

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Magdalena Maria Podlacha

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2006 – 2009 – studia I stopnia na kierunku Biologia, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
 - 18 czerwca 2009 roku – uzyskanie tytułu zawodowego licencjata (Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański)

- 2009 – 2011 – studia II stopnia na kierunku Biologia, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
 - 6 lipca 2011 roku – uzyskanie tytułu magistra, tytuł pracy magisterskiej: Wpływ chronicznej stymulacji jądra przyśrodkowej przegrody na aktywność cytotoksyczną komórek NK (natural killer) u szczurów, opiekun pracy: dr Dorota Myślińska

- 2011 – 2018 – studia Doktoranckie z Biologii, Ekologii i Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
 - **16 marca 2018 roku** – uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w zakresie Biologii, tytuł rozprawy doktorskiej: „**Aktywność behawioralna i immunologiczna w warunkach aktywacji receptorów glutaminianergicznych typu NMDA jądra przyśrodkowej przegrody (*medial septum*) i zmienności indywidualnej u szczurów**”, promotor w przewodzie doktorskim: dr hab. Danuta Janina Lewandowska, prof. UG, recenzenci: prof. dr hab. Władysław Lason (Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk) i prof. dr hab. Jan Konopacki (Uniwersytet Łódzki)

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

- 13.04.2016 – 31.03.2018 – asystent, Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

- **01.04.2018** – **aktualne miejsce pracy** – adiunkt badawczo-dydaktyczny, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

4. Omówienie osiągnięć naukowych, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

a) Tytuł głównego osiągnięcia naukowego opublikowanego w postaci cyklu 5 publikacji:

Odpowiedź immunologiczna i behawioralna zwierząt na bakteriofagi i antybiotyki

1. Podlacha, M., Grabowski, Ł., Kosznik-Kwaśnicka, K., Zdrojewska, K., Stasiłój, M., Węgrzyn, G., Węgrzyn, A. **Interactions of bacteriophages with animal and human organisms—safety issues in the light of phage therapy.** *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, 22(16), 8937. doi: 10.3390/ijms22168937

Mój wkład w powstanie tej publikacji obejmował:

- przygotowanie rozdziału dotyczącego dróg wnikania bakteriofagów do tkanek zwierząt i ludzi
- przygotowanie rozdziału dotyczącego interakcji bakteriofagów z układem oddechowym (pierwszy autor)

2. Kosznik-Kwaśnicka, K., Podlacha, M., Grabowski, Ł., Stasiłój, M., Nowak-Zaleska, A., Ciemińska, K., Cyske, Z., Dydecka, A., Gaffke, L., Mantej, J., Myślińska, D., Necel, A., Pierzynowska, K., Piotrowska, E., Radzanowska-Alenowicz, E., Rintz, E., Sitko, K., Topka-Bielecka, G., Węgrzyn, G., Węgrzyn, A. **Biological aspects of phage therapy versus antibiotics against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of chickens.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **2022**, 12, 941867. doi: 10.3389/fcimb.2022.941867

Mój wkład w powstanie tej publikacji obejmował:

- koordynowanie pracy laboratoryjnej, obejmującej sekcję kurcząt oraz pobieranie i przygotowywanie tkanek i narządów do dalszych analiz
- wykonywanie sekcji zwierząt
- przygotowanie krwi i osocza do dalszych badań
- przeprowadzenie analizy statystycznej i wizualizacja wyników badań mikrobiomu

3. Grabowski, Ł., Węgrzyn, G., Węgrzyn, A., **Podlacha, M.** **Highly different effects of phage therapy and antibiotic therapy on immunological responses of chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.** *Frontiers in Immunology*. **2022**, 13, 956833. doi: 10.3389/fimmu.2022.956833

Mój wkład w powstanie tej publikacji obejmował:

- tworzenie koncepcji publikacji
- zaplanowanie doświadczeń
- koordynowanie pracy laboratoryjnej
- wykonywanie części doświadczeń obejmujących: sekcję zwierząt; przygotowywanie krwi celem pozyskania osocza i izolacji komórek jednojądrzastych (PBMC); wykonywanie analizy wybranych parametrów hematologicznych i analizy cytometrycznej populacji limfocytów T i B oraz ich subpopulacji; współwykonywanie oznaczeń stężenia cytokin pro-zapalnych i wykazujących działanie przeciwzapalne; współwykonywanie analizy stężenia kortyzolu i kortykosteronu
- przygotowanie, analizę i interpretację uzyskanych wyników oraz danych uzupełniających (tzw. supplementary data)
- przegląd i wybór literatury
- przygotowanie wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu
- odpowiedzi na pytania i uwagi recenzentów (autor korespondujący)

4. Grabowski, Ł., Węgrzyn, G., Węgrzyn, A., **Podlacha, M.** **Phage therapy vs. the use of antibiotics in the treatment of *Salmonella*-infected chickens: comparison of effects on hematological parameters and selected biochemical markers.** *Antibiotics*. **2022**, 11(12), 1787. doi: 10.3390/antibiotics11121787

Mój wkład w powstanie tej publikacji obejmował:

- tworzenie koncepcji publikacji
- zaplanowanie doświadczeń
- przygotowanie krwi celem uzyskania osocza
- przeprowadzenie analizy hematologicznej i oznaczeń parametrów biochemicznych
- przegląd i wybór literatury
- przygotowanie wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu
- odpowiedzi na pytania i uwagi recenzentów (autor korespondujący)

5. Grabowski, Ł., Pierzynowska, K., Kosznik-Kwaśnicka, K., Stasiłojć, M., Jerzemowska, G., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., **Podlacha, M.** **Sex-dependent differences in behavioral and immunological responses to antibiotic and bacteriophage administration in mice.** *Frontiers in Immunology*. **2023**, 14, 1133358. doi: 10.3389/fimmu.2023.1133358

Mój wkład w powstanie tej publikacji obejmował:

- kierowanie projektem
- tworzenie koncepcji publikacji
- zaplanowanie doświadczeń
- koordynowanie pracy laboratoryjnej
- wykonywanie części doświadczeń obejmujących: przeprowadzenie analizy aktywności lokomotorycznej w aktometrach; współwykonywanie testu otwartego pola i uniesionego labiryntu krzyżowego; pobranie krwi i przygotowanie jej do dalszych analiz, w tym pozyskanie osocza i izolację komórek jednojądrzastych (PBMC); współwykonywanie analizy wybranych parametrów hematologicznych i analizy cytometrycznej populacji limfocytów T i B oraz ich subpopulacji; współwykonanie oznaczeń stężenia cytokin pro-zapalnych i wykazujących działanie przeciwzapalne; ważenie zwierząt i wykonywanie ich sekcji; przygotowanie części homogenatów; zebranie materiału do analizy mikrobiomu
- analizę i interpretację uzyskanych wyników
- przeprowadzenie analizy statystycznej i przygotowanie wizualizacji wyników oraz danych uzupełniających (tzw. supplementary data)
- przegląd i wybór literatury
- przygotowanie wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu
- odpowiedzi na pytania i uwagi recenzentów (autor korespondujący)

Numer publikacji	Czasopismo	Rok publikacji	IF/5-letni IF*	Liczba punktów MEiN**	Kwartyl****
1	International Journal of Molecular Sciences, ISSN 1422-0067	2021	6,208/6,628	140	Q1
2	Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, ISSN 2235-2988	2022	5,700/5,900	100	Q2
3	Frontiers in Immunology, ISSN 1664-3224	2022	7,300/8,000	140	Q1
4	Antibiotics, ISSN 2079-6382	2022	4,800/4,900	70	Q1

5	Frontiers in Immunology, ISSN 1664-3224	2023	7,300/8,000	140	Q1
---	---	------	-------------	-----	----

*IF w roku publikacji/IF 5-letni WoS

** według załącznika do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 17 lipca 2023 r.

*** według Web of Science Core Collection

Wstęp

Podstawą mojego głównego osiągnięcia naukowego jest cykl pięciu artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Tematem przewodnim jest analiza odpowiedzi immunologicznej i behawioralnej zwierząt (kurcząt i myszy) po podaniu bakteriofagów i antybiotyków.

Pojawienie się bakterii opornych na większość stosowanych antybiotyków stało się poważnym problemem medycznym, a niemożność wyleczenia pacjentów cierpiących na infekcje wywołane przez te szczepy bakterii doprowadziła do powstania terminu „kryzys antybiotykowy” (Pérez i wsp., 2020). Według danych Światowej Organizacji Zdrowia liczba zgonów w 2019 roku spowodowanych przez infekcje bakteriami wielolekoopornymi w samej tylko Europie wyniosła ponad 133 000 (Mestrovic i wsp., 2022). Szacuje się, że do 2050 roku liczba ta przekroczy 10 milionów, czyli o 2 miliony więcej niż w przypadku zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi (Soto, 2023). Antybiotyki są stosowane nie tylko w leczeniu infekcji bakteryjnych, są one również przepisywane profilaktycznie pacjentom poddawany różnym zabiegom czy procedurom medycznym, od implantacji endoprotez po chemioterapię. Ponadto, znaczące ilości antybiotyków stosuje się również w medycynie weterynaryjnej. Jest to podyktowane częstym występowaniem infekcji bakteryjnych nie tylko u zwierząt gospodarskich, dostarczających mięsa, mleka czy jajek, ale także u zwierząt domowych (jak psy czy koty). Dlatego też rozprzestrzenianie się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. AMR) będzie niosło coraz to bardziej negatywne skutki nie tylko finansowe, ale przede wszystkim te ponoszone w wyniku nie możliwości wyleczenia infekcji (Soto, 2023). W związku z tym konieczne jest poszukiwanie alternatywnych sposobów leczenia chorób ludzi i zwierząt wywoływanych przez te bakterie (Nwobodo i wsp., 2022).

Terapia bakteriofagowa jest potencjalną metodą zwalczania infekcji bakteryjnych, opierającą się na wykorzystaniu bakteriofagów (w skrócie fagów) – wirusów, które mogą rozmnażać się w komórkach bakteryjnych i je eliminować. Istnieje szereg zalet stosowania fagów, do których należą m.in. specyficzność wobec wybranych gospodarzy i ograniczenie propagacji

wyłącznie do ich obecności (Górski i wsp., 2020). Zgodnie z powszechną wiedzą bakteriofagi – jako wirusy infekujące wyłącznie komórki bakteryjne są uważane za nieszkodliwe dla ludzi i zwierząt (Górski i wsp., 2019; 2020). Można zatem założyć, że terapia fagowa jest procedurą bezpieczną, o znikomym, jeśli w ogóle, ryzyku dla pacjentów czy leczonych zwierząt. Wnioski te, znajdują również potwierdzenie w wynikach badań klinicznych, w których nie odnotowano żadnych poważnych działań niepożądanych (Luong i wsp., 2020). Z drugiej strony, nowsze dane literaturowe (a także niektóre artykuły opublikowane wiele lat temu) wskazują, że bakteriofagi mogą efektywnie oddziaływać z komórkami ludzi i zwierząt, wpływając na procesy biochemiczne i fizjologiczne (Putra i Lyrawati, 2020). Pojawia się więc pytanie, czy takie interakcje są faktycznie bezpieczne, biorąc pod uwagę, że mimo braku ostrych reakcji, niektóre łagodniejsze skutki mogą być nadal niebezpieczne dla pacjentów lub zwierząt, poddanych terapii fagowej. Rozpatrując organizm ludzki jako swoiste siedlisko dla bardzo zróżnicowanej mikroflory wykazano, że bakteriofagi mogą występować nie tylko w przewodzie pokarmowym, gdzie ich obecność nie jest niczym zaskakującym z uwagi na fakt, że są wirusami infekującymi bakterie jelitowe, ale także we krwi, moczu czy płynie mózgowo-rdzeniowym (Blanco-Picazo i wsp., 2020). Ponadto, bakteriofagi występujące we krwi obwodowej mogą oddziaływać z układem odpornościowym (Van Belleghem i wsp., 2019). Wykazano również, że mogą one u ludzi wchodzić w specyficzne interakcje z białkami niekolagenowymi macierzy pozakomórkowej, takimi jak fibronektyna (Porayath i wsp., 2018). Takie interakcje mogą znacząco modulować funkcje ludzkich tkanek i narządów. Bakteriofagi są w stanie penetrować warstwę komórek nabłonka na drodze endocytozy. Z kolei Lehti i wsp. (2017) przeprowadzili badania na komórkach nerwiaka zarodkowego (neuroblastomy), w których zaobserwowano, że bakteriofagi poprzez internalizację mogą docierać nawet do jądra komórkowego. Chociaż interakcje bakteriofagów z ludzkimi czy zwierzęcymi komórkami, tkankami i narządami mogą być potencjalnie wykorzystywane w terapii, pojawiają się również sugestie, że ich wpływ na organizmy ssaków może być szkodliwy. Mogą one znacząco rzutować na skład mikrobioty jelitowej, a tym samym zaburzać funkcjonowanie przewodu pokarmowego, co zostało zaobserwowane na szczurach otrzymujących koktajl bakteriofagowy, a same bakteriofagi określono nawet mianem „nowych patogenów ssaków” (Tetz i wsp., 2017). Ich potencjalne patogenne działanie nie musi ograniczać się tylko do przewodu pokarmowego, ponieważ późniejsze badania tego samego zespołu sugerują, że obecność konkretnych bakteriofagów może być jednym z czynników, przyspieszających progresję choroby Parkinsona u ludzi (Tetz i wsp., 2018). Ponadto, wykazano doświadczalnie, że bakteriofagi mogą nasilać zapalenie jelit i okrężnicy poprzez bezpośrednie oddziaływanie na komórki eukariotyczne i funkcjonowanie układu odpornościowego ssaków (Gogokhina i wsp., 2019). Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz fakt, że prace przeglądowe donoszące o braku efektów ubocznych fagoterapii opierają się jedynie na 35 przypadkach klinicznych i wynikach 20 doświadczeń na modelach zwierzęcych

oraz zwiększającej się liczbie publikacji sugerujących, że bakteriofagi mogą jednak stymulować/modulować układ odpornościowy ssaków w nie do końca zbadany i swoisty dla siebie sposób, który może być odmienny u różnych grup organizmów, jest to kwestia wymagająca dalszego zbadania (Liu i wsp., 2021). Niewątpliwie doniesienia opublikowane na przestrzeni ostatnich lat wskazują, że wpływ bakteriofagów na zdrowie, ale także progresję chorób ludzi i zwierząt, którym te wirusy są podawane, jest znacznie bardziej skomplikowany niż ich bezpośrednie interakcje z pojedynczymi gospodarzami bakteryjnymi. Przykładem tego mogą być interakcje z układem odpornościowym ssaków, nasilenie zjadliwości fagów przeciwko ich bakteryjnym gospodarzom w obecności komórek eukariotycznych (Chibani-Chennoufi i wsp., 2004), zwiększona przepuszczalność jelit spowodowana zastosowaniem koktajlu bakteriofagowego czy nasilenie zapalenia okrężnicy. Potencjalny wpływ bakteriofagów na ludzi i zwierzęta jest determinowany efektywnością ich dystrybucji do różnych tkanek czy narządów, która opiera się m.in. na transcytozie oraz prawdopodobnie również innych mechanizmach, a jej wydajność jest także zależna od drogi podania (doustnego, dożylnego lub dootrzewnowego) (Otero i wsp., 2019). Wspólnym mianownikiem powyższych publikacji jest konkluzja wskazująca na pilną potrzebę przeprowadzenia bardziej szczegółowych analiz (w tym eksperymentów na różnych modelach zwierzęcych) w celu pełnego zrozumienia złożonych oddziaływań między bakteriofagami a ludzkimi/zwierzęcymi komórkami, narządami czy tkankami (Edwards i wsp., 2016). Takie badania mają kluczowe znaczenie, ponieważ nie tylko pozwolą lepiej zrozumieć skomplikowane interakcje między bakteriofagami a organizmami eukariotycznymi, ale także obiektywnie i racjonalnie ocenić stosunek korzyści do potencjalnego ryzyka w upowszechnianiu stosowania tej obiecującej metody leczenia zakażeń bakteryjnych, jaką jest fagoterapia.

