszczać, że albendazol wpływa na całkowitą aktywność i kinetykę GST. Prawdopodobnie powoduje on również zmiany w czwartorzędowa strukturze tego enzymu. Doszliśmy do wniosku, że skoro GST bierze udział w biochemicznej obronie żywiciela, może to mieć dodatkowy wpływ na mechanizmy obronne żywiciela (Wojtkowiak-Giera i wsp. 2012)

Jak już wcześniej wspominałam dwa główne modele badawcze, którymi zajmuję się równolegle od wielu lat to nicień *Trichinella spiralis* oraz pełzaki wolno żyjące z wyszczególnieniem pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. W kręgu moich zainteresowań znalazła się nie tylko diagnostyka i terapia akantamebozy, ale również biologia, epidemiologia, jak również rola pełzaków wolno żyjących w transporcie innych patogenów.

- Stąd też kolejne moje badania dotyczyły **pełzaków jako przenosicieli patogenicznych bakterii.**

Mechanizm wywoływania zmian chorobotwórczych przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* nie jest do końca poznany. Wiadomo, że może być on związany z odżywianiem się pełzaka tkanką żywiciela. Jednakże coraz częściej bierze się pod uwagę rolę pełzaków jako przenosicieli chorobotwórczych bakterii. Pełzaki w naturalnym środowisku w znacznym stopniu ograniczają liczebność populacji bakterii, ale mogą też

ułatwiać przeżywalność chorobotwórczych dla człowieka szczepów, stanowiąc ich naturalny rezerwuar.

Żyjące w środowisku naturalnym bakterie stanowią główne źródło pokarmu dla pełzaków. Jednakże istnieją gatunki bakterii, którym udało się rozwinąć mechanizmy ochronne przed sfagocytowaniem, lub mechanizmy blokujące procesy zabijania i trawienia po wchłonięciu przez komórkę pierwotniaka. I tak niektóre populacje bakterii potrafią wykorzystać dostęp do bogatego i bezpiecznego wewnątrzkomórkowego środowiska dla własnej reprodukcji lub ochrony przed skutkami oddziaływań szkodliwych czynników środowiska zewnętrznego. W takich przypadkach, po wchłonięciu przez pierwotniaka bakterie hamują fuzję fagocytosomu z lizosomami uniemożliwiając rozpoczęcie procesu wewnątrzkomórkowego trawienia. Bakterie namnażają się w wodniczkach pokarmowych. Końcowym etapem infekcji jest liza komórki gospodarza, prowadząca do uwolnienia nowych generacji bakterii. W niektórych przypadkach (*Listeria monocytogenes*) obserwujemy jednak inny model zakażenia komórki pierwotniaka. Bezpośrednio po wchłonięciu bakteria uwalnia się z fagocytarnej wakuoli i przenika do cytoplazmy, w której mnoży się aż do spowodowania lizy komórki gospodarza (Ly i wsp. 1990). Znane są także gatunki mnożące się bez wywołania lizy (*Vibrio cholerae*) oraz gatunki przeżywające bez możliwości wewnątrzkomórkowych podziałów (Thom i wsp. 1992).

Bakterie, które uwalniają się z komórki pierwotniaka mogą ponownie zakażać inne pełzaki, lub dostawać się do organizmu człowieka np. podczas wdychania aerozoli zawierających ich infekcyjne formy. Inną drogą transmisji mogą być uwalniane przez pełzaki, zwłaszcza przez gatunki z rodzaju *Acanthamoeba* pęcherzyki, zawierające duże ilości bakterii, które mogą działać jak cząsteczki zakaźne. Ale niebezpieczne mogą już same pełzaki wypełnione bakteriami, których wdychanie może być jedną z dróg zakażenia bakteriami.

Szczególną ochronę zapewniają bakteriom pierwotniaki wytwarzające, charakterystyczne dla danego gatunku, formy przetrwalnikowe. Zdolność do okresowego przebywania bakterii w ich wnętrzu umożliwia ponadto kolonizację nowych, często odległych terenów w wyniku wędrówki cyst z wiatrem lub wodą.

