



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Agata Izabela Tomaszewska

Praca doktorska:

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

Doctoral thesis:

**Inflammation in atherosclerotic disease:
the role of metabolic syndrome induced
by *Haelicobacter pylori* components and
diet, and a proposal for anti-
inflammatory therapy**

- Promotor/Supervisor
dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
- Promotor pomocniczy/Assistant Supervisor
dr hab. Weronika Gonciarz, prof. UŁ
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

*Pracę dedykuję mojemu narzeczonemu **Maciejowi**, który był zawsze nieocenionym wsparciem, a nasze konstruktywne i długie dyskusje pozwoliły mi rozwiązać nie jeden problem naukowy.*

*Serdeczne podziękowania kieruję do mojej Promotor dr hab. **Agnieszki Krupy**, prof. UŁ, za nieustanną motywację oraz zaufanie do mnie, jak i moich naukowych pomysłów, a także za pomoc merytoryczną, cenne wskazówki i rady podczas całego procesu przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Promotor pomocniczej, dr. hab. **Weronice Gonciarz**, prof. UŁ, za poświęcony czas i cenne uwagi.*

Dziękuję również wszystkim pracownikom i doktorantom Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego za życzliwość, pomoc, wsparcie, a także wspólne narzekanie, które nie raz pomagało przetrwać gorsze dni.

Podziękowania kieruję również do Dyrektora oraz Sekretarza Szkoły Doktorskiej BioMedChem za wsparcie mojego kształcenia.

Jednocześnie chciałabym podziękować wszystkim osobom, bez których praca ta nie mogłaby zaistnieć w aktualnej formie, w szczególności

Prof. Magdalenie Mikołajczyk-Chmieli

Prof. Tomaszowi Rechcińskiemu

Dr. Bartłomiejowi Kostowi

Dr hab. Markowi Brzezińskiemu Prof. CBMiM PAN

Dr Karolinie Rudnickiej, Prof. UŁ

*Na sam koniec chciałabym również podziękować bliskim mi osobom, w szczególności siostrze **Róży** oraz mamie **Izabeli** za wiarę w moje możliwości, wsparcie w dążeniu do obranych celów oraz po prostu bycie obecnymi w moim życiu od samego początku mojej drogi naukowej.*

Spis treści

Źródła finansowania	4
Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej	5
Streszczenie.....	6
Streszczenie w języku angielskim	8
Wykaz skrótów	11
1.Wstęp	13
1.1. Miażdżyca - od czynników ryzyka do zmian komórkowych i molekularnych.....	14
1.1.1. Udział <i>H. pylori</i> w patogenezie miażdżycy.....	15
1.2. Stan zapalny śródbłotka jako środowisko do inicjacji zmian miażdżycowych	17
1.2.1. Rola utlenionych lipoprotein LDL w inicjacji reakcji zapalnej	18
1.2.2. Rola odpowiedzi zapalnej w formowaniu i destabilizacji blaszek miażdżycowych.....	19
1.2.3. Inflamasom NLRP3 i receptory TREM – molekularna regulacja powstawania komórek piankowatych.....	21
1.3. Przewlekły stan zapalny i zaburzenia lipidowe jako łącznik między miażdżycą a stłuszczeniową chorobą wątroby o podłożu metabolicznym	23
1.4. Przewlekły stan zapalny w miażdżycy jako cel terapeutyczny	27
1.4.1. Kolchicina w terapii przeciwzapalnej miażdżycy	27
1.4.2. Nanotechnologiczne strategie modyfikacji kolchicyny	30
2. Uzasadnienie podjęcia tematu	32
3. Hipotezy badawcze.....	34
4. Cele pracy doktorskiej.....	35
5. Materiały i Metody.....	36
5.1. Materiały.....	36
5.2. Metody – wykaz metod stosowanych w pracy doktorskiej	37
5.3. Opis metod stosowanych w pracy doktorskiej – wyniki nieopublikowane	38
5.3.1 Oceny aktywacji inflamasomu NLRP3 w komórkach monocytarno-makrofagowych.....	38
5.3.2. Pomiar stężenia ludzkiej IL-1 β	39
5.3.3. Ocena transformacji makrofagów linii THP-1 oraz THPKONLRP3 w komórki piankowate	39
5.3.4. Ocena ekspresji transbłonowej formy receptora TREM2 w tkance i na	39
komórkach monocytarno-makrofagowych	39
5.3.5. Pomiar stężenia rozpuszczalnej formy receptora TREM2 (sTREM2)	40
5.3.6. Analiza statystyczna.....	41

6. Wyniki	42
6.1. Wpływ wybranych rozpuszczalnych komponentów <i>H. pylori</i> i utlenionych steroli na rozwój zmian promiążdżycowych i zespołu metabolicznego (Publikacja I)	42
6.2. Rola inflamasomu NLRP3 w transformacji makrofagów i rozwoju zmian promiążdżycowych indukowanych przez wybrane rozpuszczalne komponenty <i>H. pylori</i> i sterole (wyniki nieopublikowane).....	60
6.2.1. Aktywacja inflamasomu NLRP3 w makrofagach po ekspozycji na komponenty bakteryjne i oksydowane sterole	60
6.2.2. Inflasom NLRP3 jako kluczowy element transformacji makrofagów w komórki piankowe	62
6.2.3. Identyfikacja receptora TREM2 w formie błonowej lub rozpuszczalnej w surowicy zaangażowanego w procesy zapalne w miażdżycy – pilotażowe badanie z wykorzystaniem materiału klinicznego	64
6.2.4. Ekspresja TREM2 w komórkach monocytarnych, oceniana w hodowlach in vitro po ekspozycji na czynniki infekcyjne i utlenione sterole.	67
6.3. Kolchicina w nośniku polimerowym jako potencjalny modulator stanu zapalnego – ocena bezpieczeństwa i skuteczności w badaniach in vitro i in vivo (Publikacja II – odpowiedzi na recenzje).....	69
7. Podsumowanie wyników	111
8. Dyskusja	112
9. Literatura.....	119
10. Dorobek naukowy	126
10.1 Pozostałe publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej	126
10.2 Projekty.....	126
11. Załączniki	127

Źródła finansowania



Doktoranckie Granty Badawcze „Inicjatywa
Doskonałości-Uczelnia Badawcza (IDUB).
(8/DGB/IDUB/2022)

Inflamasom NLRP3 jako główny czynnik regulujący aktywność makrofagów
piankowatych w patogenezie miażdżycy – zastosowanie innowacyjnych nanocząstek,
sprzężonych z kolchicyną, w hamowaniu rozwoju i progresji zmian zapalnych
i promiażdżycowych zachodzących w obrębie komórek makrofagowych.

Kierownik grantu: Agata Tomaszewska



Granty Badawcze dla Doświadczonych Naukowców
„Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza (IDUB).
(projekt **B2211002000121.07**)

Innowacyjne nanocząsteczki skoniugowane z kolchicyną jako broń do walki ze
zmianami zapalnymi i promiażdżycowymi w śródbłonku naczyńniowym

Kierownik grantu: dr hab. Agnieszka Krupa, prof. UŁ



**Badania zrealizowane zostały we współpracy z
Dr Bartłomiejem Kostem oraz
Dr hab. Markiem Brzezińskim Prof. CBMiM
z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk w Łodzi**

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

P.I. —, „*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

P.II. —, „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.

Manuskrypt w trakcie recenzji w czasopiśmie Scientific Reports

Streszczenie

Miażdżyca to przewlekły procesem zapalny naczyń krwionośnych, będący główną przyczyną chorób sercowo-naczyniowych, w tym choroby niedokrwiennej serca. Do klasycznych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy zalicza się: nadciśnienie, hipercholesterolemię, cukrzycę typu 2 oraz palenie tytoniu. Coraz częściej zwraca się uwagę na tzw. nieklasyczne czynniki ryzyka, takie jak przewlekły stan zapalny wywołany przez czynniki zakaźne. Zaburzają one metabolizm oraz aktywują układ immunologiczny. Jednym z takich czynników zakaźnych jest *Helicobacter pylori* - Gram-ujemna pałeczka kolonizująca błonę śluzową żołądka. Co ciekawe, badania wskazują, że *H. pylori* występuje częściej u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca. Coraz większą rolę w patogenezie miażdżycy przypisuje się również stłuszczeniowej chorobie wątroby o podłożu metabolicznym (MAFLD), związanej z zaburzeniami lipidowymi i przewlekłym stanem zapalnym. MAFLD sprzyja rozwojowi miażdżycy poprzez nadprodukcję promiażdżycowych lipoprotein oraz uszkodzenie śródbłonka naczyniowego. Zakażenia przewodu pokarmowego, w tym infekcje wywołane przez *H. pylori*, mogą dodatkowo pogłębiać zaburzenia metaboliczne oraz dysbiozę jelitową, co jeszcze bardziej zwiększa ryzyko sercowo-naczyniowe.

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystano model *in vivo* kawy domowej w celu oceny wpływu zakażenia *Helicobacter pylori* oraz diety wysokotłuszczowej na rozwój zmian promiażdżycowych i zespołu metabolicznego. Wykazano, że zarówno dieta, jak i zakażenie *H. pylori* prowadzą do podwyższenia poziomu LDL, nasilonej peroksydacji lipidów, apoptozy komórek śródbłonka oraz odkładania oxLDL w ścianach naczyń krwionośnych. Najbardziej zaawansowane zmiany obserwowano u zwierząt jednocześnie zakażonych *H. pylori* i karmionych dietą wysokotłuszczową. Stwierdzono również istotny związek między obecnością zakażenia i wysokotłuszczowej diety, a nasileniem stłuszczenia wątroby u zwierząt, co potwierdza udział tych czynników w rozwoju MASLD i miażdżycy. Wyniki te mogą mieć potencjalne zastosowanie w identyfikacji wczesnych markerów rozwijających się zmian miażdżycowych.

Dodatkowo na modelu komórkowym *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich monocytów potwierdzono udział składników bakteryjnych *H. pylori* oraz utlenionego sterolu w aktywacji inflamasomu NLRP3, jak również w nasilaniu transformacji monocytów w komórki piankowate. Wykazano także istotną rolę samego inflamasomu NLRP3

w procesie przekształcania makrofagów w komórki piankowe, co może stanowić istotną przesłankę do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu miażdżycy.

W przedstawionych badaniach zaproponowano również możliwość zastosowania kolchicyny zamkniętej w polimerowych nanonośnikach jako potencjalnej terapii przeciwzapalnej w miażdżycy. Kolchicina w niskich dawkach (0,5mg/ dobę) od 2023 roku jest dopuszczona przez FDA do stosowania w profilaktyce incydentów sercowo-naczyniowym u pacjentów z miażdżycą. Jednak w swojej klasycznej postaci wykazuje silne działania niepożądane, zwłaszcza ze strony układu pokarmowego. Zamknięcie kolchicyny w polimerowych nanocząstkach zmniejszyło jej działanie cytotoksyczne względem komórek eukariotycznych w porównaniu z klasyczną, niezmodyfikowaną formą leku. Ponadto nanocząstki załadowane kolchicyną wykazały porównywalną skuteczność w hamowaniu transformacji makrofagów w komórki piankowe, jak wolna kolchicina, przy jednoczesnym mniejszym działaniu cytotoksycznym. Dodatkowo w modelu zwierzęcym potwierdzono brak efektów hepatotoksycznych, nefrotoksycznych jak i kardiotoxycznych kolchicyny zamkniętej w nanocząstkach.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że zakażenie *H. pylori* oraz zaburzenia metaboliczne charakterystyczne dla MAFLD mogą działać synergistycznie, nasilając odpowiedź zapalną w ścianie naczyń i promując rozwój miażdżycy. Istotną rolę w rozwoju proaterogennych procesów zapalnych odgrywa inflammasom NLRP3, uczestniczący w przekształcaniu makrofagów w komórki piankowe. Jego aktywność może być skutecznie ograniczana przez kolchicynę zamkniętą w polimerowych nanocząstkach, co wskazuje na potencjał tej formy leku w terapii przeciwmiażdżycowej.

Streszczenie w języku angielskim

Atherosclerosis is a chronic inflammatory process of blood vessels, which is the leading cause of cardiovascular diseases, including ischemic heart disease. Classic risk factors for the development of atherosclerosis include hypertension, hypercholesterolemia, type 2 diabetes, and smoking. Increasing attention is being paid to so-called non-classical risk factors, such as chronic inflammation caused by infectious agents. These disrupt metabolism and activate the immune system. One such contagious agent is *Helicobacter pylori*, a Gram-negative bacillus that colonizes the gastric mucosa. Interestingly, studies indicate that *H. pylori* is more common in patients with ischemic heart disease. Metabolic fatty liver disease (MAFLD), associated with lipid disorders and chronic inflammation, is also increasingly recognized as playing a role in the pathogenesis of atherosclerosis. MAFLD promotes the development of atherosclerosis through the overproduction of proatherogenic lipoproteins and damage to the vascular endothelium. Gastrointestinal infections, including those caused by *H. pylori*, may further exacerbate metabolic disorders and intestinal dysbiosis, thereby increasing cardiovascular risk.

In this doctoral dissertation, an *in vivo* model using domestic guinea pigs was employed to evaluate the effects of *Helicobacter pylori* infection and a high-fat diet on the development of pro-atherosclerotic changes and metabolic syndrome. It was demonstrated that both diet and *H. pylori* infection lead to increased LDL levels, enhanced lipid peroxidation, endothelial cell apoptosis, and the deposition of oxLDL in blood vessel walls. The most advanced changes were observed in animals simultaneously infected with *H. pylori* and fed a high-fat diet. A significant association was also found between the presence of infection and a high-fat diet and the severity of liver steatosis in animals, confirming the involvement of these factors in the development of MASLD and atherosclerosis. These findings may have potential applications in identifying early markers of developing atherosclerotic changes.

In addition, an *in vitro* cell model using human monocytes confirmed the involvement of bacterial components of *H. pylori* and oxidized sterols in activating the NLRP3 inflammasome, as well as in enhancing the transformation of monocytes into foam cells. The critical role of the NLRP3 inflammasome itself in the transformation of macrophages into foam cells was also demonstrated, which may be an essential basis for the search for new therapeutic strategies in the treatment of atherosclerosis.

The presented studies also suggested the possibility of using colchicine encapsulated in polymeric nanocarriers as a potential anti-inflammatory therapy in atherosclerosis. Low doses of colchicine (0.5 mg/day) have been approved by the FDA since 2023 for the prevention of cardiovascular events in patients with atherosclerosis. However, in its classic form, it has strong side effects, especially on the digestive system. Encapsulating colchicine in polymer nanoparticles reduced its cytotoxic effect on eukaryotic cells compared to the classic, unmodified form of the drug. In addition, colchicine-loaded nanoparticles showed comparable efficacy in inhibiting the transformation of macrophages into foam cells as free colchicine, with simultaneously lower cytotoxicity. Furthermore, the absence of hepatotoxic, nephrotoxic, and cardiotoxic effects of colchicine encapsulated in nanoparticles was confirmed in an animal model.

In summary, the results obtained indicate that *H. pylori* infection and metabolic disorders characteristic of MAFLD may act synergistically, exacerbating the inflammatory response in the vessel wall and promoting the development of atherosclerosis. The NLRP3 inflammasome, which contributes to the transformation of macrophages into foam cells, plays a crucial role in the development of proatherogenic inflammatory processes. Its activity can be effectively reduced by colchicine encapsulated in polymer nanoparticles, indicating the potential of this drug form in anti-atherosclerotic therapy.

Wykaz skrótów

4-HNE – ang. *4-hydroxynonenal* – 4-hidroksynonenal

ApoB – ang. *Apolipoprotein B* – Apolipoproteina B

ApoC3 – ang. *Apolipoprotein C3* – Apolipoproteina C3

ApoE – ang. *Apolipoprotein E* – Apolipoproteina E

CagA – ang. *Cytotoxin-associated gene A* – Białko związane z cytotoksyną A

ChNS – Choroba niedokrwienna serca

COX-1/COX-2 – ang. *Cyclooxygenase-1/2* – Cyklooksigenaza 1 i 2

CRP – ang. *C-reactive protein* – Białko C-reaktywne

DAMP – ang. *Damage-associated molecular patterns* – Wzorce molekularne związane z uszkodzeniem komórki

ECM – ang. *Extracellular matrix* – Macierz pozakomórkowa

FDA – ang. *Food and Drug Administration* – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków

HDL – ang. *High-density lipoprotein* – Lipoproteina o wysokiej gęstości

ICAM-1 – ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1* – Międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1

IDL – ang. *Intermediate-density lipoprotein* – Lipoproteina o pośredniej gęstości

IFN- γ – ang. *Interferon gamma* – Interferon gamma

IL – ang. *Interleukin* – Interleukina

LDL – ang. *Low-density lipoprotein* – Lipoproteina o niskiej gęstości

LDLR – ang. *Low-density lipoprotein receptor* – Receptor lipoproteiny o niskiej gęstości

LPS – ang. *Lipopolysaccharide* – Lipopolisacharyd

MAFLD – ang. *Metabolic-associated fatty liver disease* – Stłuszczeniowa choroba wątroby o podłożu metabolicznym

MALT – ang. *Mucosa-associated lymphoid tissue* – Tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi

MASH – ang. *Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis* – Stłuszczeniowe zapalenie wątroby związane z zaburzeniami metabolicznymi

MCP-1 – ang. *Monocyte chemoattractant protein-1* – Białko chemotaktyczne monocytów-1

mmLDL – ang. *Minimally modified low-density lipoprotein* – Minimalnie zmodyfikowana lipoproteina o niskiej gęstości

NF- κ B – ang. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* – Jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B

NLRP3 – ang. *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* – Białko zawierające domeny NACHT, LRR i PYD 3 z rodziny NLR

NO – ang. *Nitric oxide* – Tlenek azotu

oxLDL – ang. *Oxidized low-density lipoprotein* – Utleniona lipoproteina o niskiej gęstości

p38/MAPK – ang. *p38 Mitogen-Activated Protein Kinase pathway* – Szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p38

PAMP – ang. *Pathogen-associated molecular patterns* – Wzorce molekularne związane z patogenami

ROS – ang. *Reactive oxygen species* – Reaktywne formy tlenu

TGF- β – ang. *Transforming growth factor beta* – Transformujący czynnik wzrostu β

TLR – ang. *Toll-like receptors* – Receptory toll-podobne

TNF – ang. *Tumor necrosis factor* – Czynnik martwicy nowotworów

TREM2 – ang. *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2* – Receptor wyzwalający na komórkach mieloidalnych 2

VacA – ang. *Vacuolating cytotoxin A* – Toksyna wakuolizująca A

VCAM-1 – ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* – Śródbłonkowa cząsteczka adhezyjna-1

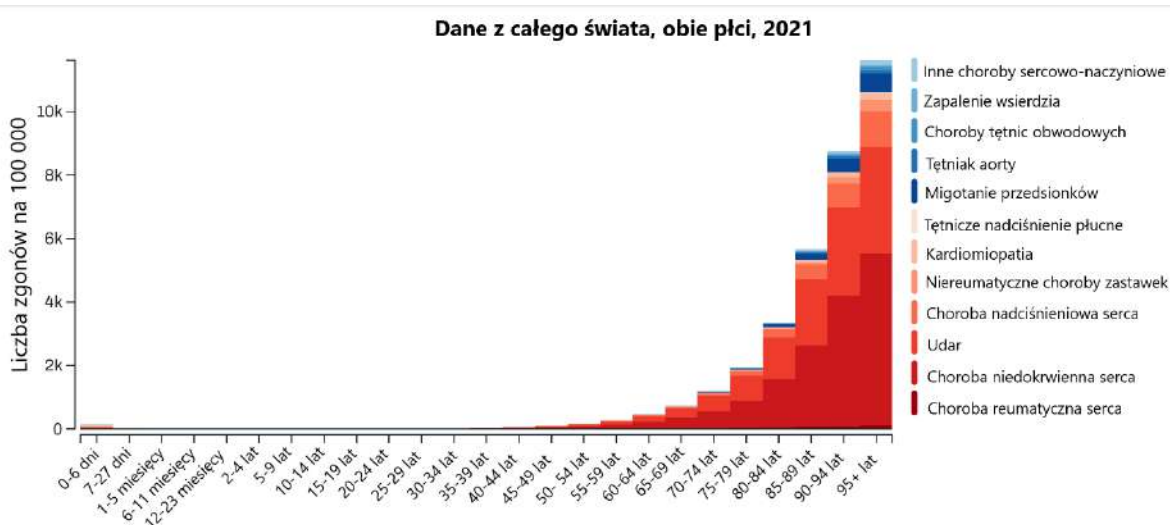
VLDL – ang. *Very-low-density lipoprotein* – Lipoproteina o bardzo niskiej gęstości

VSMC – ang. *Vascular smooth muscle cells* – Komórki mięśni gładkich naczyń

WHO – ang. *World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

1.Wstęp

Choroby sercowo-naczyniowe o podłożu miażdżycowym stanowią najczęstszą przyczynę zgonów na świecie, głównie wśród osób po 50 roku życia¹. Do najpowszechniej występujących schorzeń zaliczanych do tej kategorii należą: choroba niedokrwienna serca (ChNS), nadciśnienie tętnicze oraz udar mózgu, a ich rozwój jest ściśle związany z progresją miażdżycy u pacjentów. W ostatnich latach coraz częściej obserwuje się wzrost zachorowalności na te choroby nie tylko wśród osób starszych, ale również w populacji w wieku średnim, a nawet u osób młodszych^{2,3}.

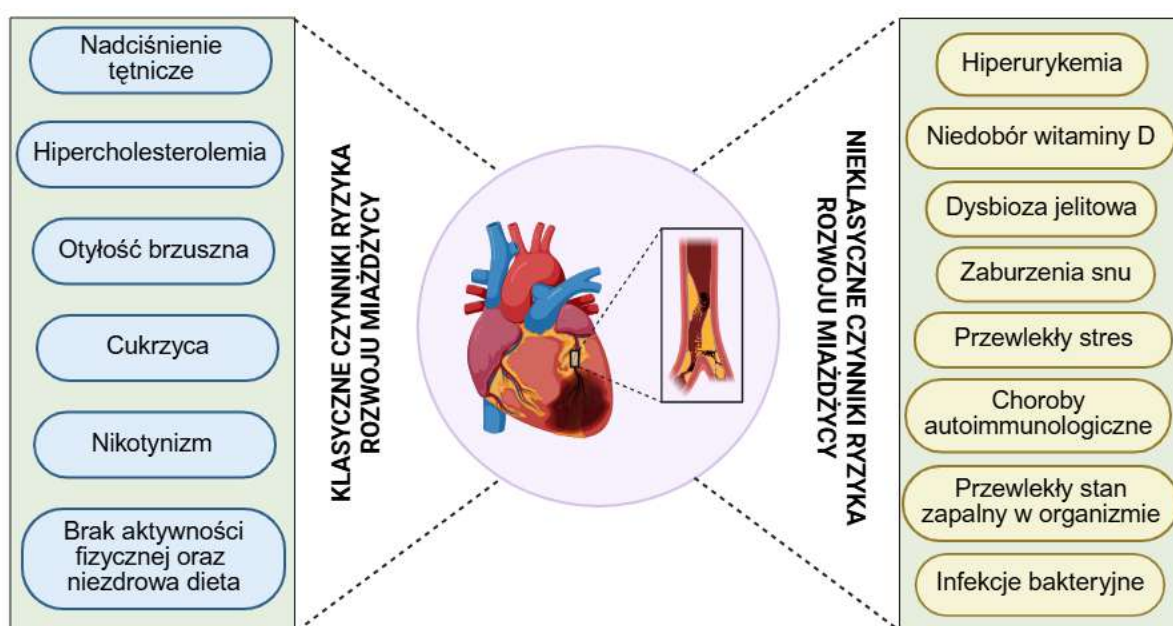


Ryc 1. Zgony w różnych grupach wiekowych z uwzględnieniem schorzeń o podłożu miażdżycowym oraz innych głównych przyczyn (Zmodyfikowano <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>).

Zapadalność na choroby sercowo naczyniowe, a w szczególności ChNS, wzrasta wraz z wiekiem, a schorzenia te występują częściej u mężczyzn, u których pierwsze incydenty sercowo – naczyniowe pojawiają się w młodszym wieku niż u kobiet (u mężczyzn 40-55 rokiem życia, u kobiet zaś między 55 – 70 rokiem życia). Podobną zależność obserwuje się w przypadku miażdżycy – najwyższe ryzyko jej rozwoju dotyczy starszych mężczyzn, a szczególnie tych, u których stwierdza się rodzinną historię chorób układu krwionośnego^{2,3}. Choroby sercowo – naczyniowe stanowią istotny problem zdrowotny na skalę globalną, będąc jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów. Ich przewlekły charakter, wysokie koszty leczenia oraz znaczący wpływ na jakość życia pacjentów powodują duże obciążenie dla systemów opieki zdrowotnej i gospodarki.

1.1. Miażdżycy - od czynników ryzyka do zmian komórkowych i molekularnych

Do klasycznych czynników ryzyka rozwoju ChNS, której podłożem jest miażdżycy, zaliczane są przede wszystkim: nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia, cukrzyca, otyłość brzuszna, nikotynizm, brak aktywności fizycznej oraz niezdrowa dieta⁴. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się również tzw. nieklasycznym czynnikom ryzyka, które mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie tej choroby. Należą do nich: zaburzenia snu, przewlekły stres i problemy ze zdrowiem psychicznym, ale również: niedobory witaminy D, dysbioza jelitowa (zaburzenie równowagi w składzie mikrobioty jelitowej), hiperurykemia (podwyższone stężenie kwasu moczowego we krwi) oraz choroby autoimmunologiczne^{5,6}.



Ryc 2. Klasyczne i nieklasyczne czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy (opracowanie własne).

Coraz częściej podkreśla się rolę bakterii, zarówno patogennych, jak i będących częścią naturalnej mikrobioty jelitowej, w rozwoju miażdżycy. Bakterie Gram-ujemne posiadają w składzie ściany komórkowej lipopolisacharyd (LPS), który może przedostawać się do krwioobiegu i nasilać procesy miażdżycowe poprzez nasilanie ogólnoustrojowej reakcji zapalnej. Szacuje się, że stężenie LPS we krwi osób zdrowych waha się w granicach 15–200 pg/ml. Poziom LPS we krwi wzrasta po spożyciu posiłków

bogato tłuszczowych, co może być związane z tworzeniem się w jelitach chylomikronów - lipoprotein zawierających apolipoproteinę B-48, które mogą wiązać LPS i transportować go do krążenia⁷. Ponadto pewna ilość LPS może przedostawać się z przewodu pokarmowego do krążenia w wyniku uszkodzenia połączeń ścisłych między komórkami nabłonka jelita, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności nabłonkowej bariery jelita. Zjawisko to może być efektem niektórych schorzeń towarzyszących miażdżycy, takich jak otyłość, cukrzyca typu II czy nadciśnienie. Połączenia ścisłe w barierze jelitowej mogą być również osłabiane przez stany zapalne oraz niektóre czynniki zakaźne układu pokarmowego⁸. Zalicza się do nich m.in. komponenty antygenowe bakterii, w tym pałeczek *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), które kolonizują błonę śluzową żołądka lub dwunastnicy u ponad połowy populacji świata, choć nie u wszystkich dochodzi do rozwoju ostrej i objawowej postaci zakażenia⁹.

1.1.1. Udział *H. pylori* w patogenezie miażdżycy

Helicobacter pylori to Gram-ujemne, mikroareofilne pałeczki zdolne do kolonizacji nabłonka żołądka lub dwunastnicy. Ich błona zewnętrzna zawiera LPS, fosfolipidy, glukozydy cholesterolu oraz białka o różnych funkcjach, m.in. adhezyny i transportery żelaza. Dzięki ureazie bakterie neutralizują kwaśne środowisko żołądka, co umożliwia im przeżycie¹⁰. Konsekwencją zakażenia *H. pylori* jest nie tylko rozwój zapalenia błony śluzowej żołądka i dwunastnicy, ale także choroby wrzodowej tych narządów oraz raka żołądka lub nowotworu tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową żołądka – MALT (z ang. *mucosa associated lymphoid tissue*). Zakażenia te są powszechne, często bezobjawowe (80-90%), a transmisja zachodzi drogą fekalno-oralną, oralno-oralną¹¹. Potencjalnie źródłem zakażenia może być skażona woda, żywność lub zwierzęta będące nosicielami tych bakterii, choć te drogi transmisji są niewystarczająco udokumentowane¹². Ryzyko zakażenia wzrasta przy niskim poziomie higieny i w gorszych warunkach socjoekonomicznych. Co więcej, częstość zakażeń rośnie z wiekiem i jest wyższa u mężczyzn oraz osób pochodzenia latynoskiego i afrykańskiego^{13,14}. Główne czynniki wirulencji *H. pylori* to liczne adhezyny oraz toksyna wakuolizująca (Vac A) i białko Cag A (z ang. *cytotoxin associated gene A*) związane z cytotoksyną. Szczepy CagA-dodatnie wywołują silniejszą odpowiedź zapalną i większe uszkodzenie nabłonka niż szczepy niewytwarzające tego białka, co potencjalnie sprzyja przenikaniu składników bakteryjnych do krwi. Wykazano, że komponenty *H. pylori* zaburzają *in vitro* zarówno integralność komórek nabłonkowych żołądka, jak i komórek

śródbłónka naczyniowego ^{15,16}. Reakcją na zakażenie *H. pylori* i komponenty tych bakterii jest aktywacja układu odpornościowego i produkcja cytokin prozapalnych interleukin (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 i IL-12), a także interferonu gamma (IFN- γ) i czynnika martwicy nowotworów (TNF). W zakażonym organizmie dochodzi także do aktywacji limfocytów T, głównie limfocytów pomocniczych Th1 oraz limfocytów B, co objawia się wytwarzaniem swoistych przeciwciał, które mogą być wyznacznikiem diagnostycznym zakażenia *H. pylori* ¹⁷. Jednakże w wielu pracach wykazano, że komponenty *H. pylori* hamują zdolność limfocytów T do proliferacji, hamują także aktywność cytotoksyczną naturalnych komórek zabijających oraz aktywność żerną makrofagów, co ogranicza eliminację tych bakterii i prowadzi do utrwalenia zakażenia ¹⁸. Wykazano, że szczepy CagA-dodatnie zwiększają aktywność cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1 i COX-2) w komórkach śródbłónka naczyniowego. Przewlekłe zakażenie *H. pylori* może prowadzić do uogólnionej reakcji zapalnej, która wpływa na funkcjonowanie układu sercowo – naczyniowego. Badania wykazały, że u pacjentów z ChNS zakażenie *H. pylori* występuje częściej, a odsetek ten wynosi od 40-90% w zależności od badania ¹⁹. Bakterie te mogą sprzyjać tworzeniu się środowiska promiażdżycowego poprzez nasilenie stanu zapalnego, czego wyznacznikami są wzrost liczby leukocytów oraz poziomu homocysteiny, fibrynogenu i białka ostrej fazy (CRP). Ponadto komponenty tych bakterii wywierają działanie prozakrzepowe - aktywując płytki krwi przyczyniają się do dysfunkcji śródbłónka naczyniowego ²⁰.

Podczas zakażenia *H. pylori* dochodzi do zaburzenia metabolizmu lipidów – podnosi się poziom trójglicerydów, obniża poziom lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL), a wzrasta poziom lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), które w środowisku stresu oksydacyjnego inicjowanego przez pałeczki *H. pylori* i komórki zapalne gospodarza mogą ulegać oksydacji w oxLDL, co inicjuje proces miażdżycowy ²¹. Wytwarzany przez komórki zapalne TNF- α hamuje aktywność lipazy lipoproteinowej i zwiększa produkcję wolnych rodników, które aktywują komórki zapalne i nasilają zakrzepice. Podczas zakażenia *H. pylori* może dochodzić do zaburzenia wchłaniania żelaza, prowadząc do jego niedoboru i rozwoju niedokrwistości, a także wpływać na wchłanianie witaminy B12 ²².

Istotną rolę przypisuje się również *H. pylori* w indukowaniu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, wynikającej z sugerowanego mechanizmu autoimmunizacji. Przeciwciała wytwarzane w odpowiedzi na antygeny *H. pylori* mogą wykazywać reaktywność krzyżową z własnymi cząsteczkami organizmu o podobnej strukturze,

prowadząc do przewlekłego stanu zapalnego zależnego od aktywacji dopełniacza i uszkodzenia tkanek. U pacjentów z ChNS zidentyfikowano m.in. przeciwciała krzyżowo reagujące z ureazą *H. pylori* i receptorem CCRL, przeciwciała wykazujące reaktywność krzyżową pomiędzy białkiem Cag A, a receptorem TNF typu I (TNFR1), a także przeciwciała skierowane przeciwko białku HspB *H. pylori* oraz ludzkim białkom szoku cieplnego Hsp60^{23,24}. Biorąc pod uwagę sugerowane zależności pomiędzy zakażeniem *H. pylori* a rozwojem choroby niedokrwiennej serca, Amerykańskie Towarzystwo Gastroenterologii wydało wytyczne o eradykacji zakażenia u osób z ryzykiem rozwoju ChNS¹⁶. Problem zakażeń *H. pylori* narasta, biorąc pod uwagę rosnącą liczbę izolatów wykazujących oporność na powszechnie stosowane antybiotyki i chemioterapeutyki, w tym klarytromycynę, amoksycylinę, metronidazol. Te dane znalazły odzwierciedlenie w postanowieniu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2008 r. zalecającym poszukiwanie nowych leków, modyfikację obecnie stosowanych antybiotyków, a także propozycje alternatywnych rozwiązań metodycznych opartych o związki biologicznie aktywne, które będą przydatne w leczeniu zakażeń *H. pylori*²⁵. Wśród proponowanych rozwiązań znajdują się propozycje wykorzystania ekstraktów roślinnych, szczepionkowych prątków *Mycobacterium bovis* BCG, a także badania nad wykorzystaniem inhibitorów białek wchodzących w skład degradosomu RNA *H. pylori*^{26–29}.

Należy podkreślić, iż więcej gatunków drobnoustrojów jest typowanych jako te które przyczyniają się do rozwoju ChNS, należą do nich bakterie z rodzaju *Mycoplasma*, wirusy opryszczki pospolitej (*Herpes simplex*) oraz zapalenia wątroby typu C, a także bakterie powodujące choroby przyzębia^{30–33}.

1.2. Stan zapalny śródbłónka jako środowisko do inicjacji zmian miażdżycowych

Miażdżycą to proces patologiczny polegający na odkładaniu się lipidów, włókien kolagenowych oraz złogów wapniowych w warstwie wewnętrznej dużych tętnic, które tworzą strukturę tzw. blaszek miażdżycowych. Zaawansowane blaszki miażdżycowe mogą powodować zwężenie światła naczynia utrudniając przepływ krwi, co w efekcie skutkuje niedokrwieniem tkanek. Powiększające się zmiany miażdżycowe uszkodzają ścianę naczynia, sprzyjając powstawaniu skrzepów i destabilizacji blaszek, co zwiększa ryzyko wystąpienia ostrego incydentu niedokrwinnego³.

Rozwój miażdżycy rozpoczyna się od dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, której towarzyszy akumulacja i modyfikacja LDL w obrębie błony wewnętrznej naczynia. Zaburzenie funkcji komórek śródbłonka prowadzi do utraty zdolności do utrzymania homeostazy, co sprzyja gromadzeniu się lipidów, adhezji leukocytów, aktywacji płytek krwi i nasileniu stresu oksydacyjnego. Te zmiany zapoczątkowują reakcję zapalną prowadzącą do formowania się smug tłuszczowych (ang. *fatty streak*) - wczesnego stadium blaszki miażdżycowej^{2,4,34}.

1.2.1. Rola utlenionych lipoprotein LDL w inicjacji reakcji zapalnej

Proces miażdżycowy w znacznym stopniu zależy od modyfikacji lipidów osoczkowych, zwłaszcza LDL, które po przeniknięciu do przestrzeni podśródbłonkowej ulegają oksydacji w środowisku bogatym w reaktywne formy tlenu (ROS). Częsteczki LDL są modyfikowane także pod wpływem enzymów takich jak lipooksygenazy i fosfolipazy³⁵. Wyróżnia się dwie główne postacie oksydowanych LDL: minimalnie zmodyfikowane LDL (mmLDL) oraz silnie utlenione LDL (oxLDL). Choć mmLDL zachowują zdolność do wiązania się z klasycznym receptorem LDL (LDLR), nabywają również cech bioaktywnych, nieobecnych w niezmodyfikowanym LDL. OxLDL, ze względu na znaczne zmiany strukturalne, przestają być rozpoznawane przez LDLR i są fagocytowane przez makrofagi głównie za pośrednictwem receptorów "zmiataczy" (z ang. *scavenger receptors* – SR) takich jak CD36 i SR-A. Bioaktywne lipidy mogą wywoływać reakcję zapalną poprzez aktywację komórek śródbłonka i makrofagów³⁶.

Dochodzi do nasilonej produkcji cytokin prozapalnych przez te komórki (np. TNF, IL-1 β) oraz wzmożonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych takich jak międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna - 1 (ICAM-1, z ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*), śródbłonkowa cząsteczka adhezyjna-1 (VCAM-1, z ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) na powierzchni komórek śródbłonka. Ułatwia to rekrutację monocytów do przestrzeni podśródbłonkowej, gdzie różnicują się w makrofagi, które intensywnie fagocytują oxLDL, przekształcając się w komórki piankowate – charakterystyczne dla wczesnej blaszki miażdżycowej³⁶.

Odkładające się lipidy gromadzą się zarówno wewnątrz komórek (makrofagów i komórek mięśni gładkich naczynia) jak i pozakomórkowo, przyczyniając się do rozrostu blaszki miażdżycowej. Towarzyszy temu aktywacja szeregu prozapalnych szlaków sygnałowych w obrębie zmienionej ściany naczyniowej. Jednym z głównych

mechanizmów tej odpowiedzi jest aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF- κ B, z ang. *nuclear factor kappa B*) w komórkach śródbłónka pod wpływem oxLDL. Skutkuje to dalszym zwiększeniem ekspresji cząsteczek adhezyjnych VCAM-1 i ICAM-1, a także wydzielaniem chemokin, takich jak białko chemotaktyczne monocytów-1 (MCP-1 z ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) i IL-8, oraz czynników prozakrzepowych, w tym czynnika tkankowego i inhibitora aktywatora plazminogenu ³⁶.

Krytycznym momentem w patogenezie miażdżycy jest pęknięcie lub rozwarstwienie blaszki miażdżycowej, które prowadzi do uszkodzenia śródbłónka naczyniowego i aktywacji układu krzepnięcia. W pierwszym etapie płytki krwi przyczepiają się do odsłoniętego kolagenu ulegając aktywacji i agregacji. Równocześnie uruchamiana jest kaskada krzepnięcia krwi, w wyniku której powstaje trombina oraz fibryna tworzące stabilną sieć wraz z agregującymi płytkami, prowadząc do powstania skrzepliny. Aktywowane płytki krwi wydzielają czynniki wzrostu, w tym transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , ang. *Transforming growth factor beta*), który stymuluje produkcję kolagenu co przyczynia się do dalszego pogrubienia blaszki miażdżycowej^{2,37}. Konsekwencją tych procesów jest postępujące zwężenie światła naczynia, a w skrajnych przypadkach jego całkowite zamknięcie. Może to prowadzić do wystąpienia ostrych incydentów niedokrwiennych, takich jak zawał mięśnia sercowego lub udar mózgu.

1.2.2. Rola odpowiedzi zapalnej w formowaniu i destabilizacji blaszek miażdżycowych.

U człowieka proces tworzenia blaszki miażdżycowej może rozpoczynać się już w okresie niemowlęcym, przechodząc następnie w fazę progresji wraz z wiekiem. Z tego względu zmiany miażdżycowe obserwuje się nie tylko u osób starszych, lecz także u młodych dorosłych, a nawet nastolatków ².

Rekrutacja i aktywacja monocytów do miejsca uszkodzenia śródbłónka wskutek procesu miażdżycowego stanowią kluczowy etap w rozwoju stanu zapalnego w miażdżycy. Proces ten rozpoczyna się od toczenia się monocytów po powierzchni śródbłónka, z udziałem P-selektyny. Następnie komórki te przytwierdzają się do śródbłónka poprzez interakcje integryn monocytów z cząsteczkami adhezyjnymi śródbłónka - VCAM-I i ICAM-I³⁸. Ponadto chemokiny związane z powierzchnią śródbłónka, takie jak CXCL1, CXCL2, CXCL4 i CCL5, aktywują monocyty, zwiększając

ich zdolność do adhezji. Chemokiny odgrywają również istotną rolę w kierowaniu migracji monocytów do warstwy wewnętrznej naczynia. Najważniejszą funkcję w tym procesie pełni chemokina CCL2 (znana również jako MCP-1), choć udział biorą również inne, m. in. CCL3, CCL4 i CCL5. CCL2 jest produkowana przez komórki śródbłónka, komórki mięśni gładkich naczyń oraz monocyty i makrofagi, a jej ekspresja wzrasta w odpowiedzi na bodźce prozapalne lub uszkodzenie tkanek^{39,40}.

