



Gdańsk, 18 grudnia 2025

Prof. dr hab. Agnieszka Marczak
Przewodnicząca Komisji Uniwersytetu Łódzkiego
d/s Stopni Naukowych
w dyscyplinie Nauki Biologiczne

Recenzja pracy 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”.

Praca doktorska mgr Agnieszki Tomaszewskiej ma charakter zbioru dwóch publikacji uzupełnionych nieopublikowanymi danymi eksperymentalnymi zawierając ich wykaz ze szczegółowymi danymi, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wykaz skrótów, wstęp, uzasadnienie podjęcia tematu, hipotezy badawcze, cele pracy doktorskiej, materiały i metody, wyniki wraz z tekstem publikacji, podsumowanie wyników, dyskusję, piśmiennictwo, dorobek naukowy oraz załączniki. Praca jest przygotowana bardzo starannie i przejrzysto, publikacje są spójne tematycznie i wynikają z konsekwentnej linii badawczej.

Dwie prace włączone do rozprawy doktorskiej to:

Helicobacter pylori components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet. Tomaszewska A, Gonciarz W, Rechcinski T, Chmiela M, Kurdowska AK, Krupa A. Sci Rep. 2024 Mar 8;14(1):5764. doi: 10.1038/s41598-024-56308-7.

Targeted and safe delivery of colchicine via polymeric nanocarriers for potential atherosclerosis therapy with in vitro and in vivo evaluation. Tomaszewska A, Kost B, Brzeziński M, Nowicka M, Krupa M, Rechciński T, Balcerzak Ł, Glińska S, Chmiela M, Krupa A. Sci Rep. 2025 Aug 26;15(1):31334. doi: 10.1038/s41598-025-16131-0.

Obie publikacje to prace oryginalne, z których jedna była już opublikowana w chwili zgłaszania doktoratu, a obecnie obie są już opublikowane w Scientific Reports, które jest bardzo dobrym czasopismem klasyfikowanym w pierwszym kwartylu czasopism interdyscyplinarnych i wysoko punktowanym (140) w klasyfikacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W obu pracach doktorantka jest zarówno pierwszą jak i korespondencyjną autorką. Podkreśla to jej kluczowy i większościowy wkład w wykonanie



przedstawianych badań oraz ich przedstawienie w publikacjach. Potwierdzone to jest również w załączonych oświadczeniach współautorów publikacji.

Głównym zagadnieniem którego dotyczy praca doktorska jest analiza roli i mechanizmów indukowanych przez zakażenie *Helicobacter pylori* oraz diety wysokotłuszczowej na proces miażdżycowy. Szczegółowo zbadano reakcję zapalną indukowaną przez rozpuszczalne komponenty *Helicobacter pylori* w rozwoju miażdżycy poprzez indukcję uszkodzenia śródbłonna, zespołu metabolicznego i stłuszczenia wątroby. Jednym z założeń był istotny udział inflamosomu NLRP3 w aktywacji makrofagów i ich przekształceniu w komórki piankowate oraz możliwości modulacji stanu zapalnego przez zastosowanie kolchicyny dostarczanej w formie nanocząstek polimerowych.

Miażdżyca stanowi jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Wiemy jak można opóźnić ten proces przez ograniczanie wpływu modyfikowalnych czynników ryzyka oraz zmniejszać śmiertelność konsekwencji miażdżycy takich jak zawał serca czy udar mózgu. Nie ma jednak sposobu na odwrócenie procesu miażdżycowego, czy w pełni skutecznego zapobiegania. Dlatego każde badanie identyfikujące czynniki i ich mechanizmy, a zwłaszcza proponujące strategie terapeutyczne jest niezwykle ważne i może nas przybliżyć do rozwiązania tego niezwykle ważnego problemu. Praca doktorska mgr Agnieszki Tomaszewskiej jest ważnym krokiem w tym kierunku.