Przetrwanie radykalnej zmiany otoczenia, którą przechodzą bytujące w komórkach pierwotniaków bakterie, wymaga posiadania sprawnych mechanizmów adaptacyjnych, które oparte są one w dużej mierze na regulacji ekspresji genów. Wykorzystanie przez pasożytnicze drobnoustroje tej samej strategii w nowych warunkach, tj. podczas inwazji komórek kręgowca, pozwala na uniknięcie ataku nieswoistych i swoistych mechanizmów obronnych

organizmu, zapewnia dostęp do nowego, bogatego w czynniki odżywcze środowiska, a często ułatwia rozprzestrzenianie się chorobotwórczych bakterii w organizmie zakażonego osobnika.

Na możliwość wykorzystania pierwotniaków jako rezerwuarów chorobotwórczych dla człowieka gatunków bakterii zwróciły uwagę zainicjowane w latach 70-tych badania nad biologią *Legionella pneumophila*, jako etiologicznego czynnika nieznanej wcześniej choroby legionistów. Od tego czasu poznano wiele innych wewnątrzkomórkowych bakteryjnych patogenów, które mogą atakować wolno żyjące pełzaki, włączając prątki z rodzaju *Mycobacterium*, przecinkowce cholery, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, bakterie z rodzaju *Chlamydia* i *Rickettsia*, *Burkholderia pseudomallei*, a także pałeczki *Salmonella*, Shigella, *Yersinia* i inne.

Celem naszych badań było znalezienie powiązań pomiędzy potencjalnie patogenicznymi pełzakami i przenoszonymi przez nie bakteriami, a możliwością wystąpienia zmian patogenicznych u człowieka.

Pełzaki wykorzystane do badań były wyizolowane z jezior oraz z ujęć wody wodociągowej na oddziałach chirurgii kilku poznańskich szpitali (sale pacjentów, sale opatrunkowe, punkty zabiegowe).

Pełzaki hodowano na podłożu stałym i płynnym. Wykonano ocenę inwazyjności i wirulencji na zwierzętach doświadczalnych.

Wykrywanie bakterii obecnych w wodzie, komórkach izolowanych pełzaków oraz w tkankach zwierząt doświadczalnych przeprowadzono za pomocą testów z przeciwciałami monoklonalnymi i metod mikrobiologicznych. Ponadto w przypadku podejrzenia istniejącego zakażenia bakteryjnego niektóre tkanki zwierząt doświadczalnych poddawane były analizie histopatologicznej.

Z większości prób wody pobranych z jezior i oddziałów chirurgii wyizolowano pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* i *Hartmannella*. Większość izolatów była inwazyjna i patogeniczna dla myszy. Z płuc i mózgów padłych zwierząt izolowano pełzaki. W przypadkach, gdy po zarażeniu pełzakami myszy padały, ale z ich tkanek nie dało się izolować pełzaków, analiza histopatologiczna wykazała zmiany w mózgach i płucach wskazujące na typowe zakażenie bakteryjne. Potwierdziły to badania bakteriologiczne tkanek, a także pełzaków. Ok. 50% izolatów zawierało wewnątrz komórek bakterie.

W izolowanych pełzakach stwierdzono obecność *Clostridium perfringens*, *Chryseomonas meningosept*, pojedyncze ziarniaki Gram (+) typu *Micrococcus* sp., *Morganella morgani*, *Proteus mirabilis* oraz *Proteus vulgaris*. Ponadto test z przeciwciałami

monoklonalnymi wykazał w pełzakach słabą reakcję pozytywną na obecność pałeczek *Legionella pneumophila*.

Obecność bakterii wewnątrz pełzaków wolno żyjących lub ewentualnie na ich powierzchni stanowi szczególne wyzwanie dla badania i kontroli czystości wód powierzchniowych, kąpielisk oraz ujęć wody pitnej. Istnieje bowiem możliwość powiązania występowania niektórych chorób człowieka z obecnością bakterii w pełzakach (Hadaś i wsp. 2001, 2002, 2003a,b).

