

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek.mgr inż. Julii Krajewskiej pt. „Opracowanie nowych form terapii celowanej nieswoistych chorób zapalnych jelit o zwiększonej biodostępności i efektywności terapeutycznej w oparciu o związki pochodzenia roślinnego i kompleksy metali oraz formułacje liposomowe”, której promotorem jest prof.dr hab. n.med. Jakub Fichna, kierownik Zakładu Biochemii Katedry Biochemii i Chemii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) to grupa nieuleczalnych, przewlekłych chorób zapalnych układu pokarmowego o wieloczynnikowej patogenezie. Zapadalność na NChZJ wzrasta, a jednocześnie rośnie też liczba chorych z nawrotami oraz nieskutecznym leczeniem. Dlatego istnieje potrzeba opracowania nowych strategii terapeutycznych.

Celem pracy doktorskiej była ocena nowych potencjalnych form terapii NChZJ poprzez zdefiniowanie działania przeciwzapalnego liposomów, nanocząstek srebra otrzymanych przy wykorzystaniu ekstraktu z czarnej porzeczki oraz kompleksu złota (III).

Rozprawa posiada typowy układ i składa się z następujących rozdziałów: 1.Wprowadzenie, 2.Założenia i cele badawcze rozprawy doktorskiej, 3.Materiał i metody, 4.Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, 5.Wyniki i dyskusja, 6.Podsumowanie, 7.Finansowanie. 8.Bibliografia, 9.Zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds.Doświadczeń na Zwierzętach, 10. Oświadczenia współautorów. Całość jest poprzedzona spisem treści, streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów.

We wstępie Autorka omawia krótko nieswoiste choroby zapalne jelit w aspekcie ich epidemiologii, etiopatogenezy, następnie ich obraz kliniczny i leczenie. Zawiera w tych rozdziałach podstawowe i najważniejsze informacje, słusznie nie rozbudowując nadmiernie tej części teoretycznej. W następnym podrozdziale rozdziału „1.Wprowadzenie” omawia kierunki badań w poszukiwaniu nowych terapii, w tym nanocząstki, formułacje liposomowe i preparaty

metali. Wykazuje się w tych podrozdziałach dużą wiedzą specjalistyczną, jednocześnie nie męcząc czytelnika nadmiernymi szczegółami.

Następnie Doktorantka formułuje założenia i cele badawcze rozprawy doktorskiej. Cele te są skonstruowane w sposób jasny i logiczny. Głównym celem pracy doktorskiej było poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych NChZJ, które pozwoliłyby zwiększyć efektywność leczenia, jednocześnie minimalizując działania niepożądane występujące przy obecnie stosowanych terapiach. Natomiast cele szczegółowe to: 1) Ocena możliwości wykorzystania terapii liposomowej dla zoptymalizowania leczenia chorób układu pokarmowego – przegląd literatury, 2) Enkapsulacja liposomowa związków aktywnych i ocena jej skuteczności w mysim modelu stanu zapalnego jelita, 3) Scharakteryzowanie nanocząstek srebra zsyntetyzowanych przy użyciu ekstraktu z czarnej porzeczki w modelach *in vitro* oraz w mysim modelu stanu zapalnego jelita, 4) Zbadanie nowo zsyntetyzowanego kompleksu złota (III) w modelach *in vitro* oraz *in vivo*.

W kolejnym dużym rozdziale „3.Materiał i Metody” Autorka omawia przygotowanie preparatów, w tym liposomów, nanocząstek srebra, związków kompleksowych złota (III) – TGS 121. Przygotowanie nanocząstek srebra oraz związków złota miało miejsce w ramach współpracy z Wydziałem Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej im. Tadeusza Kościuszki oraz jednostką innowacyjno-wdrożeniową Inwex Sp. z o.o. z Kielc. W kolejnym podrozdziale autorka opisuje modele komórkowe, w tym hodowlę komórkową, badanie cytotoksyczności preparatów za pomocą testu wychwytu czerwieni obojętnej, test Griessa. Następny rozdział to omówienie modeli zwierzęcych, w tym: warunki hodowli, opis mysiego modelu stanu zapalnego jelit wywołanego przez TNBS, a następnie DSS, ocena makroskopowa w modelu TNBS oraz DSS, ocena mikroskopowa, oznaczenie aktywności mieloperoksydazy. Doktorantka przybliży następnie czytelnikowi oznaczenia biomolekularne, w tym ocenę parametrów stresu oksydacyjnego, izolację RNA, odwrotnej transkrypcji i real-time PCR. Wszystkie te metody Doktorantka opisuje wystarczająco dokładnie dla czytelnika a jednocześnie opisy te nie są przeładowane nadmiarem szczegółów, które mogłyby spowodować niezrozumiałość lub słabą czytelność tego rozdziału.

