**OCENA POTENCJAŁU WIRULENTNEGO GLONÓW *PROTOTHECA* SPP., OPORTUNISTYCZNYCH PATOGENÓW LUDZI I ZWIERZĄT - BADANIA *IN VITRO* ORAZ *IN VIVO***

Rodzaj *Prototheca* obejmuje jednokomórkowe, pozbawione chlorofilu glony, powszechnie występujące w środowisku naturalnym. Spośród ośmiu znanych obecnie gatunków *Prototheca*, pięć (*P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. cutis* i *P. miyajii*) opisano jako czynniki etiologiczne zakażeń oportunistycznych zwanych protototekozami. Glony *Prototheca* spp. są jedynymi znanymi dotąd roślinami patogennymi dla kręgowców włączając ludzi. Główną postacią protototekozy zwierzęcej jest *mastitis*, zapalenie gruczołu mlekowego u krów. Choroba stanowi poważny problem dla sektora weterynaryjnego i przyczynia się do znaczących strat ekonomicznych w przemyśle mleczarskim na całym świecie. Straty te wynikają głównie ze spadku produktywności i przedwczesnego uboju zwierząt. Zakażenia wywołane przez glony *Prototheca* spp. stanowią również zagrożenie dla ludzi, szczególnie osób z obniżoną odpornością. Często obserwowana oporność glonów *Prototheca* spp. na większość stosowanych leków przeciwdrobnoustrojowych sprawia, że leczenie protototekozy jest mało skuteczne, a choroba przybiera ostrzejszą postać.

Glony *Prototheca* spp. i wywoływana przez nie protototekoza przez długi czas sytuowały się na marginesie dociekań badawczych. Sytuację zmieniła wzrastająca w ostatnich latach liczba wykrywanych przypadków protototekozy, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. To dopiero niedawne zainteresowanie biologią tych drobnoustrojów tłumaczy istotne luki w wiedzy na ich temat. Niejasna jest patogeneza zakażeń protototekowych. Nieznany pozostaje ich rezerwuar, drogi transmisji, czynniki ryzyka oraz specyfika interakcji na linii patogen-gospodarz. Nie przeprowadzono dotąd badań oceniających porównawczo chorobotwórczość różnych gatunków *Prototheca* spp. Niewiele też wiadomo o czynnikach zjadliwości tych patogenów. Badanie mechanizmów wirulencji utrudnia brak ustalonych modeli eksperymentalnych protototekozy *in vitro* oraz *in vivo*.
Celem niniejszego projektu jest rozpoznanie potencjału wirulentnego glonów *Prototheca* spp., a ściślej określenie zdolności różnych gatunków *Prototheca* spp. do wywołania miejscowych lub ogólnoustrojowych infekcji oraz prześledzenie oddziaływań patogen-gospodarz w strategii dwutorowej, tj. *in vitro*, przy użyciu eukariotycznych linii komórkowych oraz *in vivo*, na modelu zwierzęcym.

W projekcie zastosowane zostanie podejście dwukierunkowe, łączące badania *in vitro*, z wykorzystaniem różnych ssaczych linii komórkowych oraz *in vivo*, na modelu mysim. Opracowany zostanie protokół przygotowania dawek infekcyjnych. Wnikanie, fagocytoza i przeżywalność komórek glonów wewnątrz komórek gospodarza będą badane w oparciu o specyficzne testy *in vitro* wykonane na komórkach nabłonka, fibroblastach i makrofagach. Komórki patogenu będą lokalizowane w środowisku tkankowym (wewnątrz- i pozakomórkowym) gospodarza m.in. dzięki kombinowanemu użyciu technik immunofluorescencyjnych i mikroskopowych. Za pomocą znakowania fluorescencyjnego określana będzie także przeżywalność komórek ssaczych po ekspozycji na różne dawki infekcyjne patogenu. W badaniu *in vivo* wykorzystane zostaną zarówno myszy immunokompetentne, jak i o obniżonej odporności. Zwierzęta będą zakażane różnymi drogami, przy użyciu różnych dawek infekcyjnych, zawierających różne gatunki *Prototheca* spp. Od momentu zakażenia, myszy będą regularnie obserwowane, a ich krew badana m.in. pod katem markerów i cytokin prozapalnych. Po upływie okresu obserwacji, zwierzęta będą uśmiercane, a pobrane narządy badane histopatologicznie i mikrobiologicznie, metodą posiewów, na obecność glonów w tkankach. Wyniki otrzymane w toku projektu zostaną poddane wielopoziomowym analizom porównawczym i statystycznym w celu opracowania całościowego modelu zakaźnego protototekozy zwierzęcej.

Proponowany projekt badawczy pomyślany jest jako największe jak dotąd studium eksperymentalno-badawcze poświęcone chorobotwórczości glonów *Prototheca* spp. Uzyskane wyniki gruntownie poszerzą wiedzę na temat wirulencji tych drobnoustrojów. W istotny sposób przyczynią się do wyświetlenie ich wpływu na medycynę weterynaryjną i zdrowie publiczne. Wyniki projektu utorują drogę dla opracowania i wdrożenia nowych testów diagnostycznych umożliwiających precyzyjne określenie zjadliwości i zakaźności szczepów klinicznych oraz znacznie przybliżą do opracowania skutecznych metod leczenia i zapobiegania protototekozie u ludzi i zwierząt.