

dr hab. n. med. Małgorzata Brauncajs, prof. UM

Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 17.11.2025r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej

pt. „Stan zapalny w chorobie miażdżycowej: rola zespołu metabolicznego wywołanego przez składniki *Helicobacter pylori* i dietę oraz propozycja terapii przeciwzapalnej”

Rozprawa doktorska **mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej** została przygotowana w ramach Szkoły Doktorskiej BioMedChem, zaś jednostką doktoryzującą jest Uniwersytet Łódzki. Opiekę nad doktorantką sprawowała promotor rozprawy dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ oraz dr hab. Weroniki Gonciarz, prof. UŁ jako promotor pomocniczy.

Pani mgr Agata Izabela Tomaszewska w swojej rozprawie doktorskiej skoncentrowała się na badaniach nad ukierunkowanym dostarczaniem kolchicyny za pomocą polimerowych nośników oraz oceną wpływu komponentów zakaźnych i lipidów na mechanizmy zapalne. **Problem podjęty przez Doktorantkę jest istotny klinicznie i wpisuje się w nowoczesne podejście do profilaktyki oraz leczenia miażdżycy.**

W ostatnich latach coraz częściej podkreśla się rolę zakażeń bakteryjnych w rozwoju miażdżycy. Wyniki badań opublikowanych w literaturze światowej sugerują, że przewlekłe zakażenie *H. pylori* może prowadzić do uogólnionej reakcji zapalnej, która wpływa na funkcjonowanie układu sercowo – naczyniowego. Ponadto komponenty tego drobnoustroju wywierają działanie prozakrzepowe i, aktywując płytki krwi, przyczyniają się do dysfunkcji śródbłónki naczyniowej oraz zaburzają metabolizm lipidów. W związku z powyższym uzasadnione jest poszukiwanie skutecznych strategii ograniczania stanu zapalnego, sprzyjającego rozwojowi miażdżycy. Na tym tle szczególnie zainteresowanie budzi kolchicyna – lek o udokumentowanym działaniu przeciwzapalnym, który

poprzez hamowanie aktywności neutrofilów oraz inflamasomu NLRP3 może ograniczać reakcje zapalne w organizmie.

Rozprawa doktorska mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej pt. „Stan zapalny w chorobie miażdżycowej: rola zespołu metabolicznego wywołanego przez składniki *Helicobacter pylori* i dietę oraz propozycja terapii przeciwzapalnej” została przygotowana na podstawie cyklu 2 prac, uzupełnionego o rozbudowaną część własną i wyniki nieopublikowane, co jest zgodne z trybem przewodu doktorskiego „na podstawie cyklu publikacji”.

- „*Helicobacter pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet.”

Agata Tomaszewska, Weronika Gonciarz, Tomasz Rechcinski, Magdalena Chmiela, Anna K. Kurdowska, Agnieszka Krupa.

Scientific Reports 2024, doi:10.1038/s41598-024-56308-7.

IF:3,8 / MEiN:140 punktów

- “Targeted and safe delivery of colchicine via polymeric nanocarriers for potential atherosclerosis therapy with *in vitro* and *in vivo* evaluation”

Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Łucja Balcerzak, Sława Glińska, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa.

Scientific Reports 2025, doi: 10.1038/s41598-025-16131-0

IF:3,9 / MEiN:140 punktów

Rozprawa obejmuje 125 stron maszynopisu (bez załączników) i składa się z części wstępnej (rozbudowany *Wstęp* prezentujący przegląd literatury, uzasadnienie podjęcia tematu, hipotezy i cele badawcze), rozdziału *Materiały i metody*, obszernego rozdziału *Wyniki*, a następnie *Dyskusji*, *Podsumowania wyników*, wykazu piśmiennictwa (105 pozycji, w tym najnowsze doniesienia z 2025 roku) oraz aneksów zawierających pełne teksty publikacji. Od strony edytorskiej i formalnej praca spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom. Układ rozprawy jest przejrzysty, spis treści kompletny, a poszczególne rozdziały i podrozdziały są logicznie ponumerowane. Ilustracje (fotografie mikroskopowe, wykresy, schematy) są dobrej jakości i opatrzone czytelnymi

podpisami. Tabele z wynikami są czytelne i właściwie opisane (nagłówki, jednostki, objaśnienia skrótów).

