



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

**Recenzja**

**rozprawy doktorskiej Pani lek. mgr inż. Julii Krajewskiej  
pt. „Opracowanie nowych form terapii celowanej nieswoistych chorób zapalnych  
jelit o zwiększonej biodostępności i efektywności terapeutycznej w oparciu  
o związku pochodzenia roślinnego i kompleksy metali oraz formułacje  
liposomowe” przedłożonej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego  
w Łodzi celem uzyskania stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych**

Wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz choroba Leśniowskiego-Crohna zaliczają się do nieswoistych chorób zapalnych jelit. Są to schorzenia o nadal niewyjaśnionej etiologii, które charakteryzują się przewlekłym stanem zapalnym błony śluzowej i podśluzowej jelita lub wszystkich warstwy wybranego fragmentu ściany przewodu pokarmowego. W przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit występują zaostrzenia oraz okresy remisji o różnym *okresie/czasie* trwania. Warto zaznaczyć, że choroby te należą do czynników ryzyka rozwoju nowotworów jelita grubego. Mając na uwadze ograniczoną skuteczność dostępnej farmakoterapii celowym jest poszukiwanie strategii terapeutycznych opartych na nowych mechanizmach działania oraz opracowywanie nowych formułacji dla znanych leków.

W tym kontekście recenzowana praca wpisuje się w główny nurt działalności naukowej Zakładu Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, jakim jest badanie patofizjologicznych podstaw chorób przewlekłych o podłożu zapalnym oraz poszukiwanie nowych podejść terapeutycznych w leczeniu chorób zapalnych jelit. Tematyka dysertacji jest niezwykle interesująca pod względem naukowym i klinicznym.

Licząca 106 stron rozprawa ma charakter komentarza do spójnego tematycznie cyklu czterech publikacji, składającego się ze *i)* streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów, wprowadzenia, założeń i celu rozprawy, opisu materiałów i metod, opisu wyników badań i dyskusji, podsumowania, wskazania źródeł finansowania zrealizowanych badań i piśmiennictwa (42 aktualne pozycje), *ii)* zgód wydanych przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, *iii)* oświadczeń współautorów, określających wkład w powstanie artykułów, stanowiących podstawę rozprawy oraz *iv)* kopii czterech publikacji.

We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Analiza oświadczeń Doktorantki oraz współautorów w sposób jednoznaczny potwierdza wiodącą rolę lek. mgr inż. J. Krajewskiej w powstanie publikacji będących podstawą dysertacji, co w świetle wieloautorskiego charakteru prac zasługuje na szczególne podkreślenie. Doktorantka uczestniczyła m.in. w zebraniu materiałów źródłowych do pracy przeglądowej, zaplanowała doświadczenia, zrealizowała badania, przeprowadziła statystyczną analizę danych, opracowała manuskrypty.

We wprowadzeniu Doktorantka bardzo zwięźle podaje informacje na temat epidemiologii, etiopatogenezy, obrazu klinicznego oraz aktualnych metod leczenia nieswoistych chorób zapalnych jelit. Równie skrótowo, ale i rzeczowo, zaprezentowała kierunki badań nad bardziej skutecznymi strategiami leczenia. Autorka wskazała również najczęściej stosowane sposoby celowanego dostarczania substancji aktywnych do zmienionego zapalnie jelita oraz wskazała na przeciwzapalne właściwości wybranych metali szlachetnych.

Cel swoich badań Doktorantka zdefiniowała jako poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych nieswoistych chorób zapalnych jelit, które pozwoliłyby zwiększyć efektywność leczenia, jednocześnie minimalizując działania niepożądane, towarzyszące obecnie stosowanym lekom. Kolejno, autorka krótko omawia metodykę i przedstawia, w sposób zwięzły, wyniki i ich dyskusję (4 strony). Integralną i główną częścią rozprawy są 4 publikacje, które ukazały się drukiem w latach 2019–2021. Otwierająca cykl praca przeglądowa ukazała się w czasopiśmie z obszaru chemii medycznej *Mini Rev. Med. Chem.* (IF = 2,733). Kolejne trzy publikacje mają charakter oryginalnych prac eksperymentalnych i zostały ogłoszone w wydawnictwach z obszaru farmakologii i biologii molekularnej, tj. *J. Physiol Pharmacol.* (IF = 2,644), *Int. J. Pharm.* (IF = 5,875) i *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 6,208). Łączny współczynnik oddziaływania prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej wynosi 17,46, co odpowiada liczbie 380 punktów MNiE.