Pod względem metodycznym pracę doktorską cechuje niezwykle szerokie spektrum stosowanych procedur. Metodyka badań obejmowała hodowle komórkowe fibroblastów, monocytów oraz komórek śródbłonna, modele *in vivo* kawii domowej oraz myszy C57BL/6 zakażonych eksperymentalnie *H. pylori*. W badaniach tych stosowano stymulatory w formie cząstek pustych lub załadowanych kolchicyną cząstek poli_L-laktydu, kolchicyny, 7-ketocholesterolu, LPS *H. pylori* lub *E. coli* oraz nigerycyny. Część analityczna obejmowała immunoenzymatyczny test ELISA do oceny stężenia LDL i rozpuszczalnego ICAM-1, barwienie immunofluorescencyjne preparatów cienkowarstwowych do oceny depozycji utlenionego LDL, ekspresji ICAM, peroksydacji lipidów i apoptozy w aorcie, pomiar sztywności naczyń u zwierząt z wykorzystaniem metody pletyzmografii naczyniowej, barwienie histochemiczne skrawków wątroby wraz z oceną stłuszczenia, skaningową mikroskopię elektronową preparatów wątrobowych, ocenę aktywacji inflamosomu NLRP3 w komórkach monocytarno-makrofagowych, pomiar stężenia ludzkiej IL-1B, ocenę transformacji makrofagów w komórki piankowate, ocenę ekspresji transbłonowej formy receptora TREM2 w komórkach monocytarno-makrofagowych, pomiar stężenia rozpuszczalnej formy receptora TREM2, syntezę nanocząstek polimerowych metodą mikroprzepływów, pomiar stabilności nanocząstek polimerowych przy użyciu DLS, pomiar uwalniania kolchicyny z nanocząstek polimerowych metodą spektrofotometryczną,



badanie cytobiokompatybilności in vitro przy użyciu testu MTT, test aktywacji szlaku sygnałowego NF- κ B, z wykorzystaniem reporterowych monocytów linii THP1-Blue, ocenę ultrastruktury komórek monocytarno-makrofagowych ekspozowanych na działanie: kolchicyny, nanocząstek - pustych lub załadowanych kolchicyną, przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej, ocenę bezpieczeństwa biologicznego oraz biodystrybucji in vivo nanocząstek zawierających kolchicynę, ocenę regulacji procesu transformacji makrofagów THP1 w komórki piankowe przez kolchicynę wolną lub zamkniętą w nanocząstkach polimerowych.

Tak szerokie spektrum zastosowanej metodyki opanowanej przez Doktorantkę obejmuje pełen zakres umożliwiający w przyszłości kompetentne prowadzenie badań od fizykochemicznych procedur tworzenia potencjalnych terapeutyków, poprzez badania z zastosowaniem modeli komórkowych oraz in vivo do kompleksowej biochemicznej i strukturalnej analizy efektów biologicznych. Kluczowy wkład Doktorantki we wszystkich etapach powstawania publikacji potwierdza kompetencje w zakresie analizy, prezentacji, interpretacji i dyskusji danych badawczych.

W pierwszej publikacji stanowiącej część doktoratu celem było określenie wpływu infekcji *H. pylori* oraz udziału konkretnych struktur chemicznych tworzonych przez ten patogen w połączeniu z dietą wysokotłuszczową na rozwój objawów wątrobowego zespołu metabolicznego. Badania te wykazały, że zakażenie *H. pylori* u zwierząt pozostających na diecie wysokotłuszczowej nasiliło stres oksydacyjny i peroksydację lipidów, a następnie odkładanie się lipidów w śródbłonku, nasilenie apoptozy komórek śródbłonka oraz zwiększoną sztywność naczyń. Analiza histopatologiczna wątroby wykazała cechy zespołu metabolicznego u zwierząt zakażonych *H. pylori* karmionych dietą wysokotłuszczową. Infekcja *H. pylori* jest więc dodatkowym czynnikiem pogłębiającym wątrobowy zespół metaboliczny spowodowany dietą wysokotłuszczową.

Druga publikacja podkreśla potencjał kolchicyny zamkniętej w nanocząstkach jako bezpieczniejszej i skuteczniejszej alternatywy dla wolnej kolchicyny w leczeniu miażdżycowej choroby naczyń. Chociaż kolchicyna jest znana ze swoich właściwości przeciwzapalnych, jej toksyczność zależna od dawki ogranicza jej długotrwałe stosowanie kliniczne. Aby rozwiązać ten problem, opracowano procedurę efektywnego tworzenia polimerycznych nanocząstek zawierających kolchicynę. Cząstki takie zachowały zdolność hamowania tworzenia komórek piankowych jednocześnie znacząco zmniejszając toksyczność wobec komórek eukariotycznych. Transmisyjna mikroskopia elektronowa wykazała, że komórki poddane działaniu kolchicyny związanej z nanocząsteczkami zachowały prawidłową morfologię, w przeciwieństwie do komórek poddanych działaniu wolnej kolchicyny, która szybko kumuluje się wewnątrzkomórkowo i zaburza funkcje.