Na końcu części metodycznej przedstawia metody statystyczne użyte do obliczenia wyników. Zastosowane testy statystyczne są adekwatne do badanego materiału. Na szczególną uwagę w tym podrozdziale zasługuje zastosowanie testu Grubbsa jako metodę pozwalającą na statystycznie zasadne usuwanie wartości odstających oraz po to, aby zidentyfikować

skrajnie odchyłone wyniki w analizowanym zbiorze danych. Jest to szczególnie cenny test w badaniach laboratoryjnych, gdyż niejednokrotnie zdarza się, że pojedyncze wyniki skrajnie odbiegające od pozostałych potrafią znacznie „przesunąć” średnią, jednocześnie zwiększając odchylenie standardowe, co przyczynia się do zafałszowania rzeczywistych wyników i/lub utraty znamienności statystycznej.

Rozprawa powstała na podstawie 4 znakomitych prac opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o wysokich lub bardzo wysokich współczynnikach oddziaływania:

1. Krajewska J, Bartoszek A, Fichna J. (2018) New trends in liposome-based drug delivery in colorectal cancer. *Mini Rev Med Chem.* 2019;19(1):3-11. doi: 10.2174/1389557518666180903150928. Epub 2018 Sep 3. PMID: 30179131 Współczynnik wpływu IF 2019 2,733; pkt MNiSW 70 (stan na 2019 rok).

2. Krajewska JB, Pietruszka P, Tomczyk D, Chen C, Owczarek A, Karolewicz B, Czapor-
Irzabek H, Gorniak A, Fichna J. (2019) Evaluation of the effect of liposomes loaded with chlorogenic acid in treatment of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis. *J Physiol Pharmacol.* 2019 Apr;70(2). doi: 10.26402/jpp.2019.2.10 Współczynnik wpływu IF 2019 2,644; pkt MNiSW 70 (stan na 2019 rok).

3. Krajewska JB, Długosz O, Sałaga M, Banach M, Fichna J. (2020) Silver nanoparticles based on blackcurrant extract show potent anti-inflammatory effect in vitro and in DSS-induced colitis in mice. *Int J Pharm.* 2020 Jul 30;585:119549. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119549. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32554032 Współczynnik wpływu IF 2020 5,875; pkt MNiSW 100 (stan na 2020 rok)

4. Krajewska JB, Włodarczyk J, Jacenik D, Kordek R, Taciak P, Szczepaniak R, Fichna J. (2021) New Class of Anti-Inflammatory Therapeutics Based on Gold (III) Complexes in Intestinal Inflammation-Proof of Concept Based on In Vitro and In Vivo Studies. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 18;22(6):3121. doi: 10.3390/ijms22063121. PMID: 33803793 Współczynnik wpływu IF 2021 6,208; pkt MEiN 140 (stan na 2021 rok).

Łączny IF z tych 4 opublikowanych prac wynosi 17,460, co w sposób jednoznaczny określa niezwykle wysoki poziom rozprawy doktorskiej.

W szczególnie interesującym rozdziale „Wyniki i dyskusja”, Autorka streszcza cztery publikowane przez siebie prace, omawiając cztery główne aspekty swoich badań. W zakresie nowych strategii w leczeniu raka jelita grubego w oparciu o liposomy opiera się na swojej pracy przeglądowej „New trends in liposome-based drug delivery in colorectal cancer”, w której

omawia badania dotyczące wykorzystania liposomów dla skutecznego dostarczenia leków przeciwnowotworowych w raku jelita grubego (RJG), a także opisuje wyniki doświadczeń „in vitro” oraz „in vivo” i preparaty, które są już w stadium badań klinicznych. Autorka podkreśla, że stan zapalny jest nierozdzielnie związany z karcynogenezą, a ogólnoustrojowy stan zapalny ma szeroko zakrojony wpływ na rozwój RJG, włączając takie zjawiska jak inwazja komórek nowotworowych guza pierwotnego, proliferacja, angiogeneza i metastaza oraz hamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej. Wymienia trzy typy zapalenia związane z RJG: przewlekłe zapalenie poprzedzające nowotworzenie, zapalenie wywołane przez guz nowotworowy, a także zapalenie spowodowane terapią przeciwnowotworową. Szczególnym przypadkiem nowotworzenia uwarunkowanego zapaleniem jest RJG związany z zapaleniem jelita grubego, przy czym NChZJ zwiększa ryzyko wystąpienia RJG około 2 – 3 krotnie. Dlatego skuteczna terapia NChZJ to także skuteczna profilaktyka przeciw RJG.