Moje główne osiągnięcie naukowe koncentruje się na analizie porównawczej odpowiedzi immunologicznej i behawioralnej po podaniu bakteriofagów i antybiotyków u różnych grup organizmów (ptaków i ssaków) w kontekście weryfikacji bezpieczeństwa stosowania fagoterapii, jako metody alternatywnej w zwalczaniu infekcji bakteryjnych. Celem nadrzędnym jest ocena czy terapia fagowa podawana zwierzętom zdrowym, jak i z salmonellozą może oddziaływać na odpowiedź immunologiczną, a także zakłócać funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego, co przejawia się zaburzeniami behawioralnymi. Wszystkie publikacje wchodzące w skład przedstawionego osiągnięcia naukowego łączy ocena odpowiedzi immunologicznej po fagoterapii i antybiotykoterapii. Z uwagi na fakt, że antybiotyki są powszechnie stosowane nie tylko w leczeniu infekcji bakteryjnych u ludzi czy w medycynie weterynaryjnej, ale także w produkcji drobiarskiej profilaktycznie lub terapeutycznie, a do niedawna również, jako promotory wzrostu, doświadczenia przedstawione w niniejszych publikacjach zostały przeprowadzone na kurczakach oraz myszach. Ponadto, w ostatniej pracy, aby w pełni ocenić odpowiedź układu odpornościowego na koktajl bakteriofagowy, eksperymenty przeprowadzono na zwierzętach obu

płci, a analizę rozszerzono o testy behawioralne, co pośrednio pozwala także wnioskować o ewentualnym wpływie fagoterapii na ośrodkowy układ nerwowy. Dodatkowo, elementem spajającym wszystkie publikacje jest zastosowanie zwalidowanych metod, które są powszechnie stosowane w badaniach z zakresu immunologii czy neurofizjologii. Ocena odpowiedzi immunologicznej została przeprowadzona z użyciem cytometrii przepływowej (określenie procentowego udziału populacji limfocytów T i B oraz subpopulacji limfocytów T pomocniczych (Th, TCD4⁺) i T cytotoksycznych (Tc, TCD8⁺); testów immunoenzymatycznych ELISA (stężenie cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-8, IL-12 oraz wykazujących działanie przeciwzapalne: IL-10 i IL-4); zautomatyzowanej analizy morfologii krwi; zautomatyzowanej analizy biochemicznej. Z kolei pośrednia ocena funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego opierała się o zastosowanie standardowych testów behawioralnych: testu otwartego pola (reakcje lękowe i aktywność lokomotoryczna), uniesionego labiryntu krzyżowego (procesy pamięciowe, reakcje lękowe) oraz aktometrów (aktywność lokomotoryczna).

Publikacja 1: Interactions of bacteriophages with animal and human organisms – safety issues in the light of phage therapy

Niniejsza praca przeglądowa podsumowuje dotychczasową wiedzę dotyczącą możliwych interakcji bakteriofagów z komórkami eukariotycznymi, tkankami, narządami czy całymi układami, a także prezentuje potencjalne drogi ich dystrybucji w organizmach ludzi i zwierząt. Z uwagi na brak specyficznych receptorów dla bakteriofagów na komórkach eukariotycznych, wirusy te były przez długi czas uznawane za całkowicie neutralne dla zwierząt i ludzi. W ostatnim czasie pojawił się jednak szereg interesujących doniesień, wskazujących chociażby na oddziaływanie między różnymi typami bakteriofagów a molekułami występującymi w macierzy pozakomórkowej takimi, jak: fibronektyna, żelatyna czy heparyna (Porayath i wsp., 2018). Tego typu interakcje są kluczowe, ponieważ mogą bezpośrednio przekładać się na zmiany w funkcjonowaniu tkanek i narządów. Wykazano także, że fagi mogą wnikać do komórek nabłonka sutka poprzez endocytozę, a nawet docierać do jąder komórkowych. Taki mechanizm może ułatwiać ich transport przez warstwy komórek nabłonkowych. Sugeruje się, że proces transcytozy leży u podstaw tego zjawiska (Nguyen i wsp., 2017). Wydaje się, że kluczowe mogą tu być tzw. białka terminalne (enzymy, które mogą inicjować replikację DNA niektórych bakteriofagów), które posiadają fragmenty przypominające sekwencje sygnałowe lokalizacji jądrowej (ang. NLS), umożliwiające penetrację do jądra komórkowego komórki eukariotycznej (Redrejo-Rodríguez i wsp., 2012). W świetle tych danych modulacja ekspresji niektórych genów eukariotycznych przez bakteriofagi może okazać się wysoce prawdopodobna. Jak się okazuje, te wirusy bakteryjne mogą znacząco wpływać na funkcje układu odpornościowego, układu oddechowego, ośrodkowego układu nerwowego, układu pokarmowego, moczowego czy układu rozrodczego. Mogą nawet

oddziaływać na procesy nowotworzenia. Pojawia się więc pytanie, czy ich wpływ jest zawsze korzystny czy niekiedy może być nawet szkodliwy. Dlatego kluczowe jest dogłębne zrozumienie mechanizmów interakcji między bakteriofagami a eukariontami, co powinno pozwolić na racjonalne wykorzystanie tych wirusów w medycynie (zwłaszcza w terapii fagowej) czy biotechnologii.

Publikacja 2: Biological aspects of phage therapy versus antibiotics against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infections of chickens

Druga praca koncentruje się na porównaniu biologicznych aspektów terapii fagowej (na przykładzie koktajlu złożonego z bakteriofagów vB_SenM-2 i vB_Sen-TO17) i dwóch antybiotyków (kolistyny i enrofloksacyny) powszechnie stosowanych w medycynie weterynaryjnej u kurcząt zakażonych *Salmonella enterica*. W obliczu pojawiania się coraz większej liczby antybiotykoopornych szczepów *Salmonella enterica* i wprowadzeniu ograniczeń w stosowaniu antybiotyków w przemyśle drobiarskim (Castro-Vargas i wsp., 2020) istnieje konieczność opracowania i wprowadzenia metod alternatywnych. Z drugiej strony antybiotyki są nadal ważnymi lekami używanymi w weterynarii, w tym w hodowli drobiu (Deblais i wsp., 2020). Głównym wnioskiem sformułowanym w oparciu o przeprowadzone badania jest to, że terapia fagowa, jeśli jest zastosowana krótko po wykryciu infekcji bakteryjnej, jest równie skuteczna co antybiotykoterapia, a przy tym dużo bezpieczniejsza. Najwyższa efektywność została osiągnięta, gdy leczenie rozpoczęto nie później niż jeden dzień po zakażeniu *Salmonella enterica*. Wówczas już począwszy od następnego dnia, nie wykryto bakterii ani w analizowanych próbkach kału, ani w wymazach z kloaki. W przypadku, gdy bakteriofagi podawane są po dłuższym okresie od zakażenia, bakterie są w stanie rozprzestrzenić się w jelitach, wówczas potrzeba zdecydowanie więcej czasu, aby fagi mogły je efektywnie lizować. Jak wiadomo warunki wzrostu bakterii w jelicie są zdecydowanie inne, niż te w laboratorium, a wydajność propagacji fagów różni się, ponieważ jest ściśle związana z cyklami życiowymi ich gospodarzy. Być może badanie profilu lizy bakteriofagów w laboratorium w warunkach beztlenowych lub mikroaerofilnych mogłoby dostarczyć bardziej szczegółowych danych dotyczących tego, jak szybko bakteriofagi są w stanie pokonać infekcję bakteryjną, która jest już mocno rozwinięta. Warto jednak zaznaczyć, że nawet po dłuższym czasie (2 lub 4 dni po wykryciu bakterii z rodzaju *Salmonella*) fagi są skuteczne w zwalczaniu infekcji bakteryjnej. Jest to również obiecujący wynik, ponieważ potwierdza skuteczność terapii fagowej w zwalczaniu już trwającej infekcji bakteryjnej, a nie tylko wskazuje na jej potencjał jako środka profilaktycznego. Biorąc pod uwagę fakt, że bakteriofagi wydają się nie mieć negatywnego wpływu na zwierzęta, ten rodzaj terapii może mieć zastosowanie w nieinwazyjnym leczeniu infekcji bakteryjnych, bez konieczności likwidacji całego stada.

Kolejnym ważnym aspektem jest czas utrzymywania się stosowanych terapeutów w organizmach zwierząt. W przypadku zastosowania koktajlu fagowego, bakteriofagi były wykrywane w odchodach kurcząt przez dwa do trzech tygodni, a następnie były eliminowane z przewodu pokarmowego, co było podyktowane brakiem bakteryjnych gospodarzy w tym środowisku. Co ciekawe, po podaniu doustnym możliwa była ich detekcja w różnych narządach, w tym w mózgu, sercu, wątrobie, śledzionie, mięśniach czy nerkach. Jednak liczba wirionów była niska, nie przekraczała 200 fagów na 1 gram tkanki, co wskazuje na małą efektywność penetracji. Dane dotyczące przenikania bakteriofagów do narządów ludzkich i zwierzęcych bez obecności bakteryjnych gospodarzy nie są nowe, zostały opublikowane stosunkowo dawno (Mukerjee i Ghosh, 1962). Ważnym czynnikiem determinującym efektywność tego zjawiska jest rodzaj użytego faga, jak i droga jego podania. Obecnie zdolność fagów do przenikania do krwiobiegu i narządów wewnętrznych jest przedmiotem intensywnych badań (Dąbrowska i wsp., 2005; Dąbrowska i Abedon, 2019). Wpływ tego zjawiska na skuteczność i przebieg terapii nie jest jeszcze jasno określony.

Innym interesującym zagadnieniem jest to, czy kurczęta mogą wytwarzać przeciwciała przeciw fagom, które spowodują ich neutralizację i uniemożliwią ich skuteczne działanie w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych. Wykazano brak neutralizacji bakteriofaga vB_Sen-TO17 i umiarkowany stopień neutralizacji bakteriofaga vB_SenM-2 przez przeciwciała znajdujące się w osoczu kurcząt, które otrzymały koktajl fagowy. Różnica ta, mogła być podyktowana faktem, że vB_SenM-2 jest znacznie większym wirusem niż vB_Sen-TO17 (Kosznik-Kwaśnicka i wsp., 2020a; 2020b), a co za tym idzie może być bardziej immunogeny. Ponadto, nie stwierdzono komórek *Salmonella* opornych na podawane bakteriofagi czy antybiotyki.

Kolejnym ważnym aspektem, który był badany była mikrobiota jelitowa, która odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, a zmiany w jej składzie mogą powodować poważne zaburzenia (Zhou i wsp., 2021), nie tylko w obrębie przewodu pokarmowego, ale także w wielu różnych narządach wewnętrznych, a nawet w ośrodkowym układzie nerwowym (Cao i wsp., 2021). Pomimo tego, że wcześniejsze prace nad zastosowaniem terapii fagowej u kurcząt koncentrowały się na badaniu obecności określonych bakterii chorobotwórczych lub konkretnych objawów u ptaków, ostatnie doniesienia wskazują na konieczność badania mikrobiomu zarówno w trakcie, jak i po zakończeniu określonego rodzaju terapii (Clavijo i wsp., 2022; Lorenzo-Rebenaque i wsp., 2022). Przeprowadzona analiza wykazała, że zarówno fagi jak i antybiotyki zmieniły skład mikrobiomu jelitowego kurcząt. Jednak zmiany spowodowane podaniem koktajlu fagowego były krótkotrwałe, a mikrobiom normalizował się w ciągu 2-3 tygodni, podczas gdy leczenie antybiotykami (enrofloksacyną lub kolistyną) skutkowało długotrwałymi zaburzeniami profilu mikroflory jelitowej. Warto podkreślić, że silniejszy wpływ bakteriofagów na mikrobiom odnotowano w grupie zwierząt nie zakażonych *Salmonella enterica*. Efekt ten, mógł wynikać ze znacznej różnicy w dostępności wrażliwych szczepów bakterii gospodarzy u obu analizowanych

grup. W przypadku braku naturalnego gospodarza i stosunkowo wysokich dawek bakteriofagów możliwe są reakcje niespecyficzne, które mogą skutkować bardziej istotnymi zmianami w mikrobiomie przewodu pokarmowego. Z drugiej jednak strony, zmiany obserwowano również w grupach zakażonych bakteriami z rodzaju *Salmonella*, dlatego nie można wykluczyć, że była to kombinacja dwóch czynników, które spowodowały obserwowane zmiany. Mianowicie eliminacja bakterii z rodzaju *Salmonella* po fagoterapii skutkowałą powstaniem niszy, która została tymczasowo wypełniona innymi mikroorganizmami. Warto podkreślić, że w przypadku fagoterapii nastąpiła normalizacja mikrobiomu, a wyniki były zbliżone do tych w grupach kontrolnych.