Po dotarciu do błony wewnętrznej monocyty różnicują się w makrofagi, które mogą ulec polaryzacji do fenotypu M1 (prozapalnego) lub M2 (przeciwzapalnego). Makrofagi reagują na sygnały z otoczenia, zmieniając swój fenotyp w zależności od charakteru bodźców. Fenotyp M1 dominuje w fazie rozwoju miażdżycy, natomiast fenotyp M2 w okresie jej regresji. Makrofagi M1 produkują cytokiny i chemokiny prozapalne, a także tlenek azotu (NO) i ROS, które nasilają proces zapalny i sprzyjają dalszej rekrutacji monocytów^{36,41,42}.

Makrofagi odgrywają centralną rolę w akumulacji lipidów i podtrzymywaniu stanu zapalnego w obrębie blaszki miażdżycowej. Posiadają one liczne receptory umożliwiające internalizację zarówno zmodyfikowanych (np. oxLDL), jak i niemodyfikowanych cząsteczek LDL. Estrы cholesterolu gromadzone są w postaci kropelek lipidowych w cytoplazmie makrofagów, w pobliżu siateczki śródplazmatycznej. W prozapalnym mikrośrodoisku blaszki dochodzi jednak do zaburzenia działania transportera ABCA1, odpowiedzialnego za usuwanie cholesterolu z makrofagów. Zaburzenie tej funkcji prowadzi do nadmiernej akumulacji lipidów w makrofagach, które przekształcają się w komórki piankowate, które tworzą blaszki miażdżycowe^{43,44}.

Utlenione LDL aktywują szlaki sygnałowe zależne od NF- κ B, co wzmacnia aktywację komórek śródbłónka, promuje rekrutację kolejnych monocytów oraz nasila proces tworzenia nowych komórek piankowatych. Choć fagocytoza oxLDL przez makrofagi może mieć początkowo charakter ochronny - eliminując cytotoksyczne cząsteczki z błony wewnętrznej naczynia - nadmierna migracja monocytów i ich różnicowanie w makrofagi skutkują nadprodukcją komórek piankowatych, co prowadzi do progresji i powiększania się zmiany miażdżycowej.^{36,45,46}

Progresja miażdżycy to proces długotrwały, trwający często wiele lat. Raz utworzone blaszki miażdżycowe rozrastają się w wyniku postępującej akumulacji lipidów oraz zwiększającej się liczby komórek piankowatych. Dane eksperymentalne wskazują, iż formowanie komórek piankowatych może również zachodzić poprzez metaplastyczną transformację komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC, z ang. *Vascular*

Smooth Muscle Cells). W błonie wewnętrznej śródbłónka, zwłaszcza w obszarach predysponowanych do rozwoju blaszki miażdżycowej obecne są rezydujące komórki mięśni gładkich, które w wyniku migracji z warstwy środkowej ściany naczynia akumulują się w blaszce. Komórki mięśni gładkich wykazują zdolność internalizacji cząsteczek oxLDL i ich przekształcania w struktury piankowate. Szacuje się, że w blaszce miażdżycowej tętnic wieńcowych człowieka ponad 50% komórek piankowatych może pochodzić właśnie z komórek VSMC, a nie z makrofagów.² Dodatkowo, komórki VSMC zlokalizowane w błonie wewnętrznej wykazują obniżoną ekspresję transportera ABCA1 w porównaniu do tych znajdujących się w warstwie środkowej, co zaburza równowagę między napływem a usuwaniem cholesterolu i sprzyja jego kumulacji w komórkach^{2,36,47,48}.

1.2.3. Inflamasom NLRP3 i receptory TREM – molekularna regulacja powstawania komórek piankowatych

Zakumulowany cholesterol może formować kryształy zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i zewnątrzkomórkowo w obrębie blaszki miażdżycowej. Kryształy te odgrywają istotną rolę w aktywacji układu odpornościowego, szczególnie poprzez stymulację inflamasomu NLRP3 (z ang. *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*) w makrofagach. Inflamasomy to cytoplazmatyczne kompleksy wielobiałkowe, odpowiedzialne za inicjację odpowiedzi zapalnej na bodźce zagrożenia. Chociaż wiedza na temat mechanizmów aktywacji inflamasomu NLRP3 jest niewystarczająca, wiadomo, że jego pobudzenie prowadzi do aktywacji kaspazy-1 przekształcającej nieaktywne prekursorzy cytokin IL-1 β i IL-18 do ich formy aktywnej. Efektem jest nasilenie lokalnej reakcji zapalnej w obrębie blaszki. Badania wskazują, że inicjacja aktywacji inflamasomu NLRP3 może być związana z wychwytem oxLDL przez receptor CD36 na powierzchni makrofagów^{48,49}.

Zaawansowane stadium miażdżycy często wiąże się z występowaniem zwapnienia blaszki miażdżycowej. Proces ten rozpoczyna się w wyniku uwalniania pęcherzyków macierzy pozakomórkowej (ECM, z ang. *extracellular matrix*) powstających z obumarłych komórek mięśni gładkich naczyń oraz makrofagów. Pęcherzyki ECM inicjują tworzenia mikrozwapnień na wczesnym etapie wapnienia naczyń. W miarę postępu choroby mikrozwapnienia ulegają przekształceniu w większe ogniska zwapnienia, rozprzestrzeniające się w obrębie blaszki. Ten proces przyczynia się do

zwiększenia sztywności ściany naczyniowej, co może sprzyjać zarówno stabilizacji, jak i destabilizacji blaszki w zależności od rozmieszczenia i morfologii złogów wapnia^{48,49}.

Wyniki badań wskazują również na obecność w obrębie blaszek miażdżycowych makrofagów piankowatych, które nie wykazują właściwości prozapalnych. Komórki te charakteryzują się wysoką ekspresją receptora TREM2 (z ang. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*). Choć rola TREM2 w patogenezie miażdżycy nie została jeszcze w pełni poznana, jego obecność sugeruje występowanie mechanizmów ograniczających stan zapalny w obrębie zmiany miażdżycowej. TREM2 to receptor transbłonowy należący do nadrodziny immunoglobulin, który w warunkach fizjologicznych odpowiada za prawidłowe różnicowanie i przeżywalność komórek szpiku kostnego. Szlak sygnałowy aktywowany przez TREM2 uczestniczy także w wielu procesach biologicznych, takich jak fagocytoza, odporność na sygnały prozapalne i ochrona komórek szpikowych przed stresem oraz ich transformacja fenotypowa⁵⁰.

W ostatnich badaniach zarówno u człowieka, jak i na modelu miażdżycy u myszy w blaszkach miażdżycowych zidentyfikowano makrofagi o wysokiej ekspresji TREM2 (TREM2^{hi}), które charakteryzują się obecnością markerów takich jak *Trem2*, *Cd9*, *Ctsd* i *Spp1*^{50,51}. Wykazano, że receptor TREM2 pełni funkcję receptora, zdolnego do wiązania ligandów lipoproteinowych, m.in. apolipoproteiny (ApoE z ang. *Apolipoprotein E*) czy fosfolipidów. Po związaniu z ligandami aktywowany jest szlak sygnałowy kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p38/MAPK (z ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase pathway*), prowadzący do zwiększonej ekspresji receptora CD36, który odpowiada za wychwyt cholesterolu⁵². Choć wcześniejsze badania wskazywały, że makrofagi TREM2^{hi} to komórki piankowate bogate w lipidy, o słabej aktywności zapalnej. Jednak najnowsze doniesienia sugerują, że komórki te mogą przechodzić transformację w prozapalne makrofagi akumulujące lipidy, co wiąże się z progresją zmian miażdżycowych⁵⁰.

Nadekspresja TREM2 na komórkach mięśni gładkich naczyń w hodowlach *in vitro* oraz makrofagach powodowała nasilenie wychwytu lipidów, sprzyjając ich akumulacji i powstawaniu komórek piankowatych. W modelu miażdżycy u myszy z wyciszonym genem *ApoE* (*ApoE*^{-/-}), po zastosowaniu diety wysokotłuszczowej zaobserwowano wzrost liczby komórek piankowatych TREM2 pozytywnych w obrębie blaszek miażdżycowych⁵². Myszy z podwójnym wyciszeniem genów *Trem2* i *ApoE* (*Trem2*^{-/-}/*ApoE*^{-/-}) wykazywały istotnie mniej nasilone zmiany miażdżycowe, mniej komórek piankowatych oraz niższy poziom lipidów w blaszkach miażdżycowych niż

zwierzęta z wyciszonym jedynie genem *ApoE*. Na tej podstawie przypuszcza się, że TREM2 może sprzyjać progresji miażdżycy⁵². Jednak rola makrofagów TREM2^{hi} pozostaje niejednoznaczna, ponieważ inne badania sugerują, że komórki te mogą również uczestniczyć w stabilizacji blaszek i sprzyjać ich regresji, co czyni TREM2 interesującym, lecz nadal kontrowersyjnym celem terapeutycznym⁵⁰.

1.3. Przewlekły stan zapalny i zaburzenia lipidowe jako łącznik między miażdżycą a stłuszczeniową chorobą wątroby o podłożu metabolicznym

Stłuszczeniowa choroba wątroby o podłożu metabolicznym (MAFLD, metabolic-associated fatty liver disease) jest główną chorobą wątroby w krajach zachodnich. Częstość jej występowania na świecie wynosi około 25,24%, przy czym najwyższe wskaźniki odnotowano na Bliskim Wschodzie i w Ameryce Południowej, a najniższe w Afryce⁵³. Obecnie to choroby układu sercowo – naczyniowego są główną przyczyną zgonów wśród pacjentów z MAFLD. Problem ten pogłębia się wraz ze wzrostem liczby osób cierpiących jednocześnie na MAFLD i choroby układu krążenia, co najprawdopodobniej wynika z obecności wspólnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, takich jak otyłość, insulinooporność, nadciśnienie tętnicze czy dyslipidemia^{54,55}.

MAFLD definiowana jest jako obecność stłuszczenia w co najmniej 5% hepatocytów i obejmuje szerokie spektrum zmian histologicznych - od prostego stłuszczenia bez zwłóknienia wątroby, po metabolicznie uwarunkowane stłuszczeniowe zapalenie wątroby (MASH). MASH charakteryzuje się nie tylko obecnością stłuszczenia, ale również balonową degeneracją hepatocytów oraz naciekiem zapalnym, często współistniejącym z różnym stopniem zwłóknienia wątroby. Wszystkie stadia MAFLD wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób układu sercowo – naczyniowego, w tym ostrego zespołu wieńcowego, miażdżycy, udaru mózgu czy zaburzeń rytmu serca. Liczne badania kliniczne i eksperymentalne potwierdziły silny związek między MAFLD a chorobami serca. Przykładowo, w systematycznym przeglądzie i metaanalizie przeprowadzonej przez Wu i wsp, obejmującej 34 badania, wykazano, że chociaż MAFLD nie wpływała istotnie na ogólną śmiertelność, była istotnie związana ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo – naczyniowych, zwłaszcza choroby wieńcowej, nadciśnienia tętniczego i miażdżycy⁵⁶.

Jednym z kluczowych czynników patofizjologicznych w MAFLD jest przewlekłe, zapalenie wątroby o niskim stopniu nasilenia, które przyczynia się do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej. Mechanizm ten wynika głównie z toksycznego działania nagromadzonych lipidów, stresu oksydacyjnego, stresu retikulum endoplazmatycznego oraz zaburzeń funkcji mitochondriów. Ważną rolę w rozwoju zapalenia odgrywają również czynniki dietetyczne, zwłaszcza tłuszcze pochodzące z diety, które mogą aktywować receptory toll-podobne (TLR) na komórkach układu odpornościowego, inicjując produkcję cytokin prozapalnych^{56,57}. Dodatkowo, zarówno stres oksydacyjny, jak i stres siateczki śródplazmatycznej, mogą prowadzić do dysfunkcji śródbłonna, co nasila ryzyko rozwoju zaburzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z MAFLD. Sugeruje się, że kluczową rolę w rozwoju tych zmian zapalnych odgrywają czynniki dietetyczne, m.in. kwasy tłuszczowe zawarte w pożywieniu, które mogą aktywować receptory TLR i indukować kaskadę cytokin w komórkach odpornościowych. Wykazano również, że stres oksydacyjny i stres siateczki śródplazmatycznej wpływają na zapalenie metaboliczne poprzez wywoływanie dysfunkcji śródbłonna oraz zwiększanie ryzyka rozwoju zaburzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z MAFLD. Ponadto przewlekły stres retikulum endoplazmatycznego oraz mitochondrialna dysfunkcja nie tylko nasilają lokalne uszkodzenie wątroby, ale również odgrywają kluczową rolę w progresji MAFLD do MASH⁵⁸.

Dyslipidemia, jedno z najczęstszych zaburzeń metabolicznych w przebiegu MAFLD, stanowi istotne ogniwo łączące tę chorobę z ryzykiem sercowo-naczyniowym. Jej obraz kliniczny obejmuje zazwyczaj podwyższone stężenia trójglicerydów, obniżony poziom cholesterolu HDL oraz umiarkowany wzrost frakcji LDL. To właśnie ta frakcja odgrywa kluczową rolę w rozwoju miażdżycy, szczególnie w kontekście jej utlenionych form, które indukują transformację makrofagów w komórki piankowe i inicjują kaskady zapalne w komórkach śródbłonna naczyniowego^{56,59}.

Wątroba jest centralnym organem gospodarki lipidowej, w warunkach fizjologicznych reguluje syntezę, magazynowanie oraz usuwanie tłuszczów. W MAFLD dochodzi do zaburzenia tej równowagi, na skutek zwiększonego napływu wolnych kwasów tłuszczowych z krążenia, nadaktywnej lipogenezy w hepatocytach oraz zmniejszonego wydalania lipidów w postaci lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL). W rezultacie dochodzi do nadmiernej akumulacji tłuszczu w hepatocytach, co sprzyja rozwojowi stanu zapalnego i zaburzeń ogólnoustrojowych. Taka nieprawidłowa gospodarka lipidowa nie tylko przyczynia się do progresji zmian w wątrobie, ale również

potęguje ryzyko rozwoju miażdżycy i innych powikłań sercowo-naczyniowych. Nadmiar trójglicerydów i zmniejszenie ochronnego HDL sprzyjają powstawaniu aterogennych cząstek lipoprotein, które z łatwością penetrują ścianę naczyń, aktywując komórki śródbłonna i makrofagi. W konsekwencji, u pacjentów z MAFLD ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych, takich jak choroba wieńcowa, udar mózgu czy zawał serca, jest istotnie zwiększone, niezależnie od klasycznych czynników ryzyka⁶⁰.

Analiza dostępnych danych genetycznych wskazuje, że zaburzenia w funkcjonowaniu β -oksydacji kwasów tłuszczowych w mitochondriach hepatocytów wątroby stanowi kluczowy mechanizm łączący dyslipidemię, wywołaną MAFLD, z podwyższonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych⁶¹. Zwiększony pobór lipidów prowadzi do nadmiernego gromadzenia trójglicerydów w wątrobie, co wiąże się z nadprodukcją i wydzielaniem dużych ilości cząstek lipoprotein o bardzo niskiej gęstości, bogatych w trójglicerydy. Po przedostaniu się do krwiobiegu, pod wpływem lipazy lipoproteinowej, cząsteczki VLDL tracą część trójglicerydową, przekształcając się w liczne, aterogenne cząsteczki LDL o dominującej zawartości cholesterolu. Cząsteczki LDL są wychwytywane przez wątrobę za pośrednictwem receptorów dla LDL. Nadprodukcja cząsteczek VLDL w MAFLD prowadzi do szeregu zaburzeń lipoproteinowych, które skutkują dyslipidemią aterogenną. Charakteryzuje się ona podwyższonym stężeniem trójglicerydów w surowicy oraz niskim poziomem cholesterolu HDL, obecnością fenotypu lipoprotein aterogennych, w tym dominacji małych, gęstych cząsteczek LDL, nagromadzeniem lipoprotein bogatych w trójglicerydy i ich resztek oraz lipoprotein o średniej gęstości. Nasilenie występowania zaburzeń lipidowych postępuje wraz z rozwojem MAFLD. Małe, gęste cząsteczki LDL wykazują szczególną zdolność przenikania przez śródbłonek naczyniowy do przestrzeni podśródbłonkowej, co stanowi początkowy etap tworzenia się blaszki miażdżycowej⁵⁶.

Rozwój miażdżycy jest w dużej mierze inicjowany przez lipoproteiny zawierające apolipoproteinę B (ApoB). Oprócz ryzyka miażdżycy związanego z cholesterolem LDL, istotną rolę odgrywają lipoproteiny bogate w trójglicerydy, takie jak VLDL oraz lipoproteiny o pośredniej gęstości (IDL), które również zwiększają ryzyko sercowo-naczyniowe. Cząsteczki te zawierają dodatkowo apolipoproteinę C3 (ApoC3), która odgrywa kluczową rolę w aktywacji receptorów Toll-podobnych, prowadząc do inicjacji odpowiedzi zapalnej. Lipoproteiny z ApoC3 aktywują TLR2 i TLR4 poprzez ich dimeryzację, co z kolei prowadzi do aktywacji inflamasomu NLRP3. Jego aktywacja skutkuje proteolitycznym przekształceniem cytokiny z rodziny IL-1 β do jej aktywnej

formy oraz indukcję IL-6 w szlaku zapalnym związanym z białkiem CRP. Mechanizm ten odgrywa istotną rolę w zapaleniu naczyń i progresji miażdżycy. W związku z tym aktywacja TLR przez ApoC3, a następnie inflamasomu NLRP3, stanowi istotne ogniwo łączące aterogenne wzorce lipoprotein, obserwowane u pacjentów z MAFLD, z zapaleniem śródbłonna naczyniowego^{56,62}.

Innym istotnym aspektem stłuszczeniowej choroby wątroby jest nieprawidłowy metabolizm glukozy oraz insulinooporność, które stanowią ważne czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy. Zaburzenia gospodarki węglowodanowej u pacjentów z MAFLD tłumaczy się przewlekłym niskonasileniowym stanem zapalnym, otyłością trzewną, nadmierną masą ciała oraz zwiększoną akumulacją dysfunkcyjnej tkanki tłuszczowej. Oprócz nadmiernego nagromadzenia tłuszczu w wątrobie, istotną rolę odgrywa również akumulacja tkanki tłuszczowej w obrębie trzustki, która pozostaje w ścisłym związku z insulinoopornością oraz upośledzoną funkcją komórek β . Insulinooporności często towarzyszy przewlekła, kompensacyjna hiperinsulinemia, odgrywająca kluczową rolę w inicjacji i podtrzymaniu niekorzystnego środowiska metabolicznego^{56,63}.

W szczególności hiperinsulinemia wiąże się ze zwiększoną produkcją glukozy w wątrobie, co prowadzi do podwyższonego stężenia glukozy w osoczu oraz utrzymującego się wzrostu poziomu insuliny - tworząc samonapędzający się cykl. Mechanizm ten sprzyja dalszemu gromadzeniu tłuszczu w wątrobie oraz nasilonej produkcji nasyconych kwasów tłuszczowych, które wraz z hiperglikemią podtrzymują zaburzone środowisko metaboliczne w całym organizmie. Insulinooporność wpływa również na procesy związane z progresją miażdżycy oraz destabilizacją blaszek miażdżycowych. Przewlekła hiperglikemia i poposiłkowe skoki glukozy przyczyniają się do stresu oksydacyjnego, jednocześnie aktywując szlaki zapalne, w tym inflamasom, oraz nasilając uszkodzenia śródbłonna naczyniowego poprzez działanie produktów końcowych zaawansowanej glikacji oraz zaburzoną regulację metabolizmu lipoprotein⁵⁶.

Przewód pokarmowy wydaje się być istotnym źródłem ogólnoustrojowego stanu zapalnego, odgrywając kluczową rolę zarówno w patogenezie MAFLD, jak i miażdżycy. Zaburzenie integralności bariery jelitowej, prowadzące do zwiększonej przepuszczalności, sprzyja przedostawaniu się do krążenia cząsteczek wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP) oraz wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem komórki (DAMP). Molekuły te aktywują szlaki sygnałowe w komórkach układu odpornościowego, wywołując uogólnioną reakcję zapalną związaną z dysbiozą jelitową. Dysbioza jelitowa jest uznawana za istotne ogniwo łączące

zaburzenia mikrobiomu z rozwojem miażdżycy. U pacjentów z chorobą wieńcową i współistniejącym MAFLD obserwuje się znaczące zmiany w składzie mikrobioty jelitowej, w tym obniżenie liczebności bakterii z rodzajów *Colinsella* i *Parabacterioides*. Zmiany te mogą tłumaczyć gorszy przebieg kliniczny oraz postęp choroby w tej grupie pacjentów w porównaniu z osobami cierpiącymi jedynie na chorobę wieńcową, ale bez współistniejącej choroby tłuszczzeniowej wątroby⁵⁶.

1.4. Przewlekły stan zapalny w miażdżycy jako cel terapeutyczny

Stan zapalny odgrywa kluczową rolę w rozwoju i progresji miażdżycy, dlatego powinien być traktowany jako istotny cel terapeutyczny. Proces zapalny przyczynia się do powstawania blaszki miażdżycowej, a następnie jej destabilizacji, co zwiększa ryzyko wystąpienia poważnych incydentów sercowo-naczyniowych, takich jak zawał serca czy udar mózgu. W związku z tym warto zwrócić szczególną uwagę na leki łagodzące stan zapalny, które mogą stanowić cenne uzupełnienie dotychczasowego leczenia kardiologicznego, opartego przede wszystkim na redukcji poziomu cholesterolu w organizmie. Co więcej, leki przeciwzapalne mogą korzystnie wpływać na regulację odpowiedzi immunologicznej, która odgrywa istotną rolę w mechanizmach miażdżycowych.

1.4.1. Kolchicina w terapii przeciwzapalnej miażdżycy

Kolchicina jest alkaloidem pozyskiwanym z bulw zimowita jesiennego (*Colchicum autumnale*) i należy do najstarszych znanych substancji leczniczych pochodzenia roślinnego. Po raz pierwszy została wyizolowana i oczyszczona w 1820 roku, natomiast oficjalną nazwę “kolchicina” nadano jej w 1833 roku. Istnieją przesłanki, że już w starożytności była wykorzystywana w leczeniu stanów zapalnych i bólu stawów^{64,65}. Obecnie, ze względu na silne właściwości przeciwzapalne, kolchicina znajduje zastosowanie w terapii różnych chorób zapalnych, takich jak dna moczanowa, rodzinna gorączka śródziemnomorska czy zapalenie osierdzia⁶⁶. Kolchicina działa poprzez hamowanie aktywności neutrofili, co pozwala ograniczyć ostre objawy towarzyszące procesom zapalnym. Kolchicina wiąże się z tubuliną tworząc kompleksy blokujące fałdowanie i polimeryzację mikrotubul. Mikrotubule odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach komórkowych, takich jak transport wewnątrzkomórkowy, utrzymanie struktury komórki oraz sekrecja cytokin i chemokin^{66,67}. Kolchicina preferencyjnie gromadzi się w neutrofilach, co wynika z braku glikoproteiny-P

(o działaniu transportera odpowiedzialnego za usuwanie z komórki - tzw. efflux) w ich błonie komórkowej⁶⁸.

Wykazano, że kolchicina hamuje chemotaksję neutrofili do ogniska zapalnego oraz ogranicza ich adhezję do śródbłonka poprzez zmniejszenie ekspresji L-selektyny na powierzchni tych komórek. Dodatkowo redukuje ekspresję E-selektyny w komórkach śródbłonka, co również ogranicza przyleganie leukocytów do ścian naczyń krwionośnych. Ponadto kolchicina hamuje ekspresję receptorów czynnika martwicy nowotworów na makrofagach i komórkach śródbłonka oraz zmniejsza wydzielanie TNF przez monocyty i makrofagi. Dzięki tym mechanizmom kolchicina wykazuje silne działanie przeciwzapalne, które może znaleźć zastosowanie również w leczeniu chorób o podłożu miażdżycowym^{66,69}.

Chociaż dokładny mechanizm działania kolchicyny nie został jeszcze w pełni poznany, badania sugerują, że lek ten hamuje formowanie i aktywację inflamasomu NLRP3, co prowadzi do zmniejszenia produkcji cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β i IL-18⁷⁰. Dodatkowo kolchicina ogranicza aktywację tych cytokin również poprzez hamowanie wydzielania proteinaz przez neutrofile. Efektem tak silnego działania przeciwzapalnego jest także obniżenie poziomu innych mediatorów zapalnych, w tym interleukiny 6 oraz białka C-reaktywnego⁷¹. Ponadto, kolchicina może wpływać na zmniejszenie zwłóknienia w obrębie naczyń krwionośnych poprzez hamowanie proliferacji miofibroblastów i komórek mięśni gładkich.

Na przestrzeni lat liczne badania wykazały, że stan zapalny odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu chorób, w tym chorób sercowo-naczyniowych, takich jak miażdżyca czy migotanie przedsionków⁶⁸. W związku z tym coraz większą uwagę poświęca się strategiom terapeutycznym ukierunkowanym na działanie przeciwzapalne. Kolchicina zyskała szczególne zainteresowanie jako potencjalny lek o szerszym zastosowaniu w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań klinicznych oceniających skuteczność kolchicyny w terapii i prewencji schorzeń sercowo-naczyniowych, ze szczególnym uwzględnieniem jej roli w profilaktyce miażdżycy oraz zawału mięśnia sercowego. Do najlepiej udokumentowanych i najczęściej cytowanych badań należą programy COLCOT (Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial)⁶⁷ oraz LoDoCo (Low-Dose Colchicine)⁷², które dostarczyły istotnych dowodów na skuteczność i bezpieczeństwo kolchicyny w tych wskazaniach.

Badanie kliniczne LoDoCo, przeprowadzone w Australii⁷² w latach 2008–2010, miało na celu ocenę skuteczności kolchicyny we wtórnej prewencji chorób sercowo-

naczyniowych. Do badania włączono 532 pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, których monitorowano średnio przez 36 miesięcy. U uczestników otrzymujących kolchicynę w dawce 0,5 mg dziennie zaobserwowano istotne zmniejszenie częstości incydentów sercowo-naczyniowych w porównaniu z grupą kontrolną⁷². W badaniu LoDoCo odnotowano również pewne działania niepożądane, z których najczęstsze dotyczyły nietolerancji żołądkowo-jelitowej, występujące u około 2,5% pacjentów. Mimo to wyniki badania potwierdziły potencjalną skuteczność kolchicyny jako uzupełnienia standardowej terapii w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych^{72,73}.

Kolejne badanie LoDoCo2Kliknij lub naciśnij tutaj, aby wprowadzić tekst. zostało przeprowadzone przez australijską grupę badawczą w latach 2014–2020, skoncentrowało się na pacjentach z przewlekłą chorobą wieńcową⁷⁴. Celem badania była ocena wpływu niskiej dawki kolchicyny (0,5 mg dziennie) na częstość występowania zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych, udarów niedokrwiennych, spontanicznych zawałów mięśnia sercowego oraz rewaskularyzacji wieńcowej z powodu niedokrwienia. Średni czas obserwacji wynosił 28,6 miesiąca⁷⁴. W badaniu LoDoCo2 wzięło udział 5522 pacjentów, którzy zostali losowo przydzieleni do grupy otrzymującej kolchicynę (0,5 mg dziennie) lub grupy placebo. Kwalifikowani uczestnicy byli w wieku od 35 do 85 lat, mieli potwierdzoną chorobę wieńcową i pozostawali klinicznie stabilni przez co najmniej sześć miesięcy przed rozpoczęciem badania. Z udziału wykluczono osoby z ciężkimi chorobami wątroby lub nerek, nowotworami złośliwymi albo przeciwwskazaniami do stosowania kolchicyny. Wyniki badania wykazały, że poważne zdarzenia sercowo-naczyniowe wystąpiły u 6,8% pacjentów z grupy leczonej kolchicyną, w porównaniu z 9,6% w grupie placebo. Zgony z przyczyn niezwiązanych z układem sercowo-naczyniowym odnotowano u 1,9% pacjentów przyjmujących kolchicynę. Do najczęściej zgłaszanych działań niepożądanych należały bóle mięśni (21,2%) oraz nietolerancja żołądkowo-jelitowa (15,4%)^{73,74}.

Program COLCOT był randomizowanym badaniem klinicznym przeprowadzonym w Kanadzie w latach 2015–2019, którego celem była ocena długoterminowego wpływu kolchicyny na częstość występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów po przebytym zawałe mięśnia sercowego⁶⁷. Do badania włączono 4745 uczestników, którzy zostali losowo przydzieleni do grupy otrzymującej kolchicynę w dawce 0,5 mg dziennie lub do grupy placebo. Średni czas obserwacji wynosił 22,6 miesiąca. Kwalifikowani pacjenci przeszli zawał mięśnia sercowego w ciągu 30 dni przed rozpoczęciem badania, otrzymali standardowe leczenie i byli

w stabilnym stanie ogólnym⁶⁷. Z udziału w badaniu COLCOT wykluczono pacjentów z ciężką niewydolnością serca oraz tych którzy niedawno przebyli udar mózgu. Wyniki wykazały, że poważne zdarzenia sercowo-naczyniowe wystąpiły u 5,5% pacjentów przyjmujących kolchicynę w porównaniu z 7,1% w grupie placebo. Działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego odnotowano u 17,5% pacjentów leczonych kolchicyną, z czego najczęściej występowały biegunki (9,7%) oraz zapalenie płuc (0,9%)^{67,73}.

Na podstawie wyników dostępnych badań klinicznych, w 2023 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności Leków (FDA – Food and Drug Administration) zatwierdziła stosowanie kolchicyny w dawce 0,5 mg dziennie jako terapii uzupełniającej u pacjentów z chorobą wieńcową, w celu zmniejszenia ryzyka zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu i zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych^{75,76}. Ze względu na zgłaszane działania niepożądane ze strony przewodu pokarmowego, a także możliwość wystąpienia objawów mięśniowych, aktualnie prowadzone są dalsze obserwacje mające na celu ocenę bezpieczeństwa długoterminowego stosowania kolchicyny w grupach pacjentów kardiologicznych.

1.4.2. Nanotechnologiczne strategie modyfikacji kolchicyny

Nanomateriały, a zwłaszcza nanocząstki, odgrywają ważną rolę m.in. w medycynie i nowoczesnej farmakologii - szczególnie w kontekście wydłużania czasu półtrwania leków w organizmie, zmniejszenia ich toksyczności oraz precyzyjnego, ukierunkowanego dostarczania substancji czynnych. Nanocząstki można klasyfikować według różnych kryteriów, m.in. ze względu na ich skład chemiczny i rodzaj materiału, z którego zostały wykonane⁷⁷. Nanocząstki polimerowe, dzięki swojej biodegradowalności, biokompatybilności, nietoksyczności i nieimmunogenności, stanowią obecnie obiecujące rozwiązanie, w zastosowaniach medycznych – przede wszystkim jako bezpieczne nośniki leków. Substancje aktywne o działaniu leczniczym mogą być wprowadzane do polimerowych nanocząstek na drodze fizycznej lub chemicznej, zarówno poprzez modyfikację gotowych nanocząstek, jak i podczas ich syntezy. Do najważniejszych zalet nanocząstek polimerowych należy poprawa biodostępności leków, ochrona substancji czynnych przed degradacją, wydłużenie czasu półtrwania w organizmie oraz możliwość kontrolowanego, długotrwałego uwalniania leku w miejscu docelowym⁷⁷.

W ostatnich latach podejmowane są próby nanotechnologicznej modyfikacji kolchicyny, mające na celu przede wszystkim zwiększenie bezpieczeństwa jej stosowania oraz umożliwienie precyzyjnego dostarczania leku w terapii stanów zapalnych towarzyszących chorobom sercowo-naczyniowym.

2. Uzasadnienie podjęcia tematu

Wyniki badań naukowych wskazują, że przewlekły stan zapalny odgrywa kluczową rolę w inicjacji i progresji zmian miażdżycowych, stanowiąc ważne ogniwo patofizjologiczne w ChNS. W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się nieklasycznym czynnikom ryzyka ChNS, takim jak przewlekłe infekcje powiązane z utrwalonym stanem zapalnym oraz zaburzenia metaboliczne, które często towarzyszą stanowi zapalnemu i mogą prowadzić do rozwoju stłuszczeniowej choroby wątroby o podłożu metabolicznym (MAFLD), pogłębiając ryzyko miażdżycy. Wśród czynników zakaźnych szczególną rolę przypisuje się pałeczkom *H. pylori*, które trwale kolonizują błonę śluzową żołądka i/lub dwunastnicy powodując przewlekły stan zapalny w miejscu infekcji i na obwodzie. Rozpuszczalne składniki antygenowe tych bakterii, które mogą przedostawać się z miejsca kolonizacji do krwiobiegu mogą aktywować śródbłonek naczyń i inicjować reakcję zapalną w obrębie naczyń krwionośnych.

Rozważając mechanizmy reakcji zapalnej towarzyszącej miażdżycy sugeruje się, że aktywacja inflamasomu NLRP3 – kompleksu białkowego odpowiedzialnego za produkcję cytokin prozapalnych, takich jak IL-1B i IL-18 może odgrywać istotną rolę. Efektem aktywacji inflamasomu jest też nasilenie w środowisku miażdżycowym stresu oksydacyjnego zależnego od ROS, co sprzyja utlenianiu lipidów. W związku z powyższym uzasadnione jest poszukiwanie skutecznych strategii ograniczania stanu zapalnego, wzbudzanego przez komponenty czynników zakaźnych i komórek odpornościowych gospodarza, w tym makrofagi i granulocyty, sprzyjającego rozwojowi miażdżycy. Na tym tle szczególne zainteresowanie budzi kolchicina – lek o dobrze udokumentowanym działaniu przeciwzapalnym, który poprzez hamowanie aktywności neutrofili oraz inflamasomu NLRP3 może ograniczać reakcje zapalne w organizmie.

Kolchicina została oceniona w kilku dużych programach klinicznych pod kątem redukcji ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych, jednak jej długotrwałe stosowanie może wiązać się z działaniami niepożądanymi, zwłaszcza ze strony przewodu pokarmowego i mięśni. W związku z tym badania nad ukierunkowanym dostarczaniem kolchicyny za pomocą polimerowych nośników otwierają nowe możliwości terapeutyczne z zastosowaniem nowych lub już stosowanych leków, zwiększając ich bezpieczeństwo przy zachowaniu efektu leczniczego. Podjęcie tematu łączącego wpływ komponentów zakaźnych i lipidów na mechanizmy zapalne oraz próbę ich kontroli

z wykorzystaniem innowacyjnej formy leku przeciwzapalnego jest zatem aktualne, klinicznie istotne i wpisuje się w nowoczesne podejście do profilaktyki oraz leczenia miażdżycy.

3. Hipotezy badawcze

H1: Zmiany promiażdżycowe w śródbłonku naczyniowym oraz rozwój zespołu metabolicznego, powiązane ze stłuszczeniem wątroby, mogą być indukowane przez rozpuszczalne komponenty *H. pylori*, modulujące odpowiedź zapalną gospodarza, oraz przez utlenione sterole

H2: Inflamasom NLRP3 odgrywa istotną rolę w aktywacji makrofagów, ich transformacji w komórki piankowate oraz w rozwoju stanu zapalnego towarzyszącego zmianom promiażdżycowym indukowanym przez rozpuszczalne składniki *H. pylori* oraz utlenione sterole

H3: Stan zapalny może być skutecznie modulowany poprzez zastosowanie kolchicyny dostarczanej do komórek gospodarza w bezpiecznej formie opartej na nanocząstkach polimerowych

4. Cele pracy doktorskiej

1/ Ocena wpływu wybranych rozpuszczalnych komponentów *H. pylori* oraz utlenionych steroli na rozwój zmian promiażdżycowych w śródbłonku naczyniowym oraz na rozwój zespołu metabolicznego, w powiązaniu ze stłuszczeniem wątroby **[publikacja I]**

2/ Ocena roli inflamasomu NLRP3 w aktywację makrofagów, ich transformację w komórki piankowate oraz aktywacji stanu zapalnego w przebiegu zmian indukowanych przez wybrane rozpuszczalne komponenty *H. pylori* i utlenione sterole **[dane eksperymentalne nieopublikowane]**

3/ Ocena bezpieczeństwa biologicznego kolchicyny dostarczanej w nośniku polimerowym na wybranych komórkach eukariotycznych oraz skuteczności jej działania w zakresie ograniczenia aktywności makrofagów w celu łagodzenia stanu zapalnego **[publikacja II]**

5. Materiały i Metody

5.1. Materiały

1 Linie komórkowe:

- Fibroblasty myszy L929 (ATCC® CCL-1™, Manassas, Wirginia, USA)
- Monocyty człowieka THP-1 (ATCC® TIB-202™, Manassas, Wirginia, USA)
- Reporterowe monocyty człowieka THP1-Blue™ NF-κB (InvivoGen, San Diego, Kalifornia, USA)
- Monocyty człowieka THP-1 zawierające knockout regionu N-końcowego genu *NLRP3* THP1-KO-NLRP3 (InvivoGen, San Diego, Kalifornia, USA)
- Komórki śródbłónka naczyniowego wyizolowane z żyły pępowinowej HUVEC (ATCC® CRL-1730™, Manassas, Wirginia, USA)

2 Modele *in vivo*:

- Kawie domowe rasy himalajskiej (Zwierzętarnia Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska)
- Myszy szczepu C57BL/6 (Zwierzętarnia Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska)

3 Stymulatory:

- Puste nanocząstki z poli-l-laktydu (PLA) inicjowanego metylovaną β-cyklodekstryną (NPs, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi)
- Nanocząstki z poli-l-laktydu inicjowanego metylovaną β-cyklodekstryną załadowane kolchicyną (NPs-C, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi)
- Kolchicina (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy)
- 7-ketocholesterol (7KCH Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy)
- LPS *H. pylori* CCUG 17874 (National University of Ireland, Galway, Irlandia, dzięki uprzejmości Prof. A.P. Morana),
- LPS *E. coli* O55:B5 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy)
- Nigerycyna (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy)

5.2. Metody – wykaz metod stosowanych w pracy doktorskiej

- | | | |
|-----|---|-------------------|
| 1. | Model zwierzęcy kawii domowych zakażonych eksperymentalnie <i>Helicobacter pylori</i> , na diecie standardowej lub wysokotłuszczowej | [P.I.] |
| 2. | Immunoenzymatyczny test ELISA do oceny stężenia LDL i rozpuszczalnego ICAM-1 w próbkach surowicy zwierzęcej | [P.I.] |
| 3. | Barwienie immunofluorescencyjne preparatów cienkowarstwowych do oceny depozycji utlenionego LDL, ekspresji molekuly adhezyjnej ICAM, peroksydacji lipidów i apoptozy w tkance aorty | [P.I.] |
| 4. | Pomiar sztywności naczyń u zwierząt z wykorzystaniem metody pletyzmografii naczyniowej | [P.I.] |
| 5. | Barwienie histochemiczne skrawków cienkowarstwowych wątroby oraz ocena stłuszczenia wątroby | [P.I.] |
| 6. | Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) tkanki wątrobowej | [P.I.] |
| 7. | Oceny aktywacji inflamasomu NLRP3 w komórkach monocytarno-makrofagowych | [nieopublikowane] |
| 8. | Pomiar stężenia ludzkiej IL-1 β | [nieopublikowane] |
| 9. | Ocena transformacji makrofagów linii THP1 oraz THPKONLRP3 w komórki piankowe | [nieopublikowane] |
| 10. | Ocena ekspresji transbłonowej formy receptora TREM2 w komórkach monocytarno-makrofagowych | [nieopublikowane] |
| 11. | Pomiar stężenia rozpuszczalnej formy receptora TREM2 (sTREM2) | [nieopublikowane] |
| 12. | Synteza nanocząstek polimerowych metodą mikroprzepływów | [P.II.] |
| 13. | Pomiar stabilności nanocząstek polimerowych przy użyciu aparatury DLS | [P.II.] |
| 14. | Pomiar uwalniania kolchicyny z nanocząstek polimerowych metodą spektrofotometryczną | [P.II.] |

15. Badanie cytobiokompatybilności *in vitro* przy użyciu testu MTT [P.II.]
16. Test aktywacji szlaku sygnałowego NF-κB z wykorzystaniem reporterowych monocytów linii THP1-Blue [P.II.]
17. Ocena ultrastruktury komórek monocytarno-makrofagowych eksponowanych na działanie: kolchicyny, nanocząstek - pustych lub załadowanych kolchicyną, przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) [P.II.]
18. Ocena bezpieczeństwa biologicznego oraz biodystrybucji nanocząstek zawierających kolchicynę, na modelu *in vivo* [P.II.]
19. Ocena regulacji procesu transformacji makrofagów THP1 w komórki piankowate przez kolchicynę wolną lub zamkniętą w nanocząstkach polimerowych [P.II.]