W oparciu o literaturę Autorka wykazała, że dostarczanie chemioterapeutyków enkapsulowanych w liposomach znacząco zwiększa skuteczność działania leków, a także przeciwdziała chemiooporności, szczególnie jeśli wykorzystane są metody celowanego dostarczenia liposomów. Jest to zagadnienie szczególnie ważne w dobie wzrastającej lekooporności. Doktorantka przedyskutowała także próby enkapsulacji więcej niż jednego chemioterapeutyku w jednym preparacie.

Badania z zakresu wykorzystania liposomów w terapii chorób zapalnych Autorka opisała w artykule „Evaluation of the effect of liposomes loaded with chlorogenic acid in treatment of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis”. Wyniki uzyskane w modelu zwierzęcym były zaskakujące, gdyż liposomy zawierające mesalazynę wykazały nieznaczne działanie przeciwzapalne. Na podstawie tych badań, jak również innych przytoczonych przez Doktorantkę wysunięto podejrzenie, że doszło do nagromadzenia liposomów na powierzchni błony śluzowej, lecz substancja czynna nie została dostarczona do tkanki. Zastosowanie liposomów z kwasem chlorogenowym o działaniu przeciwzapalnym w modelu zapalenia jelit nasiliło objawy stanu zapalnego. Autorka wskazuje, że każdy aspekt przygotowania preparatów ma wpływ na ich działanie, dlatego wśród przyczyn można rozważyć nieodpowiedni skład lub proporcję lipidów. Mimo to, terapia liposomowa daje wiele możliwości, dlatego warto ją wziąć pod uwagę w przyszłości.

Autorka badała antyoksydacyjne właściwości ekstraktów roślinnych. Zastosowała je do przygotowania preparatów nanocząstek srebra. Badania te zawarła w artykule pt. „Silver

nanoparticles based on blackcurrant extract show potent anti-inflammatory effect in vitro and in DSS-induced colitis in mice". Związki aktywne obecne w ekstraktach roślinnych zapewniają efektywność, wydajność oraz przyjazność dla środowiska. Połączenie srebra i ekstraktu roślinnego w nanocząstkach pozwala na wykorzystanie różnych właściwości korzystnych dla leczenia stanu zapalnego jelit. Autorka przetestowała 2 zawiesiny o różnych rozmiarach nanocząstek srebra: o średnicy 95 nm (Ag95) oraz o średnicy 213 nm (Ag213). Lepszy okazał się Ag213, który był efektywny w stężeniach >1 ppm i stosowany w wyższych stężeniach nie powodował cytotoksyczności. In vivo, w mysim modelu zapalenia jelita wywołanym przez DSS, Ag213 wykazał silniejsze działanie przeciwzapalne niż Ag95.

Doktorantka badała też działanie kompleksu złota (III), TGS 121, w modelach zapalenia jelit, który podawany dożołądkowo wykazał działanie przeciwzapalne in vitro oraz in vivo, przy czym efekt był bardziej znaczący przy użyciu wyższej dawki. Badania te opublikowała w pracy pt. „New Class of Anti-Inflammatory Therapeutics Based on Gold (III) Complexes in Intestinal Inflammation - Proof of Concept Based on In Vitro and In Vivo Studies”. W celu zaobserwowania zmian zachodzące pod wpływem TGS 121, Badaczka oznaczała stężenie hemoksygenazy, aktywność katalazy, peroksydazy glutationowej oraz cyklooksygenazy-1 i cyklooksygenazy-2, a także stężenie zredukowanej i utlenionej formy glutationu. Najbardziej jednoznaczne zmiany wystąpiły w przypadku hemooksygenazy, gdyż jej stężenie znacząco obniżyło się wraz z wystąpieniem stanu zapalnego, natomiast leczenie przy użyciu TGS 121 spowodowało jego istotny wzrost.