Podsumowując, terapia fagowa była tak samo skuteczna jak stosowanie enrofloksacyny czy kolistyny w eliminowaniu eksperymentalnie indukowanej infekcji *Salmonella* Typhimurium u kurcząt. W obu przypadkach skuteczność była najwyższa, gdy terapeutyki były podawane krótko po zakażeniu. Terapia fagowa powodowała jednak mniejsze zmiany w mikrobiomie jelitowym niż oba antybiotyki, co stanowi ważny argument przemawiający za większym bezpieczeństwem stosowania tego, alternatywnego podejścia terapeutycznego.

Publikacja 3: Highly different effects of phage therapy and antibiotic therapy on immunological responses of chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Celem badań opisanych w trzeciej publikacji była ocena wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej na terapię fagową oraz antybiotyki u kurcząt nie zakażonych, jak i eksperymentalnie zainfekowanych *Salmonella enterica* serowar Typhimurium. Ważną obserwacją w poprzedniej pracy, która dotyczyła porównania biologicznych aspektów terapii fagowej i antybiotykoterapii było to, że bakteriofagi podawane doustnie można było wykryć w różnych narządach kurcząt, w tym w nerkach, mięśniach, śledzionie, wątrobie, sercu i mózgu. To z kolei zrodziło pytanie o potencjalny wpływ bakteriofagów na fizjologię ptaków. Z uwagi na to, że jedną z podstawowych reakcji organizmu ptaka czy ssaka na obecność obcych makromolekuł jest odpowiedź immunologiczna, ważne było zbadanie parametrów układu odpornościowego w złożonym układzie eksperymentalnym, a więc zarówno u zwierząt nie zainfekowanych, jak i zakażonych *Salmonella enterica*.

Zastosowany w niniejszej pracy eksperymentalny model infekcji bakteryjnej miał określone parametry kinetyczne. Obserwacja stanu upierzenia, stopień zaczerwienienia/odbarwienia grzebienia oraz analizowane markery stanu zapalnego czy ocena histologiczna pobranych narządów wewnętrznych potwierdziły, że infekcja miała charakter przewlekły i utajony, bez widocznych objawów zewnętrznych. Rozpatrując dynamikę jej rozwoju, zarówno poczynione obserwacje, jak i dane literaturowe potwierdzają, że w przypadku

S. enterica serowar Typhimurium największa liczba bakterii jest wykrywana w jelicie ślepym, natomiast wyniki poniżej progu detekcji dotyczą wątroby i śledziony. Zmiany patofizjologiczne wynikające z przewlekłego charakteru infekcji były widoczne w późniejszym czasie i obejmowały spadek masy ciała (nie u wszystkich kurcząt) oraz nieprawidłowy obraz histopatologiczny narządów wewnętrznych. Charakterystyczne były przede wszystkim uszkodzenia tkanek, a także zmiany zapalne, wynikające z infiltracji heterofili i limfocytów w wątrobie i nerkach oraz w mniejszym stopniu w śledzionie. W wyniku doustnej suplementacji koktajlu fagowego, oprócz eliminacji komórek bakteryjnych, zaobserwowano także brak zmian w obrazie histopatologicznym badanych narządów. Odwrotne efekty odnotowano po antybiotykoterapii, zwłaszcza po podaniu enrofloksacyny, która negatywnie wpływała na zachowanie kurcząt (epizody agresji i autoagresji) oraz wygląd i strukturę piór, a przede wszystkim indukowała szereg zmian patologicznych w strukturze badanych narządów wewnętrznych, w tym w mózgu. Ponadto, powodowała ona нефizjologiczne obniżenie stężenia cytokin prozapalnych oraz tych wykazujących działanie przeciwzapalne. Dostępnych jest niewiele danych literaturowych wskazujących, że antybiotyki z grupy chinolonów, do której należy enrofloksacyna, powodują deregulację poziomu mRNA genów kodujących niektóre cytokiny takie, jak: IL-1 α , TNF- α , IL-2, IL-3 czy IL-4. Przypuszcza się, że tego rodzaju zaburzenie syntezy cytokin, które są kluczowe dla utrzymania homeostazy immunologicznej, przypomina uruchomienie bakteryjnego systemu SOS. Ponadto, w komórkach ssaków taki stan odzwierciedla odpowiedź organizmu na silny stres lub uszkodzenie DNA (Riesbeck, 2002). Kiedy w wyszukiwarce artykułów naukowych wpisujemy frazę „enrofloksacyna i układ odpornościowy kurcząt” wyświetlone zostaną tylko 22 wyniki. Wszystkie te, badania łączy wspólny mianownik, jakim jest stwierdzenie, że enrofloksacyna może powodować poważne zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego, w tym modulować odpowiedź immunologiczną kurcząt. Jednakże, wiedza dotycząca wpływu enrofloksacyny na poziom białek czy liczebność populacji i subpopulacji komórek układu odpornościowego kurcząt jest niewystarczająca, dlatego jednym z założeń tej pracy było kompleksowe zbadanie tej kwestii. Choć antybiotyk ten ma szerokie spektrum działania, obejmujące zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne, jak się okazuje wykazuje on również wiele skutków ubocznych, obejmujących układ kostny, nerwowy czy odpornościowy. Wiele analizowanych danych literaturowych jasno wskazuje, że enrofloksacyna nie powinna być antybiotykiem pierwszego wyboru w zapobieganiu i leczeniu zakażeń bakteryjnych u drobiu (Ma i wsp., 2020). Z kolei koktajl fagowy nie tylko skutecznie zwalczał zakażenie *Salmonella enterica* serowar Typhimurium bez zakłócania równowagi cytokinowej, ale znacząco zwiększał stężenie kluczowych cytokin, które wywierają działanie przeciwzapalne. Nawet stosunkowo niewielkie podwyższenie ich poziomu, jest kluczowe dla funkcjonowania organizmu w obliczu infekcji

bakteryjnej. Wzrost stężenia cytokin: IL-4 i IL-10, w wyniku fagoterapii sugeruje, że podawane doustnie bakteriofagi wywierają działanie immunomodulujące, w tym przeciwzapalne.

Ważnym aspektem, który należy wziąć pod uwagę jest status immunologiczny organizmu przed rozpoczęciem danego typu terapii. Zależność ta, jest widoczna nie tylko w przypadku modeli zwierzęcych, ale także w badaniach klinicznych. Niektóre dane literaturowe wskazują, że bakteriofagi mogą oddziaływać w sposób analogiczny do produkcji cytokin po stymulacji lipopolisacharydem, który jest immunologicznie aktywnym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych (Ellis i wsp., 2010). Szczególnie interesującą zależność zaobserwowano w przypadku cytokiny prozapalnej, jaką jest TNF- α . U pacjentów, u których na początku badania poziom TNF- α był niski lub średni, po zastosowaniu terapii fagowej obserwowano wzrost stężenia tej cytokiny. Ponadto, bakteriofagi mogą stymulować uwalnianie interferonu przez limfocyty T na drodze interakcji z komórkami dendrytycznymi prezentującymi antygen (Kwiatek i wsp., 2020). W niniejszej pracy podawanie samego koktajlu fagowego nie powodowało podwyższenia stężenia badanych cytokin prozapalnych w osoczu krwi kurcząt.

Inną ważną kwestią, której dotyczy poniższa praca jest wpływ koktajlu fagowego na komórki immunokompetentne. Według dostępnych danych literaturowych pomimo tego, że bakteriofagi wykazują potencjał przeciwzapalny, który jest kluczowy w przezwyciężaniu różnych infekcji bakteryjnych, nie wpływają one na liczbę komórek immunokompetentnych: limfocytów, monocytów czy neutrofilów we krwi obwodowej. Analogiczna sytuacja dotyczy istotnych zmian w liczbie makrofagów, limfocytów T i B czy komórek dendrytycznych w śledzionie, wątrobie i węzłach chłonnych (Łusiak-Szelachowska i wsp., 2014; Cieślik i wsp., 2021). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają te obserwacje. Odwrotny efekt odnotowano w przypadku antybiotykoterapii, zwłaszcza po zastosowaniu enrofloksacyny. Riesbeck i wsp. (2020) wykazali, że podawanie enrofloksacyny, szczególnie w ciągu pierwszych kilku dni życia kurcząt, negatywnie wpływa na odpowiedź immunologiczną, co przejawia się zaburzeniem stosunku kluczowych subpopulacji limfocytów. Ten patologiczny stan może utrzymywać się nawet przez cały okres odchowu kurcząt. Ponadto zaobserwowano, że enrofloksacyna osłabia także odporność humoralną, związaną z produkcją przeciwciał, a stymuluje odporność komórkową, w której kluczowymi komórkami efektorowymi są limfocyty T. Z kolei kolistyna zmniejsza proliferację pęcherzyków limfoidalnych, co także skutkuje zmniejszeniem odsetka krążących limfocytów, zwłaszcza limfocytów B (Elbayoumi i wsp., 2017). Co ciekawe, spekuluje się, że badana w niniejszej pracy IL-10 jest kluczową cząsteczką w kontekście przebiegu zakażenia *S. enterica*. Jest to podyktowane faktem, że cytokina ta pozwala maskować obecność bakterii, co pozwala uniknąć w ten sposób nadmiernej aktywacji układu odpornościowego. Stymulacja proliferacji limfocytów T regulatorowych (Treg) równoważy nadmierną odpowiedź immunologiczną na trwającą infekcję bakteryjną. Salazar i wsp. (2017) wykazali, że podczas infekcji *S. enterica* serovar Typhimurium, limfocyty B dodatkowo pobudzają limfocyty T, co w efekcie promuje

powstawanie kolejnych komórek Treg. Warto zaznaczyć, że bakterie te są w stanie infekować i rezydować w limfocytach B, w ich komórkach prekursorowych w szpiku kostnym lub w komórkach plazmatycznych, co jest kluczowym czynnikiem stymulującym różnicowanie limfocytów T do komórek Treg. W związku z powyższym, badany w niniejszej pracy stosunek limfocytów B i T oraz ich subpopulacji ma kluczowe znaczenie nie tylko z punktu widzenia przebiegu zakażenia *S. enterica* serowar Typhimurium, ale także efektywności i bezpieczeństwa fagoterapii.

Ostatnimi analizowanymi w niniejszej pracy czynnikami, które nie były do tej pory badane w kontekście bezpieczeństwa fagoterapii, są hormony stresu: kortyzol i kortykosteron. Stężenie tego drugiego we krwi ptaków jest ponad 100-krotnie wyższe, niż kortyzolu (Westerhof i wsp., 1994). Podwyższony poziom kortykosteronu skutkuje szeregiem negatywnych zmian, które obejmują również parametry układu odpornościowego. Między innymi, następuje modyfikacja stosunku heterofilii do limfocytów, których liczba spada. Ponadto parametry takie, jak: rozmiar komórek, ich kształt i granulacja zmieniają się. Wzrasta również ekspresja mRNA cytokin prozapalnych i chemokin, a proliferacja limfocytów jest zahamowana. Długotrwała ekspozycja na czynniki stresogenne zaburza mechanizmy mające na celu przywrócenie homeostazy, co przekłada się na osłabienie odporności i ma negatywne konsekwencje dla zdrowia całego organizmu (Hofman i wsp., 2020). W niniejszej pracy poziom kortykosteronu był znacząco podwyższony w grupie z eksperymentalnie indukowaną infekcją bakteryjną oraz co ciekawe, w obu grupach po antybiotykoterapii. Z kolei podanie koktajlu fagowego nie powodowało wzrostu stężenia opisywanego hormonu. Z uwagi na fakt istnienia poważnych problemów wynikających z prawnych aspektów stosowania bakteriofagów jako „leków” (Moelling i wsp., 2018), wcześniejsze prace przedstawione w niniejszym osiągnięciu habilitacyjnym oraz powyższa publikacja są ważnym „kamieniem milowym”, dostarczającym istotnych dowodów nie tylko na skuteczność fagoterapii w zwalczaniu zakażeń *S. enterica* serowar Typhimurium u kurcząt, ale także na jej bezpieczeństwo, szczególnie w kontekście funkcjonowania układu odpornościowego.

Publikacja 4: Phage therapy vs. the use of antibiotics in the treatment of *Salmonella*-infected chickens: comparisons of effects on hematological parameters and selected biochemical markers

Kolejna publikacja cyklu stanowi swoiste uzupełnienie badań zaprezentowanych w poprzednio opisanej pracy. W celu dalszej oceny bezpieczeństwa terapii w porównaniu z antybiotykami (enrofloksacyną i kolistyną) przeanalizowano parametry hematologiczne oraz poziomy wybranych markerów biochemicznych w próbkach krwi pobranych od ptaków nie zainfekowanych, jak i zakażonych *Salmonella enterica* serowar Typhimurium. Celem

nadrzędnym była dalsza weryfikacja, porównanie oraz ewentualne wykrycie potencjalnych efektów niepożądanych dwóch opisywanych rodzajów terapii przeciwbakteryjnej. Badania te, powinny w znaczący sposób przyczynić się do identyfikacji i upowszechnienia stosowania najbardziej efektywnej, a przy tym najbezpieczniejszej metody leczenia zakażeń bakteryjnych drobiu.