5.3. Opis metod stosowanych w pracy doktorskiej – wyniki nieopublikowane

5.3.1 Oceny aktywacji inflammasomu NLRP3 w komórkach monocytarno-makrofagowych

Monocyty ludzkie linii THP-1 o gęstości 1×10^6 komórek/ml nanoszono w objętości 200 μ l /studzienkę na płytkę 96-studzienkową, a następnie inkubowano w obecności PMA (Sigma -Aldrich, Darmstadt, Niemcy) w stężeniu 50 nM w celu przekształcenia monocytów w makrofagi. Po 72 godz. w inkubatorze w temp 37°C, wilgotnej atmosferze z dodatkiem 5% CO₂ wymieniano podłoże hodowlane na świeże, bez dodatku PMA, a następnie komórki hodowano dodatkowo przez 24 godziny. W kolejnym etapie komórki stymulowano przy użyciu: 7-ketocholesterolu - 7KCH (40 ng/ml), LPS *H. pylori* (25ng/ml), LPS *E. coli* (25ng/ml) oraz Nigerycyny (0,5 μ g/ml) przez 6 godzin w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie supernatanty komórkowe zabezpieczano do wykorzystania w kolejnych etapach badań, a komórki utrwalano przez 10 min w 4% roztworze formaldehydu. W kolejnych etapach komórki przepłukiwano trzykrotnie PBS, inkubowano z 1% roztworem BSA/PBS przez 30 min, a następnie z przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko NLRP3 (rozcieńczenie 1:500 przygotowane w 1% roztworze BSA/PBS) przez noc w temperaturze 4°C. Po tym czasie komórki płukano trzykrotnie PBS, a następnie inkubowano z drugorzędowymi

przeciwciałami kozy przeciwko IgG myszy, skoniugowanymi z fluorochromem Alexa Fluor 488 (rozcieńczone 1:1000 w 1% roztworze BSA/PBS) przez 2 godzinny w temp. 37°C. Fluorescencje komórek odczytywano przy użyciu czytnika mikropłytek SpectraMax przy długość fali 495/519 nm.

5.3.2. Pomiar stężenia ludzkiej IL-1 β

Stężenie IL-1 β w podłożach pochodowlanych komórek THP-1 oznaczano przy pomocy testu ELISA BD OptEIA™ Human IL-1 β ELISA Set II (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Test został wykonany zgodnie z protokołem udostępnionym przez producenta.

5.3.3. Ocena transformacji makrofagów linii THP-1 oraz THPKONLRP3 w komórki piankowate

Monocyty ludzkie linii THP-1 oraz THPKONLRP3 nanoszono w gęstości 2,8 x10⁵ komórek/studzienkę do płytki 12-dołkowej w objętości 500 μ l. W celu przekształcenia monocytów w makrofagi komórki poddawano działaniu PMA (Sigma - Aldrich, Darmstadt, Niemcy) w stężeniu 50 nM. Następnie komórki inkubowano przez 72 godz. w inkubatorze w 37°C, 5% CO₂. Po 72 godz. inkubacji wymieniano podłoże hodowlane na świeże, a następnie komórki hodowano dodatkowo przez 24 godziny. W kolejnym etapie komórki stymulowano przy użyciu 7 ketocholesterolu (7 KCh 40 ng/ml), LPS *H. pylori* (25ng/ml), LPS *E. coli* (25ng/ml) przez 24 godziny w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie komórki utrwalano przez 10 min 4% roztworze formaldehydu. W kolejnych etapach komórki przepłukiwano trzykrotnie PBS i traktowano 60% izopropanolem przez 5 min. Następnie komórki poddawano barwieniu czerwieni oleistą przez 15 min, którą po tym czasie 2 krotnie odpłukiwano wodą destylowaną. Na koniec komórki dobarwiano hematoksyliną przez 1 min. Gotowe preparaty obrazowano w mikroskopie świetlnym, w celu zliczenia procenta powstałych komórek piankowatych.

5.3.4. Ocena ekspresji transbłonowej formy receptora TREM2 w tkance i na komórkach monocytarno-makrofagowych

Materiał wykorzystany do badań stanowiły fragmenty aorty pobrane od pacjentów z potwierdzoną miażdżycą podczas operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (współpraca z dr hab. Tomaszem Rechcińskim, Katedra I Kardiologii i Rehabilitacji

Kardiologicznej, Szpital im Biegańskiego w Łodzi). Z uzyskanych fragmentów naczyń przygotowano parafinowe preparaty cienkowarstwowe (współpraca z dr Jarosławem Szwalskim, Cytopath, Łódź) barwione hematoksyliną i eozyną w celu oceny histopatologicznej oraz przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne w kierunku receptora TREM2 na komórkach. W ramach procedury cienkowarstwowe sekcje naczyń odparafinowano z wykorzystaniem ksylenu i alkoholu etylowego (stężenia w zakresie 95% - 100%), a po odpłukaniu PBS inkubowano w roztworze 3% BSA/PBS przez 1 godzinę w temp. pokojowej, następnie inkubowano z I-rzędowymi przeciwciałami przeciwko TREM2 (rozcieńczenie 1:100 w 1% roztworze BSA/PBS) przez noc w 4°C, a finalnie z II-rzędowymi przeciwciałami przeciwko IgG królika skoniugowanymi z fluorochromem Alexa fluor 488 (rozcieńczenie 1:1000 w 1% roztworze BSA/PBS) przez 2 godziny w temp. pokojowej. Jądra komórkowe barwiono barwnikiem DAPI przez 15 minut w temp. pokojowej. Preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej oraz konfokalnej przy następujących długościach fali: dla Alexa Fluor 488: długość fali 495/519 nm, a dla DAPI: długość fali 360/460 nm.

W celu oceny ekspresji receptora TREM2 na komórkach linii THP-1 – monocytów rosnące na płycie 96-studzienkowej, w ilości 2×10^5 komórek/studzienkę w objętości 200 μ l, stymulowano: 7KCh (40 ng/ml), LPS *H. pylori* (25ng/ml), LPS *E. coli* (25ng/ml) oraz nigerycyną (0,5 μ g/ml) przez 6 godzin (37°C, 5% CO₂), a następnie barwiono analogicznie jak fragmenty naczyń w kierunku receptora TREM2 (opis procedury powyżej). Jedyne różnica polegała na pominięciu barwienia DNA komórek. Intensywność fluorescencji odczytano przy użyciu czytnika mikropłytek SpectraMax przy długości fali 495/519 nm.

5.3.5. Pomiar stężenia rozpuszczalnej formy receptora TREM2 (sTREM2)

Do oceny poziomu złuszczonej formy receptora sTREM2 wykorzystano supernatanty komórkowe zebrane po 6 godzinnej stymulacji monocytów THP-1 według metody opisanej w punkcie 5.3.4. Ponadto w badaniach wykorzystane zostały również surowice pobrane od pacjentów zakwalifikowanych do operacji pomostowania aortalno-wieńcowego, od których pobrano także fragmenty aort. Stężenie rozpuszczalnej formy receptora TREM2 oceniono przy pomocy komercyjnego immunoenzymatycznego testu ELISA Human TREM-2 ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Test został wykonany zgodnie z procedurą udostępnioną przez producenta.

5.3.6. Analiza statystyczna

Wykresy oraz analizy statystyczne zostały wykonane w programie GraphPad Prism, wersji 10.4.2 (Dotmatics, GraphPad Software, Stany Zjednoczone). Dane przedstawiono jako średnią i odchylenie standardowe (SD). Rozkład normalny danych i reszt został oceniony przy pomocy testu Shapiro-Wilka wraz z wizualną analizą wykresów Q-Q reszt, natomiast równość wariancji oceniono testem Browna-Forsythe'a lub Spearmana. Wartość $p < 0,05$ uznawano za istotną statystycznie. Do analizy porównawczej 3 lub więcej grup spełniających założenia testu parametrycznego zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, z testem post hoc Dunnetta. Dla danych stężenia rozpuszczalnej formy TREM2 niespełniających założeń testu ANOVA, analizę wykonano testem Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna. Dane odsetku komórek piankowatych dwóch linii komórkowych analizowano dwuczynnikowym testem ANOVA z testem wielokrotnych porównań Tukeya.

6. Wyniki

6.1. Wpływ wybranych rozpuszczalnych komponentów *H. pylori* i utlenionych steroli na rozwój zmian promiażdżycowych i zespołu metabolicznego (Publikacja I)

P.I.

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

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

Scientific Reports, 2024, 14:5764.

doi: 10.1038/s41598-024-56308-7

Badania przeprowadzono w oparciu o hipotezę, że zmiany promiażdżycowe w śródbłonku naczyniowym oraz rozwój zespołu metabolicznego, powiązane ze stłuszczeniem wątroby, mogą być indukowane przez rozpuszczalne komponenty *H. pylori*, modulujące odpowiedź zapalną gospodarza oraz przez utlenione sterole. Celem badań była ocena roli tych czynników w inicjowaniu i nasilaniu wspomnianych zmian. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem doświadczalnego modelu *in vivo* kawii domowej na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (Nr 58/ŁB45/2016; 44/LB105/2018). Zwierzęta zakażano *H. pylori* i żywiono paszą odpowiadającą różnym wariantom dietetycznym pod względem zawartości tłuszczu (standardowa lub wysokotłuszczowa). Zwierzęta podzielono na cztery grupy: niezakażone i otrzymujące karmę standardową, zakażone *H. pylori* na diecie standardowej, niezakażone na diecie wysokotłuszczowej oraz zakażone *H. pylori* na diecie wysokotłuszczowej. Po 60 lub 120 dniach zwierzęta zostały poddane eutanazji, a następnie pobrano od nich materiał biologiczny, taki jak: surowica, fragmenty naczyń krwionośnych, śledzionę oraz wątrobę do dalszych analiz.

W surowicy krwi wszystkich zwierząt oceniano poziom LDL, a uzyskane wyniki wykazały wzrost stężenia tej frakcji cholesterolu w surowicach zwierząt karmionych paszą wysokotłuszczową. Efekt ten był zależny od czasu trwania diety. Ponadto wykazano, że poziom LDL był istotnie wyższy u zwierząt zakażonych *H. pylori*. Chociaż lipoproteiny LDL same nie wykazują silnych właściwości aterogennych, to w formie utlenionej jako oxLDL mogą prowadzić do zaburzeń funkcjonowania komórek

śródbłonka i wywoływać stan zapalny. Proces utleniania lipidów odbywa się w środowisku reaktywnych form tlenu, których poziom wzrasta w organizmie gospodarza w czasie zakażenia *H. pylori*. U zwierząt zakażonych tymi bakteriami i karmionych dietą wysokotłuszczową w śródbłonku naczyniowym stwierdzono odkładanie się cząsteczek oxLDL, co korelowało ze wzrostem w tkance aortalnej poziomu 4-hydroksynonenalu (4HNE) biomarkera stresu oksydacyjnego i utlenienia lipidów. Zatem podwyższony poziom 4HNE świadczył o nasilonej peroksydacji lipidów, co sprzyjało tworzeniu środowiska promiażdżycowego. W efekcie nadmiernego stresu oksydacyjnego dochodziło do nasilenia apoptozy w komórkach śródbłonka, szczególnie u zwierząt zakażonych *H. pylori* na diecie wysokotłuszczowej. Kombinacja czynników dietetycznych oraz bakteryjnych przyczyniała się również do zwiększenia sztywności naczyń krwionośnych, przy czym najbardziej nasilone zmiany obserwowano u zwierząt eksponowanych jedynie na jeden z czynników: albo zakażenie *H. pylori* przy diecie standardowej, albo dietę wysokotłuszczową bez zakażenia. Możliwe, że efekt ten wynika nie tylko z rozwoju środowiska sprzyjającego miażdżycy, ale również z nasilonej depozycji przeciwciał produkowanych w odpowiedzi na zakażenie, które mogą odkładać się w śródbłonku oraz mięśniach gładkich naczyń, przyczyniając się do sztywności naczyń.

Biorąc pod uwagę powyższe w badaniach oceniono liczbę i wielkość centrów namnażania limfocytów w śledzionie (germinal centers – GC). Wykazano, że liczba GC wzrastała wraz z czasem trwania zakażenia, a ich średnica była istotnie większa u zwierząt zakażonych w porównaniu z grupą kontrolną (zwierzęta niezakażone). Wyniki te wskazują na aktywację odpowiedzi humoralnej w przebiegu zakażenia *H. pylori*.

Ostatni etap badań przedstawiony w niniejszej publikacji obejmował ocenę rozwoju zespołu metabolicznego u badanych zwierząt w powiązaniu ze stłuszczeniem wątroby i wczesnymi zmianami miażdżycowymi. Zespół metaboliczny obejmuje zaburzenia procesów biochemicznych i fizjologicznych związanych z chorobami układu krążenia oraz zaburzeniami czynności wątroby, określanymi jako MASLD.

W celu oceny stłuszczenia wątroby, preparaty cienkowarstwowe tego narządu od badanych zwierząt, wybarwiano hematoksyliną i eozyną, a następnie poddano ocenie histopatologicznej. Wykazano związek pomiędzy żywieniem dietą wysokotłuszczową i zakażeniem *H. pylori*, a nasileniem stłuszczenia wątroby u kawii domowych. W wątrobie zwierząt zakażonych *H. pylori* i karmionych dietą wysokotłuszczową wykazano zmiany o największym nasileniu - stłuszczenie wielokropelkowe obejmowało

około 60% powierzchni badanych skrawków cienkobarstwowych, a w obrazie mikroskopowym widoczne były charakterystyczne hepatocyty określane jako balonowate.



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

Agata Tomaszewska^{1,2✉}, Weronika Gonciarz¹, Tomasz Rechcinski³, Magdalena Chmiela¹, Anna K. Kurdowska⁴ & Agnieszka Krupa^{1✉}

The metabolic syndrome, often accompanied by hepatic manifestations, is a high-risk factor for developing cardiovascular disease. Patients with metabolic dysfunction associated with steatohepatic disease (MASLD) are at significant risk of developing coronary artery disease. Atherosclerosis is a systemic inflammatory disorder in which several factors, including dietary or infectious factors, can cause an inflammatory response. *Helicobacter pylori* (HP) bacteria have been implicated in the progression of proatherogenic vascular endothelial lesions, moreover, our previous study in an experimental in vivo model of *Cavia porcellus* showed that HP components and high-fat substances acted synergistically in promoting vascular endothelial inflammation, leading to an early onset of a proatherogenic environment. In the present study, our goal was to determine the contribution of HP components to the development of hepatic manifestations of metabolic syndrome in an experimental model. Our results showed that HP infection in animals exposed to a high-fat diet increased oxidative stress and lipid peroxidation, followed by endothelial lipid deposition, impaired endothelial apoptosis, cell lysis, and increased vascular stiffness. Finally, histopathological analysis of liver tissue showed signs of MASLD development in HP-infected animals fed a high-fat diet.

Keywords Atherosclerosis, Metabolic syndrome, *Helicobacter pylori*, Endothelium

Cardiovascular diseases (CVD) are a major cause of death in Europe. The European Heart Network reports that the number of CVD cases is still on the rise¹. CVD includes various vascular disorders, but the most common and severe of them is atherosclerosis. This condition can develop quickly and may lead to a heart attack or stroke¹. Atherosclerosis is a medical condition that affects the entire body and causes inflammation. It is strongly connected to high levels of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). This type of LDL is involved in the development of atherosclerotic plaques in medium and large arteries, which can lead to serious health problems². Multiple factors can cause the inflammatory response in atherosclerosis, including dietary or infectious sources. There is substantial evidence that the gut microbiota, which includes *Escherichia coli* (EC) and its lipopolysaccharide, can impact the development of atherosclerosis through Toll-like receptor 4 (TLR-4)—induced cellular oxidative stress^{3–5}. In addition, research conducted through seroepidemiological data and both in vitro and in vivo studies indicate that the presence of *Helicobacter pylori* bacteria (*H. pylori*, HP) may impact the development of atherosclerosis. This is particularly significant considering that over half of the world's population is infected with HP, and the infection is common in patients with cardiovascular disease^{6–13}.

Earlier studies have shown¹⁴, that soluble components of *H. pylori* bacteria, when combined with a high-fat diet, can create a proatherogenic environment in *Cavia porcellus* (guinea pig) that have been infected with the bacteria orally. This proatherogenic environment refers to a scenario, where the HP bacteria colonize the

¹Department of Immunology and Infectious Biology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland. ²Bio-Med-Chem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish Academy of Sciences, University of Lodz, Lodz, Poland. ³1st Department of Cardiology, Medical University of Lodz, Lodz, Poland. ⁴Department of Cellular and Molecular Biology, The University of Texas Health Science Center at Tyler, Tyler, Texas, USA. ✉email: agata.tomaszewska@edu.uni.lodz.pl; agnieszka.krupa@biol.uni.lodz.pl

stomach, causing chronic inflammation and high levels of reactive oxygen species (ROS) to be released from activated immune cells or gastric epithelial cells that are under stress¹⁵. This inflammation weakens the epithelial barrier, allowing bacterial components to enter the bloodstream. Furthermore, the proatherogenic environment is characterized by the presence of oxidized lipids that undergo peroxidation in the presence of oxidative stress. This can increase inflammation and damage vascular endothelial cells, which can ultimately transform macrophages into foam cells that participate in the formation of atherosclerotic plaque as showed previously¹⁴. Moreover, our previous research, that was done using fluorescently labeled dextran particles, showed that the secretion of reactive oxygen species (ROS) in response to *HP* components resulted in increased permeability of human gastric epithelial cells (AGS) or human vascular endothelial cells (HUVCE) in vitro. We also found that *HP* components inhibited the regeneration of gastric epithelial cells in vitro, thus promoted chronic inflammation^{8,15,16}. It's important to note that an imbalance between excessive ROS release and the number of neutralizing antioxidants could lead to inflammation and the development of atherosclerosis¹⁷. Pathogens and their soluble components can contribute to the development of atherosclerosis by not only inducing inflammation but also affecting lipid metabolism. This can be observed through an increase in LDL or triglyceride levels and a decrease in the concentration of high-density lipoproteins (HDL)⁴. Research has shown that patients with diagnosed cardiovascular disease who are infected with *HP* have significantly increased cholesterol levels, which decrease after the eradication of these pathogenic bacteria¹⁸. *HP* incorporates non-esterified cholesterol into the cell membrane and induces its glycosylation, using both non-esterified and glycosylated cholesterol as membrane lipid composition. This enables *HP* to evade phagocytosis and detoxify sterols that could be fatal to the bacterium¹⁹. In the stomach, *HP* reduces the amount of cholesterol in the gastric glands. This depletion helps to prevent interferon gamma signaling and allows the bacteria to escape the inflammatory response of the host²⁰. Additionally, some studies have suggested that atherosclerosis may be accompanied by an auto-immune response to low-density lipoprotein (LDL) or various antigens of infectious agents, including *HP*. This response may lead to the induction of cross-reactive antibodies^{10,21,22}. When the concentration of LDL (low-density lipoprotein) in the bloodstream increases, there is a rise in the uptake of this lipid fraction by the cells, leading to the accumulation of cholesterol in the endothelium^{23,24}. This, in turn, results in the deposition of cholesterol in the vessels, primarily through interactions with proteoglycans of the subendothelial matrix. Oxidized LDL is classified as a damage-associated molecular pattern (DAMP), and its recognition by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and other pattern recognition receptors (PRRs) can activate endothelial cells. This activation causes an upregulation of cytokines and chemokines that initiate the recruitment of monocytes²⁵. These monocytes, upon taking up oxidized LDL, transform into foam cells, which further upregulate endothelial inflammation^{17,24,26}. In addition to cholesterol, lipid oxidation can produce other harmful substances like 7-ketocholesterol (7KCh) and aldehydes such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), which have proatherogenic effects. These substances can react with proteins and activate signaling pathways that damage cell membranes²⁷. In a previous study, we found that *HP* components can cause macrophages to turn into foam cells in the presence of oxidized cholesterol-7KCh¹⁴. Another study showed that 7KCh can decrease the integrity of the HUVEC monolayer and increase cell apoptosis⁸. Recent studies indicate that metabolic syndrome, which is often accompanied by CVD, can also manifest in the liver, resulting in a high risk of clinical symptoms of CVD^{28,29}. Growing evidence suggests that patients with Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD), previously known as Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), are at significant risk of developing coronary heart disease, cardiomyopathy, and cardiac arrhythmias. This can ultimately lead to increased cardiovascular morbidity and mortality^{28,30–32}. The inflammatory aspect of atherosclerosis plays a crucial role in the development of cardiovascular disease. The hepatic manifestation of the metabolic syndrome is becoming increasingly common in patients with CVD. Therefore, the question of how inflammation is initiated and how it contributes to the development of the set of biochemical and physiological abnormalities associated with CVD is of great interest. The role *HP* infection in driving these events is also being investigated. Several animal models, including the guinea pig model, are being used to study the role of various factors, such as increased fat intake or infectious agents, in the development of CVD³³. We conducted a study to investigate the impact of *HP* infection induced locally in the stomach of guinea pigs fed a high-fat diet. We aimed to determine whether this could lead to increased oxidative stress and lipid peroxidation, followed by lipid deposition in the endothelium. We also wanted to examine whether this process could result in a range of functional impairments, such as deregulation of apoptosis, endothelial breakdown, and increased vascular stiffness. Additionally, we sought to explore the potential effects of increased deposition of oxidized lipids on the surface expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), which is responsible for allowing inflammatory cells to interact with the vascular endothelium or may be involved in regenerative processes.

Finally, we also aimed to investigate whether vascular endothelial events that are dependent on increased fat intake and ongoing *HP* infection are reflected in hepatic symptoms. These symptoms have been suggested as early markers of CVD.

Results

To study the relationship between inflammation caused by *HP* bacteria and the development of metabolic syndrome, a group of *Cavia porcellus* animals was used in an in vivo model where they were either infected with *HP* or left uninfected. They were then fed either a high-fat or standard diet. Helicobacter-like organisms (HLO) were found in gastric tissue of all *HP*-infected animals, regardless of the type of diet, 7, 28, or 60 days after inoculation. The *HP*-infected animals developed gastric inflammation, which was primarily caused by granulocytes and lymphocytes in the later phases of infection. Specific anti-*HP* antibodies were produced by the animals and were detectable in their serum samples at 7, 28, and 60 days after inoculation. Some animals were observed for

up to 120 days to track the late systemic effects of *HP* infection in the context of the development of metabolic syndrome, but no further investigation of *HP* infection markers was conducted.

Systemic inflammatory response in *Cavia porcellus* in response to oral inoculation with *Helicobacter pylori* bacilli

We conducted a study to assess whether exposure of animals to *HP* infection resulted in increased activation of systemic immune cells. To do this, we examined the germinal centers of the animals' spleens either 7 or 28 days following *HP* inoculation or in uninfected animals. We found that the size of germinal centers, as measured by mean diameter, increased during *HP* infection, and this difference was statistically significant at both 7 and 28 days after *HP* inoculation in guinea pigs (Fig. 1A, B). Additionally, the number of germinal centers also increased during *HP* infection. In control animals, the average number of germinal centers per 4 mm² was less than 10, whereas 28 days after *HP* inoculation it was more than 11 (data not shown).

Low-density lipoprotein level in serum samples of *Cavia porcellus* infected with *HP* and exposed to a high-fat diet or standard chow

We conducted a study to examine the impact of inflammation resulting from *HP* infection on metabolic syndrome related to lipids. To do this, we measured the levels of LDL in the serum of tested animals and the deposition of oxidized LDL in their aortic tissue. After 60 or 120 days of feeding, we found that the levels of LDL in the serum of animals that were exposed to a high-fat diet were significantly higher than those of animals that were fed a normal chow. This increase was observed to be time dependent. Furthermore, we found that the increase in serum LDL levels was consistently higher in animals that were fed a fat-enriched chow and infected with *HP*, as shown in Fig. 2.

Oxidative stress and deposition of oxidized lipids in the aortic tissue of *Cavia porcellus* infected with *HP* and exposed to a high-fat diet or standard feed

The deposition of ox-LDL in aortic tissue was examined using specific anti-ox-LDL antibodies and immunofluorescence staining under a microscope. After 120 days of the experiment, ox-LDL deposition was visible in the aortic endothelial layer of *HP/E* animals (Fig. 3A, B), which correlated with the concentration of LDL in serum, which was highest in the *HP/E* group of animals (Fig. 2). However, the measurement of fluorescence intensity in areas where ox-LDL deposition was confirmed microscopically did not show any statistically significant difference between experimental groups, probably due to lower sensitivity resulting from the method of performing the measurement itself (Fig. 3B).

We experimented to evaluate the level of 4 hydroxy 2 nonenal (4HNE), a product of fatty acid peroxidation, in the aortic tissue of animals from different study groups using immunofluorescence staining. After staining

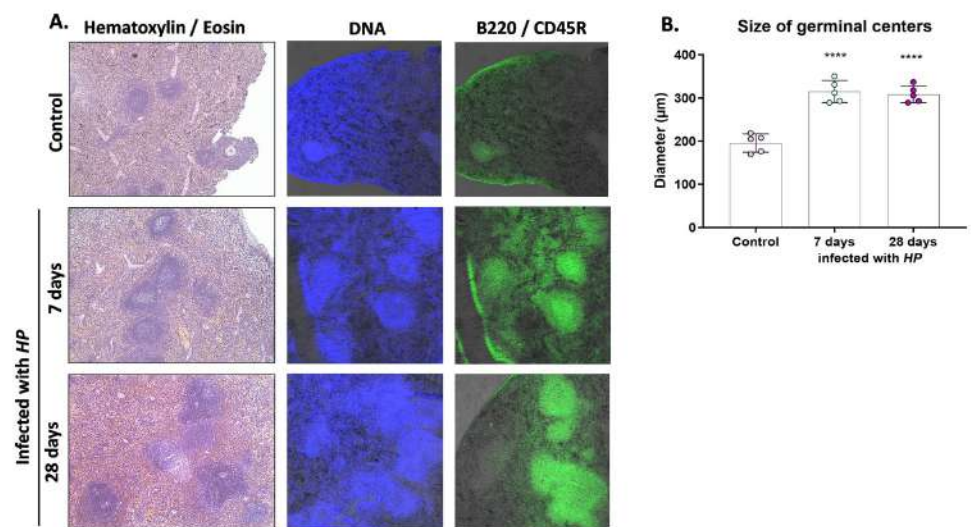


Figure 1. Size of germinal centers in the spleens of animals at 7 and 28 days after *H. pylori* (*HP*) infection. (A) Representative images of germinal centers in the spleen of animals; B220/cluster differentiation CD45R (excitation 495 nm, emission 519 nm; green)—a marker of B lymphocyte differentiation; DAPI (excitation 358 nm, emission 461 nm; blue)—staining of nuclei. (B) Diameter of germinal centers in the animals' spleens; Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, and Dunnett's post-hoc multiple comparisons test **** $p < 0.0001$; Comparison: control animals (not infected) vs guinea pigs at 7 and 28 days after *HP* inoculation.

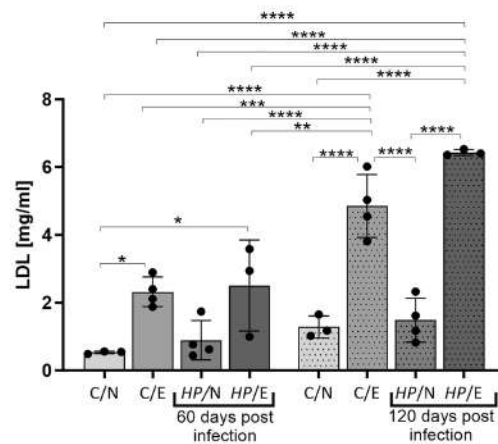


Figure 2. LDL concentration in serum samples of animals: uninfected (C-control) with *H. pylori* (HP) on a normal (N) diet (C/N), uninfected (C-control) on an experimental (E) high-fat diet (C/E), infected with HP on a normal diet (HP/N), infected with HP on an experimental high-fat diet (HP/E). Results are presented as the mean values $\pm$ SD. Statistical analysis was performed with three-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's multiple comparisons test. * $p=0.0332$; ** $p=0.0021$; *** $p=0.0002$; **** $p<0.0001$.

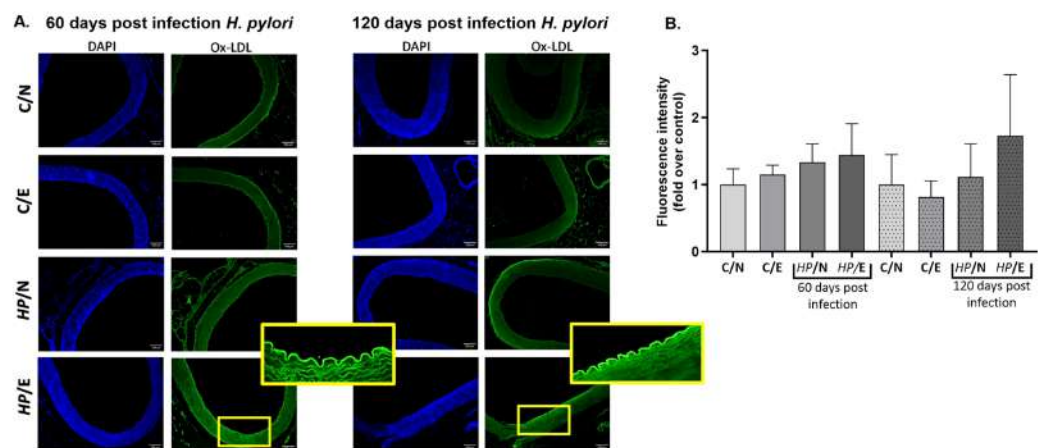


Figure 3. Deposition of ox-LDL in the aortic tissue of the studied animals after 60 or 120 days of the experiment. (A) Representative images of aortic tissue of animals: uninfected (C-control) with *H. pylori* (HP) on a normal (N) diet (C/N), uninfected (C-control) on an experimental (E) high-fat diet (C/E), infected with HP on a normal diet (HP/N), infected with HP on a high-fat diet (HP/E). Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)—green (excitation 495 nm, emission 519 nm), DAPI—(excitation 358 nm, emission 461 nm) nuclei staining, blue. (B) Relative fluorescence units presented as a multiple relative to the control group of animals (C/N). Results are presented as the mean values $\pm$ SD. Statistical analysis was performed on log transformed data to attain heteroscedasticity of residuals, with three-way ANOVA followed by posthoc Tukey's multiple comparisons test.

aortic tissue with specific fluorescently labeled anti-4HNE antibodies, the fluorescence intensity of 4HNE was found to be highest in the group of animals infected with HP and fed high-fat diets (HP/E), as shown in Fig. 4. The images presented were taken after 60 days of feeding and/or inoculation of HP animals. Although CD34 was used as an endothelial cell marker, it was difficult to attribute the fluorescence signal specifically to endothelial cells as the process of lipid peroxidation may also affect smooth muscle cells¹⁴. These findings further support our previous observations¹⁴, which demonstrated that a combination of dietary (high-fat foods) and bacterial

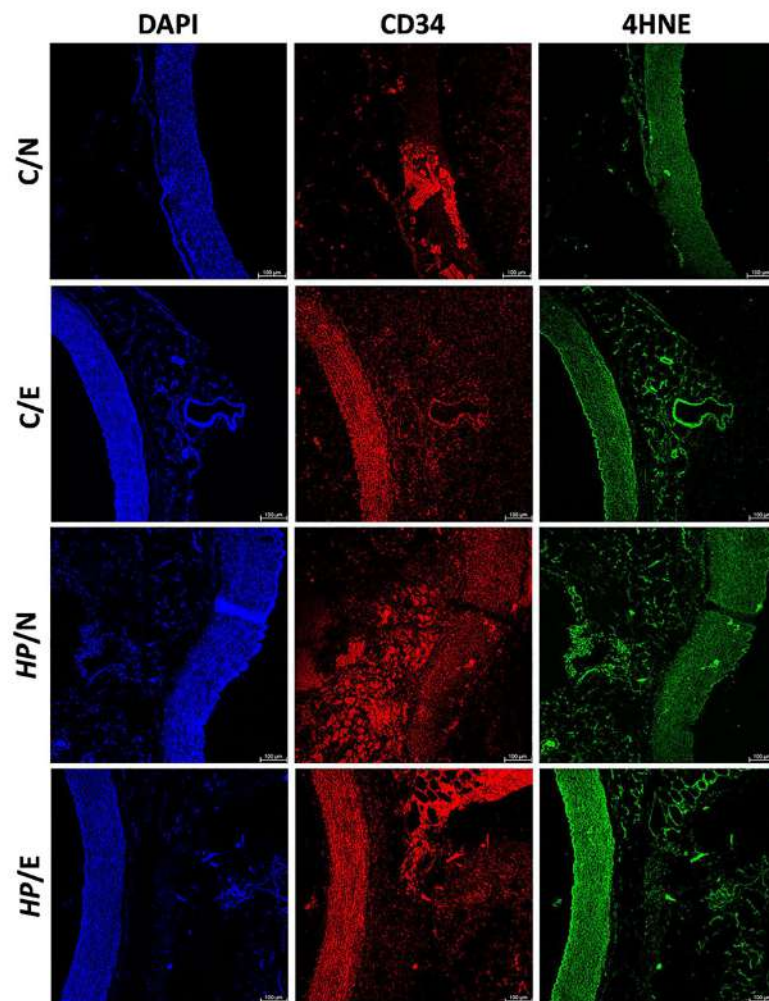


Figure 4. Representative images of guinea pig aortic tissue stained for 4 hydroxy 2 nonenal (4HNE). Animals: uninfected (C-control) with *H. pylori* (HP) on a normal (N) diet (C/N), uninfected (C-control) on experimental (E) high-fat die (C/E), infected with HP on a normal diet (HP/N), infected with HP on an experimental high-fat diet (HP/E). 4 hydroxy 2 nonenal (4HNE)—(excitation 495 nm, emission 519 nm), green; cluster of differentiation CD34—(excitation 590 nm, emission 618 nm) marker of endothelial cells, red. DAPI, marker of cell nuclei, blue (excitation 358 nm, emission 461 nm).

(soluble HP antigens) components promotes a proatherogenic environment including the transformation of macrophages into foam cells.

Apoptosis levels in the aortic tissue of *Cavia porcellus* infected with HP and exposed to a high-fat diet or standard feed

The study examined aortic tissues from different animal groups for apoptosis using the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick labelling (TUNEL) assay. The intensity of apoptosis was calculated from representative images using the Image J software. However, quantification was limited to the endothelial layer of aortic tissue. The results depicted in Fig. 5 indicate a significant increase in apoptosis in the vascular endothelium of HP uninfected (control) animals fed a high-fat diet (C/E group). Furthermore, it was observed that HP-infected guinea pigs (HP/E group) that were given experimental food had a much higher level of apoptosis.

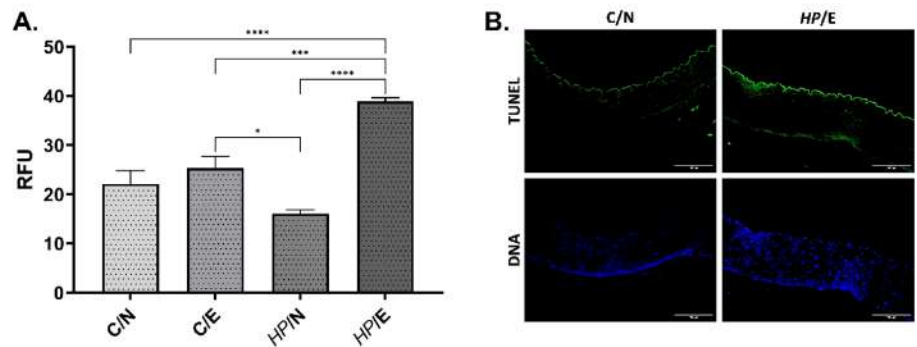


Figure 5. The level of apoptosis in vascular endothelium. Tested animals: uninfected (C-control) with *H. pylori* (HP) on a normal (N) diet (C/N), uninfected (C-control) on experimental (E) high-fat die (C/E), infected with HP on a normal diet (HP/N), infected with HP on an experimental high-fat diet (HP/E). (A) The intensity of fluorescence in the enzyme terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick labelling (TUNEL) assay was calculated based on representative pictures shown as relative fluorescence units (RFU). (B) Representative images of aortic tissue of C/N and HP/E animals—TUNEL test (excitation 590 nm, emission 618 nm) endothelial apoptosis (green), DAPI—(excitation 358 nm, emission 461 nm) nucleus staining (blue). Results are presented as the mean values $\pm$ SD. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's multiple comparisons test. * $p = 0.0332$; *** $p = 0.0002$; **** $p < 0.0001$.

Vascular stiffness

The occurrence of atherosclerosis in humans leads to an increase in blood vessel stiffness. To evaluate blood vessel stiffness in animals from different groups, we conducted a study where they were exposed to normal or fat-enriched experimental food and/or HP infection for 120 days. To measure the stiffness of the arteries, we used a special rodent surgical monitor with a high-resolution electrocardiogram (ECG) from Indus Animalab in Poznan, Poland¹⁴. The device measured the amplitude of the pulse wave, which determined the stiffness of the arteries. The lower the amplitude, the stiffer the vessel. We selected only the average amplitude value for each animal representing the data. We compared the average amplitudes between the groups and scored them based on the differences. The scoring system ranged from 1 to 3, where 1 indicates significant stiffness (amplitudes lower than 1.5 AU), 2 indicates partial arterial stiffness (amplitudes between 1.5 and 2 AU), and 3 indicates normal arterial stiffness (amplitudes between 2 and 3 AU). The results in Fig. 6 show the highest arterial stiffness (score 1) in HP-infected animals fed a normal diet (HP/N) or uninfected (control) animals that were fed a high-fat experimental diet (C/E).

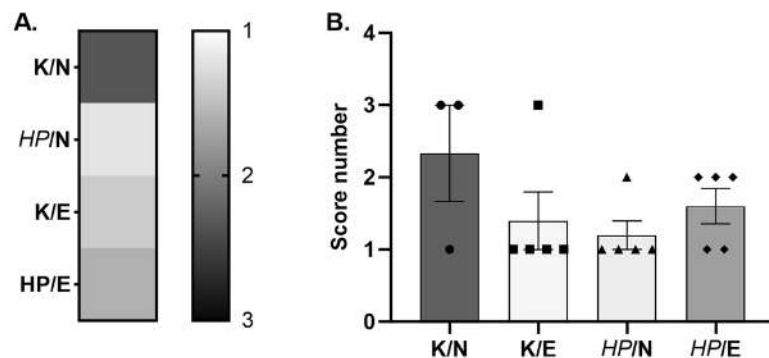


Figure 6. Effect of high-fat diet and/or HP infection on arterial stiffness in *Cavia porcellus* studied. Animals: uninfected (C-control) with *H. pylori* (HP) on a normal (N) diet (C/N), uninfected (C-control) on a high-fat experimental (E) diet (C/E), infected with HP on a normal diet (HP/N), infected with HP on a high-fat experimental diet (HP/E) after 120 days of feeding and/or HP infection. (A) Results shown as heat map. (B) Results for individual animals in different groups are shown as a bar graph (score number). Results are presented as the mean values $\pm$ SEM.

Hepatic steatosis as a hepatic manifestation of metabolic syndrome in *Cavia porcellus* infected with *HP* and exposed to a high-fat diet

Metabolic syndrome refers to a collection of biochemical and physiological abnormalities related to cardiovascular disease, that are considered to be the primary indicators of the development of atherosclerosis³⁵. The most common manifestation of dysregulation of lipid metabolism in metabolic syndrome is hepatic steatosis, fibrosis, or inflammation of the liver.

