



Warszawa, 18 grudnia 2025 r.

OCENA 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”

wykonanej w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

pod promotorską opieką

dr hab. Agnieszki Krupy, prof. UŁ (promotor)

oraz

dr hab. Weroniki Gonciarz, prof. UŁ (promotor pomocniczy)

Współczesne badania wskazują, że miażdżyca nie jest wyłącznie chorobą naczyń, lecz procesem ogólnoustrojowym o podłożu immunometabolicznym, w którym kluczową rolę odgrywają dysfunkcja śródbłonna, aktywacja komórek odpornościowych, zaburzenia gospodarki lipidowej oraz przewlekły, niskiego stopnia stan zapalny. Do czynników modulujących ten stan zalicza się zarówno elementy stylu życia (w tym dietę wysokotłuszczową), jak i przewlekłe czynniki infekcyjne, które mogą wpływać na odpowiedź immunologiczną i środowisko prozapalne, potencjalnie nasilając procesy proaterogenne.

W ostatnich latach podkreśla się również związek zaburzeń metabolicznych z manifestacjami narządowymi, w tym ze stłuszczeniową chorobą wątroby o podłożu metabolicznym (MASLD), która może współtworzyć ogólnoustrojowe tło zapalne sprzyjające progresji zmian miażdżycowych. Świadomość patofizjologicznego podłoża miażdżycy zapoczątkowała poszukiwania skutecznych terapii przeciwzapalnych w tej chorobie, w tym kolchicyny – leku o udokumentowanej aktywności przeciwzapalnej, jednak obarczonego istotnymi działaniami niepożądanymi oraz charakteryzującego się wąskim oknem terapeutycznym. W tym kontekście istotne stają się badania ukierunkowane na redukcję skutków ubocznych leków przy zachowaniu ich skuteczności z wykorzystaniem różnorodnych systemów nośnikowych, takich jak nanocząstki polimerowe, liposomy, nanonośniki lipidowe, które umożliwiają kontrolowane uwalnianie substancji czynnej, poprawę jej biodostępności oraz ograniczenie toksyczności ogólnoustrojowej, a także aktywne kierowanie leku do tkanek objętych procesem zapalnym.

Mając powyższe na uwadze, Doktorantka za główny cel swojej rozprawy doktorskiej przyjęła

pogłębienie wiedzy na temat roli przewlekłego stanu zapalnego indukowanego przez czynniki infekcyjne i dietetyczne w patogenezie miażdżycy, a także podjęcie próby opracowania nowoczesnej strategii terapeutycznej o działaniu przeciwzapalnym, opartej na enkapsulacji kolchicyny w polimerowych systemach nośnikowych. Aby zrealizować obrany cel Doktorantka zaplanowała trzy zadania badawcze: (1) ocenę wpływu wybranych rozpuszczalnych komponentów *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*) oraz utlenionych steroli na rozwój zmian promiażdżycowych w śródbłonku naczyniowym oraz na rozwój cech zespołu metabolicznego, w powiązaniu ze stłuszczeniem wątroby; (2) ocenę roli inflamasomu NLRP3 w aktywacji makrofagów, ich transformacji w komórki piankowe oraz aktywacji stanu zapalnego w przebiegu zmian indukowanych przez wybrane komponenty *H. pylori* i utlenione sterole; (3) ocenę bezpieczeństwa biologicznego kolchicyny dostarczonej w nośniku polimerowym na wybranych komórkach eukariotycznych oraz ocenę jej potencjału w ograniczaniu aktywności makrofagów i łagodzeniu stanu zapalnego.