Jak wskazują dane literaturowe oraz publikacje wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia habilitacyjnego antybiotykoterapia, która u drobiu jest niekiedy stosowana profilaktycznie, jako czynnik przyspieszający wzrost lub terapeutycznie może być rodzajem stresora, który powoduje szereg zaburzeń, zwłaszcza jeśli weźmiemy pod uwagę funkcjonowanie układu odpornościowego (w tym wskaźniki erytrocytarne), który rzutuje na fizjologię całego organizmu (Alkhalif i wsp., 2010). Jest to niezwykle istotne, gdyż ma wiele negatywnych konsekwencji, w tym ekonomicznych. Należy tu wymienić: pogorszenie jakości mięsa, mniejszą liczbę znoszonych jaj, zły wpływ na dobrostan kurcząt, a także pośrednio na konsumentów (niekorzystne oddziaływanie na mikrobiom jelitowy czy rozwój bakterii lekoopornych). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na znacznie mniej działań niepożądanych w wyniku stosowania koktajlu fagowego w porównaniu do podawanych antybiotyków. Te ostatnie, negatywnie oddziaływały na parametry układu czerwokrwinkowego, w tym hematokryt, wskaźnik średniej objętości krwinki czerwonej (MCV), wskaźnik średniej masy hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH) oraz średnie stężenie hemoglobiny w erytrocycie (MCHC). Warto podkreślić, że zakażenie *Salmonella enterica* miało również niekorzystny wpływ na wyżej wymienione parametry, jednak ich poziom uległ normalizacji po zastosowaniu fagoterapii. Co więcej, bakteriofagi podawane natychmiast lub dwa dni po zakażeniu nie wpływały znacząco na liczbę limfocytów, monocytów i neutrofilii. Z kolei podanie badanych antybiotyków skutkowało podwyższeniem poziomu aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (AST), co sugeruje hepatotoksyczność tych związków. Natomiast, fagoterapia nie wpływała na aktywność wspomnianych enzymów. Zmiany parametrów hematologicznych są również przydatne do oceny adaptacji organizmu do niekorzystnych warunków lub czynników stresogennych. Jest to szczególnie ważne w przypadku przemysłowej hodowli drobiu z przeznaczeniem na mięso i jajka. Wskaźniki erytrocytarne ulegają pogorszeniu w przypadku złych warunków hodowlanych czy niskiej zawartości składników odżywczych w pożywieniu. Zbyt uboga w składniki odżywcze pasza i długotrwałe narażenie na czynniki stresowe skutkuje obniżeniem liczby erytrocytów i poziomu hemoglobiny, co prowadzi do erytrocytopenii i osłabienia organizmu. Z kolei wzrost temperatury otoczenia powoduje utratę dużej ilości wody przez układ oddechowy, czego efektem jest zmniejszenie objętości osocza i wzrost poziomu hematokrytu. Natomiast, nefizjologiczne obniżenie jego poziomu w wyniku hemodylucji, występuje w przypadku ekspozycji na silne stresory takie, jak stres cieplny (Ribeiro i wsp., 2018). Okazuje się więc, że antybiotykoterapia może wywierać skutki uboczne, które są porównywalne

z ekspozycją na czynniki stresogenne czy uszkodzające, czego efektem jest pogorszenie funkcjonowania całego organizmu.

Uzyskane wyniki potwierdziły również, że po podaniu koktajlu fagowego analizowane parametry hematologiczne nie różniły się istotnie od wyników w grupach kontrolnych. Ponadto, normalizacja liczby erytrocytów po fagoterapii miała wymierne korzyści fizjologiczne, ponieważ pozwoliła uniknąć poważnych zaburzeń wynikających ze zmian parametrów hematologicznych, wywołanych infekcją bakteryjną, która doprowadziłaby do nieprawidłowości w funkcjonowaniu narządów wewnętrznych, w szczególności wątroby i śledziony. Można zatem stwierdzić, że terapia fagowa, na przykładzie koktajlu złożonego z bakteriofagów: vB_SenM-2 oraz vB_SenTo17, jest nie tylko równie skuteczna w zwalczaniu zakażeń *Salmonella enterica* co antybiotykoterapia, ale przede wszystkim bezpieczniejsza dla układu odpornościowego, a tym samym prawidłowego funkcjonowania całego organizmu.

Publikacja 5: Sex-dependent differences in behavioral and immunological responses to antibiotic and bacteriophage administration in mice

Ostatnia publikacja wchodząca w skład niniejszego osiągnięcia habilitacyjnego dotyczy oceny odpowiedzi immunologicznej i behawioralnej myszy na fagoterapię i antybiotyki, które są powszechnie stosowane w weterynarii (enrofloksacynę i tetracyklinę). Z uwagi na chęć zweryfikowania bezpieczeństwa fagoterapii na innej grupie zwierząt, a także brak zwalidowanych testów behawioralnych dla modelu kurzego, doświadczenia opisane w niniejszej pracy zostały przeprowadzone na myszach. Istotnym czynnikiem decydującym o nowatorskim charakterze uzyskanych wyników jest fakt, że liczne analizy behawioralne i szeroka gama oznaczeń parametrów immunologicznych została przeprowadzona u osobników obu płci, co pozwala na rzetelne sformułowanie wniosków dotyczących bezpieczeństwa fagoterapii.

Po raz pierwszy wykazany został zależny od płci negatywny wpływ antybiotykoterapii, który nie tylko dotyczył funkcjonowania układu odpornościowego, ale także znaczącej dysfunkcji ośrodkowego układu nerwowego, przejawiającej się zaburzeniem wzorca behawioralnego. Oba opisane efekty niepożądane były szczególnie nasilone u samic. Z drugiej strony, złożone analizy behawioralne i immunologiczne potwierdziły brak negatywnych skutków stosowania koktajlu bakteriofagowego. Ciekawą i niewątpliwie wymagającą dalszych badań kwestią jest różnica w obecności bakteriofagów w narządach samic i samców. Warto jednak podkreślić, że analizy biodostępności nanomolekuł o potencjale terapeutycznym potwierdzają występowanie różnic między płciami już na poziomie komórkowym i molekularnym. Fizjologiczne różnice między płciami także nie ograniczają się jedynie do zawartości tłuszczu i wody w organizmie, objętości

osocza czy ilości krwi docierającej do poszczególnych narządów. Potwierdzono na przykład, że istnieją różnice między kobietami i mężczyznami w ekspresji tysięcy genów, które determinują funkcje wątroby, tkanki tłuszczowej czy mięśni szkieletowych. Z kolei w nerkach, analiza transkryptomyczna wykazała obecność ponad dwudziestu genów, których poziom ekspresji różni się istotnie u obu płci. Kolejnym czynnikiem różnicującym, którego rola nie powinna być marginalizowana są hormony płciowe (Madla i wsp., 2021). Ponadto, analizy dotyczące mięśnia sercowego wykazały, że profile funkcjonalne istotnych białek i ich izoform różnią się u zwierząt obu płci. Różnice te, obejmowały ponad dwadzieścia dwa białka i ulegały znaczącemu pogłębieniu w miarę starzenia się myszy (Dela Justina i wsp., 2021). Lee i wsp. (2006) opisali u samic myszy istotne różnice w ekspresji ważnych genów, w tym regulujących metabolizm DNA, które wykazywały silną zależność od rodzaju tkanki/narządu. Warto podkreślić, że również odpowiedź na infekcję wirusową jest silnie zależna od regulacji hormonalnej i znacznie różni się u osobników obu płci (Hannah i wsp., 2008). Chociaż do tej pory w literaturze brakowało szczegółowych analiz behawioralnych po antybiotykoterapii u zwierząt obu płci, można znaleźć stosunkowo niedawno opisane przesłanki, wskazujące na indukowane po podaniu antybiotyków efekty niepożądane w tym zakresie. Mianowicie wykazano, że podawanie klindamycyny lub amoksyliny powodowało poważne zaburzenia zachowania. Przede wszystkim, odnotowano pogorszenie procesów poznawczych w teście rozpoznawania nowego obiektu i wzrost odsetka zachowań depresyjnych w teście zawieszenia za ogon. W przeciwieństwie do wyników opisanych w niniejszej pracy, eksperymenty te przeprowadzono wyłącznie na samicach.

Zasugerowano, że pośrednią przyczyną obserwowanych zaburzeń behawioralnych była dysbioza mikrobiomu jelitowego, wywołana przez antybiotyki (Kwon i wsp., 2020). Należy podkreślić, że w długofalowej perspektywie ekspozycja na tego typu niekorzystne czynniki, może zwiększać ryzyko wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych (Roy Sarkar i Banerjee, 2019). Można spekulować, że brak odpowiedniej różnorodności pożytecznych bakterii wchodzących w skład mikrobiomu jelitowego zwiększa przepuszczalność bariery krew-mózg, tym samym negatywnie oddziałując na odpowiedź immunologiczną mikrogleju, mielinizację, strukturę neurochemiczną mózgu oraz aktywność osi stresowej podwzgórze-przysadka-nadnercza (Leclercq i wsp., 2017). W niniejszej pracy najbardziej wyraźną zmianą w mikrobiomie był wzrost odsetka bakterii z wciąż mało poznanej rodziny *Muribaculaceae* zarówno u samców po podaniu enrofloksacyny, jak i u samic otrzymujących koktajl bakteriofagowy. Badania wykazały, że rodzina *Muribaculaceae* ma związek z tworzeniem wewnętrznej warstwy śluzu w okrężnicy i prawidłowym funkcjonowaniem bariery jelitowej, a jej liczebność jest powiązana z poziomem propionianu, który jest rodzajem krótkołańcuchowego kwasu tłuszczowego – ujemnie korelującego z występowaniem nowotworów jelita grubego u myszy (Zhang i wsp., 2020). Ponadto, bakterie te są ważne w adaptacji do stresu wywołanego niedotlenieniem oraz w odpowiedzi na proces zapalny (Zhang i wsp., 2022).

Przedstawione wyniki są ważnymi wskaźnikami, dotyczącymi ryzyka, jakie może pociągać za sobą niewłaściwe stosowanie antybiotyków. Dodatkowo, płeć jest czynnikiem, który powinien być uwzględniony w tak złożonych analizach, jako istotna determinanta warunkująca przebieg odpowiedzi immunologicznej i behawioralnej na podawane związki. Należy podkreślić również, że uzyskane wyniki potwierdziły ogólne bezpieczeństwo stosowania bakteriofagów w warunkach *in vivo*, co jest obiecujące w świetle potencjalnego upowszechnienia fagoterapii, jako procedury terapeutycznej, która może być stosowana w praktyce weterynaryjnej.

Podsumowanie i wnioski

Cykl pięciu publikacji naukowych wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia habilitacyjnego w sposób spójny i nowatorski, wykorzystując zwalidowaną metodykę, weryfikuje bezpieczeństwo fagoterapii w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych w kontekście funkcjonowania układu odpornościowego, jak i pośrednio ośrodkowego układu nerwowego u różnych grup organizmów (ptaków i ssaków). Uzyskane wyniki nie tylko potwierdzają skuteczność, ale także brak skutków ubocznych stosowania koktajlu fagowego, co stanowi merytoryczny argument jasno przemawiający za terapią bakteriofagową, jako metodą alternatywną w zwalczaniu infekcji bakteriami lekoopornymi. Ponadto, po raz pierwszy udało się wykazać zależny od płci negatywny wpływ antybiotykoterapii na funkcjonowanie obu wspomnianych układów, który był dużo silniej zaznaczony u samic. Jest to wyraźne wskazanie do tego, że płeć jest istotną determinantą, której wpływ powinien być brany pod uwagę w analizach bezpieczeństwa i skuteczności potencjalnych metod terapeutycznych.

Literatura

- Alkhalf A., Alhaj M., Al-Homidan I. Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi J. Biol. Sci.* 2010; 17, 219–225.
- Blanco-Picazo P., Fernández-Orth D., Brown-Jaque M., Miró E., Espinal P., Rodríguez-Rubio L., Muniesa M., Navarro, F. Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. *Sci. Rep.* 2020; 10(1), 1-10.
- Cao C., Chowdhury V.S., Cline M.A., Gilbert, E.R. The microbiota-Gut-Brain axis during heat stress in chickens: A review. *Front. Physiol.* 2021; 12.
- Castro-Vargas R.E., Herrera-Sánchez M.P., Rodríguez-Hernandez R., Rondón-Barragán I.S. Antibiotic resistance in *salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Vet. World* 2020; 13, 2070–2084.

- Chibani-Chennoufi S., Bruttin A., Dillmann M.L., Brüssow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J. Bacteriol.* 2004; 186(12), 3677-3686.
- Chinemerem Nwobodo D., Ugwu M.C., Oliseloke Anie C., Al-Ouqaili M.T., Chinedu Ikem J., Victor Chigozie U., Saki M. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022; 36(9), e24655.
- Cieślik M., Bagińska N., Górski A., Jończyk-Matysiak E. Animal models in the evaluation of the effectiveness of phage therapy for infections caused by gram-negative bacteria from the ESKAPE group and the reliability of its use in humans. *Microorganisms* 2021; 9, 1–15.
- Clavijo V., Morales T., Vives-Flores M. J., Reyes Muñoz A. The gut microbiota of chickens in a commercial farm treated with a salmonella phage cocktail. *Sci. Rep.* 2022; 12, 991.
- Dabrowska K., Switała-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B., Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 98, 7–13.
- Dabrowska K., Abedon, S.T. Pharmacologically aware phage therapy: Pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to phage antibacterial action in animal and human bodies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2019; 83, e00012–e00019.
- Deblais L., Kathayat D., Helmy Y.A., Closs G., Rajashekara G. Translating ‘big data’: better understanding of host-pathogen interactions to control bacterial foodborne pathogens in poultry. *Anim. Health Res. Rev.* 2020; 21, 15– 35.
- Dela Justina V., Miguez J.S., Priviero F., Sullivan J.C., Giachini F.R., Webb R.C. Sex differences in molecular mechanisms of cardiovascular aging. *Front. Aging* 2021; 2, 725884.
- Edwards R.A., McNair K., Faust K., Raes J., Dutilh, B.E. Computational approaches to predict bacteriophage–host relationships. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40(2), 258-272.
- Elbayoumi K.M., Girh Z., Hassan E.R., Amer A.M. Enhancement of immune response against IBD and IB in antibiotic treated mycoplasma gallisepticum serologically positive broiler chickens. *Int. J. Chemtech. Res.* 2017; 9(12), 934– 942.
- Ellis T.N., Leiman S.A., Kuehn M.J. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect. Immun.* 2010; 78, 3822–31.
- Gogokhia L., Buhrke K., Bell R., Hoffman B., Brown D.G., Hanke-Gogokhia C., Ajami N.J., Wong M.C., Ghazaryan A., Valentine J.F., Porter N. Expansion of bacteriophages is linked to aggravated intestinal inflammation and colitis. *Cell host & microbe* 2019; 25(2), 285-299.