The liver tissue of animals from different experimental groups was analyzed histopathologically after 120 days of exposure to normal or fat-enriched feed and/or *HP* (Fig. 7A). The analysis was based on five parameters: degree and location of steatosis, presence of fibrosis, lobular inflammation, and presence of balloon cells (Fig. 7C, D). A score was developed based on these parameters, following the method previously described by Kleiner et al.³⁶. The liver sections of animals infected with *HP* and exposed to a high-fat experimental diet (*HP/E*) showed the most intense steatosis with the highest score, location of steatosis, and ballooning. The large lipid droplets covered

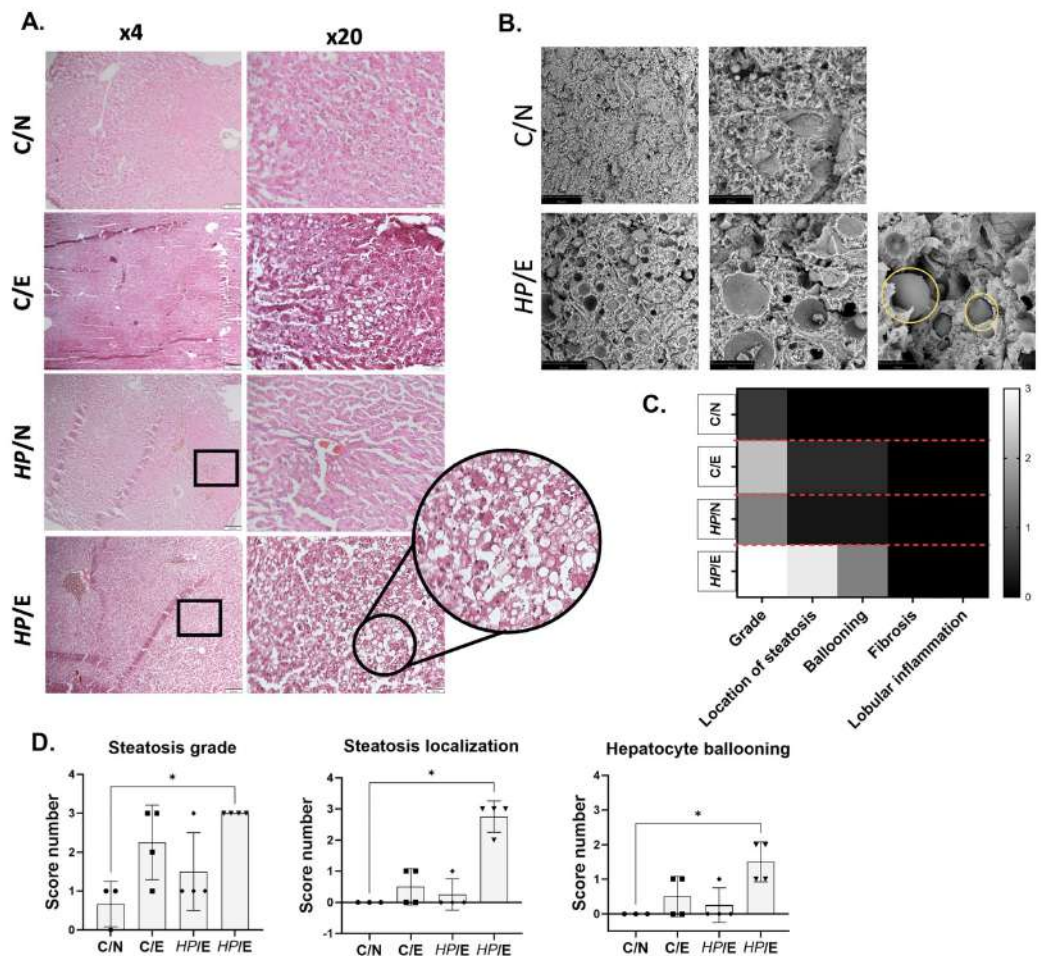


Figure 7. Evaluation of hepatic steatosis in animals fed a normal or fat-enriched diet and/or inoculated with *HP*. Animals: uninfected (C-control) with *H. pylori* (*HP*) on a normal (N) diet (C/N), uninfected (C-control) on a high-fat experimental (E) diet (C/E), infected with *HP* on a normal diet (HP/N), infected with *HP* on a high-fat experimental diet (HP/E) after 120 days of exposure. (A) Representative images of haematoxylin and eosin staining of liver sections. (B) Representative images of lipid droplets and steatosis in liver tissue captured using a scanning electron microscope for the C/N and HP/E animals' groups. (C) Heat map of results calculated for different symptom categories (mean values). (D) Results for different groups of individual animals are presented as bar graphs. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn's post-hoc multiple comparisons test. * $p < 0.0334$.

more than 60% of the organ surface, and lipids were mainly localized around small vessels. Ballooned hepatocytes were also present. In liver sections from C/E animals, hepatic steatosis was present as small droplets that covered less than 50% of the organ surface, with only a few balloon-shaped hepatocytes visible. There was no evidence of fibrosis or lobular inflammation in any animal, regardless of the experimental group. To visualize areas of liver steatosis in *HP*-infected animals fed a high-fat diet, we performed a scanning electron microscopy (SEM). As shown in Fig. 7B fragments of liver tissue show lipid droplets or lipid deposits in areas of parenchymal cells. In the process of steatosis, most cells accumulate lipid droplets, leading to hepatocyte ballooning and inflammation. In the process of steatosis, most parenchymal cells contain only one large fat droplet, and its volume can be many times larger than the original cell. Large fat droplets marginalize the cell's cytoplasm and organelles, which can interfere with metabolism and transport processes within the cell, and ultimately lead to the occurrence of cell necrosis. It can also be one of the methods to stop fat accumulation in cells³⁷.

Evaluation of arterial ICAM-1 expression and serum soluble ICAM-1 levels in *Cavia porcellus* fed standard or fat-enriched diets, infected or uninfected with *HP*

In this study, we evaluated the expression of endothelial ICAM-1 in the aortic tissue of animals through immunofluorescence, or by measuring the level of soluble ICAM-1 in their serum using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Surprisingly, feeding uninfected animals with a fat-enriched diet did not have any impact on the natural level of ICAM-1 expression in their arteries, which was like animals receiving a standard diet (Fig. 8A). However, the fluorescence of arterial samples stained with anti-ICAM-1 antibody was found to be reduced in *HP*-inoculated animals. The reduction in ICAM-1 deposition in the aortic tissue of *HP*-infected animals and

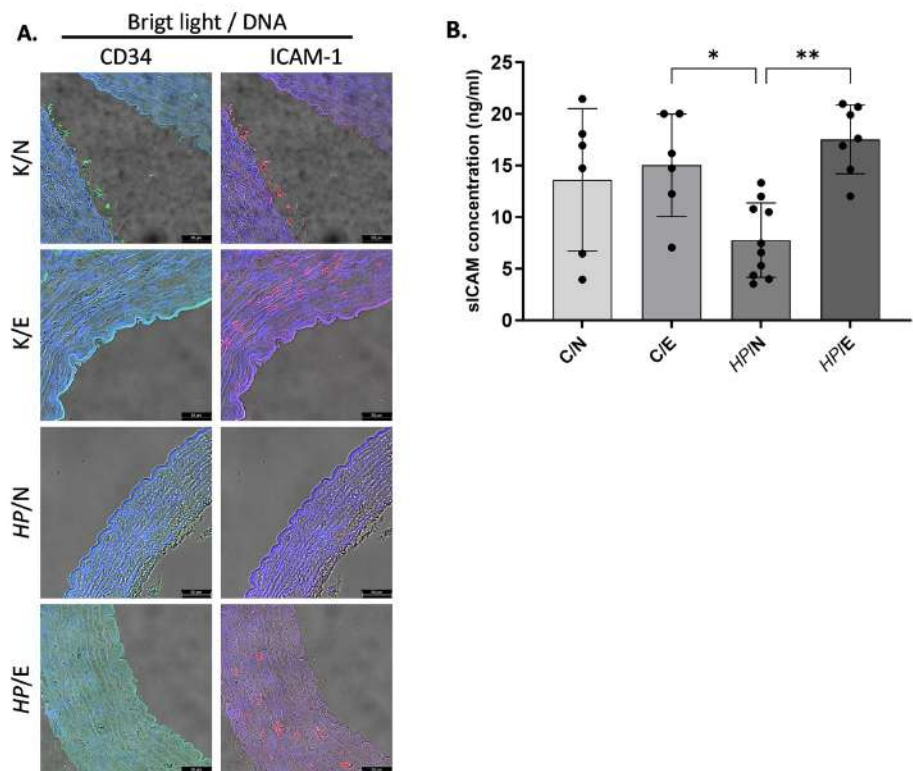


Figure 8. Evaluation of the expression of ICAM-1 molecule: surface or soluble in animals fed a normal or fat-enriched experimental diet and/or inoculated with *HP*. Animals: uninfected (C-control) with *HP* (*H. pylori*) on a normal (N) diet (C/N), uninfected (C-control) on a high-fat experimental (E) diet (C/E), infected with *HP* on a normal diet (HP/N), infected with *HP* on a high-fat experimental diet (HP/E) after 60 days of exposure. (A) Representative pictures of intracellular adhesive molecule -1 (ICAM-1) expression in aortic tissues. (B) Concentration of soluble ICAM-1 (sICAM-1) in animals' serum. Results are presented as the mean values $\pm$ SD. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's multiple comparisons test. * $p=0.0332$, ** $p=0.0021$; ICAM-1-(excitation 590 nm, emission 618 nm) red; cluster of differentiation CD34—(excitation 495 nm, emission 519 nm) marker of endothelial cells, green.

those fed a fat-enriched diet was less significant than that observed in samples obtained from animals maintained on a normal diet (Fig. 8A). We used the level of soluble ICAM-1 (sICAM-1) detected in serum samples from uninfected animals fed a standard diet as a control (Fig. 8B).

The amount of sICAM-1 in the serum samples of animals fed with fat-enriched food, both infected and non-infected with *HP*, was similar to that of the control group. However, it is worth noting that the level of sICAM-1 in serum samples of *HP*-infected animals that were fed with standard feed was the lowest compared to the other experimental groups (as shown in Fig. 8B).

Discussion

Atherosclerosis is a disease that affects the entire body and is caused by inflammation. It can be caused by various factors, including genetics, diet, and lifestyle. However, the role of microbial factors in inducing chronic inflammation is extremely important and cannot be ignored^{4,7,38}. Studies show that *HP* infection is very common in patients with CVD and is associated with increased levels of anti-*H. pylori* IgG and anti-*H. pylori* IgA, which indicates chronic exposure to these bacteria^{9–11}.

In this study, we found that *Cavia porcellus* infected with *HP* showed an increase in the number of splenic germinal centers. This suggests that a specific humoral response to *HP* antigens develops in infected animals. In *HP*-infected CVD patients, the humoral response is even higher than in non-CVD patients with *HP*-associated gastritis. This may indicate that the maturation and increasing number of germinal centers during *HP* infection is linked to an increased humoral response^{10,39}.

Soluble components of *Helicobacter pylori* (*HP*), such as lipopolysaccharide (LPS), have been found to induce oxidative stress in vascular endothelial cells. This can lead to increased cell apoptosis, cell lysis, or proatherogenic inflammation^{6,8,12}. According to Krupa et al. (2021), *HP* antigens and 7KCh antigens promote endothelial cell apoptosis through an extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent signaling pathway¹⁴. The inflammatory response associated with *HP* infection provides an ideal environment for lipid oxidation, which drives atherogenesis. Our previous results showed that *HP* and dietary components acted synergistically in the development of an early proatherogenic endothelial milieu¹⁴. In an experimental model of *Cavia porcellus*, chronic *HP* infection and exposure to a high-fat experimental diet promoted the transformation of macrophages into foam cells¹⁴. Studies have shown that during *HP* infection, the levels of cholesterol in the body increase. However, after eradicating the infection, the cholesterol levels return to normal state. *HP* can absorb cholesterol into the cell membrane or modify cholesterol in gastric tissue to avoid an inflammatory response¹⁸.

Currently, to diagnose patients with a higher risk of atherosclerosis, metabolic syndrome is diagnosed in patients with obesity, hypertension, elevated triglycerides, cholesterol, low level of high density lipoprotein (HDL), high fasting glucose, or type 2 diabetes⁴⁰. It has been suggested that patients with atherosclerosis and high LDL levels may be related to metabolic syndrome^{40,41}.

In our study, we observed that serum LDL levels in animals exposed to the high-fat diet were significantly higher than in animals fed a normal diet, and the increase in LDL levels was time-dependent (higher after 120 days). Moreover, we found that the increase in serum LDL levels was consistently higher in animals fed a fat-enriched diet and infected with *HP* after 120 days (Fig. 2). Interestingly, *HP* infection alone did not significantly increase LDL levels; thus, diet was the key factor affecting serum LDL levels in the animals studied.

A study conducted by Haeri and his colleagues in 2018 revealed that the lipid profile in individuals infected with *HP* can change during infection. However, the study found that only LDL levels significantly increased in men⁴². Interestingly, a mouse model showed a direct correlation between *HP* infection and elevated LDL levels⁴³, which is consistent with the results obtained in the *Cavia porcellus* model. The data indicated that animals exposed to a fat-enriched diet and infected with *HP* had higher serum LDL levels compared to uninfected animals or those fed a standard diet. These results prompted us to look for a possible link between *HP* infection combined with increased fat intake and arterial or systemic abnormalities in the *Cavia porcellus* model that might promote the development of atherosclerosis.

LDL is a form of cholesterol in the body that is not proatherogenic, however, when it becomes oxidized (ox-LDL), it can stick to the walls of blood vessels, disrupt the function of the cells lining the vessels, and cause inflammation²⁴. This happens when ox-LDL interacts with a receptor called LOX-1 on the cells lining the vessels. This interaction triggers a process that produces harmful molecules called reactive oxygen species, which cause damage to cells and can lead to inflammation. One such molecule is 4HNE. At high concentrations, this molecule can cause cell damage or cell death⁴⁴. Our study found that animals infected with *HP* and exposed to high-fat food had ox-LDL deposition in their aortic tissue. This deposition was accompanied by increased levels of 4HNE in the same tissue, as well as higher rates of apoptosis in aortic endothelial cells. This process weakens the vascular endothelial barrier, potentially leading to the progression of atherosclerosis by allowing lipoprotein particles to accumulate inside the vasculature. Ultimately, this can cause even stronger lipid oxidation and deposition, as shown in previous research⁴⁵.

Guinea pigs are a reliable model for studying lipid metabolism and the onset of atherosclerosis induced by a high-fat diet. This is because fatty streaks and atherosclerotic plaques can develop over weeks to months, as shown in a study by Bernick et al. in 1962. The elasticity of the aortic wall in guinea pigs, as in humans, depends on its architecture, which in turn affects systolic pressure⁴⁶. Guinea pigs and other rodent models are becoming increasingly popular for studying the development of arterial stiffness and foam cell formation that occur in atherosclerosis^{47–49}. Our data shown in Fig. 6 suggest, that even without a high-fat diet, soluble bacterial components of *HP* can cause the increase of arterial stiffness. We have previously demonstrated that this could potentially be attributed to the deposition of immune complexes⁵⁰. Also, the studies conducted by Laurilla et al.⁵¹, Satoh et al.⁵² and Vahdat et al.⁵³ suggest a significant association between *HP* infection and LDL hypercholesterolemia, HDL hypocholesterolemia, and elevated C reactive protein (CRP) levels. These studies also indicate

that chronic infection may have an impact on lipid metabolism, which can increase the risk of CVD. According to Abkas et al. 2010, individuals infected with *HP* have lower serum paraoxonase-1 activity, which is a major anti-atherosclerotic component of HDL, and higher carotid intima-media thickness, which is one of the surrogate markers of atherosclerosis¹⁸.

The metabolic syndrome can result in cardiovascular disorders, as well as liver disorders known as MASLD. This syndrome is characterized by the buildup of triglycerides in liver cells and the resulting damage, which is similar to that seen in cases of alcohol abuse. However, it is important to note that most patients with the hepatic manifestation of CVD do not abuse alcohol. There are two variants of the disease—simple metabolic dysfunction-associated steatotic liver (MASL) and metabolic dysfunction-related steatohepatitis (MASH). The former is characterized by the accumulation of fat in the liver cells, while the latter is characterized by ballooning and inflammation of liver cells. If left untreated, MASH can lead to liver fibrosis and eventually cirrhosis^{54–56}. There is a suggestion that hepatic steatosis can be a useful marker for evaluating early atherosclerotic lesions or vice versa. This is because both diseases share numerous risk factors⁵⁷.

There is some evidence suggesting that *HP* may contribute to the progression of MASLD^{58–60}. Pirouz et al.⁵⁹ demonstrated the presence of *HP* DNA in the liver tissue of patients with MASLD. Additionally, Polyzos et al.⁶⁰ detected higher levels of anti-*HP* IgG in patients with MASLD than in those without the condition, indicating a potential association between *HP* and MASLD.

Our study revealed a strong and significant correlation between a high-fat diet, *HP* infection, and the occurrence of hepatic steatosis in *Cavia porcellus*. This condition can be considered as the development of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD). In addition, we observed balloon-shaped hepatocytes in liver sections of *HP/E* animals, which may suggest a slow development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). However, we cannot confirm this definitively due to the lack of evidence of lobular inflammation.

Our findings are in agreement with He et al.'s⁴³ data. The authors conducted a study on mice and demonstrated that the combination of a high-fat diet and *HP* infection can impact the progression of steatohepatitis. They noted that either infection alone or exposure to a high-fat diet alone did not have a significant impact on hepatic steatosis and the development of MASLD⁴³.

ICAM-1 is a glycoprotein that is present on the surface of cells and acts as an adhesion receptor. Its primary function is to regulate the recruitment of leukocytes from the bloodstream to areas of inflammation in the endothelial cells. However, adhesion molecules, such as ICAM-1, are also essential for maintaining endothelial integrity and promoting tissue repair. They do so by facilitating endothelial cell migration, which leads to wound closure and neovascularization⁶¹. In 2004, Kevil et al. conducted a study on ICAM-1 and its role in regulating endothelial cell motility, which is crucial for the regeneration of endothelial tissue. The study found that ICAM-1-deficient cells exhibited impaired total endothelial cell movement and directional migration. This was associated with reduced phosphorylation of AktThr308 and endothelial nitric oxide synthase Ser1177, as well as lower nitric oxide (NO) bioavailability, which contributed to the motility defect⁶². Studies have demonstrated that when the distribution of ICAM-1 in the endothelium is impaired, it can lead to increased vascular leakage during leukocyte transmigration. This can have potential local and systemic consequences⁶³. In addition, when there is a loss of endothelial ICAM-1, wound repair can be impeded due to reduced infiltration of neutrophils and macrophages into the injured area⁶⁴.

In this study, we investigated the impact of high-fat uptake and/or *HP* infection on ICAM-1 expression in arteries, given its crucial role in inflammation. Our findings suggest that chronic *HP* infection alone in *Cavia porcellus* can result in decreased ICAM-1 expression in arteries. We have determined that the observed reduction in ICAM-1 expression in arteries is unlikely due to an endothelial ICAM-1 shedding effect. This is because the levels of systemic sICAM-1, as measured in serum samples, were not increased in animals that were treated with normal feed and inoculated with *HP*, as compared to uninfected animals that received normal feed. It was also noticed that animals that were fed fat-enriched food and exposed to *HP* exhibited a trend towards reduced ICAM-1 expression in arteries when compared to uninfected animals that received only fat-enriched chow.

One limitation of this study is that it cannot provide further explanation for a potential mechanism driven by *HP* that leads to reduced deposition of endothelial ICAM-1. *HP* has various surface components that bind sialic acid or heparan sulphate^{65,66}. These components are a part of the endothelial cell glycocalyx, which protects the vascular endothelium and prevents the progression of atherosclerosis-related disorders⁶⁷. There is a possibility that soluble *HP* surface components with such specificity may play a role, but additional studies are required to test this hypothesis.

Our study concludes that the combination of two risk factors: infectious (*HP* infection) and dietary (high-fat diet) may lead to the development of metabolic syndrome, which can cause hepatic steatosis and potentially escalate to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. These findings suggest that *HP* eradication in *HP*-positive individuals could help in the treatment of CVD patients by reducing the risk of atherosclerosis progression by controlling the cascade of events leading to the development and progression of metabolic syndrome. Moreover, *HP* eradication could potentially enable the restoration of ICAM-1-dependent mechanisms of endothelial regeneration in light of *HP*-related increases in oxidative stress and apoptosis.

Materials and methods

Animal study

All studies involving animals were approved by the Local Ethics Committee (LKE9) for Animal Experiments of the Medical University of Lodz, Poland, which was established by the Ministry of Science and Higher Education in Poland (58/LB45/2016; 44/LB105/2018). Ethics Statement: in vivo experiments were developed according to the EU directive (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33–79)). Adult Himalayan

Cavia porcellus (350–600 g), free of pathogens, were bred in the Animal House at the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz (Lodz, Poland), kept in cages with free access to drinking water and fed with normal chow or experimental diet (high-fat food). Normal chow for animals contained: proteins (24%), fat (3%), ash (8%), and fiber (10%), together with some nutritional additives, such as Vitamin A, Vitamin D3, Vitamin E, copper, calcium, sodium, phosphorus, threonine, methionine with cysteine and lysine (Agropol, Motycz, Poland). High-fat food contained: fat (19.5%), sucrose (15%), and cholesterol (0.35%) (Vivari, Warszawa, Poland). Animals were inoculated *per os* with *Helicobacter pylori* (HP), reference strain CCUG 17874 (Culture Collection University of Gothenburg, Sweden), positive for vacuolating cytotoxin (VacA) and cytotoxin associated gene A (CagA) antigen, which was cultured under microaerophilic conditions or with *Brucella* broth with addition of 10% fetal bovine serum (FBS) (control animals), as previously described^{14,68}. Animals were randomly divided into 4 groups (three to five animals per group): C/N (control uninfected/normal diet); C/E (control uninfected/experimental diet); HP/N (HP infected/normal diet) and HP/E (HP infected/experimental diet). The feeding of animals intended for HP inoculation was discontinued 24 h before the beginning of the experimental procedure, with constant access of animals to drinking water. The control animals – uninfected received 1 mL of 0.2 N NaHCO₃ by oral route (without anesthesia), and then, after 5 min, 1 mL of *Brucella* broth with FBS (without anesthesia). The procedure was repeated three times at two-day intervals. Animals infected with HP received 1 mL of 0.2 N NaHCO₃ orally (without anesthesia), and then after 5 min, 1 mL of the HP suspension 1×10^{10} CFU/mL (without anesthesia). The inoculation procedure was repeated 3 times at two-day intervals. Animals were monitored daily (body weight, water, and food intake, behavioral symptoms, skin and fur condition, diarrhea), then on days 60 and 120 were euthanized with an overdose of sodium barbiturate (Morbital, Biowet, Pulawy, Poland). Blood samples were proceeded to obtain serum, whereas spleen, liver, and aortal tissue were preserved to perform histopathology. HP infection in the animals was confirmed by the presence of *Helicobacter*-like organisms (HLO) in gastric tissue specimens stained with Mayer hematoxylin and eosin as well as assessment of accompanied local inflammation and the production of anti-HP antibodies as routinely done in our laboratory^{14,68}. The amount of HLO was graded as: (+++), (++), (+), where + means mild level of colonization/bacteria not detected in every gastric crypt; ++ means moderate level of colonization/bacteria detected in the majority of crypts present; +++ means severe level of colonization/bacteria present in all gastric crypts⁶⁸. The inflammatory reaction was evaluated according to the Sydney system criteria used for histological examination of gastric tissue samples. Fresh tissue specimens were evaluated for urease activity and the isolates were also assessed for the activity of catalase and oxidase. In serum samples the level of anti-HP antibodies was assessed by the laboratory enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the complex of HP antigens called a glycine acid extract (GE)³⁹.

Currently in guinea pigs under the study, we also determined the systemic activation of the peripheral immune system, 7 or 28 days from inoculation, by evaluation of the size of spleen germinal centers, which may correlate with activation of innate immune cells, upregulation of inflammation and development of the humoral and cellular adaptive immune response. For this purpose, the thin layer cross-sections of paraffin-embedded aortic tissue after deparaffinization were stained with hematoxylin and eosin or immunohistochemically to visualize surface molecule B220/CD45R, which is a marker characteristic of differentiating B lymphocytes. To assess the presence of B220 in spleen sections, the tissue sections were incubated overnight with primary anti-B220/CD45R antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (dilution 1:500; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and then cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, St. Louis, Michigan, USA) for 15 min. After staining spleen sections were imaged using a confocal microscope (Leica SP8, Wetzlar, Germany).

LDL and soluble ICAM-1 concentration in animal serum samples

The concentration of LDL was measured in animal serum samples with commercial HDL and LDL/VLDL Quantitation Kit according to the manufacturer's protocol (detection range: 2–10 µg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, Michigan, USA). The concentration of soluble ICAM-1 (sICAM-1) was measured in animal serum samples using commercial Guinea pig sICAM-1/CD54 ELISA Kit assay as recommended by the manufacturer (detection range: 0.313–20 ng/ml; sensitivity min: 0.188 ng/ml, max: 20 ng/ml; MyBioSource, San Diego, California, USA).

Immunofluorescence for detection of deposition of oxidized LDL, lipid peroxidation, apoptosis, and ICAM-1 exposure in aortic tissue

The thin layer cross-sections of paraffin-embedded aortic tissue were deparaffinized, then incubated with 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Michigan, USA) in phosphate-buffered saline (PBS)—BSA/PBS, for 30 min at room temperature, to block unspecific binding. To detect deposition of oxidized LDL on aortic tissue, sections were incubated with primary mouse antibodies anti-oxidized LDL (dilution 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), followed by incubation with secondary fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (dilution 1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Lipid peroxidation in aortic tissue was assessed by the detection of 4-hydroxy-2-nonenal (4HNE). For this purpose, sections were incubated with FITC conjugated primary mouse anti-4-HNE antibodies, diluted 1:500, and then with Alexa Fluor 594 conjugated mouse anti-CD34 antibodies diluted 1:500 (marker of endothelial cells, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). To visualize cell nuclei sections were incubated with DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Michigan, USA), as previously described⁶⁹. Stained tissue sections were imaged using a fluorescent microscope (Zeiss, Axio Scope, A1, Jena, Germany) at appropriate wavelengths: FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm), Alexa Fluor 594 (excitation 590 nm, emission 618 nm), and DAPI (excitation 358 nm, emission 461 nm). To detect cells undergoing apoptosis, aortic tissue sections were stained with commercially available enzyme terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick labelling (TUNEL) assay (Cat. Number

C10617; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's manual. Stained sections were visualized in a confocal microscope (Leica SP8, Wetzlar, Germany). Fluorescence intensity was measured using ImageJ v1.54 g software (<https://imagej.net/ij/index.html>). To show the endothelial expression of intracellular adhesion molecule -1 (ICAM-1) sections were stained with primary rabbit antibodies anti-ICAM-1 (dilution 1:500, Biorbyt, Cambridge, UK), followed by staining with secondary goat anti-rabbit IgG antibodies conjugated with Alexa Fluor 594 (dilution 1:2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and with primary mouse anti-CD34 antibodies (dilution 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), then with secondary goat anti-mouse IgG antibodies (dilution 1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cell nuclei were stained with DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Michigan, USA). Stained tissues were visualized using a confocal microscope (Leica SP8, Wetzlar, Germany) at appropriate wavelengths: FITC (excitation 495 nm, emission 519 nm), Alexa Fluor 594 (excitation 590 nm, emission 618 nm) and DAPI (excitation 358 nm, emission 461 nm).

Measurement of artery stiffness

In vivo, vascular stiffness was determined in all animals included in the study by photoplethysmography (Indus Instruments, Houston, TX, USA) at the location of the right hind limb artery (after 120 days of the experiment), as previously described in Krupa et al.¹⁴. Briefly, animals were laid supine on a temperature-controlled plate (THM100, Indus Instruments) and maintained under anesthesia (1% isoflurane) during the procedure. Once the heart rate was stabilized, the amplitudes were measured. The test lasted at least 15–20 s, and at least 20 waves were recorded during this time, but only representative amplitude values were selected to calculate average amplitude (AU) values. Based on the average amplitude values, a score was developed that ranged from 1 to 3; where 1—amplitude values lower than 1.5 AU, 2—amplitude values between 1.5–2 AU, and 3—amplitude values between 2 and 3 AU.

Liver histopathology

The liver was sliced with a cryotome (Leica CM1950 Biosystems, Wetzlar, Germany), stained with hematoxylin and eosin, and subjected to histopathological analysis by certified histopathologist (Cytopath, Lodz, Poland). The degree of liver steatosis was evaluated according to a scoring system developed by Kleiner et al.³⁶, and was based on five parameters: steatosis grade and location of steatosis/presence of fat droplets, fibrosis, lobular inflammation, and presence of ballooned cells. Additionally, the histopathological evaluation was expanded with the size of steatosis droplets within the organ, of which small-droplet or large-droplet steatosis was distinguished. The scores ranged from 0 to 3, except for the fibrosis category for which they ranged from 0 to 4. The parameters for the hepatic manifestation of the metabolic syndrome, as well as the rules for their evaluation, are shown in Table 1. Each category was evaluated and scored separately.

Scanning electron microscopy (SEM) of liver tissue sections

SEM analysis was performed as described in Rajathi et al. 2022 with minor modifications⁷⁰. Briefly, guinea pig liver tissues were cut into 0.5–1 mm thick slices and then fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer

Category	Score	Extent
Steatosis grade	0	< 5%
	1	5–33%
	2	33–66%
	3	> 66%
Steatosis localization	0	Zone 3 *
	1	Zone 1 **
	2	Azonal
	3	Panacinar
Hepatocyte ballooning	0	None
	1	Few balloon cells
	2	Many balloon cells
Fibrosis	0	None
	1	Perisinusoidal or periportal
	2	Perisinusoidal and portal/periportal
	3	Bridging fibrosis
	4	Cirrhosis
Lobular inflammation	0	No foci
	1	< 2 foci/200x
	2	2–4 foci/200x
	3	> 4 foci/200x

Table 1. Parameters of hepatic manifestation of metabolic syndrome. *Zone 3—hepatocytes encircled portal tracts. **Zone 1—hepatocytes located around the central veins.

for 1 h, then washed and treated with 1% osmium tetroxide for 1 h. The tissues were then dehydrated using an ethanol series (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 99.6%). Dehydrated tissues were dried using a Leica EM CPD300 critical point dryer (Leica Microsystems GmbH, Vienna, Austria). Liver sections were mounted using carbon adhesive tabs and imaged using a Phenom ProX scanning electron microscope (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Statistical analysis

All graphs were performed using GraphPad Prism 10.1.2(324) software (<https://www.graphpad.com/features>) and values were expressed as the mean values with standard deviation apart from artery stiffness measurement presented as the mean values with standard error of the mean. The Shapiro–Wilk test was used to assess the Gaussian distribution. The Brown–Forsythe test was used to verify the equality of group variances. For two- and three- way ANOVA analysis, Spearman's test for heteroscedasticity was used. Data of oxLDL deposition were log transformed before analysis to attain heteroscedasticity of residuals. The individual tests are described below the figures. In the case of all statistical analysis performed, alpha was set to 0.05.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Received: 8 January 2024; Accepted: 5 March 2024

Published online: 08 March 2024

References

- Wilkins, E. *et al.* European cardiovascular disease statistics 2017 Edition. <http://www.ehnheart.org/images/CVD-statistics-report-August-2017.pdf> (2017).
- Borén, J. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* **41**, 2313–2330 (2020).
- Carnevale, R. *et al.* Localization of lipopolysaccharide from *Escherichia Coli* into human atherosclerotic plaque. *Sci Rep* **8**, 3598 (2018).
- Lawson, J. S. Multiple infectious agents and the origins of atherosclerotic coronary artery disease. *Front Cardiovasc. Med.* **3** (2016).
- Moludi, J., Maleki, V., Jafari-Vayghyan, H., Vaghef-Mehrabany, E. & Alizadeh, M. Metabolic endotoxemia and cardiovascular disease: A systematic review about potential roles of prebiotics and probiotics. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **47**, 927–939 (2020).
- Akbas, H. S. *et al.* The assessment of carotid intima media thickness and serum Paraoxonase-1 activity in Helicobacter pylori positive subjects. *Lipids Health Dis* **9**, 92 (2010).
- Chmiela, M., Gajewski, A. & Rudnicka, K. *Helicobacter pylori* vs coronary heart disease—searching for connections. *World J Cardiol* **7**, 187 (2015).
- Gajewski, A. L. *et al.* Accumulation of deleterious effects in gastric epithelial cells and vascular endothelial cells in vitro in the milieu of helicobacter pylori components, 7-ketocholesterol and acetylsalicylic acid. *Int J Mol Sci* **23**, 6355 (2022).
- Longo-Mbenza, B. *et al.* Helicobacter pylori infection is identified as a cardiovascular risk factor in Central Africans. *Vasc Health Risk Manag* **8**, 455–461 (2012).
- Matusiak, A. *et al.* Putative consequences of exposure to helicobacter pylori infection in patients with coronary heart disease in terms of humoral immune response and inflammation. *Arch. Med. Sci.* **12**, 45–54 (2016).
- Mendall, M. A. *et al.* Relation of helicobacter pylori infection and coronary heart disease. *Heart* **71**, 437–439 (1994).
- Mladenova, I. Helicobacter pylori and cardiovascular disease: update 2019. *Minerva Cardioangiol* **67** (2019).
- Tsay, E.-W. & Hsu, P.-I.H. Pylori infection and extra-gastrointestinal diseases. *J Biomed Sci* **25**, 65 (2018).
- Krupa, A. *et al.* Helicobacter pylori infection acts synergistically with a high-fat diet in the development of a proinflammatory and potentially proatherogenic endothelial cell environment in an experimental model. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021).
- Gonciarz, W. *et al.* The effect of Helicobacter pylori infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One* **14**, e0220636 (2019).
- Mnich, E. *et al.* Impact of helicobacter pylori on the healing process of the gastric barrier. *World J Gastroenterol* **22**, 7536–7558 (2016).
- Marchio, P. *et al.* Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 1–32 (2019).
- Adachi, K. *et al.* Effects of Helicobacter pylori eradication on serum lipid levels. *J. Clin. Biochem. Nutr* **62**, 264–269 (2018).
- Shimomura, H., Hosoda, K. & Hirai, Y. Interaction of *Helicobacter pylori* cell membrane with non-esterified cholesterol and other steroids. *Open J Med Microbiol* **03**, 70–79 (2013).
- Morey, P. *et al.* Helicobacter pylori depletes cholesterol in gastric glands to prevent interferon gamma signaling and escape the inflammatory response. *Gastroenterology* **154**, 1391–1404.e9 (2018).
- Gonciarz, W. *et al.* Antibodies towards TVLLPVIFF amino acid sequence of TNF receptor induced by helicobacter pylori in patients with coronary heart disease. *J Clin Med* **11**, 2545 (2022).
- Kobiyama, K. & Ley, K. Atherosclerosis: A chronic inflammatory disease with an autoimmune component. *Circ Res* **123**, 1118–1120 (2018).
- Mundi, S. *et al.* Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors: A review. *Cardiovasc Res* **114**, 35–52 (2018).
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Dousti, M., Baradaran, A. & Nasri, H. Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* **5**, 927–946 (2014).
- Pothineni, N. V. K. *et al.* LOX-1 in atherosclerosis and myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* **69**, 2759–2768 (2017).
- Kutuk, O. & Basaga, H. Inflammation meets oxidation: NF- κ B as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med* **9**, 549–557 (2003).
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N.R.-D. & Huang, P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1343–1374 (2008).
- Kasper, P. *et al.* NAFLD and cardiovascular diseases: A clinical review. *Clin. Res. Cardiol.* **110**, 921–937 (2021).
- Wilson, P. W. F., D'Agostino, R. B., Parise, H., Sullivan, L. & Meigs, J. B. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **112**, 3066–3072 (2005).
- Brown, G. T. & Kleiner, D. E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* **65**, 1080–1086 (2016).

31. Ciardullo, S., Vergani, M. & Perseghin, G. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: screening, diagnosis, and treatment. *J Clin Med* **12**, 5597 (2023).
32. Chan, W. K. *et al.* Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD): A state-of-the-art review. *J. Obesity Metab. Syndromes* **32**, 197–213 (2023).
33. Gisterå, A., Ketelhuth, D. F. J., Malin, S. G. & Hansson, G. K. Animal models of atherosclerosis—supportive notes and tricks of the trade. *Circ Res* **130**, 1869–1887 (2022).
34. Okura, Y. *et al.* Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* **102**, 2680–2686 (2000).
35. Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S. & Mehta, J. L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis* **11**, 215–225 (2017).
36. Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–1321 (2005).
37. Wisse, E. *et al.* Fat causes necrosis and inflammation in parenchymal cells in human steatotic liver. *Histochemistry and cell biology* **157**, 27–38 (2022).
38. Rosenfeld, M. E. & Campbell, L. A. Pathogens and atherosclerosis: Update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* **106**, 858–867 (2011).
39. Rechciński, T., Chmiela, M., Matecka-Panas, E., Planeta-Malecka, I. & Rudnicka, W. Serological Indicators of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients and healthy blood donors. *Microbiol Immunol* **41**, 387–393 (1997).
40. Paoletti, R., Bolego, C., Poli, A. & Cignarella, A. Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* **2**, 145–152 (2006).
41. Blaton, V. How is the metabolic syndrome related to the dyslipidemia? *EJIFCC* **18**, 15–22 (2007).
42. Haeri, M., Parham, M., Habibi, N. & Vafaieimanes, J. Effect of helicobacter pylori infection on serum lipid profile. *J Lipids* **2018**, 1–5 (2018).
43. He, C. *et al.* Helicobacter pylori infection aggravates diet-induced nonalcoholic fatty liver in mice. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **42**, 360–367 (2018).
44. Nègre-Salvayre, A. *et al.* Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* **111**, 127–139 (2017).
45. Jiang, H. *et al.* Mechanisms of oxidized LDL-mediated endothelial dysfunction and its consequences for the development of atherosclerosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **9** (2022).
46. De Mello, W. C. Angiotensin (1–7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion: The role of the sodium pump. *J. Renin-angiotensin-aldosterone Syst.: JRAAS* **5**, 203–208 (2004).
47. deOgburn, R. *et al.* Effects of increased dietary cholesterol with carbohydrate restriction on hepatic lipid metabolism in Guinea pigs. *Comp. Med.* **62**, 109–115 (2012).
48. Ye, P., Cheah, I. K., & Halliwell, B. A high-fat and cholesterol diet causes fatty liver in guinea pigs: The role of iron and oxidative damage. *Free Radical Res.* **47**, 602–613 (2013).
49. Morgan, E. E., Casabianca, A. B., Khouri, S. J. & Kalinoski, A. L. In vivo assessment of arterial stiffness in the isoflurane anesthetized spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc. Ultrasound* **12**, 37 (2014).
50. Grebowska, A. *et al.* Potential role of LPS in the outcome of Helicobacter pylori related diseases. *Polish J. Microbiol.* **55**, 25–30 (2006).
51. Laurila, A. *et al.* Association of Helicobacter pylori infection with elevated serum lipids. *Atherosclerosis* **142**, 207–210 (1999).
52. Satoh, H., Saijo, Y., Yoshioka, E. & Tsutsui, H. Helicobacter Pylori infection is a significant risk for modified lipid profile in Japanese male subjects. *J. Atherosclerosis Thromb.* **17**, 1041–1048 (2010).
53. Vahdat, K., Jafari, S. M., Pazoki, R. & Nabipour, I. Concurrent increased high sensitivity C-reactive protein and chronic infections are associated with coronary artery disease: a population-based study. *Indian J. Med. Sci.* **61**, 135–143 (2007).
54. Day, C. P., Saksena, S. Non-alcoholic steatohepatitis: Definitions and pathogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17** (2002).
55. Pacifico, L. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and carotid atherosclerosis in children. *Pediatr Res* **63**, 423–427 (2008).
56. Paternostro, R. & Trauner, M. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Intern Med* **292**, 190–204 (2022).
57. Pais, R., Redheuil, A., Cluzel, P., Ratzu, V. & Giral, P. Relationship among fatty liver, specific and multiple-site atherosclerosis, and 10-year framingham score. *1453 Hepatology* **69**, 1453–1463 (2019).
58. Kim, T. J. *et al.* A cohort study on Helicobacter pylori infection associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* **52**, 1201–1210 (2017).
59. Pirouz, T., Zounubi, L., Keivani, H., Rakhshani, N. & Hormazdi, M. Detection of helicobacter pylori in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. *Dig Dis Sci* **54**, 1456–1459 (2009).
60. Polyzos, S. A. *et al.* Helicobacter pylori infection in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **62**, 121–126 (2013).
61. Bui, T. M., Wiesolek, H. L. & Sumagin, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol* **108**, 787–799 (2020).
62. Kevil, C. G. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 19230–19238 (2004).
63. Grönloh, M. L. B. *et al.* Endothelial transmigration hotspots limit vascular leakage through heterogeneous expression of ICAM-1. *EMBO Rep.* **24**, (2023).
64. Nagaoka, T. *et al.* Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *Am J Pathol* **157**, 237–247 (2000).
65. Chmiela, M. *et al.* Attachment of Helicobacter pylori strains to human epithelial cells. *J Physiol Pharmacol* **48**, 393–404 (1997).
66. Hirno, S., Utt, M., Ringner, M. & Wadström, T. Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycans binding to Helicobacter pylori by various polysulphated carbohydrates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **10**, 301–306 (1995).
67. Banerjee, S., Mwangi, J. G., Stanley, T. K., Mitra, R. & Ebong, E. E. Regeneration and assessment of the endothelial glycocalyx to address cardiovascular disease. *Ind Eng Chem Res* **60**, 17328–17347 (2021).
68. Walencka, M. *et al.* The microbiological, histological, immunological and molecular determinants of Helicobacter pylori infection in guinea pigs as a convenient animal model to study pathogenicity of these bacteria and the infection dependent immune response of the host. *Acta Biochim Pol* **62**, 697–706 (2015).
69. Gonciarz, W., Krupa, A., Moran, A. P., Tomaszewska, A. & Chmiela, M. Interference of LPS *H. pylori* with IL-33-driven regeneration of Cavia porcellus primary gastric epithelial cells and fibroblasts. *Cells* **10**, 1385 (2021).
70. Rajathi, S., Ramesh, G., Kannan, T. A., Dharani, P. & Gnanadevi, R. Liver in guinea pig: Scanning and transmission electron microscopic studies. *Microsc. Res. Tech.* **85**, 3391–3396 (2022).