Zgodnie z aktualną wiedzą, przewlekły stan zapalny pełni rolę czynnika inicjującego proces miażdżycowy, natomiast rozwijająca się blaszka miażdżycowa staje się wtórnie aktywnym źródłem zapalenia, tworząc samonapędzające się sprzężenie zwrotne odpowiedzialne za progresję choroby. W tym kontekście **obraną cel rozprawy mogący przyczynić się do lepszego zrozumienia tego skomplikowanego procesu oraz opracowania skuteczniejszych i bezpieczniejszych metod wyciszenia stanu zapalnego uważam za bardzo aktualny i uzasadniony naukowo.** Na szczególne podkreślenie i uznanie zasługuje fakt, że działania podjęte w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej mają wyraźnie interdyscyplinarny charakter, łącząc zagadnienia z pogranicza medycyny, chemii oraz inżynierii biomedycznej i wykorzystując najnowsze osiągnięcia technologiczne w zakresie projektowania systemów nośnikowych umożliwiających kontrolowane dostarczanie leku do organizmu.

Ocena formalna rozprawy.

Praca mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej ma postać hybrydową. Część wyników dotyczących wpływu zakażenia *H. pylori* i diety wysokotłuszczowej na rozwój zmian promiażdżycowych i MASLD została opublikowana w czasopiśmie *Scientific Reports* 2024, doi.org/10.1038/s41598-024-56308-7, IF=3.8, MEiN=140, jako praca oryginalna pt. „*Helicobacter pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet”. Z kolei, publikacja pt: „*Targeted and safe delivery of colchicine via polymeric nanocarriers for potential atherosclerosis therapy with in vitro and in vivo evaluation*” zawierająca wyniki dotyczące oceny bezpieczeństwa biologicznego kolchicyny dostarczanej w nośniku polimerowym w warunkach *in vitro* i *in vivo*, w momencie złożenia rozprawy pozostawała w procesie recenzyjnym, a obecnie jest już również opublikowana (*Scientific Reports* 2025, doi.org/10.1038/s41598-025-16131-0, IF=3.8,

MEiN=140). Ponadto do rozprawy zostały dołączone wyniki badań dotychczas niepublikowanych oceniające rolę inflammasomu NLRP3 w aktywacji makrofagów i ich transformacji w komórki piankowe pod wpływem komponentów *H. pylori* i utlenionych steroli oraz wpływ tych czynników na ekspresję receptorów TREM2 w komórkach ludzkiej linii monocytarno-makrofagowej. Tą część uzupełnia pilotażowe badanie przeprowadzone na materiale ludzkim, próbujące skorelować stopień zaawansowania miażdżycy, określony w oparciu o ekspresję receptora TREM2 w tkance aorty i rozpuszczalnej formy receptora w surowicy, z występowaniem zakażenia *H. pylori*.

Publikacje oryginalne oraz wyniki dotychczas niepublikowane zostały spójnie wkomponowane w opracowanie liczące 125 stron, obejmujące rozdziały: *Wstęp, Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego, Hipotezy badawcze, Cele pracy oraz Materiał i metody*. Całość zamyka rozdział poświęcony *Podsumowaniu i dyskusji uzyskanych wyników*. Rozprawa została opatrzona streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz zawiera 105 cytowań aktualnej literatury przedmiotu. Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktorantki i Współautorów. Doktorantka w obu opublikowanych pracach jest pierwszą autorką. Jej wkład w ich powstanie jest więc bezsprzeczny i obejmuje wykonanie wszystkich badań z użyciem materiału pobranego od zwierząt, wykonanie badań *in vitro*, analizę uzyskanych wyników, a także redagowanie treści manuskryptu zarówno przed, jak i po recenzji. Do opracowania dołączono również zestawienie dorobku naukowego Doktorantki, z którego wynika, że jest ona współautorką sześciu publikacji z listy filadelfijskiej. Doktorantka była także kierownikiem doktoranckiego grantu badawczego Uniwersytetu Łódzkiego, stanowiącego jedno ze źródeł finansowania realizowanych badań, oraz wykonawcą w pięciu projektach badawczo-rozwojowych o zróżnicowanej tematyce, obejmującej m.in. ocenę skuteczności nowych formułacji okulistycznych w zespole suchego oka, immunomodulacyjne działanie biomasy drożdży, cytozgodność biomateriałów i wydruków 3D przeznaczonych do zastosowań w medycynie regeneracyjnej, a także przeciwzapalne działanie kwasu fulwowego w kontekście regeneracji tkanek i mikrobiomu. **Aktywność ta świadczy o dużym doświadczeniu badawczym Doktorantki w realizacji projektów o charakterze multidyscyplinarnym i pozwoliła jej na wykształcenie szerokiego warsztatu metodologicznego.**