Badania Doktorantki prowadzone w ramach pracy doktorskiej stanowią istotny element poszukiwań w dziedzinie poprawy skuteczności leczenia w NChZJ oraz inspirację do dalszych prac. Dotychczasowe wyniki leczenia w NChZJ, włączając leczenie biologiczne są niewystarczające. Dlatego prezentowane w pracy doktorskiej wyniki stanowią istotny wkład w rozwój metod terapeutycznych w tych ciężkich i uciążliwych chorobach. Należy podkreślić, że żadne z prezentowanych tu badań nie jest powtórzeniem, nawet z modyfikacją, badań prowadzonych gdzie indziej wcześniej. Przeciwnie, wszystkie opisane wyniki wnoszą nowe informacje, które mogą służyć udoskonalaniu terapii NChZJ i dają podstawy do dalszych analiz. Część pracy dotycząca badań nad technikami z użyciem liposomów może przyczynić się do optymalizacji tej technologii. Związki kompleksowe złota nie były dotychczas badane w zapaleniach jelit, dlatego wyjątkowo interesujący jest mechanizm działania TGS 121. Podobnie preparaty nanocząstek srebra otrzymane metodą przyjazną dla środowiska są zupełnie odmienne od

leków obecnie stosowanych w NChZJ. Te nowatorskie technologie mogą przyczynić się do optymalizacji terapii chorób zapalnych, zwłaszcza w trudnych przypadkach.

PODSUMOWANIE

Rozprawa doktorska Pani lek.mgr inż. Julii Krajewskiej oparta na cyklu publikacji, w którym Doktorantka odgrywa wiodącą rolę wnosząca istotny wkład do wiedzy na temat NChZJ oraz ich leczenia. Należy podkreślić, że badania prowadzone przez Doktorantkę, są bardzo oryginalne, nowatorskie, bardzo interesujące z punktu widzenia naukowego oraz niezwykle ważne z punktu widzenia klinicznego. Przedstawione są w sposób klarowny i ciekawy. Czytelnik zapoznaje się z nimi z dużym zainteresowaniem, przy czym Autorka dba o to by wszystko było zrozumiałe. Układ pracy nie budzi żadnych zastrzeżeń. Cele pracy są jasno sformułowane, metodyka wystarczająco szczegółowo przedstawiona a wyniki i dyskusja przedstawiają najistotniejsze elementy wcześniej opublikowanych prac. Dodatkowo dołączony jest spis piśmiennictwa zawierający prace najbliższe tematowi opracowywanym przez Autorkę. Właściwe jest umieszczanie w tekście cytowań. Praca jest napisana dobrym językiem, bez błędów, co pozwala na łatwą percepcję poruszanych zagadnień.

Na uwagę zasługuje bardzo duża dojrzałość naukowa Doktorantki, która potrafiła bardzo dobrze zaplanować badania, następnie w sposób profesjonalny je przeprowadzić, opracować i wyciągnąć właściwe wnioski. Widoczna jest ostrożność naukowa Doktorantki i właściwy dystans do prowadzonych przez siebie badań, a także duży obiektywizm. Dodatkowym rzadko spotykanym atutem Doktorantki jest fakt, że jest Ona zarówno lekarzem jak również inżynierem, co pozwala Jej prowadzić badania zarówno z punktu widzenia medycznego jak i technicznego.

Niżej podpisany Recenzent „niestety” nie znalazł żadnych uchybień w rozprawie doktorskiej lek. mgr inż. Julii Krajewskiej. Na swoje usprawiedliwienie Recenzent niniejszej pracy doktorskiej może jedynie stwierdzić, że Recenzenci, którzy dopuścili do publikacji cztery prace wchodzące w skład cyklu zapewne również mieli o nich bardzo dobre zdanie.

Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie kilku problemów naukowych, wykazuje dużą wiedzę Kandydatki zarówno teoretyczną jak i praktyczną (o czym świadczą właściwe zaplanowanie i przeprowadzenie badań) oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.). Liczne zalety pracy upoważniają mnie do postawienia wniosku o wyróżnienie.

Dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej pt. „Opracowanie nowych form terapii celowanej nieswoistych chorób zapalnych jelit o zwiększonej biodostępności i efektywności terapeutycznej w oparciu o związki pochodzenia roślinnego i kompleksy metali oraz formułacje liposomowe” autorstwa lek. mgr inż. Julii Krajewskiej i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie tej pracy.

Z wyrazami szacunku

Prof. dr hab.n.med. i n o zdr. Marek Waluga

Prof. dr hab. n. med. Marek Waluga
Specjalista chorób wewnętrznych
i GASTROENTEROLOG
Nr prawa wyk. zaw. 8390020