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Lucja Balcerzak, Ph.D., and Magdalena Gapińska, Ph.D. from the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques at the Department of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, for their valuable assistance in preparing thin-layer liver samples

and conducting confocal microscopy. Special thanks to Piotr Józwiak, Ph.D. for his help with performing SEM on liver tissue for steatosis. The in vivo study is reported by ARRIVE guidelines.

Author contributions

All authors contributed to the study. Conceptualization: AK, MCh; methodology: AK, WG, AT; performance of in vivo experiments and collection of biological material: AT, WG, AK; data analysis: AT, AK, MCh; study of vascular stiffness—TR; expert opinion on endothelial dysfunction—AKK; writing the manuscript: AT, AK, MCh; All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

The research was funded by the University of Lodz Initiative for Excellence—Research University—Doctoral Research Grants project number 8/DGB/IDUB/2022.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.T. or A.K.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

6.2. Rola inflamasomu NLRP3 w transformacji makrofagów i rozwoju zmian promiażdżycowych indukowanych przez wybrane rozpuszczalne komponenty *H. pylori* i sterole (wyniki nieopublikowane)

Procesy zapalne związane z aktywacją komórek immunokompetentnych gospodarza odgrywają istotną rolę w patogenezie miażdżycy. Wyniki badań ostatnich lat wskazują na inflamasom NLRP3 jako wewnątrzkomórkowy kompleks białkowy uczestniczący w aktywacji makrofagów, promujący ich transformację w komórki piankowe oraz nasilający reakcję zapalną rozwijającą się w obrębie ściany naczyniowej. Hipoteza badawcza zakładała, że inflamasom NLRP3 może uczestniczyć w indukowaniu i nasilaniu zmian promiażdżycowych w naczyniach poprzez odpowiedź prozapalną makrofagów na rozpuszczalne komponenty *H. pylori* oraz utlenione sterole i ich transformację w komórki piankowe. W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki badań dotyczące aktywacji inflamasomu NLRP3 komórek linii monocytarno-makrofagowej *in vitro* po ekspozycji na komponenty *H. pylori* i/lub utlenione sterole. Ponadto zamieszczono wyniki badań wskazujące, że NLRP3 reguluje transformację makrofagów w komórki piankowe.

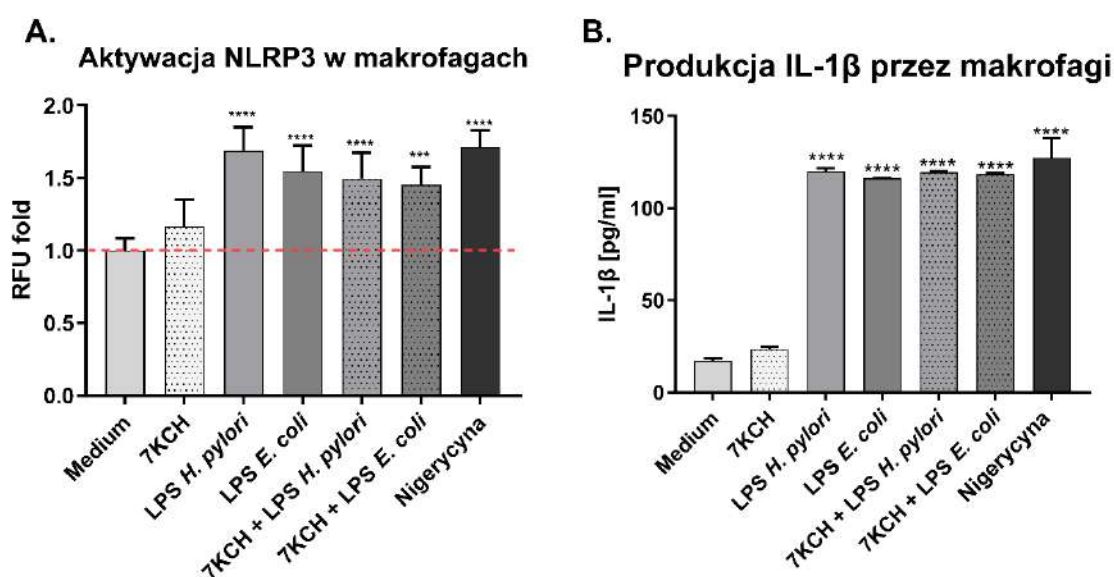
6.2.1. Aktywacja inflamasomu NLRP3 w makrofagach po ekspozycji na komponenty bakteryjne i oksydowane sterole

NLRP3 to wewnątrzkomórkowy kompleks aktywacyjny, który reaguje na szeroki zakres molekularnych sygnałów zagrożenia, pochodzących zarówno od drobnoustrojów, jak i z wnętrza komórki, a także na bodźce środowiskowe. W odpowiedzi na te czynniki dochodzi do aktywacji inflamasomu NLRP3, w którego skład wchodzi białko adaptorowe związane z apoptozą zawierające domenę rekrutującą kaspazę (ASC, ang. *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) oraz prokaspaza-1, a konsekwencją aktywacji jest konwersja pro-kaspazy-1 w jej aktywną formę, co umożliwia dojrzewanie i wydzielanie przez komórkę cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β i IL-18, które nasilają stan zapalny. Wskutek aktywacji NLRP3 może być inicjowana pyroptoza - zapalna forma śmierci komórki^{78,79}.

Wyniki badań dotyczących aktywacji inflamasomu NLRP3 zamieszczono na Rycinie 3A. Wykazano, że komponenty bakteryjne takie jak LPS *H. pylori* lub *E. coli* istotnie aktywowały inflamasom NLRP3, w stopniu porównywalnym do działania

nigerycyny, stosowanej w badaniach jako kontrola pozytywna aktywacji inflamasomu NLRP3. Utleniony sterol, taki jak 7-ketocholesterol (7KCH) słabo aktywowały NLRP3, jednak w hodowlach zawierających łącznie 7KCH i LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli* istotnie nasilały aktywację NLRP3 chociaż słabiej niż bakteryjny LPS.

Aktywację NLRP3 potwierdzono poprzez oznaczenie poziomu IL-1 β w podłożach pochodzących zebranych po stymulacji makrofagów linii THP-1 utlenionymi sterolami i/lub komponentami bakteryjnymi (Ryc.3B). Wykazano, że LPS bakterii, zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z utlenionymi sterolami, silnie stymulował wydzielanie IL-1 β , osiągając poziomy porównywalne do obserwowanych w hodowlach zawierających nigerycynę. Natomiast stymulacja makrofagów THP-1 samym 7KCH powodowała jedynie niewielki wzrost poziomu tej cytokiny, porównywalny z kontrolą negatywną, tj. komórkami niestymulowanymi (Ryc.3B).



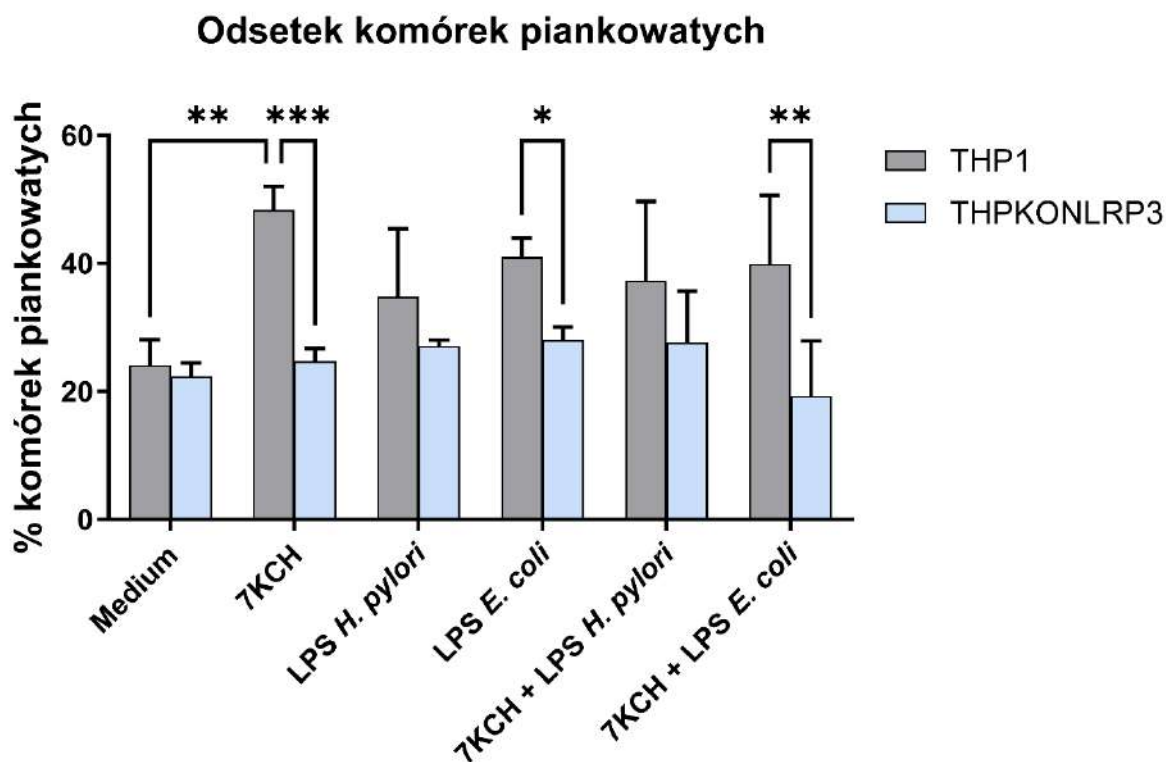
Ryc.3. Aktywacja szlaku NLRP3 w makrofagach THP-1 w wyniku ekspozycji na utlenione lipidy, czynniki zakaźne - LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli* lub nigerycynę, przedstawiona jako intensywność fluorescencji (RFU - relatywne jednostki fluorescencji) - **A**/; Stężenie IL-1 β wydzielonej przez makrofagi THP-1 stymulowane przez utlenione lipidy, LPS *H. pylori* oraz *E. coli* lub nigerycynę - **B**/; LPS – lipopolisacharyd, 7KCH – 7-ketocholesterol; *** $p < 0,0002$ **** $p < 0,0001$ Analiza statystyczna zmian w intensywności fluorescencji (RFU), oraz poziomu wydzielania IL-1 β wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA, z testem porównań wielokrotnych Dunnetta w celu porównania grup badanych do medium.

6.2.2. Inflamasom NLRP3 jako kluczowy element transformacji makrofagów w komórki piankowe

Komórki piankowe stanowią główny składnik blaszek miażdżycowych i są istotnym źródłem sygnałów zapalnych w obrębie śródbłónka naczyniowego. Zgodnie z doniesieniami naukowymi, mogą one powstawać zarówno z makrofagów, jak i komórek mięśni gładkich naczyń, w odpowiedzi na akumulację zmodyfikowanych lipoprotein, takich jak oxLDL⁸⁰. W badaniach wykonanych w ramach pracy doktorskiej skoncentrowano się na określeniu roli inflamasomu NLRP3 w powstawaniu komórek piankowatych, w populacji komórek monocytarno-makrofagowych.

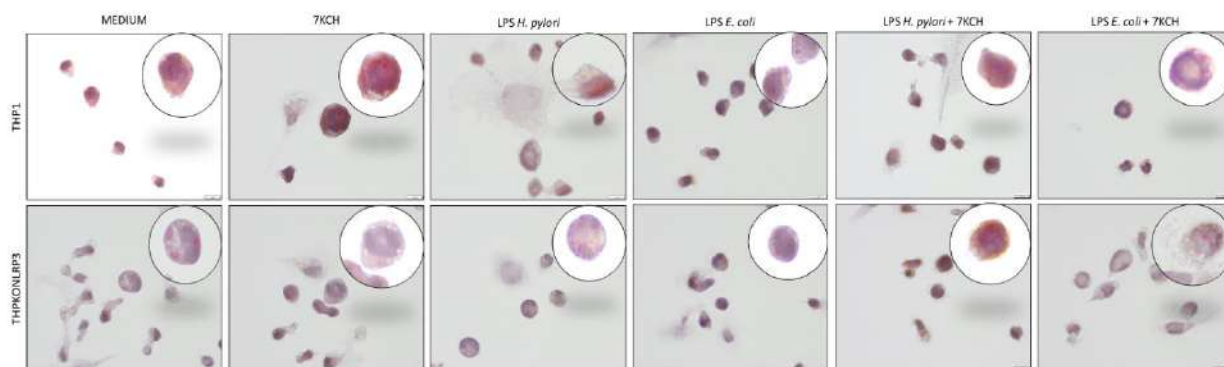
W doświadczeniach wykorzystano dwie linie komórkowe: linię monocytarno-makrofagową THP-1 z funkcjonalnym inflamasomem NLRP3 oraz komórki THPKONLRP3, wywodzące się z linii THP-1, pozbawione ekspresji genu *NLRP3*, poprzez usunięcie jego N-końcowego fragmentu, co skutkuje brakiem aktywnego inflamasomu. Komórki obu linii, różnicowano do makrofagów, a następnie przez 24 godziny stymulowano 7KCH, LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli*. Po zakończeniu stymulacji komórki utrwalono i wybarwiano czerwienią oleistą w celu wizualizacji oraz oszacowania liczby komórek piankowatych.

Otrzymane wyniki wykazały, że 7KCH oraz LPS *H. pylori* i *E. coli*, zarówno stosowane samodzielnie, jak i w połączeniu z 7KCH, indukowały transformację makrofagów linii THP1 w komórki piankowe. Największy odsetek komórek piankowatych zaobserwowano po stymulacji 7KCH (Ryc.4). W przypadku komórek z niefunkcyjnym genem *NLRP3*, efekt ten nie występował, a odsetek komórek piankowatych po stymulacji badanymi czynnikami pozostał na poziomie kontroli, którą stanowiły komórki ulegające samoistnej transformacji w komórki piankowe, w samym podłożu, wynoszącej 22%. Istotnie statystycznie obniżenie liczby komórek piankowatych wywodzących się z linii THPKONLRP3 w stosunku do komórek THP1 z funkcjonalnym inflamasomem NLRP3 odnotowano po stymulacji takich komórek: 7KCH (spadek o 23,7%), LPS *E. coli* (spadek o 12,9%) oraz jednocześnie 7KCH i LPS *E. coli* (spadek o 20,5%). Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że inflamasom NLRP3 odgrywa istotną rolę w procesie transformacji makrofagów w komórki piankowe wchodzące w skład blaszki miażdżycowej. Jego aktywacja może być wywoływana zarówno przez utlenione sterole, jak i bakteryjny LPS.



Ryc.4. Odsetek komórek piankowatych powstałych z makrofagów THP-1 lub THPKONLRP3 w wyniku ekspozycji na: 7-ketocholesterol (7KCH), lipopolisacharyd (LPS) *H. pylori* lub LPS *E. coli*; * $p < 0,0332$ ** $p < 0,0021$ *** $p < 0,0002$ Analiza statystyczna wykonana dwuczynnikowy testem ANOVA, z testem porównań wielokrotnych Tukeya, w celu porównania ze sobą grup badanych w obrębie jednej linii komórkowej, oraz pomiędzy liniami komórkowymi dla danego stymulatora.

Do wizualizacji komórek piankowatych zastosowano barwienie czerwienią oleistą oraz hematoksyliną. Makrofagi, które uległy transformacji w komórki piankowate, wykazywały obecność wyraźnie wybarwionych na czerwono kropli lipidowych w cytoplazmie. Na Ryc.5 przedstawiono reprezentatywne obrazy mikroskopowe makrofagów oraz wywodzących się z nich komórek piankowatych, wykonane dla komórek z każdego z badanych układów doświadczalnych. W komórkach linii THP1 zaobserwowano większą liczbę ciałek lipidowych w pojedynczej komórce. Natomiast w komórkach z niefunkcyjnym genem *NLRP3* (THPKONLRP3) ciałek lipidowych było mniej, często obecne były jako pojedyncze, drobne krople lipidowe.



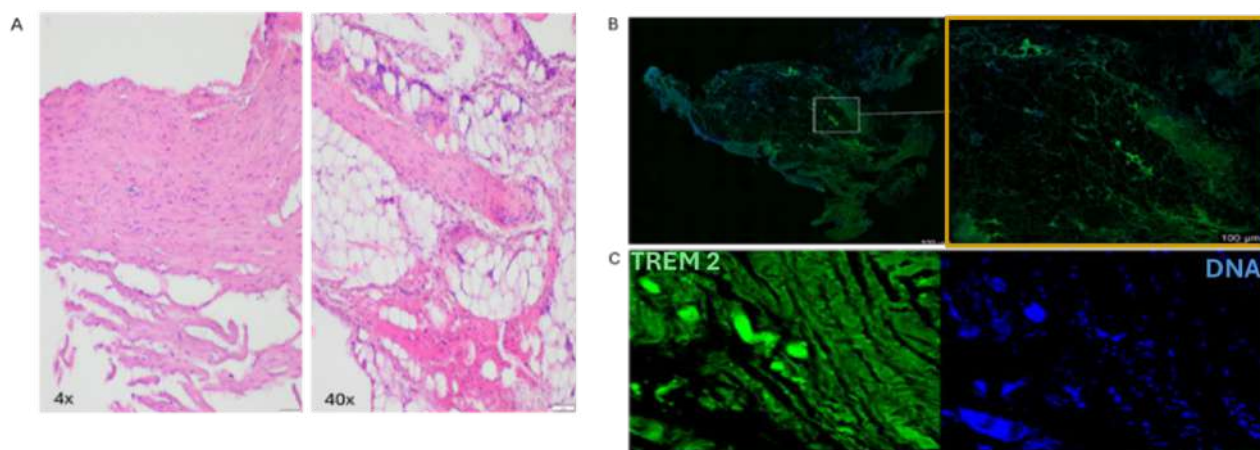
Ryc.5. Reprezentatywne zdjęcia makrofagów linii komórkowej THP1 i THAPKONLRP3 transformowanych w komórki piankowate po ekspozycji na: 7-ketocholesterol (7KCH), lipopolisacharyd (LPS) *H. pylori*, LPS *E. coli* - samodzielnie lub jednocześnie

6.2.3. Identyfikacja receptora TREM2 w formie błonowej lub rozpuszczalnej w surowicy zaangażowanego w procesy zapalne w miażdżycy – pilotażowe badanie z wykorzystaniem materiału klinicznego

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, ekspresja na makrofagach receptora wyzwalającego na komórkach mieloidalnych 2 (TREM-2, ang. *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*) jest obserwowana po ich rekrutacji do tkanek obwodowych, w odpowiedzi na bodźce zapalne. W komórkach immunokompetentnych w krążeniu lub w tkankach oraz progenitorowych komórkach szpiku kostnego, poziom ekspresji TREM2 jest bardzo niski lub często niewykrywalny. Sugeruje się zatem, że ekspresja TREM2 jest ściśle związana z odpowiedzią immunologiczną w środowisku zapalnym. Receptor ten może pełnić funkcję regulatorową, ograniczając produkcję cytokin prozapalnych i tym samym działając hamująco na rozwój reakcji zapalnej⁸¹.

W obecnym badaniu wstępnym określano występowanie TREM2 w tkance aortalnej pobranej podczas operacji pomostowania aortalno-wieńcowego od pacjentów we wczesnym (n= 4) lub zaawansowanym stadium miażdżycy (n= 4). Od pacjentów pobierano również krew celem otrzymania surowicy do równoległych oznaczeń. Badania wykonano we współpracy z Kliniką Kardiologii Katedry Kardiologii Uniwersytetu Medycznego, przy szpitalu im dr Władysława Biegańskiego w Łodzi. Z uzyskanych tkanek przygotowano preparaty cienkowiekowe, które poddano barwieniu hematoksyliną i eozyną w celu oceny histopatologicznej oraz zabarwiono stosując monoklonalne przeciwciała rozpoznające specyficznie receptor TREM2 na komórkach.

W ocenie immunohistochemicznej wykazano obecność TREM2 u 62,5% badanych pacjentów (5), a ekspresja tego receptora była widoczna w tkance aortalnej przypuszczalnie w komórkach monocytarno-makrofagowych obecnych w obrębie ściany naczyń (Ryc.6).



Ryc.6. Reprezentatywne obrazy cienkowarstwowych skrawków parafinowych fragmentów naczyń pobranych od pacjentów podczas operacji pomostowania aortalno-więcowego. **A.** Preparaty barwione hematoksyliną i eozyną (H&E), mikroskop świetlny (obiektyw 4x, 40x) **B.** Ekspresja receptora wyzwalającego na komórkach mieloidalnych 2 (TREM2) na komórkach zapalnych naciekających tkankę naczyń po barwieniu immunofluorescencyjnym (TREM2 – pseudokolor zielony, DNA / 4',6-diamidyno-2-fenylindol DAPI/– niebieski) (obrazowanie z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Leica MICA; Obiektyw 4x, 40x) **C.** Ekspresja receptora wyzwalającego na komórkach mieloidalnych 2 (TREM2) na komórkach zapalnych naciekających tkankę naczyń po barwieniu immunofluorescencyjnym (TREM2 – pseudokolor zielony, DNA / 4',6-diamidyno-2-fenylindol DAPI/– niebieski) (obrazowanie z użyciem mikroskopu konfokalnego Leica SP8, obiektyw 63x, imersja); długości fali: TREM2= 495/520 nm, DAPI= 360/460 nm

W surowicach pacjentów, od których pobrano fragmenty naczyń, oznaczono stężenie rozpuszczalnej złuszczonej formy receptorów TREM2 (sTREM2), a następnie porównano je z obecnością formy powierzchniowej TREM2 na komórkach zlokalizowanych w ścianie naczyń. Poziom sTREM2 w surowicy oceniano metodą ELISA. Obecność tego rozpuszczalnego markera została potwierdzona u 50% badanych pacjentów. Analiza wstępnych wyników wykazała występowanie czterech różnych typów (T) pomiędzy ekspresją transbłonowej formy receptorów TREM2 w tkance a poziomem jego rozpuszczalnej formy (sTREM2) w surowicy:

T1 – brak ekspresji TREM2 na komórkach w tkance aortalnej oraz brak wykrywalnego sTREM2 w surowicy,

T2 - obecność receptorów TREM2 na komórkach w tkance aortalnej, przy jednoczesnym braku wykrywalnego sTREM2 w surowicy,

T3 – ekspresja receptorów TREM2 na komórkach w tkance aortalnej i obecność sTREM2 w surowicy,

T4 – brak ekspresji TREM2 na komórkach w tkance aortalnej, ale obecność jego rozpuszczalnej formy w surowicy

Zgodnie z danymi literaturowymi⁸², typy T1 i T2 odpowiadają wczesnemu stadium miażdżycy, natomiast typy T3 i T4 są charakterystyczne zaawansowanego lub późnego stadium miażdżycy.

Tabela.1. Typy zależności pomiędzy ekspresją receptorów TREM2 w tkance aortalnej lub rozpuszczalnej formy TREM (sTREM2) w surowicy a częstością występowania czynników ryzyka rozwoju miażdżycy

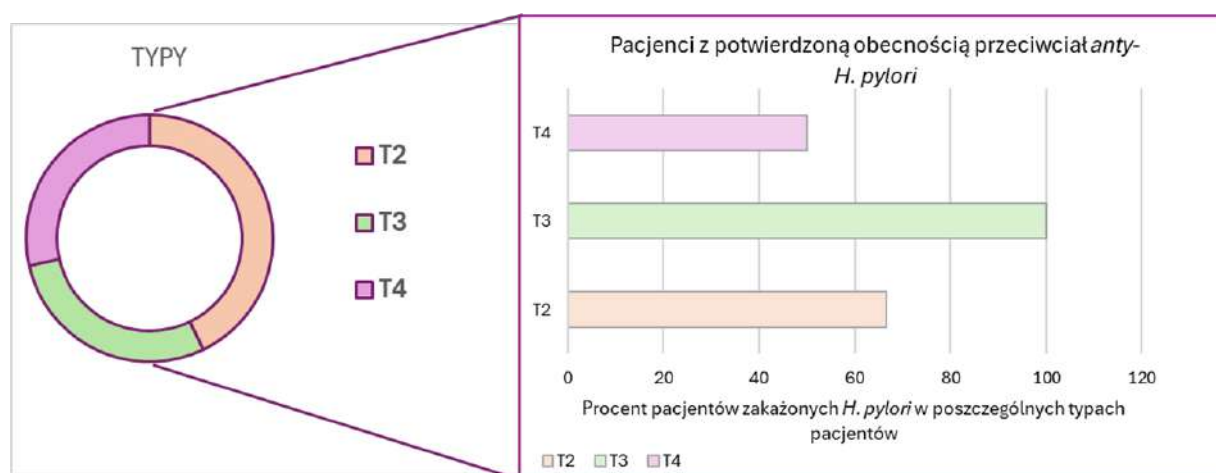
TYP- profil pacjenta	Płeć	Wiek	Hipercholesterolemia	Nadciśnienie	Cukrzyca
T1 i T2	0,75	0,5	0,25	0,5	0,25
T3 i T4	0,75	0,75	0,25	1	0,5

Pacjenci, u których występowały poniższe cechy otrzymywali po 1 punkcie za każdą z nich. Następnie sumę punktów uzyskanych w danej grupie dzielono przez liczbę pacjentów w tej grupie. Oceniane cechy to: wiek powyżej 60 lat, płeć męska, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze oraz cukrzyca

Ocena częstości występowania klasycznych czynników ryzyka (Tabela. 1): wiek powyżej 60 lat, płeć męska, hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze oraz cukrzyca – wykazała zróżnicowanie między tymi grupami. Wśród pacjentów z profilami T1 i T2 odsetek osób w wieku powyżej 60 lat wynosił 0,5; płci męskiej - 0,75; z nadciśnieniem tętniczym - 0,5; hipercholesterolemią - 0,25 oraz cukrzycą - 0,25. Natomiast w grupie T3 i T4 odsetek pacjentów w wieku powyżej 60 lat wynosił 0,75; mężczyzn – 0,75; z nadciśnieniem tętniczym - 1, hipercholesterolemią - 0,25, a cukrzycą - 0,5.

Liczne badania wskazują, że zakażenie *H. pylori* może odgrywać rolę w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych, na co wskazuje częstość takich zakażeń potwierdzona obecnością swoistych przeciwciał anty - *H. pylori* w surowicy pacjentów z CHNS. Z tego względu u wszystkich badanych osób oceniano występowanie w surowicy swoistych przeciwciał przeciwko *H. pylori*, jako wskaźnika przebytego lub

aktualnego zakażenia. Przeciwciała anty - *H. pylori* wykryto u pacjentów (2/2) należących do typu T3, z ekspresją receptora TREM2 zarówno w tkance, jak i w surowicy. Przeciwnie, w grupie pacjentów typu T1, charakteryzującym się brakiem ekspresji TREM2, nie stwierdzono zakażenia *H. pylori* (1/1). W grupach pośrednich, czyli T2 i T4, gdzie ekspresja TREM2 w tkance (T2) lub w surowicy występowała rozpuszczalna forma TREM2 (sTREM2) (T4), odsetek pacjentów z dodatnimi przeciwciałami wynosił odpowiednio 66,6% (2/3) i 50% (1/2). Uzyskane wstępne dane sugerują możliwy związek pomiędzy zakażeniem *H. pylori*, ekspresją TREM2 w tkance aortalnej lub sTREM2 w surowicy, co może mieć potencjalne znaczenie zarówno diagnostyczne, jak i terapeutyczne (Ryc.7).



Ryc. 7. Procentowy udział pacjentów z obecnością surowiczych przeciwciał anty-*H. pylori* reprezentujących immunofenotypy T1–T4, w odniesieniu do ekspresji TREM2 lub wydzielania sTREM2. U wszystkich pacjentów immunofenotypu T3, charakteryzującego się obecnością TREM2 zarówno w tkance, jak i w surowicy, wykryto przeciwciała anty-*H. pylori*. Przeciwciał takich nie stwierdzono u pacjentów immunofenotypu T1, u których ekspresja TREM2 nie została wykryta.

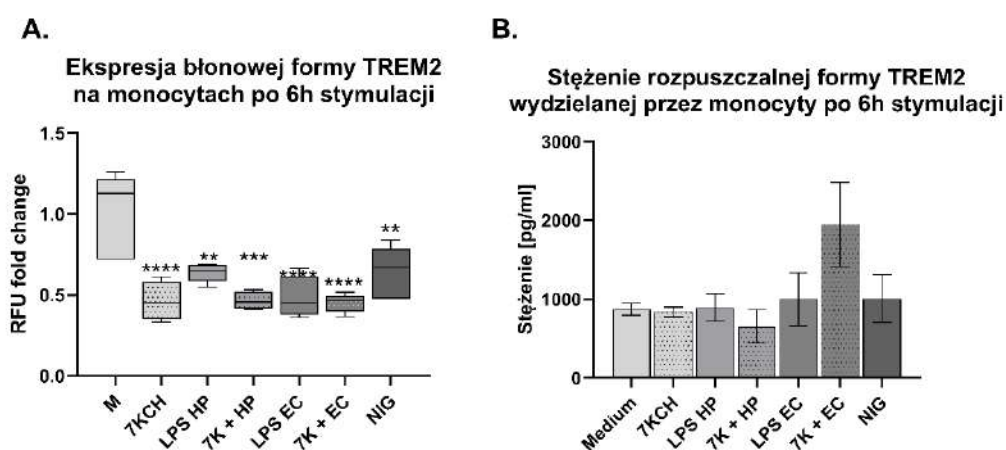
6.2.4. Ekspresja TREM2 w komórkach monocytarnych, oceniana w hodowlach *in vitro* po ekspozycji na czynniki infekcyjne i utlenione sterole.

Receptor TREM2 odgrywa istotną rolę w rekrutacji monocytów do tkanek obwodowych oraz w modulacji ich aktywacji w odpowiedzi na bodźce zapalne. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, zmiany w ekspresji TREM2 mogą być następstwem aktywacji receptora Toll-podobnego 4- TLR4 (z ang. Toll-like receptor 4 TLR4) w odpowiedzi na LPS, co wiąże się z hamowaniem produkcji cytokin prozapalnych,

takich jak IL-6 i TNF- α . Ponadto wykazano, że ekspresja TREM2 jest nasilana przez IL-4⁸¹.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że monocyty linii THP-1 stymulowane 7KCH lub bakteryjnym LPS (LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli*), niezależnie lub łącznie, wykazywały obniżoną ekspresję TREM2. Podobny efekt zaobserwowano po stymulacji komórek nigerycyną, wzorcowym aktywatorem inflamasomu NLRP3. Największy spadek ekspresji TREM2 odnotowano w warunkach stymulacji, łącznej LPS i 7KCH (Ryc.8A).

Stężenie rozpuszczalnej formy TREM2 (sTREM2) nie ulegało zmianie po stymulacji komórek THP1 tylko LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli* lub tylko 7KCH. Wzrost stężenia sTREM2 zaobserwowano jedynie po stymulacji monocytów jednocześnie LPS *E. coli* i 7KCH ale nie LPS *H. pylori* i 7KCH, jakkolwiek odnotowany wzrost ekspresji TREM2 nie był istotny statystycznie wobec kontroli, którą stanowiły komórki w samym podłożu (Ryc.8B).



Ryc. 8. Porównanie ekspresji receptorów błonowych TREM2 lub ich rozpuszczalnej formy (sTREM2) w hodowlach monocytów linii THP1. Ekspresja: **A/** transbłonowej oraz **B/** rozpuszczalnej formy receptorów TREM2 po 6 godzinach stymulacji monocytów THP-1: 7-ketocholesterolem (7KCH), LPS *H. pylori*, LPS *E. coli*, jednocześnie 7KCH i LPS *H. pylori* (7K+HP), jednocześnie 7KCH i LPS *E. coli* (7K+EC) lub nigerycyną (NIG; kontrola pozytywna aktywacji inflamasomu NLRP3); ** $p < 0,0021$ *** $p < 0,0002$ **** $p < 0,0001$ A- Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA, z testem porównań wielokrotnych Dunnetta, w celu porównania grup badanych do medium B- Analiza statystyczna wykonana testem Kruskala-Wallisa, z testem porównań wielokrotnych Dunna, w celu porównania grup badanych do medium.

6.3. Kolchicina w nośniku polimerowym jako potencjalny modulator stanu zapalnego – ocena bezpieczeństwa i skuteczności w badaniach *in vitro* i *in vivo* (Publikacja II – odpowiedzi na recenzje)

P.II.

(odpowiedzi na recenzje)

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

Praca w recenzji w Scientific Reports

W niniejszym rozdziale przedstawiono ocenę kolchicyny dostarczanej za pomocą nośnika polimerowego jako potencjalnego modulatora odpowiedzi zapalnej, która stanowi środowisko rozwoju CHNS. Badania miały na celu ocenę bezpieczeństwa biologicznego opracowanej formuły dla wybranych komórek eukariotycznych oraz jej skuteczności w regulacji aktywności makrofagów w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Pierwszy etap badań, opisany w publikacji, obejmował syntezę polimerowych nanocząstek (NPs) zbudowanych z gwieździstego poli-l-laktydu inicjowanego metylovaną β -cyklodekstryną, załadowanych kolchicyną (NPs-C). Nanocząstki te zostały przygotowane metodą mikroprzepływową, we współpracy z Instytutem Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Z wykorzystaniem aparatury, której działanie oparte jest na pomiarze dynamicznego rozpraszania światła (DLS) określono wielkość cząstek oraz oceniono ich długoterminową stabilność w ciągu 12 dni. Nie odnotowano istotnych zmian wielkości NPs w tym czasie. W przeprowadzonym badaniu uwalniania kolchicyny z NPs wykazano, że proces ten przebiega najintensywniej w ciągu pierwszych 7 godzin, a po 48 godzinach uwalnianie wchodzi w fazę wyrównaną. Po 72 godzinach do środowiska reakcyjnego uwolnione jest około 60% całkowitej ilości kolchicyny. Stężenie kolchicyny zastosowane w kompleksie NPs-C zostało celowo dobrane tak, aby odpowiadało stężeniu kolchicyny stosowanemu w badaniach prowadzonych z użyciem wolnej kolchicyny. Ustalono je w odniesieniu do dawki terapeutycznej kolchicyny dopuszczanej do stosowania u ludzi, która wynosi 0,5mg na dobę. Dzięki temu możliwe było bezpośrednie porównanie

efektywności i bezpieczeństwa biologicznego kolchicyny w formie wolnej lub zamkniętej w nanocząstkach, przy zachowaniu klinicznie poprawnych parametrów dawkowania.

W dalszym etapie badań oceniano również cytobiozgodność nanocząstek załadowanych kolchicyną wobec komórek eukariotycznych. Aktywność metaboliczną komórek po inkubacji z NPs-C oceniano przy użyciu testu redukcji MTT, zgodnie z normą ISO 10993-5:2009 dotyczącą oceny cytotoksyczności materiałów o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym. Zgodnie z tą normą, substancje uznaje się za bezpieczne, jeśli w modelu *in vitro* nie obniżają aktywności metabolicznej fibroblastów myszy L929 poniżej 70%.

Oprócz linii wzorcowej L929, nanocząstki testowano na komórkach śródbłonna naczyńowego linii HUVEC oraz komórkach wątroby linii LoVo. Wyniki uzyskane po 24-godzinnej inkubacji komórek obu linii z nanocząstkami załadowanymi kolchicyną nie wykazały efektu cytotoksycznego względem komórek L929 i HUVEC w zakresie stężeń 0,03 do 0,50 mg/ml. Dla linii LoVo brak działania cytotoksycznego obserwowano w zakresie stężeń 0,03 do 0,10 mg/ml. Ze względu na fakt, że potencjalne działanie niepożądane kolchicyny może być związane z dłuższym czasem ekspozycji komórek na związek, w kolejnym etapie oceniono żywotność komórek po 72 godzinach inkubacji zarówno z NPs-C, jak i wolną kolchicyną. Na podstawie uzyskanych danych wyznaczono wartość CC50 (stężenie w jakim kolchicyna powoduje obumarcie 50% badanych komórek) dla każdej z trzech badanych linii komórkowych, a analiza statystyczna wykazała, że wartość CC50 dla NPs-C była istotnie wyższa niż dla wolnej kolchicyny, co sugeruje większe bezpieczeństwo formuły NPs-C.

W celu pogłębionej oceny biokompatybilności NPs-C oraz identyfikacji potencjalnych uszkodzeń komórkowych, monocyty człowieka linii THP1 inkubowano z pustymi NPs, NPs załadowanymi kolchicyną (NPs-C) lub wolną kolchicyną. Następnie komórki obrazowano przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Technika ta umożliwia ocenę lokalizacji wewnątrzkomórkowej NPs oraz ewentualnych uszkodzeń ultrastrukturalnych. Obrazowanie wykazało zmiany w morfologii komórek THP-1 traktowanych wolną kolchicyną - wyrażające się nasiloną wakuolizacją oraz obecnością licznych endosomów i lizosomów, co sugeruje zaawansowaną autofagię. Dla porównania komórki inkubowane z NPs-C nie wykazywały istotnych uszkodzeń wewnątrzkomórkowych i były zbliżone pod względem kształtu, wielkości oraz

organizacji ultrastruktury do komórek kontrolnych lub komórek traktowanych pustymi nanocząstkami (NPs).

Komórki linii THP-1 wykorzystano również w celu oceny funkcjonalnego działania na te komórki kolchicyny zamkniętej w nanocząstkach. Badano wpływ zarówno wolnej kolchicyny, jak i kolchicyny związanej z nanocząstkami (NPs-C) na proces transformacji makrofagów linii THP-1 w komórki piankowate. Komórki piankowate uwidaczniano w mikroskopie świetlnym po wybarwieniu czerwienią oleistą. Zarówno kolchicyna wolna jak i w formie związanej z NPs, skutecznie hamowała transformację makrofagów w komórki piankowate indukowaną przez 7KCH lub LPS *H. pylori*, lub LPS *E. coli*. Wyniki te wskazują, że kolchicyna uwolniona z NPs wykazuje porównywalną skuteczność do wolnej kolchicyny w hamowaniu tworzenia komórek piankowatych, przy jednoczesnym ograniczeniu jej cytotoksycznego działania na komórki eukariotyczne podczas dłuższej ekspozycji.

Ostatni etap badań, realizowany w ramach trzeciego celu pracy doktorskiej, obejmował ocenę bezpieczeństwa stosowania zsyntetyzowanych NPs-C w modelu zwierzęcym myszy. Zwierzętom podawano dootrzewnowo łącznie 12 dawek, co trzy dni jednego z następujących preparatów: kolchicyny zamkniętej w nanocząstkach (NPs-C), pustych nanocząstek (NPs), wolnej kolchicyny lub buforu eksperymentalnego (EB – grupa kontrolna). Dawka kolchicyny wolnej wynosiła 1,2 mg/kg masy ciała, a dawka kolchicyny uwolnionej/związanej z NPs była porównywalna. Każda grupa badana liczyła dziesięć osobników, z równym podziałem na samce i samice (po pięć zwierząt każdej płci). Myszy monitorowano pod kątem przeżywalności, zmiany masy ciała oraz zachowania w trakcie całego doświadczenia. Zaobserwowano, że zwierzęta otrzymujące kolchicynę w NPs lub puste NPs nie wykazywały istotnych zmian masy ciała ani zachowań odbiegających normy w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast u myszy, którym podawano wolną kolchicynę, już w ciągu pierwszych trzech dni eksperymentu odnotowano spadek masy ciała przekraczający 20% wartości początkowej, co skutkowało śmiercią zwierząt po podaniu drugiej lub trzeciej dawki kolchicyny.

Po zakończeniu podawania 12 dawek badanych preparatów, myszy, które otrzymywały NPs-C, NPs lub EB zostały poddane eutanazji, a pobrany materiał biologiczny użyto do oceny działania hepatotoksycznego, nefrotoksycznego lub działania powodującego uszkodzenie mięśnia sercowego. Stosunek masy wątroby i śledziony do całkowitej masy ciała w grupach otrzymujących NPs lub NPs-C oraz w grupie kontrolnej (EB) nie różnił się ani pomiędzy grupami, ani w zależności od płci badanych zwierząt.

Ponadto, w żadnej z grup zwierząt nie stwierdzono zauważalnych zmian makroskopowych w wyglądzie narządów wewnętrznych.