Kontynuując tematykę pełzaków wolno żyjących, kolejnym tematem moich badań było:

- **Badanie prób środowiskowych na obecność pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*.**

Badania dotyczyły analizy prób środowiskowych na obecność patogenicznych pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*.

Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* dotychczas wykrywano w wodach z jezior, w basenach, a nawet w wodzie wodociągowej. Niektóre szczepy pełzaków stanowią poważne zagrożenie dla ludzi z nieprawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym, leczonych lekami immunosupresyjnymi , a także co raz częściej dla osób noszących soczewki kontaktowe. Dotychczas w literaturze nie ma wystarczających informacji na temat występowania pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* w Polsce. W ramach naszych badań po raz pierwszy w Polsce przebadaliśmy próby piasku oraz wodę z fontann.

Próby piasku pobierano z 13 piaskownic znajdujących się na placach zabaw dla dzieci na terenie miasta Poznania. Próby wody natomiast pochodziły z 9 poznańskich fontann iwodotrysków. Próby pobierano w okresie od maja do sierpnia, w latach 2012 - 2014. Wyizolowane z piasku pełzaki hodowano na podłożu NN, a następnie badano ich patogeniczności i wirulencję na zwierzętach doświadczalnych. Do badań wykorzystano 2-3 tygodniowe myszy szczepu BALB/c, którym podawano donosowo trofozoity pełzaków. Badania wykazały obecność pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* we wszystkich badanych piaskownicach. W 7 na 13 badanych piaskownic stwierdzono obecność patogenicznych pełzaków. Najbardziej zjadliwe pełzaki wyizolowano z piaskownicy przy jeziorze Malta. Powodowały one szybką śmierć myszy w ciągu 4-5 dni. Pozostałe izolaty wywoływały przewlekłe zarażenie myszy (Cholewiński i wsp. 2013).

Pełzaki występowały również w 6 z 9 badanych fontannach. Na podstawie badań biochemicznych oraz morfologiczno-mikroskopowych stwierdzono, że wyizolowane pełzaki podobnie jak w przypadku izolatów z piaskownic, należą do rodzaju *Acanthamoeba*. Badania pategoniczności i wirulencji przeprowadzone na zwierzętach doświadczalnych wykazały, że badane izolaty pełzaków nie wywołały śmierci zwierząt, stwierdzono natomiast u zwierząt

nadpobudliwość (zwięszona ruchliwość oraz bardzo gwałtowna reakcja na bodźce zewnętrzne). Wykonano posiew mózgu i płuc badanych myszy. W przypadku 1 izolatu stwierdzono trofozoity pełzaków w mózgu i płucach, w przypadku pozostałych 5 izolatów stwierdzono obecność pełzaków w mózgach myszy (Derda i wsp. 2013).

Aktualnie prowadzę badania, których tematem jest:

- **Genotypowanie izolatów pełzaków pochodzących z prób środowiskowych.**

  Badania prowadzone są we współpracy z Katedrą Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.
- **Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* jako przenosiciele patogenicznych bakterii.**
- **Określenie udziału receptorów Toll-podobnych w mechanizmach obronnych żywiciela w przebiegu doświadczalnej akantamebozy.**

  Badania prowadzone są we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii i Parazytologii Medycznej oraz Katedrą i Zakładem Histologii i Embriologii, Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
- **Zastosowania fitoterapii w inwazjach pasożytniczych wywołanych przez nicienie.**

  Badania prowadzone są we współpracy z Katedrą i Zakładem Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Podsumowanie działalności naukowej

Podsumowując, jestem autorem 88 publikacji o łącznym **IF=29.385** i **485 punktach MNiSW.** Wśród wymienionych prac są **33** prace oryginalne, **7** prac przeglądowych, **1** podręcznik akademicki i **43** streszczenia zjazdowe.

Liczba cytowani moich prac według Web of Sciences wynosi **120**.

Index Hirscha wynosi **7**.

Za moją działalność naukową otrzymałam **6 nagród** zespołowych Rektora Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki zostały szczegółowo opisane **w załączniku 3.**

Piśmiennictwo:

Cholewiński M., Hadaś E., Derda M., Wojt W.J, Skrzypczak Ł. Występowanie patogenicznych pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba* w piaskownicach miejskich. Nowiny Lekarskie, 82, 138-141, 2013.