Wstęp został napisany językiem zrozumiałym, z zachowaniem logiki wyводу. Zakres wykazu literatury jest wystarczająco szeroki, aby ugruntować czytelnika w tematyce rozprawy. Część wprowadzająca obejmuje również podrozdział dotyczący przewlekłego stanu zapalnego jako celu terapeutycznego w miażdżycy, gdzie omówiono dotychczasowe próby leczenia przeciwzapalnego. Szczegółowo opisano kolchicynę – jej mechanizm działania, wyniki najważniejszych badań klinicznych, a także informację dot. zatwierdzenia niskich dawek kolchicyny przez FDA w 2023 r. w prewencji incydentów sercowych. Autorka słusznie zauważa ograniczenia kolchicyny, przede wszystkim działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego, co stanowi logiczne wprowadzenie do własnych badań nad poprawą profilu bezpieczeństwa leku poprzez nanotechnologię.

Cele i hipotezy badawcze

W rozprawie jasno sformułowano hipotezy badawcze oraz wynikające z nich cele pracy. Głównym założeniem badawczym było przypuszczenie, że przewlekły stan zapalny wywołany przez infekcję *H. pylori* w połączeniu z dietą wysokotłuszczową nasila zmiany miażdżycowe i metaboliczne, a zatem ukierunkowana interwencja przeciwzapalna (kolchicyna) może te niekorzystne procesy hamować. Sformułowano kilka szczegółowych hipotez, m.in.:

- (1) komponenty *H. pylori* potęgują stres oksydacyjny i reakcje zapalne prowadzące do miażdżycy w modelu zespołu metabolicznego,
- (2) inflamasom NLRP3 odgrywa kluczową rolę w transformacji makrofagów w komórki piankowate pod wpływem czynników infekcyjnych i metabolicznych,
- (3) zastosowanie kolchicyny w postaci nanocząstek zwiększy bezpieczeństwo terapii i zachowa efektywność w hamowaniu procesu miażdżycowego.

Można stwierdzić, że cele zostały sformułowane jasno i logicznie, obejmując zarówno aspekt poznawczy (mechanizmy patogenezы), jak i aplikacyjny (terapia). Co istotne, wszystkie założone cele zostały w pełni osiągnięte w toku badań. Taka konstrukcja świadczy o przemyślanym planie rozprawy i konsekwentnej realizacji założeń przez Doktorantkę.

W rozdziale **Materiały i Metody** mgr Agata Izabela Tomaszewska szczegółowo opisała zastosowane techniki badawcze, modele doświadczalne oraz narzędzia analityczne. Zakres wykorzystanych metod jest bardzo szeroki i nowoczesny, co odzwierciedla interdyscyplinarny charakter rozprawy.

Autorka biegle posłużyła się różnorodnymi technikami z zakresu biologii molekularnej, komórkowej, biochemii, nanotechnologii i analizy histopatologicznej. Wszystkie metody zostały opisane szczegółowo i zrozumiale, co świadczy o tym, że Doktorantka opanowała warsztat badawczy oraz rozumie zastosowane techniki. Nie stwierdzam uchybień metodologicznych – dobór prób, odpowiednie grupy kontrolne i statystyczna analiza wyników są prawidłowe. Metody zostały dobrane adekwatnie do postawionych pytań badawczych, co pozwoliło na uzyskanie wiarygodnych i kompletnych wyników.

Wyniki badań – omówienie i ocena merytoryczna

Wyniki pracy zostały przedstawione w formie czytelnych wykresów i tabel w rozdziale 6 rozprawy na stronach 42–110, z podziałem na sekcje odpowiadające poszczególnym publikacjom oraz wynikom uzupełniającym. Prezentacja rezultatów jest klarowna, logiczna i ilustrowana czytelnymi grafikami oraz tabelami.

Publikacja I: „*Helicobacter pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet.” – Agata Tomaszewska *et al.*, Scientific Reports 14:5764 (2024).