W surowicach zwierząt badanych oceniono stężenia enzymów wątrobowych (aminotransferazy alaninowej – ALT oraz aminotransferazy asparaginianowej - AST) oraz kreatyniny i sercowej troponiny typu 1. ALT i AST, jako markery uszkodzenia lub zaburzenia funkcji wątroby, posłużyły do oceny potencjalnej hepatotoksyczności badanych związków. Uzyskane wyniki nie wykazały istotnych różnic w poziomie ALT u obu płci ani w poziomie AST u samic. Zauważono natomiast wzrost stężenia AST u samców z grupy otrzymującej NPs-C w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak wartości te mieściły się w referencyjnym zakresie uznanym dla gatunku *Mus musculus*. Nefrotoksyczność oceniono na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy. W badaniu nie wykazano istotnych różnic między grupami, co wskazuje na brak uszkodzenia nerek u badanych zwierząt. Ponadto w surowicy oceniono poziom troponiny sercowej typu 1 – markera uszkodzenia mięśnia sercowego wynikającego m.in. z niedokrwienia lub ekspozycji na bodźce mechaniczne, biologiczne lub chemiczne. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu tego markera pomiędzy grupami otrzymującymi NPs-C, NPs lub EB, co potwierdza bezpieczeństwo stosowania badanych nanocząstek względem układu sercowego.

W ramach uzupełnienia oceny bezpieczeństwa biologicznego badanych formuł NPs lub NPs-C przeprowadzono również wstępną ocenę ich biodystrybucji narządowej. W tym celu wykorzystano nanocząstki znakowane pirenem, związkiem o właściwościach fluorescencyjnych umożliwiającym śledzenie ich rozmieszczenia w tkankach. Obrazowanie fluorescencyjne wykazało, że zarówno puste NPs, jak i NPs-C akumulowały się w tkankach wątroby oraz serca. Jednakże sygnał fluorescencji w obrębie wątroby był słabszy niż w sercu. Różnice te mogą wynikać z budowy mięszu wątroby, wysokiej aktywności metabolicznej tego narządu oraz zdolności do szybkiej eliminacji cząsteczek ze względu na obecność makrofagów wątrobowych, a także mniejszej liczby podanych dawek (trzy iniekcje). W obecnym badaniu preparaty podawano drogą dootrzewnową co pozwala na osiągnięcie efektu ogólnoustrojowego narażenia na substancję, porównywalnego z iniekcją dożylną, dzięki szybkiemu wchłanianiu podawanego preparatu z dobrze unaczynionej jamy otrzewnej do krążenia. Ponadto, droga dootrzewnowa podawania preparatów jest powszechnie stosowaną i technicznie prostszą metodą w badaniach przedklinicznych na gryzoniach, zmniejszając ryzyko powikłań związanych z podaniem dożylnym, a jednocześnie zapewniającą wiarygodne

dane farmakologiczne i toksykologiczne (*Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider*; *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011 Sep;50(5):600–613).

Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy with In Vitro and In Vivo Evaluation

Agata Tomaszewska^{1,2*}, Bartłomiej Kost³, Marek Brzeziński³, Martyna Nowicka^{1,4}, Maja Krupa¹, Tomasz Rechciński⁵, Łucja Balcerzak⁶, Sława Glińska⁶, Magdalena Chmiela¹, Agnieszka Krupa^{1*}

¹ University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Immunology and Infectious Biology, Lodz, Poland

² BioMedChem Doctoral School of the University of Lodz and Lodz Institutes of the Polish

Academy of Sciences, Lodz, Poland

³ Polish Academy of Sciences, Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Lodz, Poland

⁴ Department of Human Epigenetics, Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 5 Pawinskiego Street, 02-106 Warsaw, Poland, Doctoral School of Translational Medicine, Centre of Postgraduate Medical Education

⁵ Medical University of Lodz, Clinic and Department of Cardiology, Lodz, Poland

⁶ University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Lodz, Poland

*email – agnieszka.krupa@biol.uni.lodz.pl; agata.tomaszewska@edu.uni.lodz.pl

Abstract

This study highlights the potential of nanoparticle-encapsulated colchicine as a safer and more effective alternative to free colchicine for treating atherosclerotic vascular disease (ASCVD). While colchicine is known for its anti-inflammatory properties, its dose-dependent toxicity limits long-term clinical use. To address this issue, colchicine was encapsulated in polymeric nanoparticles synthesized through a microfluidic method using methylated β -cyclodextrin as the initiator. The resulting formulation achieved an encapsulation efficiency of 30% and a drug loading capacity of 75%, indicating a high payload capability. This approach not only demonstrated high drug-loading efficiency but also enabled controlled release, with approximately 60% of the drug being released over 96 hours. The nanoparticle formulation preserved colchicine's ability to inhibit foam cell formation—a critical event in the progression of atherosclerosis—while significantly reducing toxicity to eukaryotic cells. Transmission electron microscopy revealed that cells treated with nanoparticle-bound colchicine maintained normal morphology, unlike those exposed to free colchicine, which rapidly accumulates intracellularly and disrupts cell function. *In vivo* evaluation confirmed the safety of the formulation, showing no adverse effects on the liver, kidneys, or heart, as indicated by stable levels of ALT, AST, creatinine, and cardiac troponin I. Biodistribution studies with fluorescently labeled

nanoparticles further suggested accumulation in tissues such as the heart and liver, highlighting the potential therapeutic relevance of colchicine-loaded nanoparticles for cardiovascular applications. Given these findings, the nanoparticle-based colchicine formulation presents a favorable efficacy and safety profile, warranting further preclinical development and eventual clinical evaluation.

Keywords

Colchicine, nanoparticles, atherosclerosis, foam cells, cytobiosafety

Introduction

Colchicine is an alkaloid derived from the tubers of the autumn crocus (*Colchicum autumnale*) and is one of the oldest known medicinal substances extracted from plants. Colchicine was likely used in ancient times to treat inflammatory conditions and joint pain. The alkaloid was first isolated and purified in 1820, and it was officially named "colchicine" in 1833.^{1,2} Colchicine works by inhibiting the activity of neutrophils, thereby helping to prevent the acute symptoms associated with inflammatory diseases. It binds to tubulin and forms complexes that inhibit the folding and polymerization of microtubules. Microtubules play a crucial role in several essential cellular processes, including the transport of substances within cells, maintaining cell structure, and secreting cytokines and chemokines.^{3,4} Due to its anti-inflammatory properties, colchicine is widely used to treat various conditions, including gout, familial Mediterranean fever, ASCVD, and pericarditis. Its powerful anti-inflammatory effects, linked to multiple cellular pathways, have led to increased interest in its potential use for treating cardiovascular diseases in recent decades.

Numerous clinical trials have evaluated colchicine's role in treating cardiovascular disease, especially for preventing atherosclerosis and myocardial infarction. Key among them are the COLCOT and LoDoCo trials.⁴⁻⁷ The original LoDoCo trial (2008-2010, Australia) assessed colchicine for secondary prevention in 532 patients with stable coronary artery disease. Over 36 months, those receiving 0.5mg daily showed a significant reduction in cardiovascular events. Side effects included gastrointestinal intolerance (2.5%) and rare muscle issues, including one case of myositis. The study highlighted the benefits of adding colchicine to standard therapy.^{5,7} The LoDoCo2 trial (2014-2020) further investigated the use of low-dose colchicine in 5,522 patients with chronic coronary disease. Over a median 28.6-month follow-up, major

cardiovascular events occurred in 6.8% of the colchicine group versus 9.6% in the placebo group. Non-cardiovascular deaths were 1.9%. Common side effects included myalgia (21.2%) and gastrointestinal intolerance (15.4%).^{6,7} The COLCOT trial (2015-2019, Canada) investigated the use of colchicine after myocardial infarction in 4,745 patients. Over 22.6 months, serious cardiovascular events occurred in 5.5% of the colchicine group versus 7.1% with placebo. Side effects were reported in 17.5% (diarrhea - 9.7%; pneumonia - 0.9%) of the participants.^{4,7} These trials led to FDA approval of 0.5mg colchicine daily for reducing the risk of myocardial infarction, stroke, and cardiovascular death in coronary artery disease patients.⁸ However, gastrointestinal and muscle-related side effects are common. Enhancing colchicine delivery could improve tolerance, adherence, and long-term cardiovascular outcomes.

Our objective was to reduce the side effects of colchicine while enhancing its therapeutic effectiveness. To achieve this, we encapsulated colchicine in polymeric nanoparticles synthesized using methylated β -cyclodextrin as a lactide polymerization initiator, forming an inclusion complex that may improve drug solubility and reduce toxicity. The delivery system leverages key advantages of polymeric nanoparticles over other nanocarriers, including controlled and sustained drug release, enhanced stability, and high encapsulation efficiency, while being biocompatible and biodegradable. We employed microfluidic technology to produce nanoparticles with superior size uniformity and reproducibility compared to traditional emulsion methods. Additionally, the use of star-shaped polylactic acid (PLA) significantly enhances drug loading and encapsulation efficiency compared to linear polymer systems, thereby contributing to a more effective delivery platform. This work encompasses a comprehensive characterization of the formulation's cytocompatibility, biodistribution, and anti-inflammatory potential to evaluate its suitability for modulating the inflammatory response associated with the development and progression of atherosclerosis. Compared to other nanocarriers, such as liposomes, micelles, and inorganic particles, our polymeric system offers superior drug

protection, tunable release kinetics, structural stability, and reduced immunogenicity, all of which are essential for safe and effective delivery.

Results

Stability Analysis, Morphological Characterization, and Colchicine Release Evaluation of Nanoparticles in Biological and Physiological Environments

The polymer for the preparation of NPs was synthesized by ring-opening polymerization of lactide in the presence of the catalyst/initiator system composed of tin (II) octoate/methylated- β -cyclodextrin (M β CD)⁹. In the applied condition, a star-shaped homopolymer of lactide with a M β CD core was successfully achieved (Supplementary Data, Fig. 1S). The molar mass of the polymer and the number of average arms were estimated by using size-exclusion chromatography (M_n = 12,000 g/mol) and ¹H NMR (M_n = 7000 g/mol). The comparison of molar masses obtained from these two methods allows for the estimation of the average number of arms in the polymer as 7.

A dynamic light scattering (DLS) apparatus was utilised to determine the sizes of two types of nanoparticles: empty nanoparticles (NPs) and colchicine-loaded nanoparticles (NPs-C). The results, shown in Fig. 1A, indicate that both types of nanoparticles, prepared from M β CD-PLA and colchicine, have monomodal size distributions. The average size of the NPs-C was found to be 210 nm (PDI=0.068, ζ = -25.3 mV), while the NPs measured an average size of 230 nm (PDI=0.077, ζ = -34 mV). Furthermore, FTIR analysis was conducted on the NPs, NPs-C, and pure colchicine to confirm the successful encapsulation of colchicine within the nanoparticles. Figure 2S in the Supporting Information displays the spectra for pure colchicine (blue line), NPs (green line), and NPs-C (red line). The FTIR spectrum of NPs-C exhibits characteristic signals of PLA at 1750 cm⁻¹, along with additional peaks in the 1700–1300 cm⁻¹ range corresponding to colchicine, confirming its presence in the formulated nanoparticles.

A key parameter for characterizing these nanoparticles is their long-term stability, which significantly impacts their applicability. The stability of the nanoparticles was assessed over 12 days. Measurements revealed slight variations in particle size, ranging between 200 nm and 240 nm, as illustrated in Fig. 1B.

Transmission electron microscopy (TEM) played a crucial role in visualizing and morphologically characterizing both empty nanoparticles (NPs) and colchicine-containing nanoparticles (NPs-C). As shown in Fig. 1C, TEM images confirm the DLS measurements in terms of the differences in nanoparticle size, both empty and loaded with

colchicine. However, it should be noted that the nanoparticles appear smaller in TEM (NPs-99.86 nm and NPs-C-85.19 nm) compared to the DLS measurements. Importantly, TEM only measures the solid core, while DLS considers the hydrodynamic diameter, which includes solvent layers, surface coatings, and any aggregations¹⁰. Furthermore, the drying process during TEM can lead to shrinkage or collapse of softer coatings, which can further decrease the apparent size of the nanoparticles.

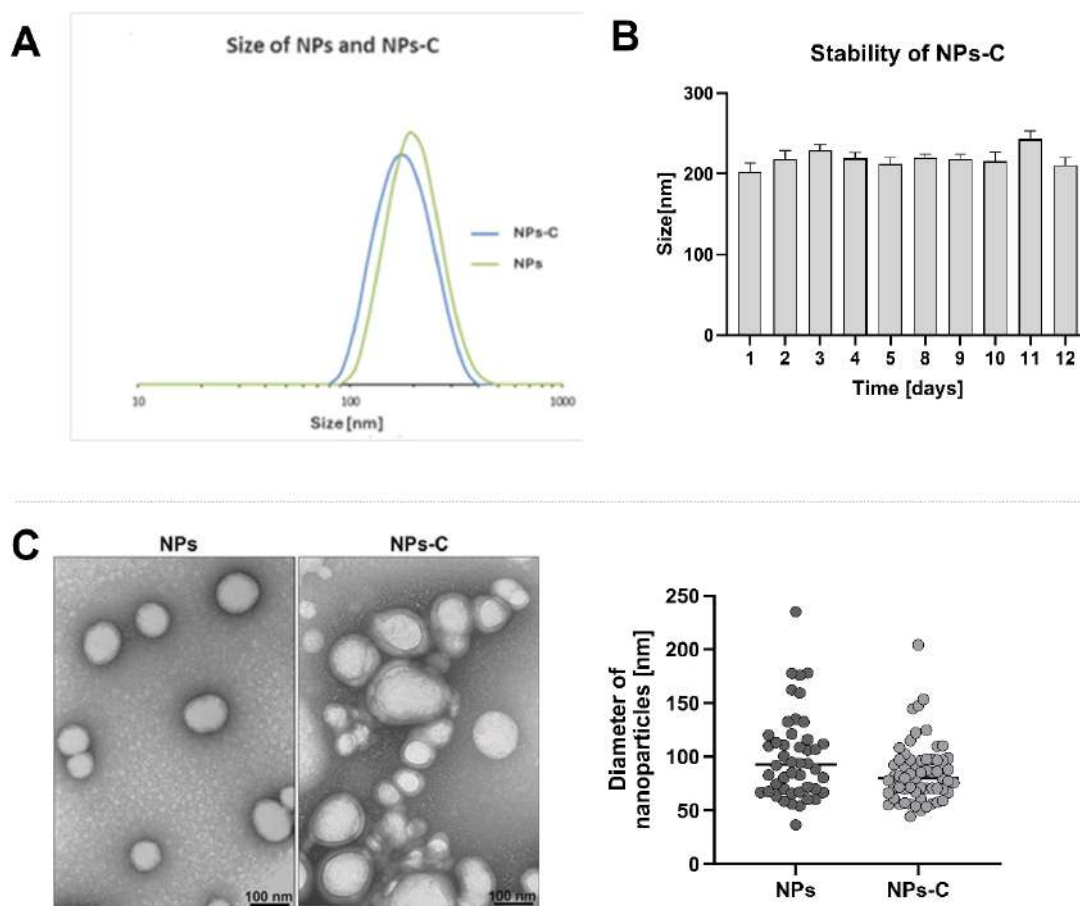


Fig. 1. Characterization of nanoparticles: A/ The size and B/ Stability measured by Dynamic Light Scattering; C/ Representative TEM images show the morphology and diameter of nanoparticles. NPs – empty nanoparticles; NPs-C – colchicine-loaded nanoparticles.

***In Vitro* Testing of Cytocompatibility for Nanoparticles**

The metabolic activity and viability of cells exposed to empty or colchicine-loaded nanoparticles (NPs and NPs-C, respectively) were assessed using the MTT salt reduction assay, following the ISO 1099-3-2009 standard for substances with potential biomedical

applications. The metabolic activity of the cells, which reflects their viability after incubation with the nanoparticles, was expressed as a percentage and compared to a positive control, consisting of untreated cells with 100% metabolic activity/viability (C+). The assay also included the control of cells cultured in the presence of 0.1% H₂O₂ (all cells were destroyed, C-). According to ISO 1099-3-2009, substances intended for biomedical use are considered safe if they do not reduce the metabolic activity of mouse fibroblasts L929 below 70% in an *in vitro* model. This approach allowed for the testing of empty nanoparticles (NPs) to assess their cytotoxicity over a concentration range of 0.05 to 2.50 mg/mL. The results indicate that the preparation met the safety criteria for cells in the concentration range from 0.05 to 1.88 mg/ml; however, cells cultured in the presence of NPs at concentrations from 0.21 mg/ml showed full metabolic activity (Fig. 2A). Based on the obtained results, nanoparticles in the concentration of 0.21 mg/ml were used to encapsulate colchicine in the NPs-C complex.

The results in Fig. 2B, C, and D refer to the cytotoxicity test of colchicine-loaded nanoparticle preparations against selected eukaryotic cells within 24 hours. Thus, nanoparticles loaded with colchicine (NPs-C) at drug concentrations ranging from 0.03 to 0.50 mg/ml did not exhibit cytotoxic effects on L929 and HUVEC cells. In contrast, for the LoVo cell line, NPs-C were safe at concentrations ranging from 0.03 to 0.10 mg/ml.

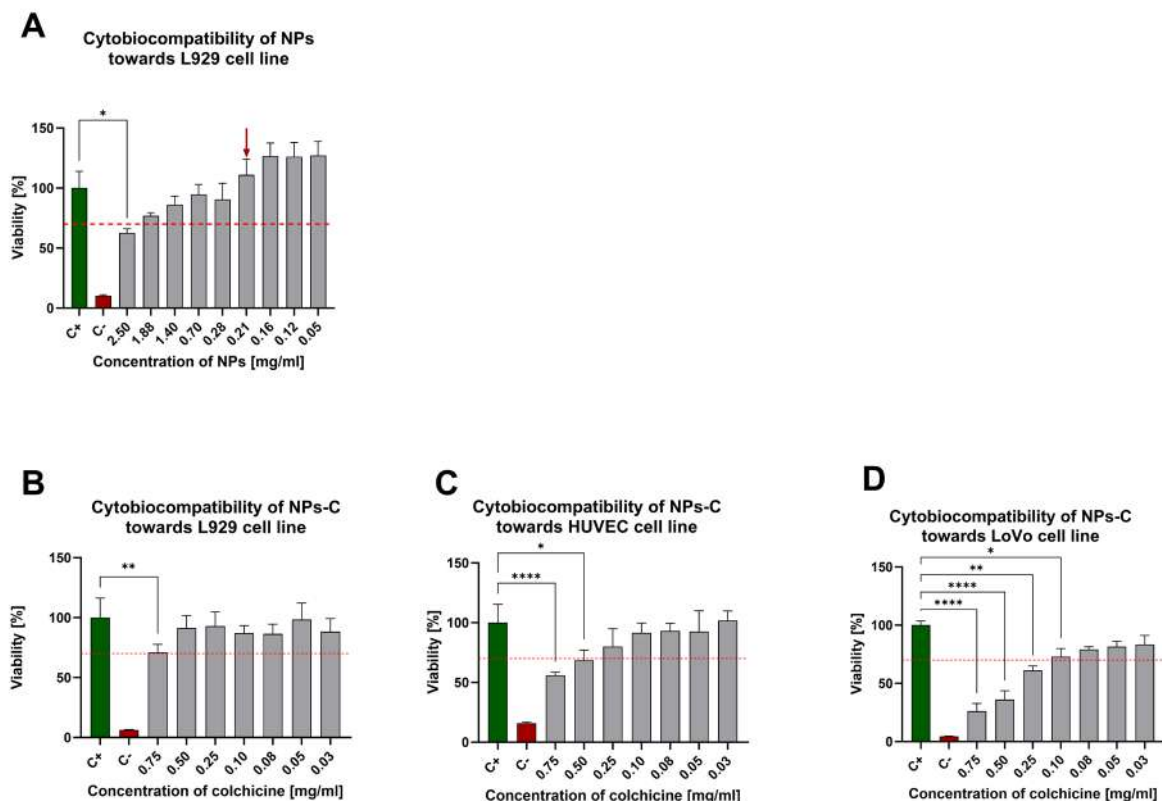


Fig. 2. Metabolic activity of L929 cells treated with empty nanoparticles (NPs) for 24 hours – A/. Metabolic activity of various cell lines: L929 – B/, HUVEC primary cells – C/, and LoVo cells – D/ stimulated with colchicine-loaded nanoparticles (NPs-C) for 24 hours - C+ - untreated cells, C- cells treated with 0,1% H₂O₂. Results are presented as the mean values $\pm$ SD. Statistical analysis for graph A, B, C, D was performed using Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn's post-hoc multiple comparisons test, $n \geq 4$; ns – $p > 0.05$, (*) – $p \leq 0.05$, (**) – $p \leq 0.01$, (***) – $p \leq 0.001$, (****) – $p \leq 0.0001$.

Although short-term exposure of eukaryotic cells to colchicine (24 hours) does not cause changes in cell metabolic activity in the concentration range of 0.03–0.5 mg/ml (Fig. 3S), the potential adverse effects of colchicine on cells during long-term exposure (72 hours). The study evaluated the metabolic activity of selected eukaryotic cells (L929, HUVEC, LoVo) cultured for 72 hours with colchicine-containing nanoparticles (NPs-C), and the results were compared with those obtained for colchicine that was never included in the carrier. The results (Fig. 3A, B) show that L929 and HUVEC eukaryotic cells exposed to free colchicine for 72 hours experienced a significant loss of metabolic activity at concentrations ranging from 0.10 to 0.50 mg/mL.

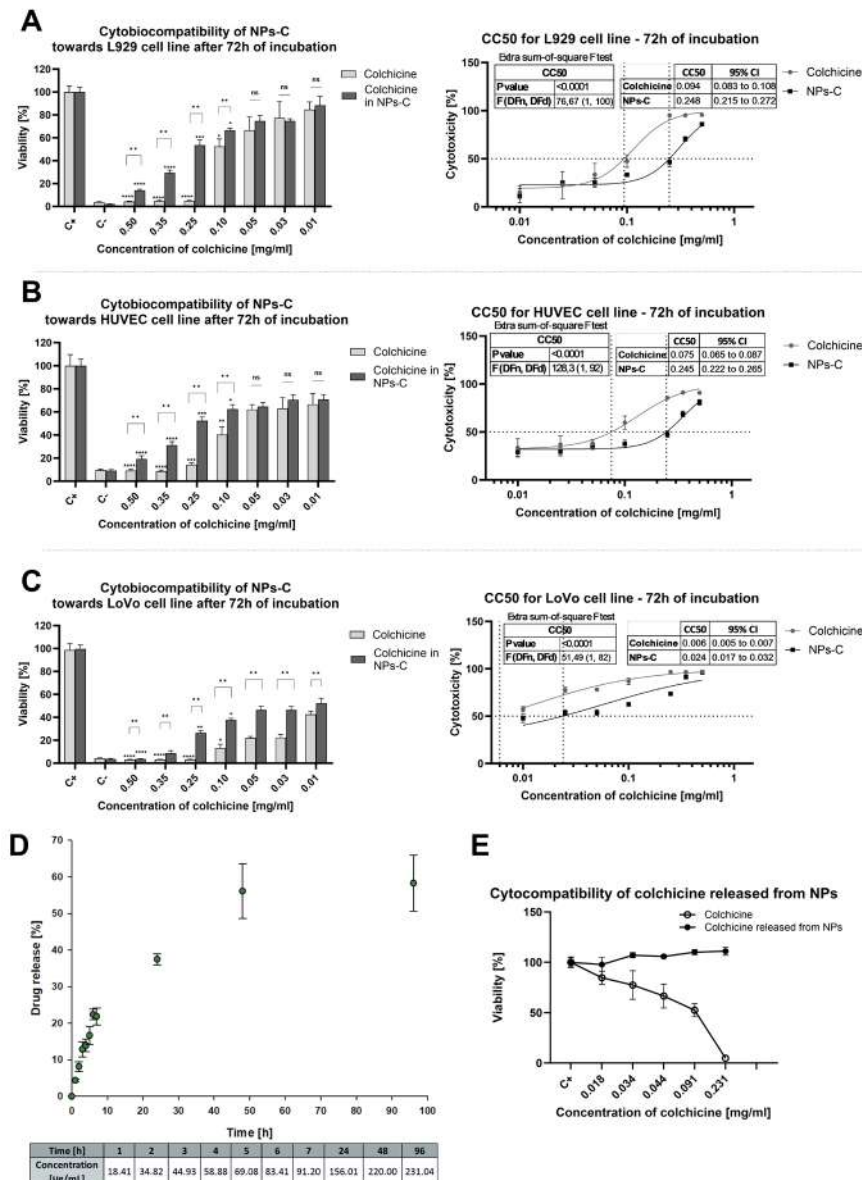


Fig. 3. The effect of nanoparticles loaded with colchicine (NPs-C) and free colchicine (C) on the metabolic activity of various eukaryotic cell lines: A) L929, B) HUVEC, and C) LoVo after 72 hours of exposure. C+ - untreated cells, C- cells treated with 0.1% H₂O₂. D/ The release of colchicine from nanoparticles (NPs-C) over a 96-hour period. The table includes the average concentrations of colchicine released from NPs-C at each time point. E/ The effect of free colchicine and colchicine released from nanoparticles (NPs-C) on the metabolic activity of L929 cells after 72 hours of exposure. Results are presented as the mean values $\pm$ SD, $n \geq 4$. Statistical analysis for cytotoxicity on A, B, and C graphs was performed to compare cell viability values for free colchicine and NPs-C at each concentration separately using multiple Mann-Whitney tests with a two-tailed p-value, and Holm-Šídák multiple comparisons correction. Adjusted p-values are reported above brackets. Moreover, a Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc multiple comparisons test was performed to compare each concentration of free colchicine or NPs-

C with untreated cells (C+); adjusted p values are reported above the bars. An extra sum-of-squares F test was performed to compare best-fit CC50 values for each cell line, and the p-value is reported on the graphs. ns – $p > 0.05$, (*) – $p \leq 0.05$, (**) – $p \leq 0.01$, (***) – $p \leq 0.001$, (****) – $p \leq 0.0001$.

Colchicine encapsulated in nanoparticles was found to be safer for all three tested cell lines, allowing the cells to maintain their metabolic activity. However, in the case of LoVo cells, free colchicine was toxic over a wide range of exposure concentrations (0.01–0.50 mg/ml). While it is true that approximately 50% cell viability was observed in LoVo cells after 72 hours of exposure to NPs-C, this does not contradict our conclusion. On the contrary, the comparative analysis reveals a substantial reduction in toxicity and a notable improvement in cytocompatibility when colchicine is delivered via nanoparticles compared to its free form. Based on the data obtained, the concentration of colchicine, free or complexed with NPs-C, that caused a cytotoxic effect in 50% of cells (50% cell cytotoxicity - CC50) was calculated (Fig. 3A, B, C). Statistical analysis of CC50 values showed that the CC50 of NPs-C is significantly higher than that of colchicine CC50, with a p-value < 0.0001 for each cell line.

UV-VIS spectroscopy with a Flot-a-layer membrane with a cutoff of 3000 was used to study the release of colchicine from the NPs-C complex. Colchicine was encapsulated in the carrier at a concentration of 0.40 mg/ml (400 μ g/ml), which was demonstrated to be safe for L929 reference cells (Fig. 2B). The encapsulation efficiency and drug loading were calculated to be 30% and 75%, respectively. The results obtained in the colchicine release study from the complex (Fig. 3D) indicate that release can be rapid within the first 7 hours, which can be attributed to the release of the drug from the polymer surface of the NPs (the concentration of released colchicine after 7 hours was 91.20 μ g/ml). After 48 hours, release tends to plateau. The concentration of colchicine in the incubation fluids was measured as 220.00 μ g/ml after 48 hours and 231.04 μ g/ml after 96 hours. The table below provides detailed information on colchicine concentration at each time point within this time frame (see Fig. 3D). It is worth noting that approximately 60% of the drug concentration is released from the nanoparticles into the reaction environment at 72 hours. Therefore, the NPs-C complex can be considered colchicine bound/released from NPs-C.

Since colchicine bound/released from nanoparticles appears to be safer for eukaryotic cells during prolonged exposure, an experiment was conducted to compare the metabolic activity of L929 cells after 72 hours of incubation with unbound colchicine and colchicine released from nanoparticles (Fig. 3E). The highest concentration of colchicine released

from the carrier (NPs-C) used in the experiment was 231 ug/ml, which is the concentration of colchicine released from nanoparticles after 96 hours (see Fig. 3D - release of colchicine from the NPs-C complex). The results indicate (Fig. 3E) that colchicine released from nanoparticles (NPs-C) was safe for L929 cells within the tested concentration range of 0.018 to 0.231 mg/mL, in contrast to colchicine that was never bound to the carrier and was present in the experiment at similar concentrations. L929 cells cultured in unbound colchicine at a concentration of 0.231 mg/ml completely lost their metabolic activity, which may indicate the high toxicity of the preparation in long-term exposure.

Microscopy Based Cytobiosafety Evaluation of Colchicine-Loaded Nanoparticles in Cells

A preliminary assessment of the cytobiosafety of colchicine bound/released from nanoparticles (NPs-C in THP-1 cells was conducted using light microscopy. The material, fixed and embedded in Epon-Spurr resin, was cut into semi-thin sections and placed on glass slides. These sections were stained and analyzed in transmitted light to evaluate the morphology of at least 100 cells. Representative images of cells from each experimental condition are shown in Fig. 4.

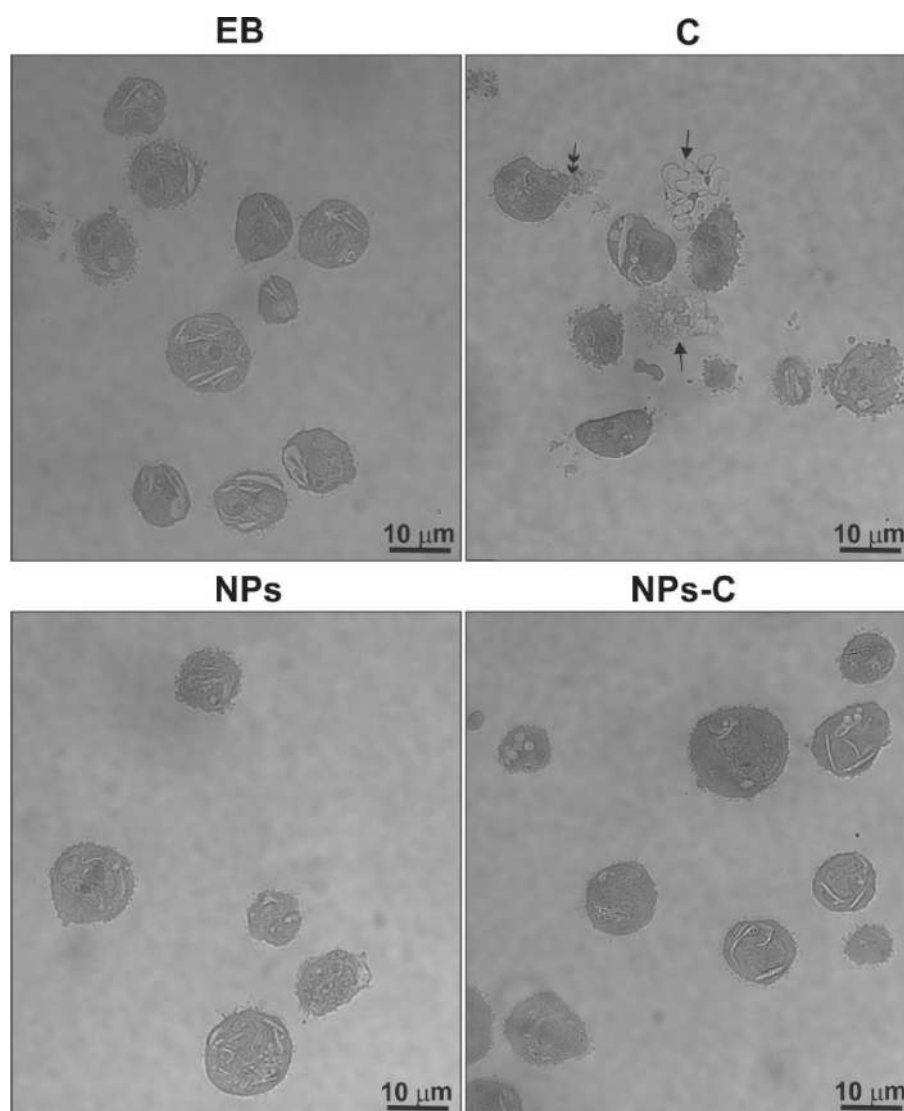


Fig. 4 THP-1 cell morphology assessed by light microscopy on semi-thin sections of Epon-Spurr resin-embedded material. In colchicine-treated material, many cells appeared to be destroyed (solid arrow) or partially disrupted (double arrow). EB – experimental buffer; C – colchicine; NPs – empty nanoparticles; NPs-C – colchicine-loaded nanoparticles.

The results indicate that only colchicine, never bound to the carrier, caused significant damage to THP-1 cells during the 1.5-hour treatment period. Many cells appeared either destroyed or partially damaged, as indicated by a solid and a double arrow, respectively (Fig. 4). In contrast, THP-1 cells treated with colchicine bound to/released from the NPs-C, as well as those treated with empty nanoparticles, exhibited morphology similar to that of the control cells. The concentration of free colchicine used in the experiment corresponded to that released from the complex after approximately 2 hours, which was measured at 34.82 µg/ml (see Fig. 3D).

TEM is utilized in biosafety studies to provide high-resolution images of cellular ultrastructure and the interactions between nanoparticles and cells at the nanometer scale. This imaging technique facilitates the assessment of cytotoxic effects, determination of intracellular localization, and identification of any potential structural damage caused by the substances being tested. Such detailed visualization is essential for evaluating biocompatibility and identifying potential hazards in biomedical applications.

TEM analysis showed that THP-1 cells cultured with nanoparticles (NPs, Fig. 5C, D) exhibited a similar ultrastructure to the control cells (Fig. 5A, B). Both cell types were comparable in size, shape, granularity, and displayed lobate nuclei (Fig. 5A, C). The membranes of cells from both groups exhibited some ruffling, and numerous pseudopodia were visible (Fig. 5A, B). A few small vacuoles were primarily located in the peripheral regions of the cells (Fig. 5A, C). The cytoplasm contained many Golgi apparatus (GA) cisternae, abundant vesicles, and mitochondria, which displayed an electron-dense matrix and numerous cristae (Fig. 5B, D). Small, opaque lysosomes were observed near the Golgi apparatus (Fig. 5D), and endoplasmic reticulum (ER) cisternae were scattered throughout the cytoplasm (Fig. 5B).

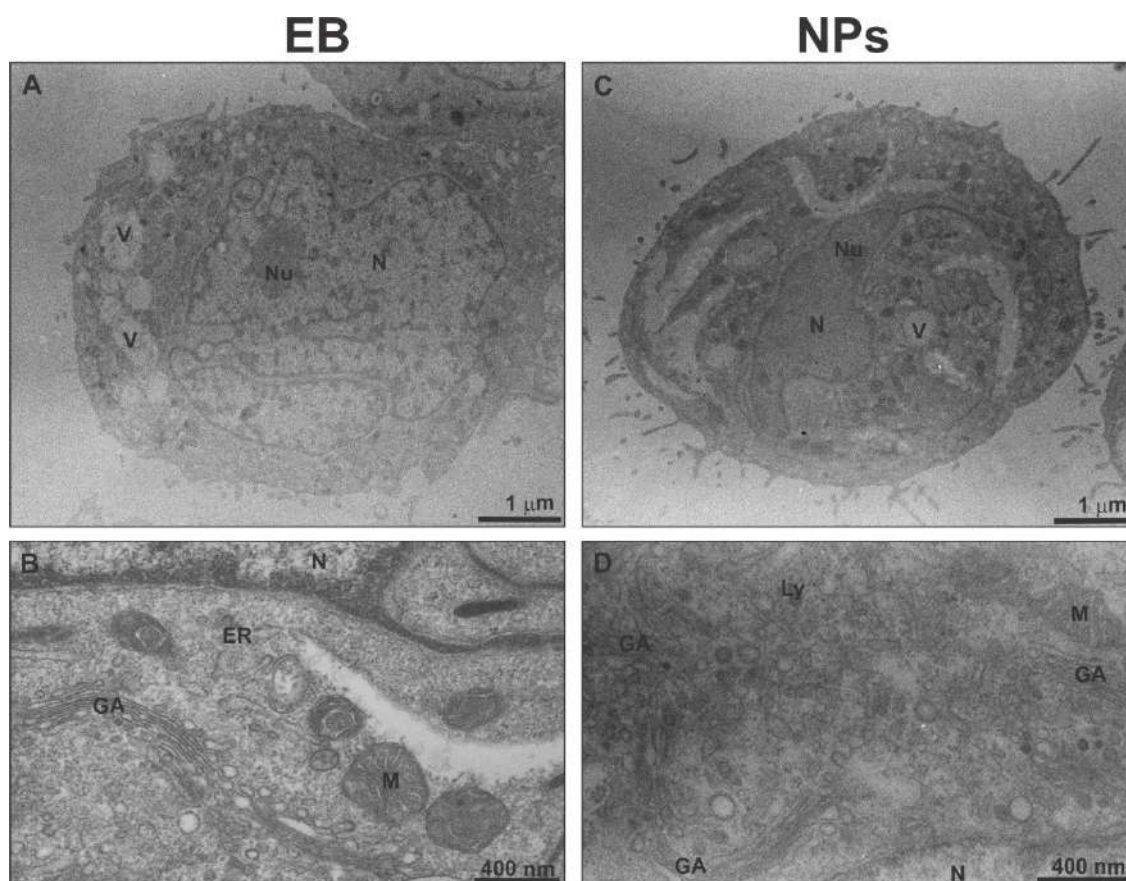


Fig. 5 Representative TEM images of THP-1 cells cultured for 1.5 hours in experimental buffer (EB) and in the presence of empty nanoparticles (NPs). N - nucleus, Nu – nucleolus, V – vacuole, M – mitochondrion, GA- Golgi apparatus, Ly – lysosome, ER – endoplasmic reticulum.

As illustrated in Fig. 6, most of the THP-1 cells treated for 1.5 hours with colchicine, which did not bind to the carrier, were severely damaged. These cells exhibited significant vacuolation, and aside from the cell nucleus, only a few cellular organelles were retained in the cytoplasm (see Fig. 6A). Some cells showed a low degree of vacuolization and had dense cytoplasm. However, their plasma membrane was disrupted (Fig. 6B, arrow) and formed plasmalemma blebbing (Fig. 6B, asterisk). No Golgi apparatus cisternae were seen in highly vacuolated cells, and mitochondria were shrunken with a very electron-dense matrix and swollen cristae; moreover, the perinuclear space ballooned at a large region (Fig. 6C, arrow). Numerous endosomes and lysosomes indicated an advanced autophagy process (Fig. 6D). Colchicine bound to/released from the NPs-C did not cause such degenerative changes in the ultrastructure of THP-1 cells as free colchicine (Fig. 6E-H). Cells treated with colchicine bound to/released from the NPs-C were similar in size, shape, and ultrastructure to control and those treated with empty NPs (Fig. 6E, Fig. 5A, C). Some cells had slightly changed shape, were distended,

and contained large vesicular inclusions within the peripheral region of the cytoplasm. Moreover, the number of pseudopodia in these cells was reduced (Fig. 6F). In the cytoplasm were numerous mitochondria with a standard structure and regular ER cisternae (Fig. 6F-H). Numerous lysosomes (Fig. 6G, H) and single endosomes (Fig. 6G) were noticed in some cells. The cell nucleus and nuclear envelope showed no disturbances (Fig. 6E, F, H). Golgi apparatus cisternae were rarely observed; however, in many cells, small, numerous GA vesicles were present (Fig. 6H, arrows).