- Górski A., Międzybrodzki R., Jończyk-Matysiak E., Borysowski J., Letkiewicz S., Weber-Dąbrowska B. The fall and rise of phage therapy in modern medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2019; 19, 1115–1117.
- Górski A., Międzybrodzki R., Węgrzyn G., Jończyk-Matysiak E., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B. Phage therapy: current status and perspectives. *Med. Res. Rev.* 2020; 40, 459–463.
- Hannah M.F., Bajic V.B., Klein S.L. Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain Behav. Immun.* 2008; 22 (4), 503–16.
- Hofmann T., Schmucker S.S., Bessei W., Grashorn M., Stefanski V. Impact of housing environment on the immune system in chickens: A review. *Animals* 2020; 10, 1–26.
- Kosznik-Kwaśnicka K., Ciemińska K., Grabski M., Grabowski Ł., Górniak M., Jurczak-Kurek A., Węgrzyn G., Węgrzyn A. Characteristics of a series of three bacteriophages infecting *salmonella enterica* strains. *Int. J. Mol. Sci.* 2020a; 21, 6152.
- Kosznik-Kwaśnicka K., Grabowski Ł., Grabski M., Kaszubski M., Górniak M., Jurczak-Kurek A., Węgrzyn G., Węgrzyn A. Bacteriophages vB_Sen-TO17 and vB_Sen-E22, newly isolated viruses from chicken feces, specific for several *salmonella enterica* strains. *Int. J. Mol. Sci.* 2020b; 21, 8821.
- Kwiatek M., Parasion S., Nakonieczna A. Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections – an in vivo studies overview. *J. Appl. Microbiol.* 2020; 128, 985–1002.
- Kwon H.J., Mohammed A.E., Eltom K.H., Albrahim J.S., Alburae N.A. Evaluation of antibiotic-induced behavioral changes in mice. *Physiol. Behav.* 2020; 223, 113015.
- Leclercq S., Mian F.M., Stanisz A.M., Bindels L.B., Cambier E., Ben-Amram H. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat. Commun.* 2017; 8(1), 15062.
- Lee W.J., Majumder Z.R., Jeoung D.I., Lee H.J., Kim S.H., Bae S. Organ-specific gene expressions in C57BL/6 mice after exposure to low-dose radiation. *Radiat. Res.* 2006; 165(5), 562–9.
- Lehti T.A., Pajunen M.I., Skog M.S., Finne J. Internalization of a polysialic acid-binding *Escherichia coli* bacteriophage into eukaryotic neuroblastoma cells. *Nat. Commun.* 2017; 8(1), 1-12.
- Liu D., Van Belleghem J.D., de Vries C.R., Burgener E., Chen Q., Manasherob R., Suh G.A. The safety and toxicity of phage therapy: a review of animal and clinical studies. *Viruses* 2021; 13(7), 1268.

- Lorenzo-Rebenaque L., Malik D.J., Catalá-Gregori P., Marin C., Sevilla-Navarro S. Gastrointestinal dynamics of non-encapsulated and microencapsulated salmonella bacteriophages in broiler production. *Animals* 2022; 12, 144.
- Luong T., Salabarria A.C., Roach D.R. Phage therapy in the resistance era: where do we stand and where are we going? *Clin. Ther.* 2020; 42(9), 1659-1680.
- Łusiak-Szelachowska M., Zaczek M., Weber-Dabrowska B., Międzybrodzki R., Kłak M., Fortuna W. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral. Immunol.* 2014; 27, 295–304.
- Ma B., Mei X., Lei C., Li C., Gao Y., Kong L. Enrofloxacin shifts intestinal microbiota and metabolic profiling and hinders recovery from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium infection in neonatal chickens. *mSphere* 2020; 5, e00725–20.
- Madla C.M., Gavins F.K., Merchant H.A., Orlu M., Murdan S., Basit A.W. Let's talk about sex: differences in drug therapy in males and females. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021; 175, 113804.
- Mestrovic T., Aguilar G.R., Swetschinski L. R., Ikuta K.S., Gray A.P., Weaver N.D., Naghavi M. The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: A cross-country systematic analysis. *The Lancet Public Health*, 2022; 7(11), e897-e913.
- Moelling K., Broecker F., Willy C. A wake-up call: We need phage therapy now. *Viruses* 2018; 10, 688.
- Mukerjee S., Ghosh, S.N. Localization of cholera bacteriophage after intravenous injection. *Ann. Biochem. Exp. Med.* 1962; 22, 73–76.
- Nguyen S., Baker K., Padman B.S., Patwa R., Dunstan R.A., Weston T.A., Schlosser K., Bailey, B., Lithgow T., Lazarou M. Luque, A. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *MBio* 2017; 8(6), e01874-17.
- Otero J., García-Rodríguez A., Cano-Sarabia M., MasPOCH D., Marcos R., Cortés P. Llagostera M. Biodistribution of liposome-encapsulated bacteriophages and their transcytosis during oral phage therapy. *Front. Microbiol.* 2019; 10, 689.
- Pérez J., Contreras-Moreno F.J., Marcos-Torres F.J., Moraleda-Muñoz A., Muñoz-Dorado The antibiotic crisis: How bacterial predators can help. *J. Comput Struct Biotechnol.* 2020; 18, 2547-2555.
- Porayath C., Salim A., Veedu A.P., Babu P., Nair B., Madhavan A., Pal S. Characterization of the bacteriophages binding to human matrix molecules. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 110, 608-615.
- Putra R.D., Lyrawati D. Interactions between bacteriophages and eukaryotic cells. *Scientifica* 2020.

- Redrejo-Rodríguez M., Muñoz-Espín D., Holguera I., Mencía M. Salas M. Functional eukaryotic nuclear localization signals are widespread in terminal proteins of bacteriophages. PNAS 2012; 109(45), 18482-18487.
- Ribeiro M.N., Ribeiro N.L., Bozzi R., Costa R.G. Physiological and biochemical blood variables of goats subjected to heat stress—A review. J. Appl. Anim. Res. 2018; 46, 1036–1041.
- Riesbeck K. Immunomodulating activity of quinolones: Review. J. Chemother. 2002; 14, 3–12.
- Riesbeck K., Ellis T.N., Leiman S.A., Kuehn M.J., Khalifeh M.S., Amawi M.M. Immunomodulating activity of quinolones: Review. Poult. Sci. 2020; 14, 2118–24.
- Roy Sarkar S., Banerjee S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. J. Neuroimmunol. 2019; 328, 98–104.
- Salazar G.A., Peñaloza H.F., Pardo-Roa C., Schultz B.M., Muñoz-Durango N., Gómez R.S. Interleukin-10 production by T and B cells is a key factor to promote systemic *salmonella enterica* serovar typhimurium infection in mice. Front. Immunol. 2017; 8, 889.
- Soto S.M. Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. Antibiotics 2023; 12(3), 451.
- Tetz G.V., Ruggles K.V., Zhou H., Heguy A., Tsirigos A., Tetz, V. Bacteriophages as potential new mammalian pathogens. Sci. Rep. 2017; 7(1), 1-9.
- Tetz G., Brown S.M., Hao Y., Tetz, V. Parkinson's disease and bacteriophages as its overlooked contributors. Sci. Rep. 2018; 8(1), 10812.
- Van Belleghem J.D., Dąbrowska K., Vaneechoutte M., Barr J.J. Bollyky P.L. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. Viruses 2019; 11(1), 10.
- Westerhof I., Van Den Brom W.E., Mol J.A., Lumeij J.T., Rijnberk A. Sensitivity of the hypothalamic-Pituitary-Adrenal system of pigeons (*Columba livia domestica*) to suppression by dexamethasone, cortisol, and prednisolone. Avian Dis. 1994; 38, 435–45.
- Zhang Z., Cao H., Song N., Zhang L., Cao Y., Tai J. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition. Food Chem. Toxicol. 2020; 138, 111237.
- Zhang Y., Luo H., Niu Y., Yang X., Li Z., Wang K. Chronic intermittent hypoxia induces gut microbial dysbiosis and infers metabolic dysfunction in mice. Sleep Med. 2022; 91, 84–92.
- Zhou Q., Lan F., Li X., Yan W., Sun C., Li J. The spatial and temporal characterization of gut microbiota in broilers. Front. Veterinary Sci. 2021; 8.

Pozostałe osiągnięcia naukowe

b) Weryfikacja potencjału terapeutycznego genisteiny w chorobie Alzheimera i jej działania profilaktycznego niwelującego fizjologiczną (stopniową) utratę funkcji kognitywnych

Choroba Alzheimera (AD) jest jedną z najczęściej diagnozowanych chorób neurodegeneracyjnych na świecie. Według danych szacunkowych w Polsce cierpi na nią ponad pół miliona osób. Na świecie liczba ta sięga 55 milionów, a do roku 2050 ma przekroczyć 139 milionów (wg. Alzheimer's Disease International, Dementia statistics). Główne symptomy to: zaburzenia pamięci, trudności w podejmowaniu decyzji i zmiany w zachowaniu (Scheltens i wsp., 2016). Na poziomie molekularnym schorzenie to charakteryzuje się pojawieniem się blaszek starczych i wewnątrzneuronalnych splątków neurofibrylarnych. Te patologiczne struktury składają się z β -amyloidu (β A) i hiperfosforylowanego białka tau (p-tau) (Sanabria-Castro i wsp., 2017). Należy jednak zauważyć, że szczegółowy mechanizm choroby Alzheimera nie został w pełni wyjaśniony, a niektóre hipotezy zakładają, że akumulacja β A i p-tau jest raczej skutkiem, a nie pierwotną przyczyną obserwowanych zmian patofizjologicznych (Szutowicz i wsp., 2017). Niemniej jednak, niezależnie od tego jaka jest etiologia choroby przyjmuje się, że akumulacja β A (szczególnie β A40 i β A42) i p-tau powoduje postępującą degenerację neuronów, co prowadzi do opisanych powyżej symptomów (Sanabria-Castro i wsp., 2017). Pomimo szeroko zakrojonych badań nad chorobą Alzheimera, do tej pory nie jest dostępna żadna skuteczna terapia.

Jednym z nowszych i obiecujących podejść jest stymulacja autofagii. Przypuszcza się, że może to efektywnie prowadzić do degradacji nagromadzonych agregatów patogennych makromolekuł, eliminując w ten sposób przyczynę neurodegeneracji (Pierzynowska i wsp., 2018a). Największym ograniczeniem w stosowaniu większości znanych stymulatorów autofagii jest to, że nie spełniają one kryteriów środków terapeutycznych przeznaczonych do długotrwałego stosowania. W szczególności takie związki powinny nie tylko przekraczać barierę krew-mózg i stymulować autofagię, ale także działać na tyle łagodnie, aby uniknąć niszczenia prawidłowych komórek podczas długotrwałego procesu leczenia, a tym samym wykluczyć możliwość wystąpienia poważnych działań niepożądanych (Yang i wsp., 2013). Związkiem spełniającym powyższe kryteria jest genisteina – izoflawon, występujący w roślinach z rodziny Fabaceae. Cząsteczka ta, przekracza barierę krew-mózg (Tsai, 2005) i jest nietoksyczna dla zwierząt, nawet gdy jest stosowana w wysokich dawkach, tj. 160 mg/kg/dzień (Malinowska i wsp., 2009). Badania kliniczne, przeprowadzone z udziałem dzieci cierpiących na chorobę Sanfilippo (jedna z mukopolisacharydoz, grupa lizosomalnych chorób spichrzeniowych) potwierdziły bezpieczeństwo jej długotrwałego (ponad rok) stosowania w wysokiej dawce (150 mg/kg/dzień) (Kim i wsp., 2013). Oprócz stymulacji biogenezy

lizosomalnej, ze względu na aktywację czynnika transkrypcyjnego EB (TFEB) (Moskot i wsp., 2014), genisteina indukuje autofagię, co prowadzi do eliminacji agregatów zmutowanej huntingtyny w komórkowym modelu choroby Huntingtona (Pierzynowska i wsp., 2018b).

W związku z powyższym celem przeprowadzonych badań było zweryfikowanie czy genisteina podawana codziennie w wysokiej dawce (150 mg/kg/dzień) może poprawiać parametry biochemiczne i behawioralne w szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera. W niniejszych badaniach użyty został model indukowany podaniem streptozotocyny do komór bocznych mózgu szczura. Efektem jest insulinooporny stan mózgu, który jednocześnie odzwierciedla biochemiczne, morfologiczne i behawioralne zmiany, obserwowane u pacjentów ze sporadyczną postacią choroby, która stanowi 85 % wszystkich diagnozowanych przypadków. Uzyskane wyniki wskazują, że wysoka dawka genisteiny (150 mg/kg/dzień) na drodze aktywacji autofagii doprowadziła do całkowitej degradacji agregatów β -amyloidu i hiperfosforylowanego białka tau w mózgu szczurów z indukowaną streptozotocyną chorobą Alzheimera. Ponadto, podawany izoflawon powodował normalizację zachowania zwierząt z AD tak, że były one praktycznie nie odróżnialne od osobników z grupy kontrolnej we wszystkich przeprowadzonych testach behawioralnych: labiryncie wodnym Morrisa, teście uniesionego labiryntu krzyżowego, teście otwartego pola i analizie aktywności lokomotorycznej w aktometrach. Oprócz korekty zaburzeń behawioralnych, obserwowana była poprawa parametrów biochemicznych. Sporadyczna postać choroby Alzheimera jest niewątpliwie spowodowana wieloma czynnikami takimi, jak: akumulacja agregatów białkowych, nasilona apoptoza, stres oksydacyjny oraz neurozapalenie. Dlatego też, aby potencjalna terapia okazała się w pełni skuteczna, musi hamować wszystkie te patologiczne procesy. Jak wiadomo genisteina nie tylko indukuje autofagię, co prowadzi do degradacji agregatów białkowych, ale także chroni neurony przed apoptozą, neurozapaleniem i stresem oksydacyjnym, a do tego jest bezpieczna nawet przy długotrwałym stosowaniu w wysokich dawkach. Jest więc to unikalna cząsteczka o plejotropowym działaniu, co potwierdziły nie tylko badania na modelach komórkowych, ale także na szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera.

Wyniki uzyskane w ramach powyższych doświadczeń zostały opublikowane:

Pierzynowska K., **Podlacha M.**, Gaffke L., Majkutewicz I., Mantej J., Węgrzyn, A., Osiadły M., Myślińska D., Węgrzyn G. Autophagy-dependent mechanism of genistein-mediated elimination of behavioral and biochemical defects in the rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2019; 148, 332-346.