Przedstawiony mi do oceny materiał został przygotowany bardzo starannie. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (o łącznym IF= 7.6, MEiN = 280). Omówienie prac jest napisane dobrym językiem i daje kompleksowy wgląd w tematykę badań i uzyskane wyniki. Forma hybrydowa rozprawy doktorskiej stanowi w mojej opinii interesujące i w pełni uzasadnione podejście, pozwalające na przedstawienie rzeczywistego, całościowego udziału Doktorantki w badaniach znajdujących się na różnych etapach zaawansowania, poczynając od wyników już opublikowanych, poprzez prace będące w procesie recenzji, aż po rezultaty dotychczas

niepublikowane, stanowiące materiał do kolejnych publikacji.

Rozprawę rozpoczyna obszerny **Wstęp** zawierający wprowadzenie do tematyki dysertacji, szczegółowy opis immunometabolicznych uwarunkowań miażdżycy, znaczenia czynników infekcyjnych i dietetycznych dla rozwoju przewlekłego stanu zapalnego oraz omówienie aktualnych koncepcji terapeutycznych ukierunkowanych na hamowanie zapalenia w chorobach sercowo-naczyniowych. Wstęp jest dobrze napisanym opracowaniem, świadczącym o ugruntowanej wiedzy teoretycznej Doktorantki w obszarze prowadzonych badań i ich potencjalnych implikacji klinicznych.

Opis **metod badawczych** jest jasny i szczegółowy. Metody zastosowane w badaniach opublikowanych opisano szczegółowo w publikacjach, natomiast metody badań nieopublikowanych przedstawiono w dysertacji. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania przeprowadzono zarówno w podejściu *in vivo*, jak i *in vitro*. W badaniach *in vivo* użyto modelu kawii domowej rasy himalajskiej, zakażonej eksperymentalnie *H. pylori* i żywionej dietą standardową lub wysokotłuszczową. W tym modelu analizowano m.in. parametry lipidowe i zapalne, markery stresu oksydacyjnego i apoptozy, ekspresję molekuł adhezyjnych, sztywność naczyń oraz zmiany histopatologiczne w aorcie i wątrobie. Drugi model zwierzęcy (myszy szczepu C57BL/6) został użyty do oceny bezpieczeństwa biologicznego, tolerancji i biodystytucji nanocząstek polimerowych zawierających kolchicynę. Uzupełnieniem badań *in vivo* były doświadczenia przeprowadzone *in vitro* na linii komórkowej ludzkich monocytów THP-1 (w tym wariant linii z nokautem genu NLRP3), w której oceniano aktywność inflamasomu NLRP3, aktywację szlaku NF- κ B, transformację makrofagów w komórki piankowate, wydzielanie IL-1 β oraz ekspresję receptorów TREM2, oraz na liniach mysich fibroblastów, komórek śródbłónka (HUVEC) oraz ludzkich komórek raka jelita grubego (LoVo), na których testowano cytobiozgodność kolchicyny wolnej i enkapsulowanej. Co dodatkowo podnosi walory tej pracy, wykorzystano w niej fragmenty tkanki aortalnej pobranej podczas operacji pomostowania aortalno-wieńcowego oraz odpowiadające im próbki surowicy pacjentów (ocena ekspresji receptora TREM2 w tkance i oznaczenie rozpuszczalnej formy receptora w surowicy). Ważnym elementem pracy o dużym potencjale translacyjnym było opracowanie i charakterystyka nowej formułacji kolchicyny w postaci polimerowych nanonośników otrzymywanych metodą mikroprzepływową oraz ocena ich stabilności, uwalniania leku i cytotoksyczności. **Przeprowadzenie tak licznych doświadczeń z użyciem różnorodnych metod badawczych z pewnością umożliwiło Doktorantce rozwój szerokiego warsztatu badawczego.** W opisie metod zabrakło mi jedynie podania płci kawii domowej, a także brak podania liczby powtórzeń w wybranych doświadczeniach na liniach komórkowych.