Červa L. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. Science 163: 576, 1969.

Boczoń K., Hadaś E., Wandurska-Nowak E., Derda M.: A stimulation of antioxidants in muscles of *Trichinella spiralis* infected rats. Acta Parasitologica 41, 136-138, 1996.

De Donno A., Grassi T., Idolo A., Guido M., Papadia P., Caccioppola A., Villanova L., Merendino A., Bagordo F., Fanizzi F.P. First-time comparison of the in vitro antimalarial activity of *Artemisia annua* herbal tea and artemisinin. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 106, 696-700, 2012.

Derda M., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Wojt W. Changes in the activity of glutathione-S-transferase in muscles and sera from mice infected with *Trichinella spiralis* after treatment with albendazole and levamisole. Parasitology Research, 89, 509-512, 2003.

Derda M., Hadaś E. Antioxidants and proteolytic enzymes in experimental trichinellosis. Acta Parasitologica, 45, 71-76, 2000.

Derda M., Hadaś E., Antczak E., Wojt W.J. Incidence of *Entamoeba gingivalis* in the oral cavity of students. Journal of Stomatology, 64, 784-795, 2011.

Derda M., Hadaś E., Thiem B., Sułek A. Natural products as amebicidal drug against Acanthamoeba spp. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 61, 24-26, 2004.

Derda M., Hadaś E., Wojtkowiak-Giera A., Wojt W.J., Cholewiński M., Skrzypczak Ł. Występowanie pełzaków pierwotnie wolno żyjących w fontannach. Problemy Higieny i Epidemiologii, 94, 147-150, 2013.

Derda M., Wandurska-Nowak E., Boczoń K. Glutathione-S-transferase activity in mouse muscle during experimental trichinellosis. Wiadomości Parazytologiczne, 42, 227-232, 2001.

Derda M., Wandurska-Nowak E., Hadaś E. Changes in the level of the antioxidant in the blood from mice infected with *Trichinella spiralis*. Parasitology Research, 93, 207-210, 2004.

Fowler M., Carter R.F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. British Medical Journal, 2, 740-742, 1965.

Hadaś E., Derda M. Free-living amoebae as carriers of pathogenic bacteria. IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae, Proceedings, 158, 2001.

Hadaś E., Derda M. Termiczne odkażanie w celu zapobieżenia nawracającym inwazjom *Enterobius vermicularis*. Problemy Higieny i Epidemiologii, 95, 643-645, 2014.

Hadaś E., Derda M., Boczoń K., Wandurska-Nowak E. Biochemical investigations of the dynamics of proteinase activity at different stages of trichinellosis in mice. Wiadomości Parazytologiczne, 40, 329-335, 1994.

Hadaś E., Derda M., Sułek A., Wojt W. Free-living amoebae as potential pathogenic organisms to man and carriers of pathogenic bacteria. Xth International Congress of Parasitology, Vancouver, Canada, 194, 2002.

Hadaś E., Derda M., Sułek A. *Acanthamoeba spp.* as vector of pathogenic bacteria. XV Wrocławska Konferencja Parazytologiczna "Parazytologia w ochronie środowiska i zdrowia". Wrocław-Karpacz. Wiadomości Parazytologiczne, 49, 394-395, 2003a.

Hadaś E., Derda M., Wandurska-Nowak E. Effect of exogenous nitric oxide in experimental trichinellosis. Parasitology Research, 88, 86-88, 2002.

Hadaś E., Derda M., Winiecka-Krusnell J., Sułek A. *Acanthamoeba* spp. as vehicles of pathogenic bacteria. Acta Parasitologica, 49, 276-280, 2004.

Hadaś E., Derda M., Winiecka-Krusnell J., Sułek A. Amoebae of genus *Acanthamoeba* as vector of pathogenic bacteria. Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae. October 5-10, 2003b, Cd. Obregon, Senora, Mexico. Proceedings. Eds.: F. Lares-Villa, G.C. Booton, F. Marciano-Cabral. s. 235-240 il. bibliogr. abstr.