Lektura pracy przeglądowej dowodzi, że podejmując prace nad rozprawą autorka dysponowała wiedzą na temat korzyści wynikających z dostarczania chemioterapeutyków o działaniu przeciwnowotworowym w postaci liposomów. Wiedzę tę, świadoma ograniczeń technologicznych dotyczących liposomów, postanowiła wykorzystać realizując pierwszy cel swoich badań. W pierwszej pracy eksperymentalnej autorka podjęła się oceny skuteczności wykorzystania mesalazyny i kwasu chlorogenowego enkapsulowanych w liposomach w mysim modelu zapalenia jelita grubego indukowanym podaniem kwasu trinitrobenzenosulfonowego (TNBS). Struktura oraz właściwości fizykochemiczne liposomów, w sposób bezsprzeczny, zostały potwierdzone uznanymi metodami dzięki współpracy z prof. Bożeną Karolewicz z Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Jednak, jak stwierdziła autorka „*Wyniki uzyskane w modelu zwierzęcym były zaskakujące.*” Liposomy zawierające mesalazynę wykazały nieznaczne działanie przeciwzapalne, natomiast zastosowanie liposomów z kwasem chlorogenowym nasilało objawy stanu zapalnego.

Drugi obszar tematyczny dotyczył oceny właściwości przeciwzapalnych nanocząstek srebra uzyskanych przy wykorzystaniu właściwości redukujących ekstraktu z czarnej porzeczki. Ten wątek tematyczny, opierający się o ciekawy i przyjazny dla środowiska sposób otrzymywania nanocząstek, jest wynikiem współpracy z zespołem prof. Marcina

Banacha z Politechniki Krakowskiej. W swoich badaniach autorka poddała ocenie bezpieczeństwo oraz aktywność przeciwzapalną dwóch preparatów zawierających nanocząstki srebra o średnicy 95 nm (Ag 95) i 213 nm (Ag 213). Ocenę bezpieczeństwa nanocząstek przeprowadziła metodą *in vitro*, po 48-godzinnej ekspozycji komórek makrofagowej linii RAW264.7, przy użyciu testu wychwytu czerwieni obojętnej (NRU). Natomiast ocenę reakcji zapalnej *in vitro*, w linii makrofagowej RAW264.7 stymulowanej lipopolisacharydem, prowadziła dokonując oznaczeń zawartości azotynów metodą kolorymetryczną. Zastosowanie odczynnika Griessa umożliwiło przeprowadzenie ilościowej oceny tlenu azotu uznanego za marker stanu zapalnego. Doktorantka udowodniła, że zawiesiny zawierające dwa rodzaje nanocząstek zahamowały wytwarzanie tlenu azotu. Korzystniejszy profil bezpieczeństwa wykazał preparat zawierający nanocząstki Ag 213. W kolejnym etapie Doktorantka określiła właściwości przeciwzapalne nanocząstek srebra w modelu *in vivo* (po podaniu dojelitowym). Jako model badawczy zastosowała 7-dniowy myszy model stanu zapalnego jelit wywołany podaniem soli sodowej siarczanu dekstranu (DSS). Jako próbę kontrolną zastosowano 0,9% roztwór chlorku sodu. Analizę przeprowadzono na podstawie makroskopowej, mikroskopowej i biochemicznej oceny tkanek, pozyskanych po zakończeniu eksperymentu, wykorzystując odpowiednio skalę punktową oraz stosując metody spektrofotometryczne (do oceny m.in. aktywności mieloperoksydazy). Efektem przeprowadzonych doświadczeń jest obserwacja, że nanocząstki Ag 213 charakteryzują się korzystniejszym profilem bezpieczeństwa *in vitro* oraz wykazują silniejsze działanie przeciwzapalne *in vivo* niż nanocząstki Ag 95. Uzyskane wyniki potwierdzają tezę o zależności efektu zapalnego od rozmiaru nanocząstek. Natomiast określenie roli ekstraktu z czarnej porzeczki oraz preparatu srebra w obserwowanym efekcie przeciwzapalnym wymaga dalszych badań. Ewentualną synergię między działaniem przeciwzapalnym składników aktywnych ekstraktu z czarnej porzeczki oraz srebra w postaci nanocząstek można byłoby określić dokonując niezależnej oceny efektu przeciwzapalnego tych komponentów oraz ich łącznego podania. Powyższa uwaga nie umniejsza faktu, że uzyskane wyniki wprowadzają *novum* w temacie zastosowania formułacji, zawierających srebro w leczeniu chorób jelit o podłożu zapalnym.

Trzeci wątek tematyczny podjęty przez Doktorantkę dotyczył oceny aktywności przeciwzapalnej nowego kompleksowego związku złota III  $[\text{Au}(\text{CN})_4]_2(\text{ClO}_2)\text{Na}$  (TGS 121), w modelach zapalenia jelita. Preparat do badań uzyskano dzięki współpracy z firmą innowacyjno-wdrożeniową Inwex Sp. z o.o. z siedzibą Kielcach. Doktorantka ponownie dowiodła opanowania metod służących: *i*) ocenie bezpieczeństwa związków o aktywności biologicznej z wykorzystaniem testu NRU, *ii*) ocenie produkcji tlenu azotu w teście Griessa z wykorzystaniem linii makrofagowej stymulowanej lipopolisacharydem, *iii*) ocenie zmian makroskopowych i mikroskopowych w mysim modelu stanu zapalnego wywołanym podaniem DSS, *iv*) weryfikacji wpływu związków chemicznych na funkcję tkanek jelita, prowadząc pomiar aktywności mieloperoksydazy oraz *v*) określeniu wpływu związku TGS 121 na parametry stresu oksydacyjnego (katalaza, GSH, GSSG, GPX, Cox1, Cox2).