IF (WoS): 2019 (2-letni): 4,431; 2019 (5-letni): 4,512

Liczba punktów MEiN: 140

Ponadto, zostały one objęte ochroną patentową.

Nazwa: Genisteina do zastosowania do leczenia choroby Alzheimera.

Numer patentu: 237739

Data udzielenia: 17.05.2021

Mój wkład w powyższe osiągnięcie obejmował:

opiekę i przygotowanie zwierząt, będących modelem sporadycznej postaci choroby Alzheimera; podawanie genisteiny; zaplanowanie i przeprowadzenie wszystkich eksperymentów behawioralnych (pomiar aktywności lokomotorycznej w aktometrach, labirynt wodny Morrisa, test uniesionego labiryntu krzyżowego, test otwartego pola); analizę statystyczną i prezentację graficzną wyników uzyskanych na zwierzęcym modelu AD; przygotowanie części manuskryptu obejmującej badania na modelu zwierzęcym (opis materiałów i metod, wyników oraz dyskusja – wiodący autor równorzędny). Ponadto, udział ten obejmował przygotowanie części wniosku patentowego, dotyczącego opisu metod i uzyskanych wyników na zwierzęcym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera (współtwórca patentu).

Funkcje kognitywne (poznawcze) definiowane są, jako zespół procesów umysłowych, determinujących prawidłowy odbiór, przetwarzanie, kodowanie i wykorzystanie bodźców, docierających ze środowiska zewnętrznego przez ośrodkowy układ nerwowy. Do najważniejszych zalicza się: percepcję, uwagę i pamięć. Powszechnie wiadomo, że procesy starzenia negatywnie oddziałują na sprawność funkcji poznawczych, co skutkuje tym, że systematycznie zwiększa się liczba osób, u których potwierdza się zaburzenie funkcji kognitywnych o różnym stopniu nasilenia lub wręcz otępienie (Elliott i wsp., 2021). Pomiędzy stopniową (fizjologiczną) utratą funkcji poznawczych, a otępieniem, istnieje wiele stanów pośrednich, które charakteryzuje złożoność symptomów, co utrudnia postawienie szybkiej i właściwej diagnozy. Dlatego ważne jest, aby odpowiednio wcześniej upowszechnić stosowanie właściwych związków profilaktycznych, które pozwolą na zapobieganie postępującej utracie funkcji kognitywnych.

W wyniku wcześniej przeprowadzonych doświadczeń na szczurzym modelu sporadycznej postaci choroby Alzheimera okazało się, że genisteina wspomaga procesy pamięciowe u zwierząt z grupy kontrolnej. W związku z powyższym podjęta została próba weryfikacji potencjału profilaktycznego genisteiny w niwelowaniu fizjologicznej (stopniowej) utraty funkcji kognitywnych u samic i samców myszy szczepu CBA/C57BL w wieku, odpowiednio: 6 miesięcy, 12 miesięcy oraz 18 miesięcy. Według danych literaturowych (Dutta i Sengupta, 2016), 1 rok życia człowieka odpowiada 9 dniom z życia myszy, stąd też wybrany do analizy wiek, to w przeliczeniu na życie człowieka: 20 lat, 40 lat i 60 lat. Suplementację

genisteiną rozpoczęto, gdy zwierzęta miały 4 miesiące. Izoflawon był podawany codziennie w dawce 150 mg/kg/dzień w objętości 0,2 ml za pomocą metalowego zgłębnika dożołądkowego, co gwarantowało dostarczenie do organizmu myszy pożądanej dawki. Ocena parametrów kognitywnych została przeprowadzona w teście labiryntu wodnego Morrisa, a potwierdzeniem uzyskanych wyników była ich weryfikacja w uniesionym labiryncie krzyżowym oraz teście rozpoznawania nowego obiektu.

We wszystkich analizowanych parametrach, widoczny jest istotny statystycznie potencjał profilaktyczny genisteiny w zapobieganiu stopniowej (fizjologicznej) utracie funkcji kognitywnych, która ulega nasileniu wraz z wiekiem. Pozytywny wpływ na procesy pamięciowe dotyczy zarówno samców, jak i samic, u których jak pokazały badania zaburzenia otępienne pojawiają się szybciej i są trudniejsze w terapii.

Wyniki uzyskane w ramach powyższych doświadczeń zostały objęte zgłoszeniem patentowym: Rozszerzenie zakresu ochrony patentowej na podstawie zgłoszenia europejskiego (Numer zgłoszenia: EP22208963.3, data: 22.11.2022) w oparciu o przedmiotowe zgłoszenie polskie P440869.

Mój wkład w powyższe osiągnięcie obejmował:

opiekę i przygotowanie zwierząt; podawanie genisteiny; zaplanowanie i przeprowadzenie wszystkich eksperymentów behawioralnych (labirynt wodny Morrisa, uniesiony labirynt krzyżowy, test rozpoznawania nowego obiektu); analizę statystyczną i prezentację graficzną uzyskanych wyników; przygotowanie części wniosku patentowego, dotyczącej opisu metod i uzyskanych wyników na myszach suplementowanych genisteiną (współtwórca zgłoszenia patentowego).

Literatura

- Dutta S., Sengupta P. Men and mice: relating their ages. *Life sci.* 2016; 152, 244-248.
- Elliot V., Morgan D., Kosteniuk J., Bayly M., Froehlich Chow A., Cammer A., O'Connell M. E. Palliative and end-of-life care for people living with dementia in rural areas: A scoping review. *PloS one* 2021; 16(1), e0244976.
- Kim K.H., Dodsworth C., Paras A., Burton B.K. High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system. *Mol. Genet. Metab.* 2013; 109, 382–385.
- Malinowska M., Wilkinson F.L., Bennett W., Langford-Smith K.J., O'Leary H.A., Jakobkiewicz-Banecka J., Wynn R., Wraith J.E., Wegrzyn G., Bigger, B.W. Genistein reduces lysosomal storage in peripheral tissues of mucopolysaccharide IIIB mice. *Mol. Genet. Metab.* 2009; 98, 235–242.

- Moskot M., Montefusco S., Jakóbkiewicz-Banecka J., Mozolewski P., Węgrzyn A., Di Bernardo D., Węgrzyn G., Medina D.L., Ballabio A., Gabig-Cimińska M. The phytoestrogen genistein modulates lysosomal metabolism and transcription factor EB (TFEB) activation. *J. Biol. Chem.* 2014; 289, 17054–17069.
- Pierzynowska K., Gaffke L., Cyske Z., Puchalski M., Rintz E., Bartkowski M., Osiały M., Pierzynowski M., Mantej J., Piotrowska E., Węgrzyn G. Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metab. Brain Dis.* 2018a; 33, 989–1008.
- Pierzynowska K., Gaffke L., Hać A., Mantej J., Niedziałek N., Brokowska J., Węgrzyn G. Correction of Huntington's disease phenotype by genistein-induced autophagy in the cellular model. *NeuroMolecular Med.* 2018b; 20, 112–123.
- Sanabria-Castro A., Alvarado-Echeverría I., Monge-Bonilla C. Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: an update. *Ann. Neurosci.* 2017; 24(1), 46-54.
- Scheltens P., Blennow K., Breteler M.M., De Strooper B., Frisoni G.B., Salloway S., Van der Flier W.M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet* 2016; 388(10043), 505-517.
- Szutowicz A., Bielarczyk H., Zyśk M., Dyś A., Ronowska A., Gul-Hinc S., Klimaszewska-Łata J. Early and late pathomechanisms in Alzheimer's disease: from zinc to amyloid- β neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 2017; 42, 891–904.
- Tsai T.H. Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. *J. Chromatogr. A* 2005; 1073, 317–322.
- Yang Y.P., Hu L.F., Zheng H.F., Mao C.J., Hu W.D., Xiong K.P., Wang F., Liu C.F. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol. Sin.* 2013; 34, 625–635.

c) Opracowanie, rewizja i walidacja funkcjonalnych biomarkerów choroby Huntingtona, pozwalających na wczesną diagnostykę oraz monitorowanie progresji, jak i skuteczności jej terapii w oparciu o model myszy R6/1

Choroba Huntingtona (HD) jest genetyczną chorobą neurodegeneracyjną. Gen *IT15*, który koduje białko huntingtynę (HTT), zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 4. Pierwszy ekson tego genu ma polimorficzny region ze zmienną liczbą powtórzeń tripletowych CAG, kodujących glutaminę. Mutacja powodująca chorobę polega na zwielokrotnieniu tripletu CAG – objawy rozwijają się po przekroczeniu 35 powtórzeń. Dziedziczenie HD jest autosomalne dominujące (Testa i Jankovic, 2019). Obecność wielu powtórzeń glutaminy na N-terminalnym

końcu huntingtyny prowadzi do ekspresji nieprawidłowej formy tego białka (mHTT). Jest to najbardziej widoczne w ośrodkowym układzie nerwowym, ale także w tkankach obwodowych (Lin i wsp., 2019). Konsekwencjami aktywności mHTT w komórce są: ekscytotoksyczność, stan zapalny, dysfunkcja mitochondriów, hamowanie proteasomu i autofagii (Andre i wsp., 2016; Jędrak i wsp., 2018). Dysfunkcja ruchowa, zaburzenia funkcji poznawczych i problemy psychiatryczne, to triada objawów typowych dla HD. Klinicznie, choroba jest najczęściej diagnozowana wraz z pojawieniem się charakterystycznych zaburzeń ruchowych, następnie przeprowadzane są badania genetyczne w celu ostatecznego potwierdzenia diagnozy. Okazuje się, że deregulacja odpowiedzi immunologicznej, przejawiająca się chronicznym stanem zapalnym, wyrażonym podwyższonym stężeniem cytokiny prozapalnej, jaką jest IL-6 w osoczu krwi pacjentów, rozpoczyna się nawet 15 lat przed wystąpieniem pierwszych objawów motorycznych (Crotti i Glass, 2015). Akumulacja mHTT bezpośrednio wpływa na jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, powodując zwiększoną ekspresję genów prozapalnych, a tym samym produkcję prozapalnych chemokin i cytokin takich, jak: IL-6, IL-8 i TNF- α (Cho, 2019). Z uwagi na fakt, że progresja HD jest powolna, a pierwsze symptomy takie, jak zmiany osobowości, zaburzenia poznawcze lub depresja są niespecyficzne, wczesne postawienie prawidłowej diagnozy jest niezwykle trudne. Jest to szczególnie problematyczne, gdy mamy do czynienia z pojawieniem się pierwszego przypadku choroby w danej rodzinie. Wówczas retrospektywna ocena potwierdza identyfikację wczesnych objawów patofizjologicznych, znacznie wyprzedzających symptomy motoryczne typowe dla HD. Od kilku lat w ramach Europejskiej Sieci Badawczej HD (ang. EHDN), prowadzone są wielokierunkowe badania mające na celu określenie czułych i specyficznych biomarkerów (Testa i Jankovic, 2019).

Dlatego też, celem niniejszych doświadczeń było zweryfikowanie możliwości potencjalnego wykorzystania biomarkerów takich, jak: cytokiny prozapalne i wykazujące działanie przeciwzapalne, stężenie glukozy i kortykosteronu, których poziomy były dodatkowo skorelowane z procesami poznawczymi, aktywnością lokomotoryczną i zmianami masy ciała we wczesnej diagnostyce i monitorowaniu progresji HD, przy użyciu mysiego modelu choroby. Odpowiedni biomarker musi spełniać kilka podstawowych kryteriów: być łatwy do oznaczenia, powtarzalny i skorelowany z progresją choroby. Spośród trzech głównych kategorii biomarkerów, tak zwane mokre, tj. te analizowane we krwi lub innych płynach ustrojowych oraz te, które pozwalają na nieinwazyjne obrazowanie zmian zachodzących np. w ośrodkowym układzie nerwowym, mają szczególne znaczenie. Kluczowym aspektem procesu walidacji biomarkerów jest możliwość standaryzacji i czułości metod ich oznaczania, a także zachowanie wiarygodności statystycznej na etapie analizy uzyskanych danych (Przybył i wsp., 2021). Biomarkery takie jak cytokiny, mogą być pomocne w określeniu stopnia aktywacji układu odpornościowego, a tym samym stadium ciężkości choroby. Na uwagę zasługuje fakt, że ich synteza ma miejsce zarówno na obwodzie, jak i ośrodkowo przez neurony oraz komórki glejowe,

co pozwala pośrednio i w nieinwazyjny sposób monitorować zmiany w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, które wynikają z progresji choroby (Barro i Zetterberg, 2021). Ponadto, dane literaturowe wskazują, że zmiany stężenia cytokin są widoczne na przedobjawowym etapie choroby i utrzymują się podczas progresji dysfunkcji ruchowej (Cho, 2019). Pomimo wielu lat badań, wciąż brakuje biomarkerów, które pełniłyby podwójną rolę. Z jednej strony umożliwiłyby monitorowanie progresji choroby, a z drugiej dzięki wiarygodnej walidacji, nadawałyby się do obiektywnej oceny skuteczności potencjalnych metod terapii. HD jest chorobą przewlekłą, a więc ma fazę przedobjawową, w której dysfunkcja ruchowa jest jeszcze niezauważalna, natomiast obwodowe procesy patologiczne wynikające z akumulacji nieprawidłowego białka (mHTT) nadal postępują. Konieczność znalezienia odpowiednich biomarkerów została nawet ogłoszona przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków, która wzywa badaczy do kontynuowania badań w obszarze monitorowania progresji zmian patofizjologicznych w przebiegu HD.