Ho W.E., Peh H.Y., Chan T.K., Wong W.S. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. Pharmacology and Therapeutics, 142, 126-139, 2014.

Howe D.K., Vodkin M.H., Novak R.J., Visvesvara G., McLaughlin G.L. Identification of two genetic markers that distinquish pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. Parasitology Research, 83, 345–348, 1997.

Kasprzak W., Mazur T. Free-living amoeba isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznan, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie, 23, 391–398, 1972.

Lehmann O.J., Green S.M., Morlet N., Kilvington S., Keys M.F., Matheson M.M., Dart J.K.G., McGill J.I., Watt P.J. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial

and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba keratitis*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 39, 1261–1265, 1998.

Linder M., Winiecka-Krusnell J., Linder E. Use of recombinant cellulose binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. Applied and Environmental Microbiology 68, 2503-2508, 2002.

Ly T.M.C., Muller H.E. Interactions of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* and *Listeria innocula* with protozoans. Journal of General and Applied Microbiology, 36, 143-150, 1990.

MacLean R.C., Hafez N., Tripathi S., Childress C.G., Ghatak N.R., Marciano-Cabral F. Identification of Acanthamoeba sp. in paraffin-embedded CNS tissue from an HIV+ individual by PCR. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 57, 289–294, 2007.

Mathers W.D., Nelson S.E., Lane J.L., Wilson M.E., Allen R.C., Folberg R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba keratitis* using polymerase chain reaction analysis. Archives of Ophthalmology, 118, 178–183, 2000.

Pussard M., Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genere *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica, 13, 557–598,1977.

Shpigel E., Roiz L., Goren R., Shoseyov O. Bacterial cellulose-binding domain modulates in vitro elongation of different plant cells. Plant Physiology, 117, 1185-1194, 1998.

Thom S., Warhurst D., Drasar B.S.F. Association of *Vibrio cholera* with fresh water amoebae. Journal of Medical Microbiology, 36, 303-306, 1992.

Wandurska-Nowak E., Boczoń K., Derda M., Hadaś E., Matias-Guzek A. The effect of methylprednisolone on the dynamics of oxygen uptake and peroxidase and superoxide dismutase activities in skeletal muscles of mice infected with *Trichinella spiralis* larvae. Acta Parasitologica, 43, 54-56, 1998.

Wandurska-Nowak E., Hadaś E., Derda M., Wojt W. Effect of nitric oxide releasing drugs on the intensity of infection during experimental trichinellosis in mice. Parasitology Research, 90, 164-165, 2003.

Wang, H., Pevsner J. Detection of endogenous biotin in various tissues: novel functions in the hippocampus and implications for its use in avidin-biotin technology. Cell and Tissue Resarches, 296, 511–516, 1999.

Wąsowicz A. Occurrence of Artemisia annua L. in Wrocław city area (Lower Silesia, Poland). Acta Botanica Silesiaca, 1, 141–146, 2004.

Wojtkowiak A., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Derda M. Evaluation of effects of albendazole on the kinetics of cytosolic glutathione transferase in skeletal muscles during experimental trichinellosis in mice. Parasitology Research,100, 647-651, 2007.

Wojtkowiak-Giera A., Wandurska-Nowak E., Michalak M., Derda M. Changes in the activity and kinetics of mouse intestinal glulathione transferase during experimental trichinellosis. Parasitology Research,108, 1309-1313, 2011.

Wojtkowiak-Giera A., Wandurska-Nowak E., Michalak M., Derda M., Łopaciuch J. Trichinellosis in mice: effect of albendazole on the glutathione transferase in the intestines. Folia Parasitologica, 59, 311-314, 2012.

Yagi S., Schuster F.L., Bloch K. Demonstration of presence of *Acanthamoeba* mitochondrial DNA in brain tissue and cerebrospinal fluid by PCR in samples from patient who died of granulomatous amebic encephalitis. Journal of Clinical Microbiology, 45, 2090–2091, 2007.

M. Derda

Poznań, 18.07.2016r. **Monika Derda**