Autorka wykazała znaczący efekt przeciwzapalny nowego kompleksowego związku złota III w modelu *in vitro* oraz w mysim modelu zapalenia jelita po podaniu dożołądkowym. W badaniach biochemicznych, mających przybliżyć molekularny mechanizm działania

przeciwzapalnego związku TGS 121, Doktorantka zaobserwowała, że związek ten zwiększa aktywność hemooksygenazy. Natomiast analiza ekspresji genów kodujących białka, regulujące funkcję bariery jelitowej, wskazała, że związek TGS 121 podwyższa obniżoną w procesie zapalnym ekspresję klaudyny 15. Zapewne dalsze badania nad mechanizmem działania przeciwzapalnego nowego kompleksu złota są konieczne, jednak dokładna lektura publikacji będącej częścią rozprawy, potwierdza zrozumienia przez autorkę złożonego charakteru procesów zapalnych jelit. Otwiera to perspektywę na opracowanie bardziej celowanych sposobów leczenia nieswoistych chorób zapalnych jelit. Ten aspekt pracy jest szczególnie oryginalny i budzi moje zainteresowanie.

Chcę zwrócić uwagę, że realizacja ambitnych celów badawczych zaprezentowanych w ocenianej dysertacji była możliwa dzięki wsparciu finansowemu z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, w ramach projektu Team koordynowanego przez prof. Jakuba Fichnę, Narodowego Centrum Nauki oraz Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Oceniam przedstawioną pracę jako bardzo dobrą. Doktorantka z sukcesem zrealizowała założony cel. Zakres zastosowanych metod jest prawidłowy. Pewien niedosyt budzi skrótowy opis metod dotyczący m.in. doboru dawek badanych związków (mesalazyna, kwas chlorogenowy), sposobu opracowania formułacji do badań *in vivo* zawierających nanocząstki srebra. Ułatwieniem w analizie wyników byłoby wprowadzenie odwołania w sekcji „Wyniki i dyskusja” do konkretnych rycin w publikacjach stanowiących integralną część rozprawy. Przedstawione uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Autorka jednoznacznie udowodniła umiejętność interpretacji wyników, a wnioski zostały prawidłowo wyprowadzone.

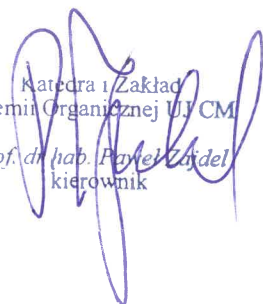
Lektura przedłożonej do oceny rozprawy skłoniła mnie do zdefiniowania poniższych problemów, mogących być punktem wyjścia do dyskusji z Doktorantką:


- 1) planując otrzymanie nowych formułacji do zastosowań w farmacji coraz większą uwagę zwraca się obecnie na kwestie ekologii i ograniczenia stosowania toksycznych rozpuszczalników i reagentów; czy opracowując formułacje oparte na liposomach konieczne jest zastosowanie chloroformu?
- 2) proszę o rozwinięcie myśli zawartej w stwierdzeniu „antyoksydacyjne właściwości ekstraktów roślinnych zastosowano do przygotowania preparatów nanocząstek srebra”?
- 3) krytycznym parametrem w rozwoju kandydatów na lek jest ich stabilność chemiczna i bezpieczeństwo; czy analizowano stabilność chemiczną związku TGS 121 w osoczu? Czy prowadzono ocenę cytotoksyczności nowych preparatów (nanocząstek srebra, kompleksu złota) wobec innych linii komórkowych niż mysia linia makrofagowa, np. ludzkich hepatocytów, czy też poddano ocenie wpływ na obraz krwi?
- 4) zapewne ze względu na rekomendacje Lokalnej Komisji Etycznej ocenę efektu przeciwzapalnego nowych preparatów metodami *in vivo* prowadzono wobec tzw. kontroli solnej (0,9 % roztwór NaCl); mając możliwość poszerzenia grup zwierząt laboratoryjnych, jakie substancje referencyjne należałoby zastosować dla potwierdzenia skuteczności nanocząstek srebra i kompleksów złota?

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym, w związku z czym zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. mgr inż. Julii Krajewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze oryginalność badań zaprezentowanych w rozprawie, ich wysoką wartość merytoryczną, fakt realizacji badań w interdyscyplinarnym zespole badawczym i integrację w rozprawie wiedzy z obszaru chemii bioorganicznej, biochemii, technologii postaci leku i farmakologii eksperymentalnej; również potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników i współpracę z prywatnymi jednostkami naukowo-wdrożeniowymi, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Julii Krajewskiej.

Kraków, 06.03.2023 r.

Katedra i Zakład  
Chemii Organicznej UJ CM  
prof. dr hab. Paweł Zajdel  
kierownik



Prof. dr hab. n. farm. Paweł Zajdel  
Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Organicznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków  
 [pawel.zajdel@uj.edu.pl](mailto:pawel.zajdel@uj.edu.pl)