Dzięki koncepcji łączenia parametrów obwodowej odpowiedzi immunologicznej z procesami poznawczymi, poziomem glukozy i kortykosteronu, a także pomiarami masy ciała w krytycznych punktach czasowych progresji choroby, monitorowanie i weryfikowanie skuteczności potencjalnych metod terapeutycznych u mężczyzn, jak i kobiet, może stać się bardziej efektywne i skuteczne. W niniejszych doświadczeniach zbadanych zostało po raz pierwszy tak wiele parametrów dotyczących układu odpornościowego i procesów poznawczych, których zmiany były monitorowane w ośmiu punktach czasowych, odzwierciedlających krytyczne etapy progresji objawów HD. Ponadto, wzięta została pod uwagę zmienność markerów u zwierząt obu płci, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia czynników wpływających na progresję tego zaburzenia. Wśród wskaźników oznaczanych we krwi obwodowej, odnotowano znaczne podwyższenie markerów stanu zapalnego (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-12), których stężenie systematycznie wzrastało od pierwszego do ostatniego pomiaru. Ponadto, na wczesnym etapie choroby zaobserwowano znaczne upośledzenie przeciwwzapalnych mechanizmów obronnych, wyrażone obniżeniem poziomu IL-10. Warto również podkreślić, że wykazana została nadmierna aktywacja osi stresowej podwzgórze-przysadka-nadnercza, co przejawiało się podwyższonym stężeniem kortykosteronu, który pośrednio może przyczyniać się do upośledzenia funkcji poznawczych, a także nasilać zaburzenia motoryczne. W przypadku wielu analizowanych biomarkerów, odnotowano szybszą progresję opisywanych zaburzeń u samic, co może przekładać się na mniejszą skuteczność potencjalnych metod terapeutycznych u kobiet dotkniętych HD.

Podsumowując, przedstawione zostało zestawienie potencjalnych przedklinicznych biomarkerów HD, które w nieinwazyjny sposób pozwolą na wykrywanie i monitorowanie progresji określonych kategorii objawów, których nasilenie zależy również od płci. Wskaźniki te, odpowiadają złożonym aspektom zaburzeń patofizjologicznych, które wpływają zarówno na parametry oznaczane w tkankach obwodowych, jak i w ośrodkowym układzie nerwowym. Bardzo ważną zaletą prezentowanych biomarkerów jest możliwość monitorowania ich zmian we

wczesnym, przedobjawowym stadium choroby, co może ułatwić kierowanie potencjalnych pacjentów na badania genetyczne i lepsze ich przygotowanie do ewentualnej diagnozy, potwierdzającej wykrycie choroby. W przyszłości, gdy zostanie opracowana terapia, proponowane biomarkery pozwolą na lepsze monitorowanie jej skuteczności, służąc jako specyficzne punkty krytyczne nasilenia określonych grup objawów, a także pozwolą na lepsze dostosowanie metod wspomagających leczenie.

Wyniki uzyskane w ramach powyższych doświadczeń zostały opublikowane:

Podlacha M., Pierzynowska K., Gaffke L., Jerzemowska G., Piotrowska E., Węgrzyn G. Behavioral- and blood-based biomarkers for Huntington's disease: Studies on the R6/1 mouse model with prospects for early diagnosis and monitoring of the disease. *Brain, Behavior and Immunity – Health* 2022; 23, 100482.

Kompletna lista moich publikacji naukowych została przedstawiona w załączniku: „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”

Literatura

- Andre R., Carty L., Tabrizi S.J. Disruption of immune cell function by mutant huntingtin in Huntington's disease pathogenesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2016; 26, 33–38.
- Barro C., Zetterberg H. The blood biomarkers puzzle – a review of protein biomarkers in neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Methods* 2021; 361, 109281.
- Cho K. Emerging roles of complement protein C1q in neurodegeneration. *Aging Dis.* 2019; 10, 652–663.
- Crotti A., Glass C.K. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. *Trends Immunol.* 2015; 36, 364–373.
- Jędrak P., Mozolewski P., Węgrzyn G., Więckowski M.R. Mitochondrial alterations accompanied by oxidative stress conditions in skin fibroblasts of Huntington's disease patients. *Metab. Brain Dis.* 2018; 33, 2005–2017.
- Lin Y.H., Maaroufi H.O., Ibrahim E., Kucerova L., Zurovec M. Expression of human mutant huntingtin protein in *Drosophila* hemocytes impairs immune responses. *Front. Immunol.* 2019; 10.
- Przybyl L., Wozna-wysocka M., Kozłowska E., Fiszer A. What, when and how to measure—peripheral biomarkers in therapy of huntington's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22, 1–21.

- Testa C.M., Jankovic J. Huntington disease: a quarter century of progress since the gene discovery. J. Neurol. Sci. 2019; 396, 52–68.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Poniżej prezentuję przegląd mojej działalności naukowej.

W roku 2011 rozpoczęłam studia III stopnia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. W ramach przygotowywanej rozprawy doktorskiej pt. „Aktywność behawioralna i immunologiczna w warunkach aktywacji receptorów glutaminianergicznych typu NMDA jądra przyśrodkowej przegrody (*medial septum*) i zmienności indywidualnej u szczurów” doskonaliłam umiejętności z zakresu neurofizjologii, które obejmowały m.in. wykonywanie implantacji stereotaktycznych kaniul/elektrod do mózgowia szczurów, barwienia immunofluorescencyjne i immunohistochemiczne, cytometrię przepływową, analizę wzorca zachowań w oparciu o testy behawioralne, a także ocenę parametrów obwodowej i ośrodkowej odpowiedzi immunologicznej. Uzyskane wyniki zostały opublikowane:

Podlacha M., Glac W., Listowska M., Grembecka B., Majkutewicz I., Myślińska D., Plucińska K., Jerzemowska G., Grzybowska M., Wrona D. Medial septal NMDA glutamate receptors are involved in modulation of blood natural killer cell activity in rats. JNIP 2016; 11(1), 121-132. (autor wiodący), a także były prezentowane na licznych międzynarodowych konferencjach naukowych. Ponadto, decyzją Komitetu Naukowego European College of Neuropharmacology (ECNP) w uznaniu za prowadzone badania znalazłam się w gronie 100 młodych naukowców z całej Europy, którzy otrzymali zaproszenie do wzięcia udziału w warsztatach organizowanych przez ECNP w Nicei (03.2014), a także możliwość opublikowania wyników swoich badań w Journal of the European College. Dwa lata później otrzymałam dofinansowanie udziału oraz możliwość zaprezentowania wyników swojej pracy podczas 22nd Annual Meeting of the Society on Neuroimmune Pharmacology (SNIP). W trakcie studiów doktoranckich byłam kierownikiem 4 projektów dla Młodych Badaczy, finansowanych przez Uniwersytet Gdański, a także wykonawcą w 4 projektach, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki.

Po obronie rozprawy doktorskiej rozpoczęłam pracę w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, na stanowisku adiunkta. Tematyka prowadzonych przeze mnie badań naukowych obejmuje: indywidualizację procesów poznawczych u osobników, różniących się wrażliwością na stres; związek między modulacyjnym wpływem układu odpornościowego na dysfunkcję receptorów typu NMDA, a występowaniem takich schorzeń, jak: schizofrenia czy depresja; obustronne powiązania między układem odpornościowym i

ośrodkowym układem nerwowym. Jednak w ostatnim czasie głównym przedmiotem mojego zainteresowania naukowego jest terapia chorób neurodegeneracyjnych i genetycznych z wykorzystaniem naturalnych substancji pochodzenia roślinnego oraz bezpieczeństwo i skuteczność fagoterapii w zwalczaniu zakażeń bakteriami wielolekoopornymi. Od początku mojej pracy w Katedrze Biologii Molekularnej jestem zaangażowana w realizację licznych projektów: 4 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz 2 finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Zdobyte umiejętności z zakresu neurofizjologii i psychoneuroimmunologii, a także poznanie podstawowych technik biologii molekularnej zaowocowało, przy wsparciu Kierownika Katedry - Pana Profesora Grzegorza Węgrzyna - współpracą z innymi jednostkami naukowymi.

Od maja 2018 roku do chwili obecnej współpracuję z Katedrą i Zakładem Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanym przez Pana Profesora Ryszarda Smoleńskiego, w którym w ramach kilku krótkoterminowych staży, realizuję prace badawcze dotyczące poznania molekularnego mechanizmu choroby Huntingtona, opracowania nieinwazyjnych biomarkerów, a także opracowania potencjalnych możliwości terapeutycznych tej choroby na modelach zwierzęcych. Część uzyskanych wyników z prowadzonych badań została opublikowana w postaci dwóch artykułów oryginalnych, a kolejne są w przygotowaniu.

- Pierzynowska K., **Podlacha M.**, Łuszczek D., Rintz E., Gaffke L., Szczudło Z., Tomczyk M., Smoleński R.T., Węgrzyn G. Hair dysmorphology in the R6/1 and R6/2 mouse models of Huntington's disease. *Gene* 2021; 765, 145133.
- Tomczyk M., Braczko A., Mierzejewska P., **Podlacha M.**, Krol O., Jablonska P., Jedrzejewska A., Pierzynowska K., Węgrzyn G., Słomska E.M., Smolenski R.T. Rosiglitazone Ameliorates Cardiac and Skeletal Muscle Dysfunction by Correction of Energetics in Huntington's Disease. *Cells*. 2022; 11(17), 2662.

W roku 2019 rozpoczęła się moja współpraca z Profesorem Andreiem Sibirnym z Instytutu Biologii Komórki (NAS, Ukraina) oraz Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego. Celem wykonywanych badań podczas krótkoterminowego stażu (przełom 2019/2020 roku, Uniwersytet Rzeszowski) było określenie poziomu przeciwciał neutralizujących anty-SARS-CoV-2, skierowanych przeciwko domenie wiążącej receptor (ang. receptor-binding domain, RBD), która jest obecna na podjednostce S1 białka S w mysich surowicach po stymulacji podaniem dopyszczkowym (*per os*) preparatów, zawierających białka/komórki drożdży *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), należących do rzędu *Saccharomycetales*, w kontekście opracowania potencjalnej szczepionki przeciwko COVID-19. Część uzyskanych wyników została zaprezentowana podczas 6th Ukrainian Congress for Cell Biology (Yaremche, Ukraina) oraz 1st Polish Yeast Conference (Rzeszów, Polska), a także zostanie opublikowana (manuskrypt w przygotowaniu).

W maju 2019 roku rozpoczęła się również moja współpraca z Prof. Adrianą Miką z Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Celem prowadzonych badań jest określenie defektów behawioralnych, fizjologicznych, anatomicznych i histopatologicznych, wywołanych mutacją w genie *ELOVL1* u myszy, które nie zostały do tej pory opisane. W związku z tym, że doświadczenia są prowadzone zgodnie ze standardami zalecanymi przez International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC), prowadzone są dwie główne linie badawcze: behawioralno-metaboliczna oraz fizjologiczno-histologiczna. Pierwsza ścieżka obejmuje: ogólną ocenę neurologiczną; pomiar koordynacji ruchowej, motoryki, męczliwości i siły uchwytu; ocenę procesów kognitywnych; poziomu lęku; aktywności, rytmu dobowego i funkcji metabolicznych. Natomiast, doświadczenia w ramach drugiej ścieżki obejmują: obserwacje anatomiczne (układ kostny, deformacje szkieletu); analizę funkcji sercowo-naczyniowych (pulsoksymetria); badanie krzywej cukrowej; termoregulację (pomiar temperatury ciała w odpowiedzi na zmianę termicznych uwarunkowań zewnętrznych u zwierząt w narkozie); elektrofizjologię (elektromiografia i rejestracje neurofizjologiczne); badania histologiczne. Z uwagi na dużą liczbę analizowanych parametrów i wysoką śmiertelność myszy, doświadczenia są cały czas kontynuowane.

Rok 2021 przyniósł rozpoczęcie współpracy z dr Martą Krychowiak-Maśnicką z zespołu kierowanego przez Panią Profesor Aleksandrę Królicką z Zakładu Badania Związków Biologicznie Czynnych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach prowadzonych doświadczeń zajmowałam się oceną bezpieczeństwa środka antybakteryjnego z tkanek rosiczki *Drosera gigantea*, który był podawany miejscowo, dopyszczkowo (*per os*) oraz dootrzewnowo myszom BALB/c. Analizy obejmowały morfologię i biochemię krwi obwodowej, histologię, a także ocenę ogólną stanu zwierząt. Część uzyskanych wyników została zaprezentowana podczas 8th Central European Congress of Life Science (Eurobiotech 2022; Kraków, Polska), a także zostanie opublikowana (manuskrypt w przygotowaniu). Ponadto, uzyskane wyniki są podstawą złożonego zgłoszenia patentowego na wynalazek: „Sposób otrzymywania środka antybakteryjnego z tkanek rosiczki *Drosera gigantea* zawierającego związki przeciwbakteryjne, środek antybakteryjny zawierający związki przeciwbakteryjne oraz zastosowanie tego środka”, numer zgłoszenia P.437775 (WIPO ST 10/C PL43775, 05.05.2021).