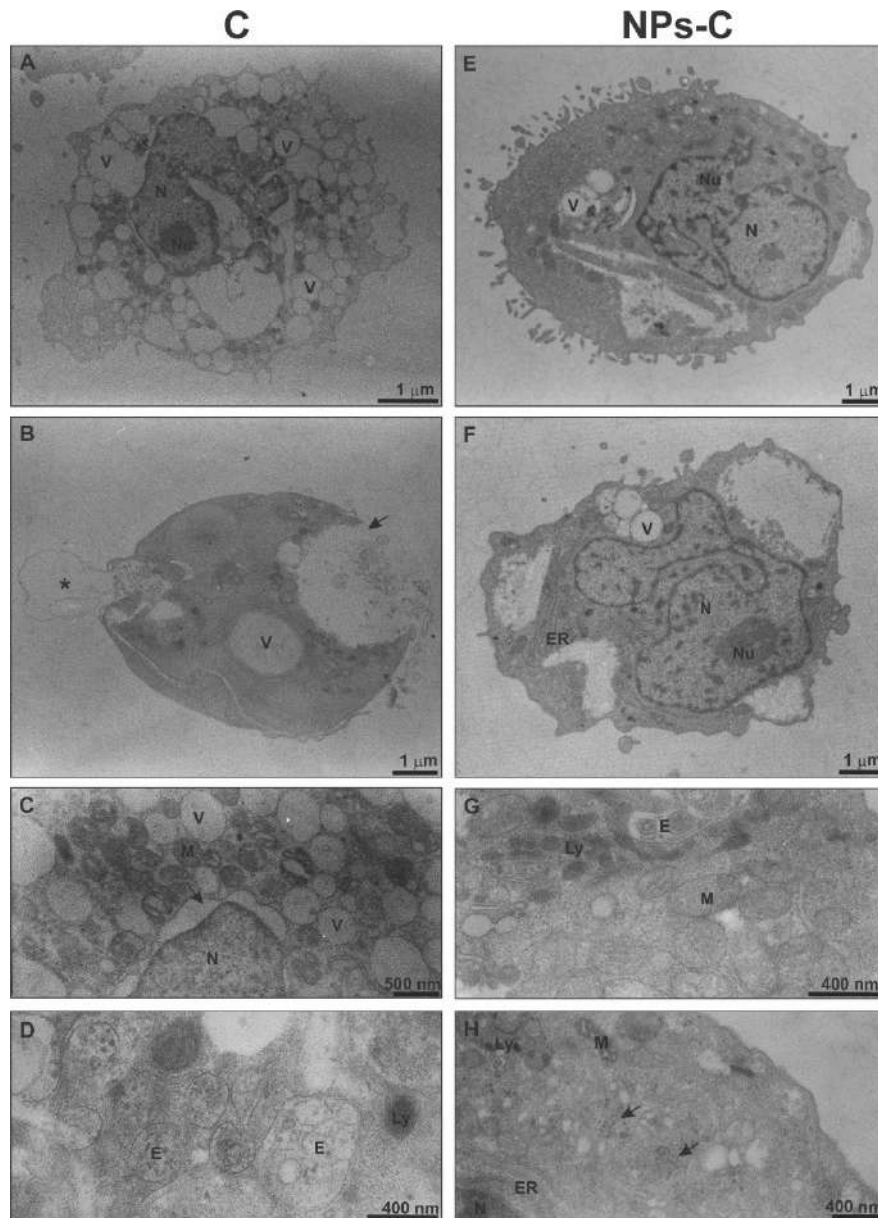


Fig. 6 Representative TEM images of THP-1 cells incubated for 1.5 hours with free colchicine (C) or colchicine-loaded nanoparticles (NPs-C). Many colchicine-treated cells were almost wholly damaged (6A) or highly disrupted (6B, C) with numerous endosome vesicles (6D). Encapsulated colchicine didn't cause degenerative changes in the cell

ultrastructure (6E-H). N - nucleus, Nu – nucleolus, V – vacuole, M – mitochondrion, GA- Golgi apparatus, Ly – lysosome, ER – endoplasmic reticulum, E - endosome.

Evaluation of Survival, Body Weight Dynamics, and Biosafety of Colchicine-Loaded Nanoparticles *in Vivo*

Mice were monitored for survival and changes in body weight following intraperitoneal administration of 12 doses (one dose every three days) of one of the following: colchicine encapsulated in nanoparticles (NPs-C), empty nanoparticles (NPs), free colchicine (C), or experimental buffer (EB) serving as a negative control. The experimental buffer consisted of 0.85% sodium chloride (NaCl) mixed with the vehicle used for nanoparticle synthesis, which was 5% N-methylpyrrolidone in sterile water for injection. The concentration of colchicine unbound to the carrier (C) and that encapsulated in nanoparticles (NPs-C) was ready to correspond to the concentration of the drug approved by the FDA for treating cardiovascular events (0.5 mg daily). Each test group of mice consisted of ten individuals with an equal sex distribution—five females and five males. The route of administration was intraperitoneal (IP) since it leads to systemic drug exposure comparable to intravenous (IV) injection due to rapid adsorption through the highly vascularized peritoneal membrane into the bloodstream. Empirical evidence supports that IP administration can produce pharmacological and toxicological outcomes consistent with systemic delivery.^{11,12}

It was observed (Fig. 7A) that animals receiving colchicine encapsulated in nanoparticles (NPs-C) or empty nanoparticles (NPs) displayed behaviours similar to those of the control group (EB). In contrast, animals administered free colchicine (C) died within three days of the start of the experiment, and their deaths were associated with a significant decrease in body weight. The free colchicine group experienced weight loss exceeding 20% of their initial body weight (Fig. 7B), with male mice showing a tendency to lose more weight than females (Fig. 7B). This observed effect may indicate that the C57BL/6 strain of mice is susceptible to colchicine, even though the concentration administered did not exceed 1.47 mg/kg, which is only 25% of the LD50 value for colchicine¹³. Considering the mice's body weight, this dose did not exceed 0.03 mg per dose (1.2 mg/kg).

After the animals were euthanized (using 12 doses of the preparation), we isolated their blood and organs, including the liver and spleen. These were weighed and assessed for size within their respective study groups. Additionally, photographs were taken to

evaluate their appearance (not shown). It is important to note that due to the premature death of animals in the group receiving free colchicine, we were unable to collect organs and blood from this group.

The results shown in Fig. 7 illustrate the average ratio of liver or spleen (Fig. 7C) weight to the total weight of the animals, expressed as a percentage of organ weight relative to total body weight percentage. The percentage of liver and spleen weight to total body weight in the NPs, NPs-C, and control (EB) groups did not show any significant differences, nor did they vary between the sexes of the animals studied. However, one female in the NPs-C treated group exhibited a single instance of increased spleen weight. No noticeable changes were observed in the organs of the animals across all tested groups.

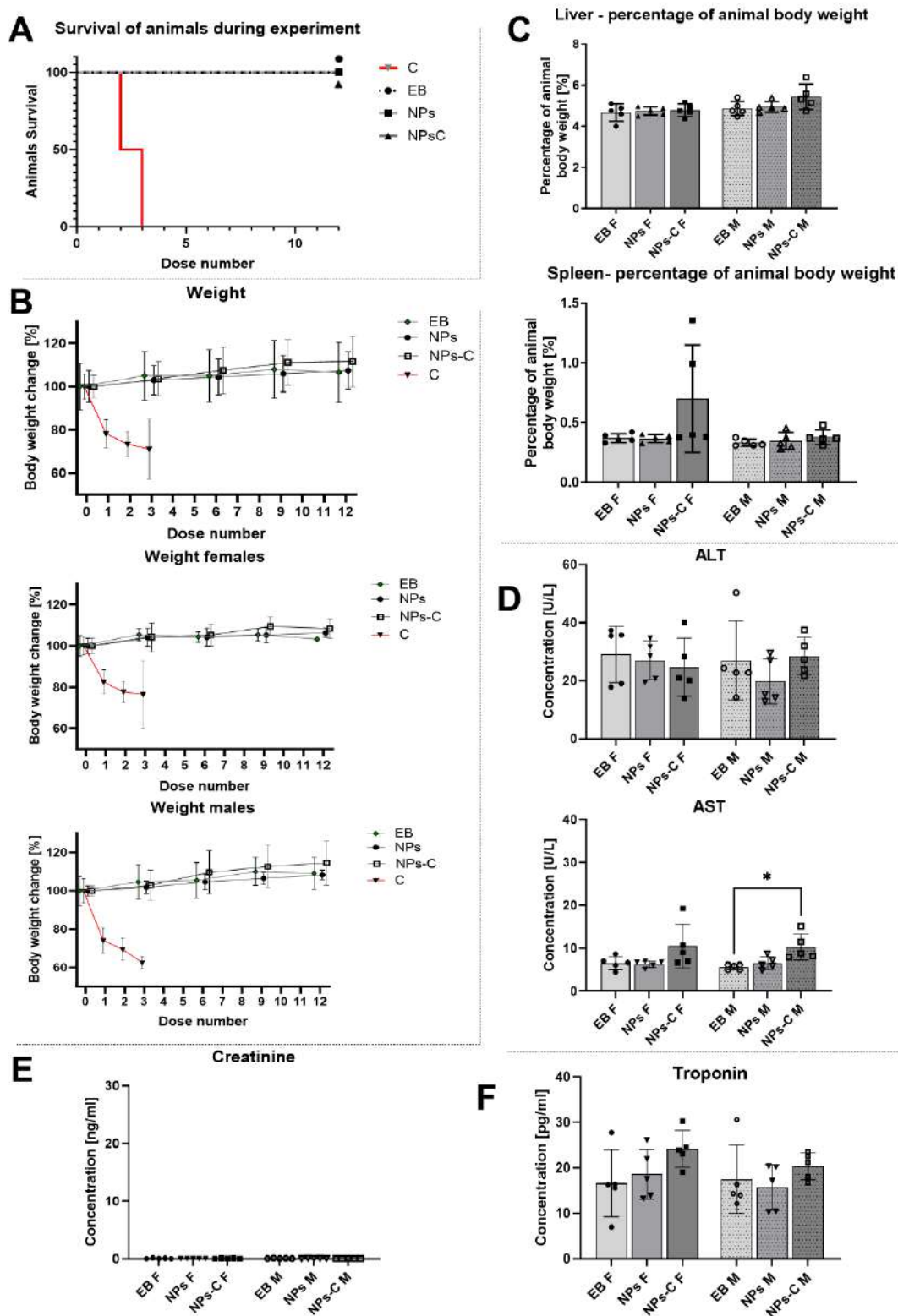


Fig. 7 Biosafety of nanoparticles loaded with colchicine (NPs-C) *in vivo*. The survival evaluation – A/ and body weight change – B/ of animals receiving experimental buffer (EB, negative control), nanoparticles (NPs), colchicine-loaded nanoparticles (NPs-C), or free colchicine (C). The percentage of liver and spleen weight relative to total body weight – C/. The concentration of ALT and AST in the sera of animals – D/. The

concentration of Creatinine in the sera of animals – E/. The concentration of Troponin Type 1 in the sera of all animal groups – F/. NPs-C – nanoparticles loaded with colchicine, NPs – empty nanoparticles, EB – experimental buffer, F – female, M – male. Results are presented as the mean values $\pm$ SD. Statistical analysis for liver and spleen weight was performed by one-way ANOVA and Šídák's multiple comparisons test. Statistical analysis for graphs D, E, and F was performed using the Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post-hoc multiple comparisons test. ns – $p > 0.05$, (*) – $p \leq 0.05$, (**) – $p \leq 0.01$, (***) – $p \leq 0.001$, (****) – $p \leq 0.0001$. For each group of animals, $n=5$.

The concentrations of the liver enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), which are established markers of hepatotoxicity, were measured in the sera of animals exposed to colchicine-containing nanoparticles (NPs-C), empty nanoparticles (NPs), or a control buffer (EB). The results (Fig. 7D) showed no statistically significant differences in ALT enzyme levels between the animals treated with colchicine-containing nanoparticles (NPs-C) and the control group (EB), which received the experimental buffer or were exposed to empty nanoparticles (NPs). This lack of difference was consistent regardless of the sex of the animals.

Similar results were observed for the AST enzyme, but only in female animals. In contrast, a slight but statistically significant increase in AST concentration was noted in the male group receiving NPs-C when compared to the control group (EB). However, all values obtained for the liver enzymes tested remained within the reference range recognized for *Mus musculus* species, not exceeding 221 U/L.

Additionally, creatinine concentrations were measured in the serum of the animals to evaluate the effect of colchicine-loaded nanoparticles (NPs-C) on renal function. The results, presented in Fig. 7E, show that the creatinine concentration in the serum of all animals (both sexes) remained below 0.156 U/L, which is the lowest but still measured value in the creatinine standard test. Therefore, these results indicate that NPs-C does not have any nephrotoxic effects in the *in vivo* system.

Finally, the cardiac troponin type 1 concentration was measured in serum isolated from the animals. Troponins are proteins that form part of the troponin-tropomyosin complex found in the thin fibers of cardiomyocyte myofibrils. The presence of troponins in serum indicates myocardial damage resulting from acute ischemia caused by mechanical, viral, or chemical stimuli^{14,15}. Due to the high concentration of troponins in cardiomyocytes, even minor tissue damage can lead to increased serum concentrations. The results shown in Fig. 7F indicate that there were no statistically significant differences in the levels of cardiac troponin type 1 among the groups of animals treated with NPs-C, NPs, or EB control animals. This observation was consistent for both male and female

mice, with the cardiac troponin levels in all animal sera not exceeding 30 pg/ml. In humans, elevated levels of cardiac troponin are typically considered to range from 30 pg/ml for asymptomatic damage to 200 pg/ml for myocardial damage.¹⁴

Colchicine-Encapsulated Nanoparticles: Heart Distribution and Effectiveness in Macrophage Foam Cell Development *In Vitro*

To investigate the accumulation of colchicine-loaded nanoparticles (NPs) in organs, an experiment was conducted using NPs-C, which were pre-labeled with pyrene, a fluorescent compound. Preliminary *in vitro* studies with these nanoparticles showed that they did not exhibit cytotoxic effects against mouse L929 fibroblasts, as assessed by a test measuring metabolic activity by evaluating the reduction of MTT salt (Supplementary Data Fig. 2S).

The accumulation of NPs and NPs-C (pre-labeled with pyrene) in the hearts and livers of mice that received NPs, NPs-C, or experimental buffer (EB) was examined using thin paraffin sections (3 μ m) of the examined organs. Despite excluding the toxicity of pyrene-labeled preparations *in vitro* (Supplementary Fig.5S), they were administered to animals in three doses at three-day intervals. The selection of organs for biodistribution analysis of the tested preparations is related to the liver's cleansing function in the body and the potential use of NPs-C in the treatment of ASCVD.

Thin-layer preparations of heart tissues (non-stained or stained with haematoxylin and eosin) were analysed using a Leica MICA WideField fluorescence microscope, which allowed for simultaneous imaging of the same tissue sections under transmitted light. Pyrene fluoresces in the 365/480 nm range, while colchicine fluoresces in the 365/435 nm range. By using a detection wavelength of 365/454 nm, we observed fluorescence from both the empty nanoparticles and the encapsulated colchicine.

Our analysis showed that both empty nanoparticles (NPs) and colchicine-loaded nanoparticles (NPs-C) accumulated in the hearts of animals, regardless of their sex. The results in Fig. 8A indicate that fluorescence signals were detected in animals injected with empty NPs and NPs-C. In animals that received NPs-C, this suggests that the emitted fluorescence resulted from the combined action of nanoparticles and colchicine. However, this finding did not significantly alter the overall results, as shown in Figure 8A. Fluorescence intensity scans revealed that the highest intensity was observed in the hearts of male mice. The results for those treated with empty nanoparticles labeled with pyrene were statistically significant compared to the control group (Fig. 8A and 8B).

Similar observations were made for female mouse heart preparations; however, the differences in fluorescence intensity between the control group and the NPs- or NPs-C-treated group were not statistically significant.

The nanoparticles, NPs and NPs-C, that accumulated in the livers of animals exhibited weaker fluorescence compared to those in the hearts. This difference may be attributed to variations in tissue structure, as the liver has a more parenchymal composition. Additionally, it could result from insufficient exposure to the preparations, as only three doses were administered, along with the liver's strong cleansing properties (Supplementary data Fig. 6S).

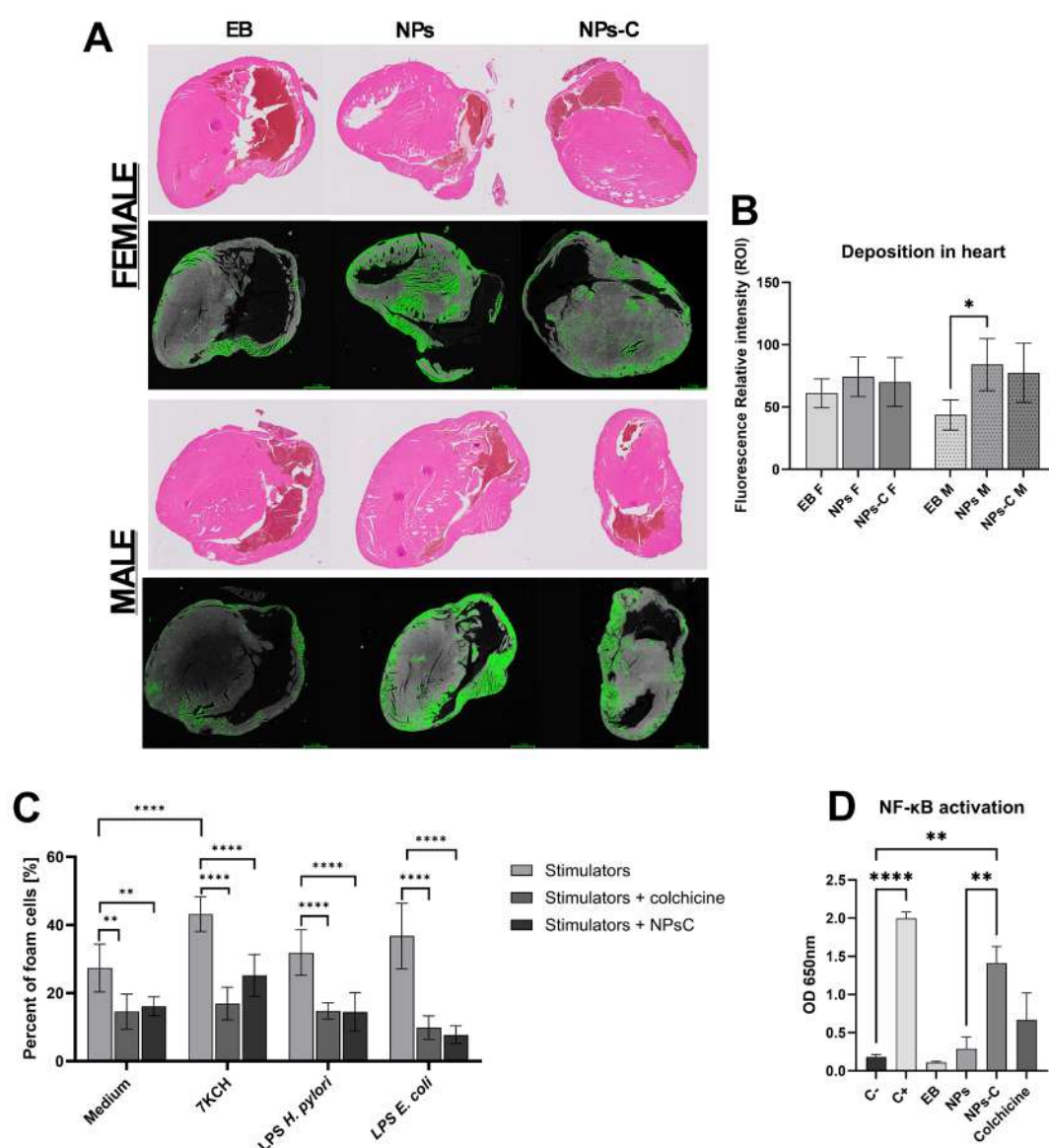


Fig. 8 Deposition of empty and colchicine-loaded nanoparticles in the heart - A/. Representative images showing thin-layer paraffin sections of heart tissue, stained with haematoxylin and eosin and photographed in transmitted light or non-stained and

photographed under a fluorescence microscope. The fluorescence intensity was calculated using the photographs in ImageJ – B/. Transformation of THP1 macrophages into foam cells upon stimulation with: medium, 7KCH, bacterial lipopolysaccharides: *Helicobacter pylori* (LPS *H.pylori*) or *Escherichia coli* (LPS *E.coli*) in the presence of free and loaded into nanoparticles colchicine – C/. NF- κ B pathway in THP-1 blue cells treated with NPs, NPs-C, or Colchicine for 24 hours – D/. NPs-C – nanoparticles loaded with colchicine, NPs – empty nanoparticles, EB – experimental buffer, F – female, M – male, 7KCH – 7-ketocholesterol. Results are presented as the mean values $\pm$ SD. Statistical analysis for graph B was performed using one-way ANOVA, and post-hoc Šídák multiple comparisons test, $n=5$; Statistical analysis for graph C was performed with two-way ANOVA followed by post-hoc Šídák multiple comparisons test $n=6$; Statistical analysis for graph D was performed using Brown-Forsythe and Welch ANOVA test, and post-hoc Dunnett's T3 multiple comparisons test, $n=4-6$. ns – $p > 0.05$, (*) – $p \leq 0.05$, (**) – $p \leq 0.01$, (***) – $p \leq 0.001$, (****) – $p \leq 0.0001$.

The development and progression of atherosclerosis are primarily driven by the accumulation and activity of foam cells, which play a central role in forming lesions. Previous research ¹⁶ indicates that soluble bacterial components, such as lipopolysaccharides from *E. coli* or *H. pylori*, encourage the transformation of macrophages into foam cells, similarly to the effect of 7KCH. It was decided to use the in vitro model that had been developed. ¹⁶ To evaluate the ability of both free colchicine and colchicine bound/released from NPs-C to regulate this process. Foam cell formation was assessed by oil-red O staining.

As shown in Fig. 8C, colchicine bound/released from NPs-C significantly inhibited the transformation of macrophages into foam cells induced by the oxidized form of cholesterol-7KCH or infectious agents: LPS *H. pylori* or LPS *E. coli*. The transformation of macrophages into foam cells induced by 7KCH was reduced by free colchicine or colchicine bound/released from nanoparticles from 43.2% to 16.9% or 25.2%, respectively. The spontaneous transformation of macrophages into foamy cells was also attenuated by exposing cells to free colchicine or an NP-C preparation. A similar trend was observed with bacterial stimulants such as *H. pylori* or *E. coli* LPS. In the case of *H. pylori* LPS, the transformation decreased from 31.9% to 14.8% with free colchicine and 14.5% with NPs-C. In the case of *E. coli* LPS, the transformation decreased from 36.7% to 9.8% with free colchicine and 7.7% with NPs-C. The results presented in Fig. 8C indicate that colchicine, when bound to NPs-C nanoparticles, can inhibit the transformation of macrophages into foam cells, similarly to the effects of free colchicine.

However, colchicine that is not bound to the carrier causes changes at the cellular level in THP-1 macrophages after just 1.5 hours of exposure (see Fig. 6).

The study also tested the activation of the NF- κ B signaling pathway in macrophages using THP1-Blue™ cells, which are specifically designed to monitor the activation of the NF- κ B transcription factor. This was assessed by measuring the activity of embryonic alkaline phosphatase (SEAP), as these cells contain a reporter gene for this purpose. The test involved empty nanoparticles at a concentration deemed safe for eukaryotic cells (0.21 mg/mL) to eliminate any potential pro-inflammatory effects that could arise from LPS-endotoxin contamination. The results (see Fig. 8D) indicate that no activation of the NF- κ B transcription factor was observed in the reporter cells cultured with the nanoparticles or those treated with the experimental buffer (EB). It is interesting that colchicine, not bound to a carrier, as well as released/bound to nanoparticles (NPs-C) at the concentration tested in *in vitro* studies (see Fig. 3E), stimulated the activation of the transcription factor NF- κ B in reporter cells (Fig. 8D). Although the stimulation is not as intense as after the positive control LPS *E. coli* (C+), it is significantly higher than the negative control (untreated cells C-).

Discussion

Ischemic heart disease (IHD) is one of the most serious chronic coronary vascular conditions and poses significant health and social challenges, often being life-threatening. Coronary artery disease (CAD) can arise from the disruption of vascular endothelial homeostasis, leading to endothelial dysfunction, which is usually accompanied by chronic pathological inflammation.^{17,18} Ongoing active inflammation can destabilize atherosclerotic plaques, resulting in their detachment. These plaques may then become lodged in narrowed blood vessels, causing blockages that, in advanced stages, can lead to ischemic events.

Anti-inflammatory drugs, such as celecoxib and rofecoxib, are used in the treatment of CAD by inhibiting the cyclooxygenase pathway, which affects vasodilation and thrombosis.^{17,19,20} Colchicine, which has been FDA-approved since 1961 for gout, has also shown cardiovascular benefits by inhibiting neutrophil function.^{3,4} Studies like LoDoCo (2008–2012) and COLCOT (2015–2018) demonstrated its effectiveness in reducing cardiovascular incidents with a low-dose regimen of 0.5 mg per day, although gastrointestinal side effects were reported.^{4,5} In June 2023, the FDA approved low-dose colchicine for the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease, expanding its therapeutic potential despite concerns regarding long-term side effects.²¹

Polymeric NPs are widely used for the encapsulation of drugs due to their ability to reduce the side effects and potential drug toxicity. The polylactide-poly(ethylene glycol) – PLA NPs are very interesting because of their biodegradability and biocompatibility. The encapsulation of colchicine inside the PLA NPs was first investigated by Tang et al.²² They utilized linear PLA copolymers with a carboxylic group to attach the targeting VHPK peptide, thereby enhancing the delivery of colchicine to endothelial cells in atherosclerotic plaques.²² Another approach to enhance the delivery of colchicine was proposed by Wang Y et al.²³ The encapsulation of colchicine in inorganic calcium carbonate nanoparticles reduced infarct size and attenuated myocardial fibrosis; however, the low loading capacity can significantly reduce its practical use.²³

In our model, methylated β -cyclodextrin was selected as the initiator for lactide polymerization because it can create an inclusion complex with colchicine, potentially reducing side effects.²⁴ Additionally, the microfluidic approach enables the production of NPs with better reproducibility compared to emulsion techniques, and the use of star-shaped PLA offers improved encapsulation efficiency over linear polymers.⁹ The study evaluated the metabolic activity of eukaryotic cells cultured for 72 hours with both nanoparticle-bound colchicine and free colchicine, given the potential negative impact of colchicine on cells during long-term exposure. The results confirmed that free colchicine had a toxic effect, significantly decreasing the metabolic activity of the tested cell lines. In contrast, colchicine released/bound to nanoparticles demonstrated a safer profile. Additionally, a noteworthy comparison was made between the effects of non-nanoparticle-bound colchicine and that released from the nanoparticle-colchicine complex. Unlike the free colchicine at the tested concentrations, the colchicine released from nanoparticles did not inhibit cell metabolic activity.

The results suggest that colchicine encapsulated in nanoparticles is released gradually, resulting in approximately 60% of the drug being released from the complex after 96 hours. Nanoparticles enable the slow release of colchicine, which helps minimize peak drug concentrations and thereby reduces the risk of cytotoxicity in eukaryotic cells, especially with prolonged exposure. In contrast, colchicine, not bound to any carrier, is rapidly adsorbed and distributed within the cell, resulting in high intracellular concentrations that can excessively disrupt microtubule dynamics. The toxicity of colchicine results from its binding to tubulin, which disrupts microtubule dynamics and impairs essential cellular functions such as mitosis, intracellular transport, and cell shape maintenance, leading to cytotoxic effects.²⁵

A cell-level cytobiosafety test was performed using light microscopy and TEM techniques with free colchicine and colchicine released/bound to nanoparticles. The research model consisted of THP-1 monocyte-macrophage cells, and the results obtained indicate that free colchicine caused visible damage to THP-1 cells after only 1.5 hours of exposure. In contrast, cells treated with colchicine and nanoparticles showed a morphology similar to that of the negative control. Monocyte-derived THP-1 cells were selected for TEM imaging due to the critical role of monocytes and macrophages in mediating immune responses to pro-inflammatory stimuli. Monocytes are actively recruited to sites of vascular injury, where they differentiate into macrophages and contribute to the activation of inflammatory pathways, including the NLRP3 inflammasome. Given the relevance of monocytes to inflammation and atherosclerosis, we utilized the THP-1 cell line to investigate how nanoparticle-encapsulated colchicine (NPs-C) interacts with cells central to the inflammatory response. Additionally, due to their phagocytic nature, monocytes are more likely to internalize nanoparticles, potentially resulting in enhanced intracellular accumulation and a more pronounced cytotoxic effect, making them a suitable model for ultrastructural studies using TEM. The dose used for THP-1 cells was selected based on preliminary cell viability assays, the results of which are provided in the Supplementary data (Fig.4S). For the TEM analysis, a colchicine concentration of 0.05 mg/mL—both in free form and encapsulated in NPs-C—was chosen, as it provided a measurable biological effect without inducing excessive cytotoxicity.

Furthermore, the study's results indicate that colchicine released or bound to nanoparticles had no effect on animal survival and did not exhibit any adverse effects on the liver or kidneys. This was demonstrated by measuring the concentrations of liver enzymes ALT and AST and creatinine levels in the sera of the tested mice. Furthermore, the encapsulated colchicine did not harm the heart muscle, as indicated by measuring the level of troponin type 1, a recognized biomarker of cardiac damage in mammals.^{14,15}

To investigate the biodistribution of colchicine in the body, we utilized modified nanoparticles labeled with the fluorescent dye pyrene. Although the labeled preparation did not show toxicity in vitro, mice were given only three doses of this preparation. Microscopic observations of thin-layer tissue preparations showed that the heart may be a site of accumulation of colchicine-containing nanoparticles. Considering that the preparation may be intended for treating cardiovascular disorders, the results are promising for further stages of formulation research.

Monocytes infiltrate the arterial wall and transform into macrophages, which engulf oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and become foam cells. These foam cells contribute to chronic inflammation by releasing pro-inflammatory cytokines and promoting the migration of smooth muscle cells, which in turn leads to lesion growth. Foam cells are vital to the fibrous cap of atherosclerotic plaques. When they undergo apoptosis, they release their lipid content, which forms a necrotic core rich in cholesterol crystals, thereby worsening plaque instability.²⁶ Research by Krupa et al.¹⁶ has revealed that soluble bacterial components, such as LPS from *E. coli* and *H. pylori*, facilitate the conversion of macrophages into foam cells, similarly to 7KCH. The finding highlights the role of infectious agents in the development of atherosclerosis, particularly given that *H. pylori* bacteria affect over 50% of the population. Additionally, it supports the leaky gut hypothesis,²⁷ which identifies the intestines as a primary habitat for *E. coli*.

The results indicate that colchicine released/bound to nanoparticles can effectively regulate the transformation of macrophages into foam cells induced by soluble bacterial components and 7KCH. Moreover, its effectiveness is comparable to that of free colchicine. However, a significant advantage of using colchicine encapsulated in a carrier is that it is non-toxic to cells (see Fig. 5 and Fig. 6).

Interestingly, free colchicine, as well as colchicine released/bound to nanoparticles (NPs-C) at the concentration tested in *in vitro* studies (see Fig. 3E), stimulated the activation of the transcription factor NF- κ B in reporter cells (Fig. 8D). The stimulation of NF- κ B signaling pathway activation was not as strong as that induced by LPS *E. coli* (positive control). However, it was still greater than in untreated cells (negative control). The role of the NF- κ B signaling pathway in inflammation and immune responses of cells is undeniable, and it is one of the most important signaling pathways in biology. However, it is essential to understand the dual nature of this transcription factor, which can act as an “enemy” by promoting pathological inflammation and as a “friend” by maintaining immune homeostasis.²⁸

Colchicine is primarily known for its anti-inflammatory properties, particularly due to its ability to inhibit the NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome.²⁹ Its interaction with the NF- κ B pathway, however, is complex and varies depending on the context. Studies suggest that colchicine generally inhibits NF- κ B activation, especially under conditions of oxidative stress or inflammation. For instance, in endothelial cells subjected to oxidative stress, colchicine was found to inhibit NF- κ B activation, which in turn reduced the expression of pro-inflammatory cytokines and

markers of cellular aging.³⁰ Nevertheless, the effects of colchicine can differ based on the cell type and specific circumstances. In neutrophils from healthy individuals, high doses of colchicine increased the expression of the NLRP3 and MEFV genes. However, there was no significant effect on NF- κ B p65 expression, indicating that the impact of colchicine on NF- κ B may not be consistent across different cellular contexts.³¹

Recently, there has been significant interest in nanopharmacology and modern carriers, such as polymeric nanoparticles, for controlled drug delivery systems (DDS). Polymeric nanoparticles are recognized for their stability in the bloodstream, their ability to avoid immune system stimulation, and their non-inflammatory properties. They can be made from both synthetic and natural polymers, including poly-l-lactide. Additionally, due to their small size and unique physical properties, these nanoparticles can deliver targeted drugs through the bloodstream while minimizing side effects.^{32,33}

Tang J et al. (2023)²² developed a new nanosystem for the delivery of colchicine encapsulated in nanoparticles in a complex - VHPK-PLGA@COL, which, according to the authors, ensured specific targeting of inflammatory endothelial cells and mitigation of plaque accumulation. The study was conducted using a mouse model of atherosclerosis ApoE - / -, and the effect of colchicine encapsulated in nanoparticles was compared to unbound colchicine. The researchers suggested that the effect of colchicine in the complex is achieved through the regulation of the NF- κ B / NLRP3 signaling pathway.

The clinical relevance of this novel nanoparticle-based delivery platform lies in its potential to overcome the dose-dependent toxicity limitations of colchicine, particularly during long-term treatment for cardiovascular disease. This study introduces a formulation that encapsulates colchicine in star-shaped PLA nanoparticles initiated with methylated β -cyclodextrin, which enhances drug loading and stability, enables sustained release, and reduces the peak concentration exposure associated with cytotoxicity. *In vitro* studies demonstrate preserved therapeutic effects, such as foam cell inhibition, alongside reduced immune cell toxicity. The observed *in vivo* accumulation of nanoparticles in cardiac tissue suggests the possibility of targeted delivery to inflamed cardiovascular sites, potentially enhancing while minimizing off-target effects. The colchicine-containing nanoparticles represent a significant advancement, as they improve drug delivery and reduce toxicity, particularly over prolonged use. However, it remains unclear whether the reduced cellular toxicity results from altered colchicine conformation after release from nanoparticles or from gradual, sustained drug release itself. Further research

is essential to clarify these mechanisms and to advance the preclinical and clinical evaluation of this promising therapeutic platform towards eventual clinical translation.

Materials and methods

Nanoparticles preparation and characterization

To prepare the NPs, 5 mg of M β CD-PLA and 2 mg of surfactant (PLDA-b-PEG) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were weighed into a vial. Subsequently, 1 ml of the solvent, 1-methyl-2-pyrrolidone (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), was added, and the solution was stirred using a magnetic stirrer. In the case of colchicine-loaded nanoparticles (NPs-C), 2 mg of colchicine (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was added to the M β CD-PLA and surfactant solution. Once a homogeneous mixture was obtained, the solution was transferred into a 10 ml glass syringe and placed in a microfluidic apparatus (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Nanoprecipitation was then conducted in the microfluidic apparatus using a solution containing NPs-C or NPs as the organic phase at a flow rate of 100 μ L/min, and the aqueous phase (distilled water) at a rate of 500 μ L/min. The entire solution was then collected in a Falcon tube containing 15 ml of distilled water. The size of the nanoparticles was determined using a dynamic light scattering (DLS) apparatus Zetasizer NanoZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK). The M β CD-PLA homopolymer was synthesized using the previously published methodology.³⁴ The stability of empty (NPs) and colchicine-containing nanoparticles (NPs-C) was measured over 12 days. At each time point, 2 ml of nanoparticle solution was collected in a glass cuvette, and the size was measured using a DLS instrument Zetasizer NanoZS (Malvern Panalytical, Malvern, UK). The nanoparticles were stored at room temperature.

Measurement of colchicine release from NPs-C

In the first step, a calibration curve of colchicine was performed using an Evolution 220 UV/Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), using solutions of the following concentrations: 2.5; 5; 10; 15; 20; 25; 30 μ g/ml. The measurement was performed at an analytical wavelength of 350 nm. The standard curve served as a reference against the colchicine release curve. Colchicine concentration was calculated from the equation of the curve ($y=0.0449x+0.001$). The drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE) were calculated based on the UV/Vis measurement. Firstly, 1 ml of the NPs-C solution was placed in an Eppendorf vial, and the water was removed under vacuum. Subsequently, the white precipitate was dissolved in CHCl₃ (Sigma-

Aldrich, Darmstadt, Germany), and the UV/Vis measurement was performed. The DL and EE were calculated according to the following equations:

$$DL = \frac{\text{Weight of the drug in nanoparticles}}{\text{Weight of the nanoparticles}} * 100$$

$$EE = \frac{\text{Actual drug loaded}}{\text{theoretical drug loaded}} * 100\%$$

The release process was carried out using a float-a-layer dialysis membrane (cut-off 3000), (Repligen, Waltham, MA, USA) introducing 1 ml of previously prepared NPs-C solutions loaded with colchicine (colchicine concentration in 1ml of the preparation was 0.4 mg). The membrane was placed in a vial containing 5 ml of Phosphate-Buffered Saline (PBS) buffer (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Absorbance was measured hourly from 1 to 7 hours, and then at 24, 48, and 96 hours. The nanoparticle solution was incubated at 37 °C. Before use, the membrane was activated for 24 hours in a 15% aqueous ethanol solution.

Cell culture

The cell lines used in the studies were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA (mouse fibroblasts L929 – CCL-1; human vascular endothelial cells - HUVEC - CRL-1730). The mouse fibroblasts L929 were cultured in RPMI-1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) formulated with L-Glutamine, HEPES (25mM) (Biowest, Nuaille, France) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; HyCloneCytiva, Marlborough, MA, USA), penicillin (100U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C in a cell culture incubator. The human THP-1 monocyte leukemic cells (TIB-202, ATCC) were cultured in RPMI-1640 formulated with L-Glutamine, HEPES (25mM, Biowest) medium supplemented with 10% FBS and 2-mercaptoethanol to a final concentration of 0.05 mM in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C in a cell culture incubator. THP1-Blue™ NF-κB monocytes (InvivoGen, San Diego, CA, USA) were cultured according to the producer's guidelines in RPMI-1640 formulated with L-Glutamine, HEPES (25mM, Biowest) supplemented with heat-inactivated 10% FBS (HyClone, Cytiva, Marlborough, MA, USA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 100 µg/mL normocin and 10 µg/mL blasticidin (selective antibiotics) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37

°C. The human HUVEC endothelial cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in endothelial growth medium 2 (EGM-2; PromoCell, Heidenberg Germany) enriched with Supplements mix containing 2% Fetal Calf Serum, Epidermal Growth Factor 5ng/ml, Basic Fibroblast Growth Factor 10ng/ml, Insulin-like Growth Factor 20ng/ml, vascular endothelial growth factor 0.5ng/ml, ascorbic acid one µg/ml, hydrocortisone 0.2 µg/ml, and heparin 22.5 µg/ml (PromoCell, Heidenberg Germany).

***In Vitro* Cytobiocompatibility Studies**

The cytobiocompatibility of empty NPs or colchicine-loaded NPs was assessed according to ISO 1099-3-2009 using reference mouse fibroblasts L929. Additionally, HUVEC and human colon cell line (LoVo) were employed to evaluate the cytocompatibility of NPs-C. Briefly, L929, HUVEC or LoVo cells were plated on 96-well plate at the density of 2×10^5 /ml (100 µl/well), incubated for 24 h at 37 °C and 5%CO₂, and treated with NPs or NPs-C at concentrations: 2.50; 1.88; 1.40; 0.70; 0.28; 0.21; 0.16; 0.12; 0.05 mg/ml or 1.00; 0.75; 0.50; 0.25; 0.10; 0.08; 0.05; 0.03; 0.01 mg/ml, respectively. Cells incubated with medium served as positive control (C+), whereas they were treated with 0.1% H₂O₂ as a negative control (C-). After 24 h of incubation, 20µl/well of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide solution (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, Michigan, USA), at a concentration of 5mg/ml, was added to the cells. After 4 hours, culture media were removed and formazan crystals dissolved in 150µl / well of DMSO solution. Absorbance was read using a reader Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 570 nm. The cytotoxicity of colchicine, free or released from NPs-C complex, was assessed using the same procedure.

NF-κB activation

THP1-Blue™ NF-κB cells were specially designed to monitor the NF-κB signal transduction pathway in a physiologically relevant cell line. The activation of the NF-κB signaling pathway in cells exposed to NPs was evaluated according to the procedure recommended by the test manufacturer (InvivoGen, Toulouse, France). The concentration of free colchicine and colchicine in NPs-C used in the test was 0.05 mg/ml. The empty nanoparticles were used at a concentration of 0.21 mg/ml (deemed safe for eukaryotic cells). The positive control in the test is lipopolysaccharide *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at a final concentration of 100 ng/ml, and the negative control is unstimulated cells.