Liczne wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały zawarte w 2 publikacjach oryginalnych lub opisane w dysertacji. W publikacji nr 1 Doktorantka wykazała, że: (i) dieta wysokotłuszczowa

stanowiła główny czynnik odpowiedzialny za wzrost stężenia LDL w surowicy, natomiast zakażenie *H. pylori* samo w sobie nie wpływało istotnie na profil lipidowy; (ii) stężenie rozpuszczalnej formy ICAM-1 w surowicy było najwyższe w grupie łączącej dietę wysokotłuszczową i zakażenie, co wskazuje na nasilony ogólnoustrojowy komponent zapalny; (iii) w aorcie nie wykazano istotnych różnic w depozycji LDL pomiędzy grupami (co autorzy wiązali z ograniczoną czułością metody), natomiast peroksydacja lipidów (4-HNE) była najbardziej nasiloną u zwierząt zakażonych *H. pylori* i karmionych dietą wysokotłuszczową, przy czym sygnał nie był możliwy do jednoznacznego przypisania wyłącznie śródbłonkowi; (iv) analiza ICAM-1 w tkance aorty ujawniła nieoczekiwaną modulację – zakażenie *H. pylori* wiązało się z obniżeniem lokalnej ekspresji ICAM-1; (v) test TUNEL wykazał wyraźne zwiększenie apoptozy komórek śródbłonka w grupie łączącej zakażenie i dietę wysokotłuszczową, co sugeruje addytywne oddziaływanie czynników infekcyjnych i metabolicznych; (vi) pomiar sztywności naczyń wskazywał na tendencję do jej wzrostu w grupach eksperymentalnych, jednak różnice nie osiągnęły istotności statystycznej; (vii) w wątrobie najbardziej nasilone zmiany histopatologiczne (stłuszczenie, balonowanie hepatocytów oraz wyższa punktacja w skali NAS) występowały u zwierząt zakażonych *H. pylori* karmionych dietą wysokotłuszczową, co wskazuje na addytywne, niekorzystne działanie obu czynników w rozwoju MASLD.

W badaniach dotychczas nieopublikowanych wykazano, że: (i) *H. pylori* oraz *E. coli* indukują klasyczną aktywację inflamasomu NLRP3 w makrofagach, ocenianą zarówno metodami fluorescencyjnymi, jak i funkcjonalnie poprzez zwiększone wydzielanie IL-1 β , natomiast utlenione sterole nie wywołują takiej odpowiedzi zapalnej; (ii) oksydowane sterole najsilniej indukują transformację makrofagów w komórki piankowate, a proces ten jest zależny od obecności NLRP3 mimo braku jego klasycznej aktywacji; (iii) w materiale ludzkim wykazano ekspresję TREM2 w tkance aortalnej u ponad 60% badanych pacjentów z miażdżycą (iv) oznaczenia sTREM2 w surowicy umożliwiły wyodrębnienie czterech fenotypów pacjentów na podstawie obecności/braku ekspresji TREM2 w tkance i sTREM2 w krążeniu, co zestawiono z wczesnym lub zaawansowanym stadium miażdżycy; (v) obecność przeciwciał przeciwko *H. pylori* była związana z grupami pacjentów o bardziej zaawansowanej miażdżycy i aktywnej osi TREM2 (vi) w badaniach *in vitro* stymulacja monocytów linii THP-1 oksydowanymi sterolami i/lub *H. pylori* prowadziła do obniżenia ekspresji TREM2, co wskazuje na złożoną, etapową regulację tego receptora w przebiegu odpowiedzi monocytarno-makrofagowej na czynniki stresowe.