W publikacji Autorka wykazała, że infekcja *H. pylori* wyraźnie nasila zespół metaboliczny oraz związane z nim stłuszczenie wątroby u zwierząt na diecie wysokotłuszczowej. W doświadczalnym

modelu *in vivo* zaobserwowano synergistyczny, szkodliwy wpływ czynników zakaźnych i dietetycznych: u zwierząt poddanych jednocześnie działaniu składników *H. pylori* i diety bogatej w tłuszcze stwierdzono zwiększony stres oksydacyjny i peroksydację lipidów, prowadzące do odkładania lipidów w śródbłonku, uszkodzeń jego komórek (upośledzenie apoptozy, liza komórek) oraz wzrost sztywności naczyń. W badaniach histopatologicznych wątroby wykazano natomiast cechy rozwoju stłuszczeniowej choroby wątroby u zwierząt zakażonych *H. pylori* karmionych wysokotłuszczowo, w porównaniu do grup kontrolnych. Publikacja ta wnosi istotny wkład w zrozumienie następstw infekcji o etiologii *H. pylori*, niezwiązanych z układem pokarmowym. Wskazuje, że przewlekłe zakażenie może potęgować zaburzenia metaboliczne wywołane dietą, przyspieszając inicjację zmian miażdżycowych i uszkodzeń narządowych.

Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że Doktorantka zdołała wykazać wiele powiązanych aspektów zmian patofizjologicznych: od parametrów biochemicznych, przez zmiany w ścianie naczyniowej, lipidogram, aż po odległe skutki w narządzie docelowym, jakim są początki stłuszczenia wątroby. Tak kompleksowe podejście wzmacnia wiarygodność wniosków. Wyniki te są oryginalne, gdyż dotychczas w literaturze światowej tylko sugerowano związek *H. pylori* z zaburzeniami metabolicznymi, natomiast brakowało modeli doświadczalnych dowodzących bezpośredniego wpływu bakterii na np. nasilenie NAFLD czy dysfunkcję śródbłonka w kontekście diety. Pod tym względem uważam, że Publikacja I znacząco poszerza wiedzę w dziedzinie patofizjologii miażdżycy – pokazuje nowy wymiar interakcji mikrobiom–metabolizm–układ krążenia.

Publikacja II: *“Targeted and safe delivery of colchicine via polymeric nanocarriers for potential atherosclerosis therapy with in vitro and in vivo evaluation”* Agata Tomaszewska et al. Scientific Reports 2025, doi: 10.1038/s41598-025-16131-0

Publikacja II przedstawia oryginalne podejście nanotechnologiczne do poprawy profilu terapeutycznego kolchicyny, ważnego leku przeciwzapalnego stosowanego w chorobach sercowo-naczyniowych. Zaprezentowana formuła nanocząstek jest nowatorska (wysokie wysycenie lekiem, wykorzystanie cyklodekstryny jako inicjatora polimeru) i została wszechstronnie

przebadana. Wyniki dowodzą, że enkapsulacja pozwala zachować efekt terapeutyczny przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych, co ma duże znaczenie dla możliwości długotrwałego stosowania kolchicyny w profilaktyce i leczeniu miażdżycy. Praca ma charakter interdyscyplinarny i wskazuje kierunek poprawy bezpieczeństwa terapii przeciwzapalnych.