Badania *in vivo* potwierdziły bezpieczeństwo stosowania preparatu, nie wykazując negatywnego wpływu na wątrobę, nerki ani serce. Badania biodystrybucji z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie nanocząsteczek dodatkowo sugerowały akumulację w sercu i wątrobie, co podkreśla potencjał terapeutyczny nanocząsteczek z kolchicyną w terapii chorób sercowo-naczyniowych. Formuła kolchicyny oparta na nanocząsteczkach prezentuje korzystny profil skuteczności i bezpieczeństwa, uzasadniając dalsze badania przedkliniczne i kliniczne.

Najważniejsze tezy przeprowadzonych badań to wykazanie, że zakażenie *H. pylori* w połączeniu z dietą wysokotłuszczową nasila zmiany promiążdżycowe, takie jak zespół metaboliczny, zapalenie śródbłonna oraz stłuszczenie wątroby. Zaobserwowano również że LPS *H. pylori* i *E. coli* aktywują inflamazom NLRP3 który uczestniczy w transformacji makrofagów w komórki piankowe. Kolejne obserwacje dotyczą receptorów TREM2 które występują w naczyniach oraz w formie rozpuszczalnej w surowicy u pacjentów z miażdżycą powikłaną chorobą niedokrwienną serca i zakażonych *H. pylori*. Ponadto wykazano, że ekspresja receptorów TREM2 komórek linii monocytarno-makrofagowej jest modulowana przez LPS *H. pylori* lub *E. coli* jak również przez 7KCH. Bardzo ważnym z praktycznego punktu widzenia jest stwierdzenie, że kolchicyna uwolniona/związana z nanocząstek zachowuje swoją aktywność przeciwzapalną przy słabszym działaniu cytotoksycznym wobec komórek eukariotycznych w warunkach długotrwałej ekspozycji niż kolchicyna w formie wolnej.

Wnioski te są solidnie poparte uzyskanymi wynikami i stanowią bardzo ważny wkład w zrozumienie patogenetycznych zmian promiążdżycowych i samej miażdżycy. Ponadto, badania zawarte w pracy doktorskiej proponują nowe podejście terapeutyczne które ma duże szanse wdrożenia w niedalekiej przyszłości.

Chciałbym przedstawić jedynie kilka drobnych uwag i pytań.

Czy próbowano zbadać wpływ antybiotykowej eradykacji *H. pylori* na zmiany promiążdżycowe?

Jak powszechny może być aterogeny efekt obserwowany dla *H. pylori* i jego mechanizm dla innych bakterii lub wirusów? Krótko wspomniano o tej możliwości na str. 17, jednak zagadnienie to jest warte szerszego omówienia.

W ramach drobnych uwag chciałbym podkreślić pewne nadużywanie terminu tkanka np. tkanka serca, tkanka wątroby, tkanka aorty, tkanka naczyń. Nie jest to do końca poprawne i lepiej jest pisać w sercu, wątrobie, aorcie, naczyniach.



W streszczeniach i podsumowaniach lepiej jest nie używać niestandardowych skrótów które są wprowadzone wyjaśnione w pracy, ale nie zawsze ten element będzie dostępny dla czytających.

Wkradło się trochę niedoskonałości edytorskich (np. paragraf 2 na str 29), czy niespójność odnośnie opisu wpływu *H. pylori* na apoptozę (w streszczeniu pracy 1 na str. 45 jest impaired apoptosis, a powinno być enhanced apoptosis).

Sugerowałbym również nieco inny sposób pisania streszczeń w publikacjach poświęcając więcej uwagi nowym wynikom które zawiera praca, a mniej wprowadzeniu do badanego problemu. Widać pewna ewolucję, bo w pierwszej publikacji wprowadzenie zajmuje ponad połowę streszczenia, a w drugiej większość to już opis własnych wyników. Nadal jednak jest brak jasnego podziału na wprowadzenie, metody, wyniki i wnioski. Taki podział również w streszczeniach poprawia komunikatywność, co z kolei może przyczynić się do częstszego cytowania.

W podsumowaniu chciałbym stwierdzić, że praca doktorska mgr Agaty Tomaszewskiej stanowi znaczący wkład w zrozumienie mechanizmów zmian przedmiadźcowych i poszukiwanie nowych terapii. Oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw Stopni Naukowych w dyscyplinie Nauki Biologiczne o dopuszczenie mgr Agaty Tomaszewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo szeroki i interdyscyplinarny zakres stosowanej metodyki opanowanej i wdrożonej przez Doktorantkę, wysoką wartość naukową prowadzonych badań obejmujących nie tylko końcowe efekty lecz również ich mechanizmy, perspektywę zastosowań praktycznych oraz publikację uzyskanych wyników w bardzo dobrym czasopiśmie przy niewątpliwie wiodącej roli doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem
KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. **Ryszard Tomasz Smoleński**