W publikacji nr 2 opracowano polimerowe nanocząstki z kolchicyną wytwarzane metodą mikroprzepływową, o wysokiej stabilności i kontrolowanym uwalnianiu leku. Wykazano, że; (i) w badaniach *in vitro* enkapsulacja kolchicyny w nanocząstkach istotnie redukowała jej cytotoksyczność, szczególnie w dłuższych punktach czasowych, co wykazano m.in. w testach metabolicznych na

różnych liniach komórkowych (fibroblasty, HUVEC, LoVo); (ii) po ekspozycji na kolchicynę wolną analiza ultrastruktury w TEM wykazała znaczne uszkodzenia komórkowe, natomiast po zastosowaniu kolchicyny w nanonośnikach obraz ultrastruktury pozostawał zachowany; (iii) w modelu myszy C57BL/6 wolna kolchicina wykazywała wysoką toksyczność ogólnoustrojową (szybkie zgony i utrata masy ciała), podczas gdy nanocząstki z kolchicyną były dobrze tolerowane, bez istotnych zmian parametrów narządowych (ALT, AST, kreatynina, troponina I), masy ciała i przeżywalności w porównaniu do kontroli oraz grupy otrzymującej puste nanocząstki; (iv) ocena biodystrybucji z użyciem znakowania fluorescencyjnego wskazywała na akumulację nanonośników m.in. w wątrobie i sercu, co może być istotne w kontekście dalszych badań nad zastosowaniem terapeutycznym w układzie sercowo-naczyniowym.

Doktorantka kończy prezentację wyników ich podsumowaniem. W mojej ocenie warto by dodatkowo uzupełnić dysertację wnioskami zawierającymi główne przesłanie tej interesującej i wielokierunkowej rozprawy doktorskiej.

W trakcie lektury wyników i dyskusji nasunęło mi się kilka pytań i komentarzy:

1. Czy oceniano rozwój innych składowych zespołu metabolicznego poza parametrami lipidowymi u kawii domowej pod wpływem diety wysokotłuszczowej i/lub zakażenia *H. pylori* (masa ciała, poziom glikemii, triglicerydów, ciśnienie tętnicze)?
2. Czy zwierzęta zakażone *H. pylori* spożywały taką samą ilość karmy wysokotłuszczowej i standardowej co zwierzęta niezakażone? Czy przyrost masy u tych zwierząt był taki sam? Mogłoby to mieć wpływ na wyniki eksperymentów szczególnie w grupach otrzymujących dietę wysokotłuszczową. Zwierzęta jakiej płci zostały użyte w tej pracy i czy rozważano potencjalne różnice zależne od płci w odpowiedzi na dietę wysokotłuszczową i zakażenie *H.pylori*?
3. W niepublikowanych wynikach wykazano, że oksydowane sterole, mimo iż nie prowadziły do klasycznej aktywacji inflamasyonu NLRP3 (ocenianej fluorescencyjnie ani poprzez wydzielanie IL-1 β), najsilniej indukowały transformację makrofagów w komórki piankowate w sposób zależny od obecności NLRP3? Czy Doktorantka mogłaby zaproponować interpretację tych wyników?
4. Dawka kolchicyny zastosowana w pracy nr 2 (1.2 mg/kg) pomimo, że stanowiła 25% dawki LD50, była wysoce toksyczna dla myszy i prowadziła w krótkim czasie do zgonu wszystkich zwierząt w grupie. Czy Doktorantka rozważała zastosowanie niższej dawki wolnej kolchicyny (np. ~0,1 mg/kg), wynikającej z przeliczenia allometrycznego dawki klinicznej (0,5 mg/dobę)? Taka dawka została również zastosowana w pracy Tang 2023, doi.org/10.1186/s12951-023-02228-z porównującej bezpieczeństwo i skuteczność przeciwmiażdżycową kolchicyny wolnej i enkapsulowanej w nanocząstkach u myszy ApoE^{-/-}.