Wyniki Publikacji II dotyczące nanoterapii kolchicyną są bardzo obiecujące i mają zarówno wymiar poznawczy, jak i potencjalnie wdrożeniowy. Autorka udowodniła, że udało się rozwiązać kluczowy problem toksyczności kolchicyny poprzez jej zamknięcie w nanocząstkach. Rezultaty *in vitro* jednoznacznie wskazują, że nanoformulacja zmniejsza toksyczność – komórki traktowane nanokolchicyną przeżywają dłużej i nie wykazują oznak stresu, w przeciwieństwie do komórek z wolną kolchicyną. Jednocześnie zachowana jest aktywność biologiczna leku. To bardzo ważny wniosek: często enkapsulacja leków wiąże się z utratą części ich aktywności, tutaj jednak efekt przeciwzapalny i przeciwmiażdżycowy kolchicyny został utrzymany. Jeszcze istotniejsze są wyniki *in vivo*, które udokumentowały, że nanokolchicyna jest bezpieczna w dawce, która w formie wolnej jest śmiertelna dla zwierząt. Myszom podawano przez kilka tygodni kolchicynę w nanocząstkach bez negatywnych skutków, podczas gdy kolchicyna klasyczna w równoważnej dawce powodowała ostre wyniszczenie i zgony. Tak wyraźna różnica świadczy o ogromnym potencjale aplikacyjnym proponowanej nanoformulacji. Praca doktorska analizuje też stężenia enzymów wątrobowych, kreatyniny, troponiny – brak ich wzrostu u zwierząt z grupy nanokolchicyny potwierdza brak działań ubocznych. Wprawdzie odnotowano niewielkie zwiększenie AST u samców w grupie NPs-C, ale było ono w granicach normy. Tego typu drobne różnice mogły wynikać np. z naturalnej zmienności lub metabolizmu kolchicyny, jednak nie wpływają na ogólny wniosek o bezpieczeństwie nanoterapii, co zostało słusznie zinterpretowane przez Autorkę.

Oprócz powyższych dwóch głównych publikacji, rozprawa zawiera także wyniki niepublikowane, które poszerzają kontekst badań. Doktorantka przedstawiła własne doświadczenia dotyczące roli inflammasomu NLRP3 w transformacji makrofagów w komórki piankowe przy ekspozycji na składniki infekcyjne i utlenione lipidy, a także badania receptorów TREM2 (zarówno formy rozpuszczalnej w surowicy pacjentów, jak i ekspresji formy transbłonowej w hodowlach komórkowych). Te dodatkowe eksperymenty, opisane w części *Wyniki* rozprawy, dostarczyły

interesujących danych uzupełniających. Potwierdzono m.in., że aktywacja inflamasomu NLRP3 jest kluczowa dla tworzenia komórek piankowatych, receptor TREM2 może być zaangażowany w odpowiedź zapalną towarzyszącą miażdżycy (we krwi pacjentów stwierdzono jego rozpuszczalną formę, zaś w komórkach stymulowanych komponentami *H. pylori* i sterolami zaobserwowano zmiany w ekspresji TREM2). Wynik ten jest ważny poznawczo, gdyż potwierdza rolę tego inflamasomu jako pomostu między bodźcem zapalnym, a odkładaniem cholesterolu w makrofagach – co z kolei wskazuje, że NLRP3 może być potencjalnym celem terapeutycznym w prewencji powstawania blaszek miażdżycowych.

Wyniki dotyczące mechanizmów zapalnych (inflamasom NLRP3, receptor TREM2), przedstawione w pracy poza publikacjami, stanowią cenne uzupełnienie i świadczą o docieklivosti naukowej Autorki. Włączenie tych wyników świadczy o wszechstronnym podejściu Autorki do tematu – nie tylko zbadała ona wpływ czynników zewnętrznych i terapii, ale również zagłębiła się w mechanizmy molekularne regulujące procesy zapalne. Dzięki temu cykl publikacji uzupełniony treścią rozprawy stanowi spójną, logiczną całość, obejmującą zagadnienia od patogenезы po potencjalną terapię.

Dyskusja

Dyskusja przedstawione z rozdziale 8 jest obszerna i świadczy o krytycznym podejściu Doktorantki do własnych danych. Autorka konfrontuje swoje wyniki z literaturą światową. Omawia zgodność obserwacji dot. *H. pylori* z pracami innych autorów wskazujących na związek infekcji z dyslipidemią czy zapaleniem naczyniowym oraz porównuje swoją nanoformulację kolchicyny z innymi próbnymi systemami dostarczania tego leku. Dyskusja dowodzi dojrzałości naukowej Autorki, która potrafi nie tylko zaprezentować wyniki, ale i krytycznie je omówić na tle aktualnej wiedzy oraz wskazać ograniczenia.