Oprócz doświadczeń realizowanych w ramach współpracy z opisanymi powyżej jednostkami naukowymi, eksperymentów przeprowadzanych jako wykonawca projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki lub z innych źródeł zewnętrznych, od września 2021 roku kierowałam realizacją działania naukowego, na które uzyskałam finansowanie w ramach konkursu Miniatura 5 (nr decyzji DEC-2021/05/X/NZ4/0021). Celem działania naukowego „Ocena ośrodkowej odpowiedzi immunologicznej indukowanej obecnością bakteriofagów w tkance nerwowej” było sprawdzenie hipotezy czy bakteriofagi podawane

doustnie indukują ośrodkową odpowiedź immunologiczną, wpływając tym samym na funkcjonowanie mózgowia. Prowadzone badania mają niezwykle istotne znaczenie, szczególnie w kontekście bezpieczeństwa fagoterapii, gdyż w literaturze pojawiają się doniesienia, że fagi obecne w ośrodkowym układzie nerwowym mogą być identyfikowane przez komórki glejowe jako wirusy, wówczas może dojść do aktywacji ośrodkowych procesów zapalnych, które mogą przyczyniać się do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. W celu oceny czy podanie bakteriofagów może wpływać na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego, przy pomocy testów behawioralnych, zbadane zostały procesy pamięciowe (test rozpoznawania nowego obiektu, test uniesionego labiryntu krzyżowego), zdolność uczenia się (labirynt wodny Morrisa), reakcje na stres (test otwartego pola). Z uwagi na to, że obecność różnych wirusów prowadzi do odpowiedzi immunologicznej, zmierzony został poziom markerów stanu zapalnego (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TNF- β) w lizatach z tkanki nerwowej (Western-blotting) oraz w osoczu krwi obwodowej (test immunoenzymatyczny ELISA), a także sprawdzone zostały parametry układu czerwono- i białokrwinkowego (analiza hematologiczna). Ponadto, określony został poziom IgG w osoczu krwi obwodowej, który potwierdził migrację fagów z przewodu pokarmowego do krwi. Obecność badanych bakteriofagów w ośrodkowym układzie nerwowym została zweryfikowana poprzez ich miareczkowanie w homogenatach z mózgów i narządów obwodowych, pobranych od myszy, a także przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Realizacja niniejszego działania naukowego pozwoliła na potwierdzenie hipotezy, która zakładała możliwość migracji podawanych doustnie bakteriofagów do tkanki nerwowej. Ponadto, przeprowadzenie eksperymentów na myszach obu płci dało możliwość zaobserwowania różnic w zdolnościach przemieszczania się bakteriofagów, które różnią się nie tylko budową, ale przede wszystkim materiałem genetycznym. Uzyskane wyniki potwierdziły, że bariera krew-mózg, która u samic cechuje się większą przepuszczalnością, pozwala na wnikanie do głębiej położonych struktur mózgu, fagów o większych rozmiarach. Bardzo istotnym elementem uzyskanych wyników jest potwierdzenie bezpieczeństwa stosowania preparatów fagowych zarówno u samców, jak i u samic. Dzięki złożonej analizie zachowania udało się stwierdzić, że myszy otrzymujące fagi, pomimo tego, że wnikają one nie tylko do mózgowia, ale również narządów obwodowych, nie odbiegają wzorcem behawioralnym od zwierząt z grup kontrolnych. Kolejnym ważnym aspektem prowadzonych badań były parametry immunologiczne. Zarówno obwodowa, jak i ośrodkowa odpowiedź immunologiczna, wyrażona przede wszystkim równowagą cytokinową, a także wskaźnikami morfologicznymi, nie zostały zaburzone po podaniu bakteriofagów. Realizacja niniejszego zadania naukowego stanowi ważny element mojej kariery naukowej, gdyż pozwoliła na pozyskanie wyników, stanowiących trzon dwóch bardzo obszernych manuskryptów: pierwszy z nich „*Sex-dependent differences in behavioral and immunological responses to antibiotic and bacteriophage administration in mice*” jest częścią głównego osiągnięcia habilitacyjnego, a drugi jest aktualnie w przygotowaniu. Ponadto, mechanizm molekularny obserwowanych interakcji

będzie przedmiotem badań i jednym z głównych celów projektu, który zostanie złożony w ramach konkursu SONATA, a także wpisuje się w tematykę głównego nurtu prowadzonych przeze mnie badań.

Należy podkreślić, że część opisanych powyżej badań została wykonana przeze mnie w jednostkach naukowych, z którymi współpracuję, w szczególności w jednostkach organizacyjnych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania te wykonywałam w ramach krótkoterminowych staży naukowych. W ten sposób spełniony został przeze mnie wymóg prowadzenia istotnej aktywności naukowej w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej.

Oprócz powyżej przedstawionych aspektów mojej działalności naukowej, jestem również współautorką 36 publikacji naukowych oraz 3 rozdziałów w książkach:

- Hopes and disappointments related to the use of flavonoids in therapeutical approaches. W: Modulation of Oxidative Stress: Biochemical, Physiological and Pharmacological aspects. Edited by: Luciano Saso, Alessandro Giuffrè, Giuseppe Valacchi and Mauro Maccarrone, 2023; ISBN: 978-0-443-19247-0.
- Genistein-a natural antioxidant and its use in treatment of various diseases. W: Bentham briefs in biomedicine and pharmacotherapy: oxidative stress and natural antioxidants. Edited by: Kaur Pardeep, 2021; ISBN: 978-981-4998-88-8.
- Mucopolysaccharidosis Type III (Sanfilippo Disease) subtypes A, B, C, D: molecular mechanism and therapeutic effect. W: Neurochemistry of metabolic diseases: lysosomal storage diseases, Phenylketonuria, and Canavan disease. Edited by: Surendran Sankar, 2020; ISBN: 978-1-53618-339-9.

Ponadto, w 2021 roku zostałam uhonorowana Zespołową Nagrodą Rektora UG pierwszego stopnia za wiodący wkład w cykl publikacji, dotyczących: Molekularnych mechanizmów chorób genetycznych z grupy mukopolisacharydoz. Z kolei, rok później otrzymałam Zespołową Nagrodę Rektora UG drugiego stopnia za udział w powstaniu cyklu publikacji pt. „Molekularne mechanizmy procesów komórkowych leżących u podłoża funkcjonowania tkanek i organizmów”.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Od początku studiów doktoranckich nabywałam praktycznych umiejętności dydaktycznych, początkowo asystując, a po 6 miesiącach samodzielnie prowadząc zajęcia ze studentami. Były to głównie ćwiczenia:

- Anatomia funkcjonalna człowieka dla I roku Biologii i Biologii medycznej, studia I stopnia;
- Fizjologia Zwierząt i Człowieka dla I roku Biologii i Biologii medycznej, studia I stopnia;

- Metody Behawioralne w Neurobiologii dla II roku Biologii medycznej, studia I stopnia;
- Metody badań Ośrodkowego Układu Nerwowego dla III roku Biologii medycznej, studia I stopnia;
- Pracownia specjalnościowa dla studentów I i II roku Biologii i Biologii medycznej, studia II stopnia.

Od roku akademickiego 2019/2020 prowadzę liczne wykłady i ćwiczenia o zróżnicowanej tematyce takie, jak:

- Genetyka behawioralna – wykład dla studentów III roku Biologii medycznej, studia I stopnia;
- Genetyka zachowania – wykład dla II roku studentów dziennych i zaocznych Kryminologii, studia II stopnia;
- Neurofizjologia molekularna – ćwiczenia audytoryjne i laboratoryjne dla studentów III roku Genetyki i biologii eksperymentalnej, studia I stopnia;
- Zwierzęce modele chorób autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych i metabolicznych – wykład dla studentów I roku Biologii medycznej, studia II stopnia;
- Seminarium dla studentów I i II roku Biologii i Biologii medycznej, studia II stopnia;
- Pracownia specjalnościowa dla studentów I i II roku Biologii i Biologii medycznej, studia II stopnia;
- Pracownia specjalnościowa dla studentów III roku Biologii, Biologii medycznej oraz Genetyki i biologii eksperymentalnej, studia I stopnia.

Za swoją działalność dydaktyczną w 2021 roku zostałam przez studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego nominowana do Nagrody im. K. C. Mrongowiusza. Od momentu rozpoczęcia pracy w Katedrze Biologii Molekularnej, jestem członkiem Komisji Egzaminacyjnych, recenzentem prac dyplomowych, a także opiekunem/promotorem prac licencjackich i magisterskich.

Tematy promowanych prac magisterskich:

1. „Wpływ genisteiny na reakcje stresowe oraz wybrane elementy morfologiczne krwi obwodowej u myszy R6/1 stanowiących genetycznie modyfikowany model choroby Huntingtona” – Estera Rintz, data obrony: 02.07.2019;
2. „Wpływ podawania genisteiny na zaburzenia motoryczne i biochemiczne markery dysfunkcji mięśni oraz narządów w chorobie Huntingtona – badania na modelu mysim” – Karol Jasiński, data obrony: 21.09.2020;

3. „Wpływ długotrwałego stosowania genisteiny na procesy pamięciowe i wybrane parametry odpowiedzi immunologicznej w mysim modelu choroby Huntingtona” – Klaudia Grochowalska, data obrony: 21.09.2020;
4. „Efekty motoryczne i wybrane wskaźniki biochemiczne obwodowych zaburzeń patofizjologicznych w chorobie Huntingtona w warunkach terapii izoflawonowej – badania na modelu mysim” – Patryk Radzikowski, data obrony: 21.09.2020;
5. „Procesy pamięciowe i wybrane parametry biochemiczne w mysim modelu choroby Huntingtona w warunkach terapii genisteiną po wystąpieniu objawów” – Marta Janiak, data obrony: 21.09.2020;
6. „Wpływ długotrwałego stosowania genisteiny na wybrane wskaźniki osocza w mysim modelu choroby Huntingtona” – Robert Olek, data obrony: 12.07.2021;
7. „Obwodowe i ośrodkowe markery reakcji stresowej w przebiegu choroby Huntingtona w warunkach terapii genisteiną” – Oliwia Budzik, data obrony: 12.07.2021;
8. „Zaburzenia kognitywne i neuropsychiatryczne w chorobie Huntingtona” – Martyna Łągiewska, data obrony: 08.07.2022;
9. „Wpływ długotrwałego stosowania resweratrolu na procesy pamięciowe oraz wybrane parametry odpowiedzi immunologicznej w mysim modelu neuronopatycznej choroby z grupy mukopolisacharydoz” – Patryk Lorenz, data obrony: 08.07.2022;
10. „Wpływ stresu na progresję zaburzeń motorycznych w przebiegu choroby Huntingtona” – Mateusz Piątek, data obrony: 13.10.2022;
11. „Wpływ długotrwałego stosowania resweratrolu na wybrane wskaźniki osocza oraz parametry behawioralne u myszy MPS III B” – Monika Dębińska, data obrony: 05.07.2023.

Począwszy od grudnia 2022 roku jestem także promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Grabowskiego, uczestnika Szkoły Doktorskiej w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Tytuł rozprawy doktorskiej, to: „Analiza bezpieczeństwa terapii fagowej stosowanej w zwalczaniu zakażeń wywoływanych przez serowary *Salmonella enterica*”, natomiast promotorem głównym jest Pani prof. dr hab. Alicja Węgrzyn. Moja praca w ramach opieki naukowej nad słuchaczem Szkoły Doktorskiej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN wskazuje również na moją aktywność naukową na rzecz kolejnej instytucji naukowej, wpisując się w wypełnienie warunku ustawowego prowadzenia istotnej aktywności naukowej w więcej niż jednej uczelni lub instytucji badawczej.

Ponadto, w 2021 roku byłam członkiem Rady Programowej Kierunku Biologia, której działalność ma na celu dostosowanie oferty kształcenia do oczekiwań studentów i kandydatów na studia, a

także zapewnienia im jak najlepszego startu na rynku pracy. Moja działalność organizacyjna obejmowała również udział w organizacji konferencji i sympozjum:

- 4th Congress of Baltic Microbiologists 10.-12.09.2018, Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Polska
- II Konferencja Doktorantów Pomorza Biomed Session 7.12.2018, Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Polska
- I Sympozjum Bakteriofagowe 8-10.09.2022

Jestem również członkiem krajowych i międzynarodowych stowarzyszeń naukowych:

- Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego
- Polskie Towarzystwo Fizjologiczne
- Polskie Towarzystwo Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej
- Federation of European Neuroscience Societies
- International Brain Research Organization

Oprócz wymienionej działalności organizacyjnej, staram się także angażować w działania, mające na celu popularyzację nauki. Współprowadziłam m.in. warsztaty rezerwowane („Czym się pasjonują neurofizjolodzy zwierząt?”) podczas Nocy Biologów i Dni Mózgu, a także prezentowałam tematykę badawczą i odpowiadałam na liczne pytania potencjalnych kandydatów na studia w trakcie Dni Otwartych Wydziału Biologii.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery naukowej.

Moja działalność naukowa obejmuje nie tylko część badawczą, ale także rolę recenzenta. Do tej pory recenzowałam ponad 20 manuskryptów dla takich czasopism, jak: Metabolic Brain Disease, Scientific Reports, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology czy Frontiers in Immunology. Ponadto, pełnię funkcję edytora gościnnego w specjalnym numerze czasopisma Genes: Genetics and Genomics of Inherited Metabolic Diseases (IF: 3,759). Wrodzone choroby metaboliczne obejmują szeroki i złożony wachlarz rzadkich zaburzeń genetycznych. Szybki postęp w dziedzinie genomiki i dyscyplin pokrewnych ułatwił zrozumienie patofizjologii większości zaburzeń metabolicznych i doprowadził do opracowania podejść terapeutycznych, w tym: terapii komórkowej, enzymatycznej terapii zastępczej, terapii opartej na redukcji substratu, terapii genowej i innych. Niemniej jednak, podczas gdy ulepszone metody badań przesiewowych i nowoczesna diagnostyka, umożliwiają rozpoczęcie terapii w przedobjawowej fazie choroby, nie wskazują one, jakie podejście terapeutyczne jest najbardziej korzystne dla danego pacjenta. Potrzebne są zatem dalsze badania dotyczące patofizjologii wspomnianych chorób, opracowanie

efektywnych terapii skojarzonych i określenie optymalnego czasu rozpoczęcia leczenia. W związku z powyższym celem numeru specjalnego jest zebranie artykułów, dotyczących najnowszych osiągnięć z zakresu genetyki i genomiki dziedzicznych chorób metabolicznych. Dodatkowo, jestem również edytorem gościnnym w aktualnie przygotowywanym numerze specjalnym Energy Metabolism in Neurodegenerative Diseases czasopisma Metabolites (IF: 4,1). Choroby takie, jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona i stwardnienie rozsiane to przewlekłe schorzenia charakteryzujące się postępującą utratą neuronów w obszarach mózgu warunkujących ruch, czucie czy procesy poznawcze. Rośnie liczba doniesień naukowych, wskazujących na istnienie zależności pomiędzy dysregulacją metaboliczną a neurodegeneracją. Zmiany w metabolizmie energetycznym, stres oksydacyjny i dysfunkcja mitochondriów, okazały się jednymi z kluczowych czynników, przyczyniających się do progresji procesu neurodegeneracji. Te zaburzenia metaboliczne mogą zakłócać homeostazę komórkową, upośledzać funkcje neuronów i ostatecznie prowadzić do ich śmierci. Zrozumienie skomplikowanej interakcji między zmianami metabolicznymi a neurodegeneracją ma ogromne znaczenie w pełnym poznaniu mechanizmów, leżących u podstaw tych zaburzeń oraz w identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych. Dlatego też, niniejszy numer specjalny będzie poświęcony najnowszym badaniom, dotyczącym roli metabolizmu energetycznego w chorobach neurodegeneracyjnych, ale także opracowania biomarkerów, identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych i przyszłych metod leczenia związanych ze szlakami metabolicznymi.



(podpis wnioskodawcy)