5. Czy Doktorantka dysponuje danymi farmakokinetycznymi (np. stężenie kolchicyny w osoczu) po podaniu wolnej kolchicyny i kolchicyny uwalnianej z nanocząstek?
6. Bardzo wartościowym uzupełnieniem przedstawionych badań byłoby wykazanie bezpośredniego efektu przeciwmiażdżycowego kolchicyny enkapsulowanej w nanocząstkach w odpowiednim modelu miażdżycy *in vivo*, co istotnie wzmocniłoby wnioski dotyczące jej potencjału terapeutycznego oraz zwiększyło znaczenie translacyjne uzyskanych wyników w kontekście klinicznym.

Podsumowanie i ocena końcowa

Przedstawione uwagi i komentarze nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej. Jestem pod dużym wrażeniem zarówno ilości, jak i różnorodności badań wykonanych w ramach tej pracy. Wyniki przedstawione przez Doktorantkę istotnie poszerzają wiedzę o roli współistniejących przewlekłych bodźców zapalnych o podłożu infekcyjnym i metabolicznym, w modulowaniu środowiska promiażdżycowego, w tym mechanizmów zależnych od aktywacji makrofagów i dysfunkcji śródbłónka. **Na szczególne wyróżnienie zasługuje część pracy poświęcona propozycji optymalizacji terapii przeciwzapalnej z wykorzystaniem kolchicyny dostarczanej za pomocą nanonośników, która stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i medycznego, jakim jest potrzeba ograniczenia działań niepożądanych towarzyszących leczeniu przeciwzapalnemu kolchicyną.** Mocną stroną rozprawy jest również jej aspekt technologiczny polegający na opracowaniu polimerowych nanonośników wytwarzanych z wykorzystaniem techniki mikroprzepływowej, co umożliwiło uzyskanie stabilnych nanocząstek o jednorodnych parametrach i kontrolowanym uwalnianiu leku. Użycie gwiazdzistego poli(kwasu mlekowego) (PLA) istotnie zwiększyło zdolność załadunku leku i efektywność jego enkapsulacji w porównaniu z liniowymi systemami polimerowymi. Autorzy przeprowadzili kompleksową charakterystykę opracowanej formulacji, obejmującą zarówno analizy fizykochemiczne, jak i ocenę biologiczną. Wartościowe są dane jednoznaczne wskazujące, że enkapsulacja kolchicyny istotnie poprawia jej profil bezpieczeństwa, wyraźnie redukując toksyczność w badaniach *in vitro* i *in vivo* w porównaniu z formą wolną, gwarantując stopniowe przedłużone uwalnianie leku. Przeprowadzenie prób bezpieczeństwa u zwierząt *in vivo* wzmacnia potencjał translacyjny tego rozwiązania technologicznego.

Wartość rozprawy podnosi również fakt, że znaczna część wyników została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, a zatem przeszła wymagający proces recenzji. Rozdziały „Wstęp” i „Dyskusja” pozwalają na pozytywną ocenę wiedzy teoretycznej Doktorantki w obszarze prowadzonych badań. Doktorantka swobodnie porusza się zarówno w obszarze badań podstawowych

prowadzonych na modelach zwierzęcych i liniach komórkowych, jak i w zakresie badań z użyciem materiału ludzkiego. Zaprezentowała również umiejętność posługiwania się licznymi, metodami badawczymi w tym umiejętnością wymagającej pracy w modelach zwierzęcych. Taki warsztat eksperymentalny stanowi mocną podstawę do dalszego, samodzielnego rozwoju naukowego.

Konkluzja formalna

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 r. poz. 574). W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne **o dopuszczenie mgr Agaty Izabeli Tomaszewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

Jednocześnie, z uwagi na fakt, uzyskanie wyników o istotnym znaczeniu poznawczym, a także potencjalnym znaczeniu klinicznym i aplikacyjnym ukierunkowanym na poprawę profilu bezpieczeństwa leku, a także opublikowanie wyników w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym **wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**