Podsumowanie

Spójność i logiczność przedstawionego mi do oceny cyklu publikacji nie budzą zastrzeżeń – obie publikacje wyraźnie łączy wspólna oś tematyczna. Pierwsza praca identyfikuje problem, jakim jest nasilenie zmian miażdżycowych i metabolicznych na skutek infekcji *H. pylori*, a druga proponuje rozwiązanie -innowacyjną terapię przeciwzapalną z wykorzystaniem kolchicyny. Tym samym cykl publikacji wyczerpująco obejmuje kluczowe aspekty zaproponowanego tematu rozprawy. Sumaryczny *impact factor* publikacji wynosi 7,7 a łączna punktacja MEiN to 280 punktów, co przekracza typowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie nauk biologicznych i potwierdza wysoką wartość merytoryczną osiągnięcia naukowego.

Dodatkowo należy podkreślić całość aktywności naukowej Doktorantki i zaznaczyć, że *impact factor* pozostałych opublikowanych przez nią publikacji niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wynosi 28,964 przy punktacji MEiN=760 . Wskaźniki te wskazują na wysoką dojrzałość naukową. Ponadto, Doktorantka była wykonawcą w 6 projektach naukowych oraz kierownikiem IDUB (Doktoranckie Granty Badawcze UŁ).

Z obowiązku recenzenta, jaki i z zainteresowania tematyką rozprawy mam do Doktorantki pytanie: która z form terapii - metaboliczna, immunomodulacyjna, przeciwutleniająca czy też mikrobiomowa jest wg Pani najlepsza, aby przerwać efekt synergistyczny jaki daje zakażenie *H.pylori* w połączeniu z dietą wysokotłuszczową?

Wniosek Końcowy

Rozprawa doktorska mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej przedstawia oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego z pogranicza immunologii i kardiologii – wyjaśnia związek przewlekłego stanu zapalnego z rozwojem miażdżycy oraz proponuje nowatorską strategię terapeutyczną. Praca dowodzi, że Doktorantka posiada rozległą wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Uważam, że rozprawa w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, w tym kryteria określone w art. 187 ust. 1 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Praca stanowi zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych, prezentuje oryginalne wyniki stanowiące wkład w rozwój dyscypliny, a ponadto potwierdza zdolność Doktorantki do samodzielnego myślenia naukowego i krytycznej analizy danych. Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Na podstawie przedstawionej przeze mnie recenzji rozprawy doktorskiej mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej mam przyjemność wnieść do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy z uwagi na jej wyjątkowe walory naukowe.

Niniejsza rozprawa spełnia w najwyższym stopniu kryteria stawiane pracom doktorskim, a w szczególności cechuje się wyróżniającą jakością badań, w trakcie których Doktorantka przeprowadziła testy cytotoksyczności zgodnie ze standardem ISO 10993-5:2009 – to ważne, bo wskazuje na świadomość wymogów dotyczących potencjalnych zastosowań biomedycznych. Dodatkowo użyła w swoich badaniach transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) do wizualizacji nanocząstek wewnątrz komórek, która jest metodą czasochłonną, ale dostarczająca bezpośrednich dowodów, że nanocząstki nie powodują np. uszkodzeń błon czy organelli, co zostało potwierdzone w pracy. Znakomitym uzupełnieniem jest też model zwierzęcy oceny bezpieczeństwa: podawanie myszom serii dawek nanokolchicyny vs. wolnej kolchicyny i obserwacja parametrów klinicznych oraz biochemicznych. Taki układ doświadczalny pozwolił kompleksowo porównać obie formy leku *in vivo*, co znacznie podnosi wiarygodność wniosków o bezpieczeństwie nanoterapii. Doktorantka również wykonała badanie biodystrybucji nanocząstek - to zaawansowana metoda, rzadko stosowana na etapie badań doktorskich.

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty, stwierdzam, że rozprawa mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej znacznie przewyższa wymagania stawiane pracom doktorskim i w pełni zasługuje na wyróżnienie.

Wnoszę zatem do Komisji UŁ ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej **mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej**

Zakład Mikrobiologii
i Laboratornej Immunologii Medycznej
Katedry Biologii i Mikrobiologii Medycznej
Wydziału Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
dr hab. n. med. Małgorzata Brauncajs
profesor uczelni