***In vivo* studies**

The Local Ethics Committee approved all animal procedures for Animal Experiments (LKE9) at the Medical University of Lodz, appointed by the Ministry of Science and Higher Education. The approval number for the *in vivo* experiments conducted in this study is ŁB 278/2023. Ethical statement: The *in vivo* experiments were carried out by the EU Directive (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of September 22, 2010, on the protection of animals used for scientific purposes (OJ L 276, 20.10.2010, p. 33-79)). The study's animals come from the Faculty of Biology and Environmental Protection facility of the University of Lodz (Lodz, Poland). The animal facility meets all the required breeding and ethical standards, ensuring that animals are housed in appropriate living conditions by applicable regulations. It is officially registered in the Polish Register of Breeders under number 048, which confirms its legality and compliance with the rules governing the breeding of laboratory animals. The study used C57BL/6 mice weighing 18 to 24 g and aged 8 to 12 weeks (both genders). The animals were bred in an animal house at the Faculty of Biology and Environmental Protection at the University of Lodz (Lodz, Poland), housed in cages, provided with free drinking water, and fed standard food. During the study, the mice were divided into four groups (5 females and 5 males per group): a control group receiving a mixture of saline and an experimental buffer (5% N-methyl pyrrolidone in water for injection; EB), an experimental group receiving empty NPs, an experimental group receiving nanoparticles with colchicine (NPs-C), and an experimental group receiving colchicine (C). The animals received twelve doses of each preparation, administered intraperitoneally at three-day intervals. According to the DrugBank database, the LD50 value of colchicine for mice is 5.87 mg/kg (https://go.drugbank.com/drugs/DB01394?utm_source). To ensure safety, the preparations were diluted so that a single dose of colchicine did not exceed 25% of the LD50 value (1.47 mg/kg). Considering that an adult mouse weighs between 20 and 25 grams, the concentration of colchicine in a single dose was 0.03 mg (1.2 mg/kg). Both free colchicine and nanoparticle-bound colchicine preparations have been prepared accordingly. The animals were monitored daily, including body weight, water and food intake, behavioral symptoms, skin and coat condition, and the presence of diarrhea. After twelve doses, the animals were euthanized by administering a lethal dose of sodium barbiturate (Morbital, Biowet, Puławy, Poland). Blood samples were then taken for serum, and the spleen, liver, and heart tissue were preserved for further evaluation. The concentration of AST, ALT, creatinine, and troponin type 1 was measured in animal serum samples with commercial enzyme-linked immunosorbent assays

(ELISA): Mouse ALT, Mouse AST, Mouse Creatinine (Biorbyt, Cambridge, UK), and Mouse Troponin Type 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturer's protocols. To evaluate the organ accumulation of NPs and NPs-C, we administered pyrene-labeled NPs to mice (fluoresce at 365/480 nm). We divided the mice into three groups, each consisting of 5 males and 5 females. The groups received either EB, NPs, or NPs-C, as prepared in previous studies. The dosing was conducted three times at three-day intervals. Afterward, we collected the hearts and livers, prepared paraffin blocks, sectioned them into 3- μ m slices, and analyzed them using Leica MICA WideField fluorescence microscopy.

Transmission Electron Microscopy (TEM) and Light Microscopy of THP-1 cells

The nanoparticles' negative staining (NS) morphology was evaluated through NS-TEM analysis. 5 μ l of each sample was placed on a carbon film-coated 200 mesh copper EM grid (Polysciences Inc, Warrington, Pennsylvania, USA) and incubated for 2 minutes. Then, the sample was blotted with filter paper and negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate (UA, ACS Reagent, Polysciences Inc, Warrington, Pennsylvania, USA) for 60 seconds. The grids were allowed to air dry at room temperature for 5 minutes and imaged in transmission electron microscope JEM 1010 (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) at 100 kV. The developed films were scanned using the Perfection V700 PHOTO scanner (Epson, Tokyo, Japan) at 600 dpi. To analyze the ultrastructure of the cells, THP-1 cells were placed in Eppendorf tubes and fixed for 3 hours with 2.5% glutaraldehyde (Polysciences, Inc, Warrington, Pennsylvania, USA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) (pH 7.2) at 4°C. After fixation, the cells were centrifuged at 500 x g for 3 minutes, rinsed with PBS for 30 minutes, and suspended in molten 2% agar. The agar blocks were then rinsed twice in PBS for 30 minutes and fixed in 1% osmium tetroxide (Polysciences, Inc. Warrington, Pennsylvania, USA) in PBS for 2 hours at 4°C. The material was then dehydrated in 10%, 30%, and 50% ethanol three times for 15 minutes. The samples were stained overnight at 4°C with 50% ethanol of uranyl acetate. After further dehydration in an ethanol concentration gradient (70%, 80%, 90%, and 100%) (POCH, Gliwice Poland) and propylene oxide (Polysciences, Inc, Warrington, Pennsylvania, USA), the samples were infiltrated and embedded in a mixture of Epon - Spurr resins (Polysciences, Inc, Warrington, Pennsylvania, USA) and then polymerized for 3 days at increasing temperatures (37°C, 60°C, and 72°C). The epoxy resin blocks were then cut with a diamond knife using an Ultra Cut E ultra-microtome (Reichert Jung, Depew, New York, USA). The ultra-thin sections (70 nm) were placed on

formvar-coated nickel EM grids with a mesh size of 300 (Polysciences, Inc, Warrington, Pennsylvania, USA) and stained with 2% (w/v) UA and Reynold's reagent for 20 minutes. The ultrastructure of the cells was examined in a transmission electron microscope JEM 1010 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 100 kV.

Semithin sections (100 nm) of THP-1 cells were stained with 1% water solution of toluidine blue and imaged in transmitted light with the Leica TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Germany) confocal microscope.

Foam Cell Formation

The test for transforming macrophages into foam cells was carried out according to the protocol previously established by Krupa et al.¹⁶. Briefly, the test was performed using THP-1 cells transformed into macrophages using 50 nM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) for 72 hours at 37 °C with 5% CO₂, and then stimulated: 7KCH 40 ng/ml, LPS *H. pylori* 25 ng/ml, LPS *E. coli* 25 ng/ml) Also, in the presence of NPs-C or free colchicine, 24 hours at 37 °C is required with 5% CO₂. Cells were stained as previously described by Krupa *et al* 2021¹⁶ and visualized with a light microscope.

Statistical analysis

The graphs were prepared using GraphPad Prism 10.1.2 (324) software (<https://www.graphpad.com/features>), and the values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The Shapiro–Wilk test was used to assess the Gaussian distribution of data/residuals along with analysis of the Q-Q plots. The Brown-Forsythe test was used to test the equality of the group variances. Spearman's test for heteroscedasticity was used in the case of two-way ANOVA analysis. For 72-hour MTT results, absolute CC50 values were calculated based on a 4-parameter variable slope model with the least squares fit method. The best-fit CC50 values were compared using the extra-sum-of-squares F test to compare two nested models. Apart from an extra sum-of-squares F test to compare absolute CC50 values, Mann-Whitney tests with two-tailed p-values were performed to compare average rank cell viability values between colchicine and NPs-C for each concentration separately. Nonetheless, we adjusted for multiple comparisons using the Holm-Šidák method; therefore, the adjusted p-value is reported. The Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test was performed for each MTT assay (24 h and 72 h) to compare each concentration of free colchicine, NPs, or NPs-C with untreated cells.

Statistical analysis of liver and spleen weights was performed using one-way ANOVA with post-hoc Šídák's multiple comparisons test. Statistical analysis for concentration of AST, ALT, creatinine, and troponin was performed using the Kruskal–Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post-hoc multiple comparisons test. Statistical analysis for THP-1 macrophage transformation into foam cells was performed using two-way ANOVA, followed by a post-hoc Šídák multiple comparisons test. In all statistical analyses performed, alpha was set to 0.05; therefore, p value <0.05 was considered statistically significant.

Data availability

All data of this study are available within the paper and its Supplementary Information. Should any raw data files be needed, they are available from the corresponding author upon reasonable request.

Statement

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. The in vivo study is reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Literature:

1. Dasgeb, B. *et al.* Colchicine: an ancient drug with novel applications. *British Journal of Dermatology* **178**, 350–356 (2018).
2. Zhang, F. *et al.* Therapeutic potential of colchicine in cardiovascular medicine: a pharmacological review. *Acta Pharmacol Sin* **43**, 2173–2190 (2022).
3. Leung, Y. Y., Yao Hui, L. L. & Kraus, V. B. Colchicine—Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum* **45**, 341–350 (2015).
4. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* **381**, 2497–2505 (2019).
5. Nidorf, S. M., Eikelboom, J. W., Budgeon, C. A. & Thompson, P. L. Low-Dose Colchicine for Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* **61**, 404–410 (2013).
6. Nidorf, S. M. *et al.* Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *New England Journal of Medicine* **383**, 1838–1847 (2020).
7. Deftereos, S. G. *et al.* Colchicine in Cardiovascular Disease: In-Depth Review. *Circulation* **145**, 61–78 (2022).
8. Nidorf, S. M., Ben-Chetrit, E. & Ridker, P. M. Low-dose colchicine for atherosclerosis: long-term safety. *Eur Heart J* **45**, 1596–1601 (2024).

9. Kost, B. *et al.* Stereocomplexed micelles based on polylactides with β -cyclodextrin core as anti-cancer drug carriers. *Eur Polym J* **120**, 109271 (2019).
10. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release* **235**, 337–351 (2016).
11. Fonseca-Gomes, J. *et al.* In vivo Bio-Distribution and Toxicity Evaluation of Polymeric and Lipid-Based Nanoparticles: A Potential Approach for Chronic Diseases Treatment. *Int J Nanomedicine* **Volume 15**, 8609–8621 (2020).
12. Turner, P. V, Brabb, T., Pekow, C. & Vasbinder, M. A. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **50**, 600–13 (2011).
13. Lewis, R. J. *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 11th Edition.* (Wiley-Interscience, Wiley & Sons, Inc. Hoboken, 2004).
14. Duffy, P. A. *et al.* Biomarkers for safety and toxicology: Drug induced cardiac injury and dysfunction. *European Journal of Cancer Supplements* **5**, 143–151 (2007).
15. Marcinkowska, E., Flisiński, M. & Manitius, J. [Diagnostic and prognostic value of cardiac troponins in patients with chronic kidney disease]. *Pol Merkur Lekarski* **23**, 375–81 (2007).
16. Krupa, A. *et al.* Helicobacter pylori Infection Acts Synergistically with a High-Fat Diet in the Development of a Proinflammatory and Potentially Proatherogenic Endothelial Cell Environment in an Experimental Model. *Int J Mol Sci* **22**, 3394 (2021).
17. Davignon, J. & Ganz, P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* **109**, (2004).
18. Hajar, R. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views* **18**, 109–114 (2017).
19. Li, T., Liang, W., Xiao, X. & Qian, Y. Nanotechnology, an alternative with promising prospects and advantages for the treatment of cardiovascular diseases. *Int J Nanomedicine* **Volume 13**, 7349–7362 (2018).
20. Pello Lázaro, A. M., Blanco-Colio, L. M., Franco Peláez, J. A. & Tuñón, J. Anti-Inflammatory Drugs in Patients with Ischemic Heart Disease. *J Clin Med* **10**, 2835 (2021).
21. Hughes Sue. FDA OKs Low-Dose Colchicine for Broad CV Indication. *Medscape* (2023).
22. Tang, J. *et al.* Colchicine delivered by a novel nanoparticle platform alleviates atherosclerosis by targeted inhibition of NF- κ B/NLRP3 pathways in inflammatory endothelial cells. *J Nanobiotechnology* **21**, 460 (2023).
23. Wang, L. *et al.* Colchicine-Containing Nanoparticles Attenuates Acute Myocardial Infarction Injury by Inhibiting Inflammation. *Cardiovasc Drugs Ther* **36**, 1075–1089 (2022).

24. Gao, H. *et al.* The inclusion mode, characterization and cytotoxic activity evaluation of host-guest complex by β -cyclodextrin trimer with podophyllotoxin. *J Mol Struct* **1315**, 138972 (2024).
25. Finkelstein, Y. *et al.* Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin Toxicol (Phila)* **48**, 407–14 (2010).
26. Milioti, N., Bermudez-Fajardo, A., Penichet, M. L. & Oviedo-Orta, E. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Dev Immunol* **2008**, 723539 (2008).
27. Camilleri, M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut* **68**, 1516–1526 (2019).
28. Guo, Q. *et al.* NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduct Target Ther* **9**, 53 (2024).
29. Silvis, M. J. M. *et al.* Colchicine reduces extracellular vesicle NLRP3 inflammasome protein levels in chronic coronary disease: A LoDoCo2 biomarker substudy. *Atherosclerosis* **334**, 93–100 (2021).
30. Zhou, H. *et al.* Colchicine prevents oxidative stress-induced endothelial cell senescence via blocking NF- κ B and MAPKs: implications in vascular diseases. *J Inflamm* **20**, 41 (2023).
31. Manukyan, G., Petrek, M., Navratilova, Z., Margaryan, S. & Boyajyan, A. Transcriptional activity of neutrophils exposed to high doses of colchicine: short communication. *J Biol Regul Homeost Agents* **29**, 125–30 (2015).
32. Niemirowicz, K. & Car, H. Nanonośniki jako nowoczesne transportery w kontrolowanym dostarczaniu leków. *CHEMIK* **66**, 868–881 (2012).
33. Kučuk, N., Primožič, M., Knez, Ž. & Leitgeb, M. Sustainable Biodegradable Biopolymer-Based Nanoparticles for Healthcare Applications. *Int J Mol Sci* **24**, 3188 (2023).
34. Kost, B. *et al.* PLA Stereocomplexed Microspheres Modified with Methyl- β -Cyclodextrin as an Atropine Delivery System. Synthesis and Characterization. *Mater Today Commun* **25**, 101605 (2020).

Funding. The research was funded by the University of Lodz Initiative for Excellence - Research University - Senior Research Grants project number *IDUB* B2211002000121.07

Author contributions. All authors contributed to the study. Conceptualization: AK, TR, AT, MCh; methodology: AK, AT, BK, MB; nanoparticle preparation: BK, MB;

performance of in vitro and in vivo experiments: AT, AK, BK, MN, MK; microscopy: LB, SG; data analysis: AT, AK, MCh; writing and revising the manuscript: AK, AT, MCh, TR, BK, MB; All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interest. The authors declare no competing interests

Supplementary data

List of contents:

Fig.1S - Characterization of nanoparticles - Construction diagram

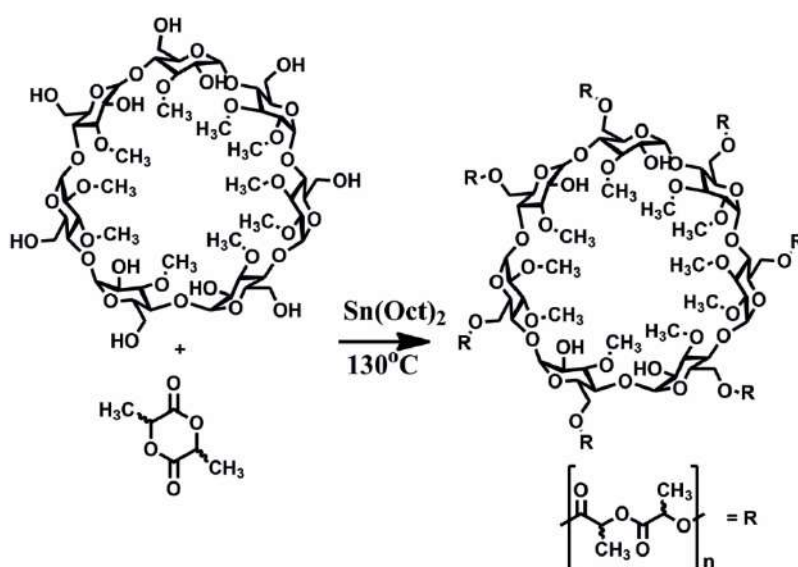
Fig.2S - FTIR analysis

Fig.3S - Metabolic activity of L929 cells treated with colchicine for 24 hours

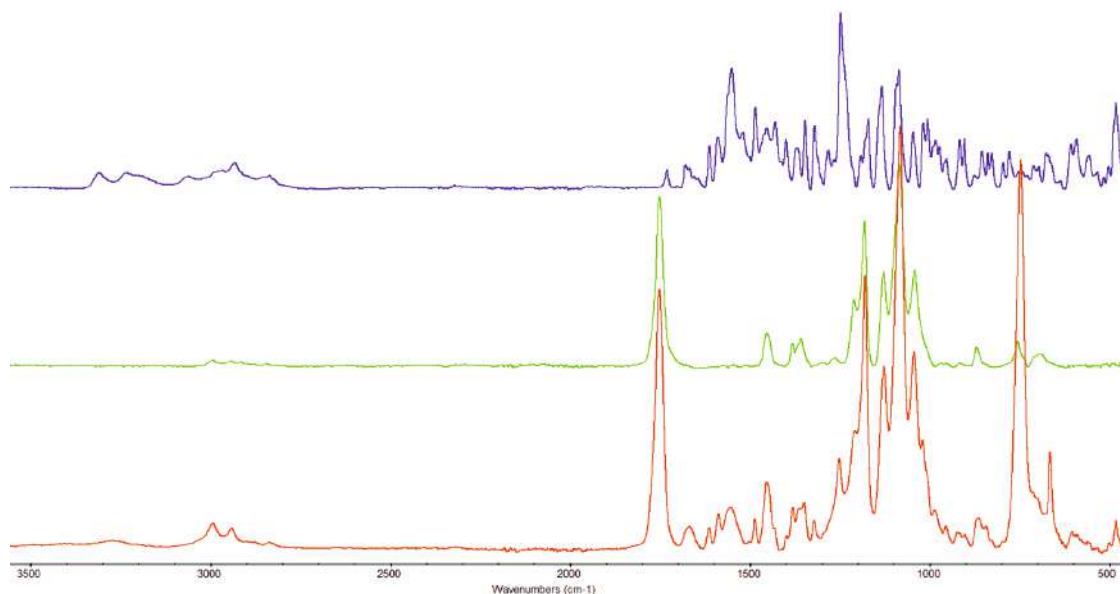
Fig.4S - Metabolic activity of THP1 cells treated with NPs-C for 24 hours

Fig.5S - Metabolic activity of L929 cells treated with empty nanoparticles pre-labeled with pyrene (NPs) for 24 hours

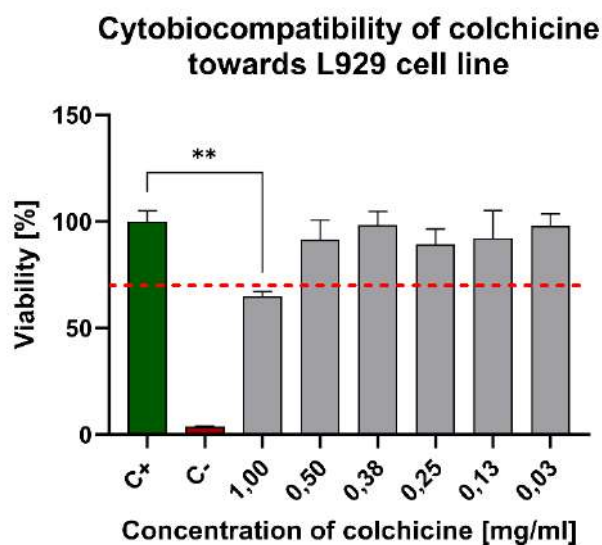
Fig.6S - Deposition of empty and colchicine-loaded nanoparticles in the liver



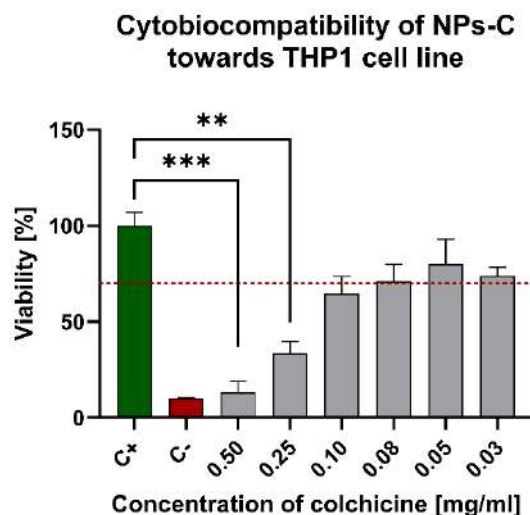
Supplementary Fig. 1S. Characterization of nanoparticles - Construction diagram.



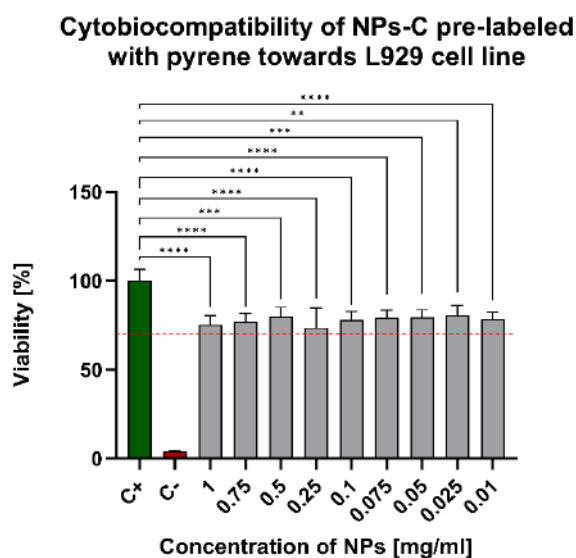
Supplementary Fig. 2S. The spectra of spectra for the pure colchicine (blue line), NPs (green line), and NPs-C (red line).



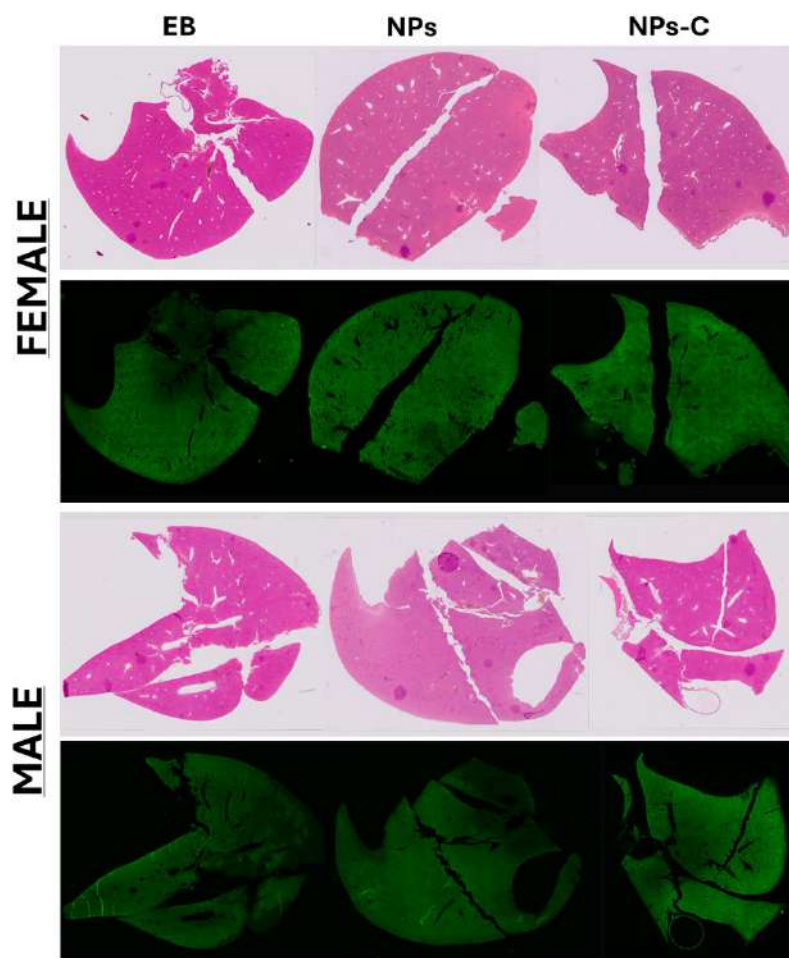
Supplementary Fig. 3S. Metabolic activity of L929 cells treated with colchicine for 24 hours. C⁺ - untreated cells, C⁻ - cells treated with 0,1% H₂O₂. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn's post-hoc multiple comparisons test, n ≥ 5; ns – p > 0.05, (*) – p ≤ 0.05, (**) – p ≤ 0.01, (***) – p ≤ 0.001, (****) – p ≤ 0.0001.



Supplementary Fig. 4S. Metabolic activity of THP1 cells treated with NPs-C for 24 hours. C⁺ - untreated cells, C⁻ - cells treated with 0,1% H₂O₂. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn's post-hoc multiple comparisons test, $n \geq 5$; ns – $p > 0.05$, (*) – $p \leq 0.05$, (**) – $p \leq 0.01$, (***) – $p \leq 0.001$, (****) – $p \leq 0.0001$.



Supplementary Fig. 5S. Metabolic activity of L929 cells treated with empty nanoparticles pre-labeled with pyrene (NPs) for 24 hours. C⁺ - untreated cells, C⁻ - cells treated with 0,1% H₂O₂. Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Dunn's post-hoc multiple comparisons test, $n \geq 16$; ns – $p > 0.05$, (*) – $p \leq 0.05$, (**) – $p \leq 0.01$, (***) – $p \leq 0.001$, (****) – $p \leq 0.0001$.



Supplementary Fig.6S. Deposition of empty and colchicine-loaded nanoparticles in the liver. Representative images showing thin-layer paraffin sections of liver tissue, stained with hematoxylin and eosin and photographed in transmitted light or non-stained and photographed under a fluorescence microscope. EB – experimental buffer; NPs – empty nanoparticles; NPs-C – nanoparticles loaded with colchicine.

7. Podsumowanie wyników

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że:

- Zakażenie *H. pylori* w połączeniu z dietą wysokotłuszczową może przyczyniać się do rozwoju wczesnych zmian promiażdżycowych, takich jak zespół metaboliczny, stan zapalny śródbłónka oraz stłuszczenie wątroby
- LPS *H. pylori* i wzorcowy LPS *E. coli* aktywują inflamasom NLRP3 który uczestniczy w transformacji makrofagów w komórki piankowate
- Receptory TREM2 występują w tkance naczyniowej pacjentów z ChNS i miażdżycą eksponowanych na zakażenie *H. pylori*, a w surowicy takich pacjentów występują w formie rozpuszczalnej (sTREM2). Ekspresja receptorów TREM2 zlokalizowanych na komórkach linii monocytarno-makrofagowej THP-1 jest modulowana przez LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli*, lub 7KCH.
- Kolchicina uwolniona/związana z NPs wykazuje istotnie słabsze działanie cytotoksyczne wobec komórek eukariotycznych w warunkach długotrwałej ekspozycji niż kolchicina w formie wolnej, zachowując jednocześnie swoją aktywność funkcjonalną

8. Dyskusja

Miażdżyca to przewlekła choroba zapalna, która prowadzi do odkładania lipidów i komórek odpornościowych w ścianach naczyń krwionośnych, co skutkuje tworzeniem blaszek miażdżycowych. Z czasem blaszki te zwężają światło naczyń i ograniczają przepływ krwi, co czyni miażdżycę główną przyczyną chorób sercowo-naczyniowych i zgonów na świecie. Do rozwoju stanu zapalnego przyczyniają się czynniki genetyczne, środowiskowe, styl życia i przewlekłe zakażenia.

Zespół metaboliczny to zestaw zaburzeń metabolicznych, zapalnych i prozapalnych, które zwiększają ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy i stłuszczenia wątroby. Diagnozuje się go, gdy u pacjenta występują co najmniej trzy z pięciu objawów: wysokie stężenie trójglicerydów, niskie stężenie HDL, nadciśnienie, cukrzyca typu 2 lub insulinooporność oraz brzuszna otyłość. Rozwój zespołu metabolicznego i progresja miażdżycy są ściśle związane z przewlekłym, ogólnoustrojowym stanem zapalnym⁸³.

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie rolą czynników zakaźnych, zwłaszcza bakterii i ich komponentów, takich jak LPS, który może wywoływać przewlekły stan zapalny, który przyczynia się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i/lub metabolicznych⁸³. Zakażenie *H. pylori*, skutkuje rozwojem przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka lub dwunastnicy, które może być manifestowane także na obwodzie i przez to sprzyjać rozwojowi miażdżycy. Szczepy *H. pylori*, zwłaszcza CagA-dodatnie, nasilają produkcję cytokin prozapalnych przez komórki nabłonkowe żołądka, a także śródbłónka naczyniowego. Napływ komórek immunokompetentnych takich jak granulocyty i makrofagi do miejsca kolonizacji i ich aktywacja nasilają stres oksydacyjny, sprzyjający dalszemu uszkodzeniu bariery nabłonkowej i utrwaleniu reakcji zapalnej, co prowadzi do aktywacji układu odpornościowego i rozwoju uogólnionej reakcji zapalnej. Ta przewlekła odpowiedź zapalna sprzyja dysfunkcji śródbłónka naczyniowego, aktywacji płytek krwi oraz zaburzeniom metabolicznym, które razem zwiększają ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych.

W pierwszej części niniejszej rozprawy doktorskiej (Publikacja I) oceniano wpływ LPS *H. pylori* i wzorcowego LPS *E. coli* oraz utlenionych steroli na rozwój zmian promiażdżycowych w śródbłónku naczyniowym i zespołu metabolicznego w powiązaniu ze stłuszczeniem wątroby. Wzięto pod uwagę, że w warunkach stresu oksydacyjnego

indukowanego zakażeniem może dochodzić do utleniania lipidów, co czyni je bardziej prozapalnymi.

W badaniach zastosowano model zwierzęcy - kawii domowych z eksperymentalnym zakażeniem *H. pylori* i karmionych dietą wysokotłuszczową. Zwierzęta podzielono na cztery grupy: niezakażone na diecie standardowej, zakażone *H. pylori* na diecie standardowej, niezakażone na diecie wysokotłuszczowej oraz zakażone *H. pylori* na diecie wysokotłuszczowej [P.I]. Wykazano istotnie wyższy poziom LDL w surowicy zwierząt na diecie wysokotłuszczowej w porównaniu z grupami na diecie standardowej. Najwyższe stężenie LDL zaobserwowano u zwierząt zakażonych *H. pylori* na diecie wysokotłuszczowej. Sama infekcja *H. pylori* bez diety wysokotłuszczowej nie powodowała znaczącego wzrostu stężenia LDL, co wskazuje na kluczową rolę diety wysokotłuszczowej jako czynnika determinującego stężenie LDL, jako czynnika proaterogennego. Podobne zależności opisano w badaniu Haeri i wsp. z roku 2018, w którym wykazano zakażenie *H. pylori* było powiązane z podwyższonym stężeniem LDL u osób zakażonych, zwłaszcza u mężczyzn.

LDL dopiero w środowisku bogatym w wolne rodniki łatwo ulegają utlenieniu do oxLDL, i w takiej formie wykazują silne właściwości prozapalne i sprzyjają dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w przebiegu miażdżycy ⁸⁴. Jednym z markerów stresu oksydacyjnego i w efekcie utlenienia lipidów jest 4HNE - cząsteczka, która w wysokich stężeniach prowadzi do uszkodzenia i obumierania komórek ⁸⁵.

Wyniki uzyskane w publikacji [P.I.] wskazują na nasilone odkładanie oxLDL i wzrost ilości 4HNE w aortach zwierząt zakażonych *H. pylori* na diecie wysokotłuszczowej, co pozostawało w związku z nasileniem apoptozy komórek śródbłonna. Sugeruje to, że utlenione lipidy osłabiają barierę śródbłonkową, sprzyjając wczesnemu rozwojowi zmian miażdżycowych i postępującej utracie elastyczności naczyń⁸⁶. We wcześniejszych badaniach wykazano nasilenie stresu oksydacyjnego w nabłonku żołądka kawii zakażonych *H. pylori*, a także w hodowlach *in vitro* pierwotnych komórek nabłonkowych żołądka tych zwierząt po ekspozycji na LPS *H. pylori*, co pozostawało w związku ze wzrostem liczby komórek ulegających apoptozie w takim środowisku⁸⁷. Pomiar sztywności naczyń przeprowadzony w niniejszej pracy u badanych zwierząt wykazał, że u zwierząt zakażonych *H. pylori*, nawet przy diecie standardowej, naczynia są bardziej sztywne co może być związane z odkładaniem się w nich oksydowanych lipidów. Efekt taki może być również spowodowany odkładaniem się w ścianie naczyń kompleksów immunologicznych powstałych w odpowiedzi na

zakażenie⁸⁸. Wyniki prezentowane w publikacji [P.I.] potwierdzają wzrost liczby centrów namnażania limfocytów B w śledzionie, co wskazuje na rozwój humoralnej odpowiedzi immunologicznej na antygeny *H. pylori*. Powstające przeciwciała mogą uczestniczyć w tworzeniu kompleksów immunologicznych, które odkładając się w naczyniach mogą sprzyjać dysfunkcji naczyń i nasilaniu reakcji zapalnej.

Stan zapalny odgrywa kluczową rolę w rozwoju zespołu metabolicznego i zaburzeń sercowo-naczyniowych. Jednym z jego powikłań jest stłuszczenie wątroby typu MAFLD, prowadzące do odkładania trójglicerydów w hepatocytach i ich uszkodzenia. MAFLD może ulegać progresji do stłuszczeniowego zapalenia wątroby (MASH), a następnie do zwłóknienia i marskości wątroby⁸⁹⁻⁹¹. Ze względu na wspólne czynniki ryzyka, MAFLD uznaje się za potencjalny wczesny marker zmian miażdżycowych, które fenotypowo są możliwe do identyfikacji znacznie później⁹¹.

W publikacji [P.I.] wykazano nasilone stłuszczenie wątroby u kawii domowych zakażonych *H. pylori* i karmionych dietą wysokotłuszczową, podczas gdy u zwierząt niezakażonych na takiej diecie zmiany były słabiej wyrażone. U zakażonych zwierząt zaobserwowano również obecność hepatocytów balonowatych, co może sugerować wczesny etap rozwoju MASH, choć brak nacieków zapalnych i zwłóknienia uniemożliwia jednoznaczne potwierdzenie tego zespołu. Wyniki te są zgodne z badaniami He i wsp.⁹², którzy wykazali, że dopiero połączenie diety wysokotłuszczowej z zakażeniem *H. pylori* wpływa na rozwój stłuszczenia wątroby u myszy. U osób z MAFLD obserwowano wyższy poziom przeciwciał IgG anti-*H.pylori* oraz obecność DNA tych bakterii w tkance wątrobowej⁹³⁻⁹⁵. Wyniki uzyskane w publikacji [P.I.] wskazują, że współistnienie zakażenia *H. pylori* i zaburzeń metabolicznych może sprzyjać rozwojowi wczesnych zmian miażdżycowych.

Stan zapalny w obrębie naczyń krwionośnych zaburza homeostazę i funkcję komórek śródbłonna naczyniowego, a także prowadzi do rekrutacji monocytów, które po przekształceniu w makrofagi fagocytują oxLDL, tworząc komórki piankowate. Te z kolei intensyfikują stan zapalny, wydzielając cytokiny i stymulując migrację komórek mięśni gładkich, co sprzyja rozrostowi blaszek miażdżycowych. Szczególną rolę odgrywa proaterogenna IL-1 β , wydzielana wskutek aktywacji inflamasomu NLRP3⁹⁶. Jego aktywacja zachodzi pod wpływem wzorców molekularnych związanych zarówno z uszkodzeniem tkanek, jak i wzorców czynników zakaźnych t.j. LPS.

Nieopublikowane wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują na silną aktywację inflamasomu NLRP3 w makrofagach linii THP1 pod

wpływem ekspozycji wyłącznie na LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli*, lub w obecności 7-KCH. Same utlenione sterole wykazywały ograniczoną zdolność do indukowania aktywacji NLRP3. Aktywacja inflamasomu oceniona była również na podstawie stężenia IL-1 β w podłożach pohodowlanych, co pozwoliło na ocenę jego funkcjonalnej aktywności. Uzyskane wyniki były zgodne z oceną fluorescencyjną, a zatem LPS, samodzielnie lub LPS w obecności utlenionych steroli, nasilały wydzielanie IL-1 β , czego nie obserwowano w odpowiedzi na same sterole.

Zaobserwowane różnice w aktywacji inflamasomu NLRP3 mogą być rezultatem zaangażowania różnych mechanizmów. Inflamasom może być aktywowany poprzez szlaki: klasyczny lub nieklasyczny lub alternatywny⁹⁶. W klasycznym mechanizmie, aktywacja prowadzi do tworzenia wewnątrzkomórkowego aktywnego kompleksu inflamasomu, złożonego z receptora rozpoznającego wzorce NLRP3, białka adaptorowego ASC oraz prokaspazy-1, następnie aktywacji kaspazy-1, produkcji IL-1 β , IL-18 oraz indukcji pyroptozy w komórce. Z kolei szlak nieklasyczny opiera się na rozpoznaniu LPS w cytoplazmie, co prowadzi do aktywacji kaspazy-4 i -5, rozszczepienia gasderminy D i wywołania pyroptozy. Alternatywny mechanizm aktywacji, charakterystyczny dla monocytów, nie wymaga etapu inicjacji i uruchamiany jest bezpośrednio przez oddziaływanie TLR4 z pozakomórkowym LPS⁹⁷.

LPS jest silnym aktywatorem inflamasomu NLRP3, zdolnym do uruchomienia tego szlaku na wymienionych powyżej trzech drogach. W przeciwieństwie do LPS, utlenione sterole pełnią głównie rolę sygnału inicjującego. Co więcej, aktywacja inflamasomu indukowana przez LPS zachodzi szybciej i intensywniej niż pod wpływem utlenionych steroli, które wywołują wolniejszą i mniej dynamiczną odpowiedź^{98–100}.

Komórki piankowate odgrywają kluczową rolę w formowaniu blaszki miażdżycowej; ich apoptoza prowadzi do uwolnienia lipidów i tworzenia martwiczego rdzenia z kryształami cholesterolu, co zwiększa niestabilność blaszki¹⁰¹. Badania wykonane przez Krupa i wsp.²¹ wykazały, że LPS *H. pylori* lub LPS *E. coli*, podobnie jak 7KCH, indukują przekształcenie makrofagów w komórki piankowate, podkreślając możliwość udziału czynników zakaźnych w rozwoju miażdżycy. Potwierdzenie w niniejszej pracy aktywacji inflamasomu NLRP3 przez LPS *H. pylori* było przesłanką do zbadania jego roli w procesie transformacji makrofagów w komórki piankowate. W tym celu wykorzystano dwie linie komórkowe monocytarno-makrofagowe: THP-1 typu dzikiego (z funkcjonalnym inflamasomem) oraz linię THPKONLRP3 z wyciszonym genem *NLRP3*. Komórki obu linii stymulowano przez 24 godzinny: 7KCH, LPS

H. pylori, LPS *E. coli* rozdzielnie lub łącznie. W linii THP-1 wszystkie czynniki, niezależnie lub łącznie, indukowały transformację makrofagów w komórki piankowate²¹. Natomiast w linii THPKONLRP3 efekt ten nie występował, a liczba komórek piankowatych pozostawała na poziomie samoistnej transformacji komórek w samym podłożu. Wyniki te pozwalają sugerować rolę inflamasomu NLRP3 w tym procesie, choć nie można wykluczyć udziału innych mechanizmów komórkowych.

Jednym z receptorów, które mogą uczestniczyć w regulacji funkcji makrofagów, jest receptor wyzwalający występujący na komórkach mieloidalnych 2 (TREM2). Jest to pojedyncze białko transbłonowe obecne m.in. w makrofagach tkanki tłuszczowej czy serca. Składa się z domeny zewnątrzkomórkowej (odpowiedzialnej za wiązanie ligandów, takich jak DNA, produkty bakteryjne i lipoproteiny), domeny transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Zewnątrzkomórkowa część TREM2 może być łatwo odcinana przez proteazy, prowadząc do powstania rozpuszczalnej formy receptora TREM2 (sTREM2)^{50,82}.

W odpowiedzi dochodzi do ciągłej syntezy i transportu nowych cząsteczek TREM2 na powierzchnię komórki, co pozwala na utrzymanie aktywności receptora. Z tego względu poziom sTREM2 w osoczu lub płynie mózgowo-rdzeniowym może odzwierciedlać stopień aktywacji TREM2 przez jego ligand. Wzrost stężenia sTREM2 uznawany jest za potencjalny wskaźnik aktywności makrofagów w odpowiedzi na uszkodzenia tkanek i może pełnić rolę biomarkera diagnostycznego oraz prognostycznego. W chorobach układu sercowo-naczyniowego poziom sTREM2 jest istotnie wyższy u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca niż u osób zdrowych. Ponadto podwyższone stężenie sTREM2 w surowicy wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych, co czyni ten marker potencjalnie użytecznym w ocenie ryzyka niestabilności blaszki miażdżycowej i przewidywaniu incydentów sercowo naczyniowych^{50,82}.

Pilotażowe badania wykonane na materiale klinicznym (fragmenty aort oraz surowice pacjentów z różnym stopniem miażdżycy) miały na celu ocenę receptorów TREM2 w tkance naczyniowej lub w surowicy (sTREM2) w odniesieniu do zaawansowania miażdżycy. Obecność sTREM stwierdzono u 50% pacjentów, u których dominowały zaawansowane zmiany miażdżycowe oraz wyższa była częstość klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. U pacjentów z sTREM2 częściej występowały przeciwciała anti-*H. pylori*, co może wskazywać na udział zakażenia w modulacji ekspresji TREM2. Dalsze badania na większej liczbie sklasyfikowanych

diagnostycznie pacjentów pozwolą uzyskać wiarygodne dane na temat możliwości wykorzystania sTREM2 jako potencjalnego markera diagnostycznego miażdżycy w odniesieniu do zakażenia *H. pylori*.

Miażdżycą to powszechna choroba cywilizacyjna XXI wieku o złożonym patomechanizmie i licznych czynnikach ryzyka, dla której wciąż nie opracowano kompleksowego leczenia. Obecne terapie koncentrują się na redukcji stężenia frakcji LDL cholesterolu poprzez działanie statyn i diety, jednak stan zapalny w obrębie blaszek miażdżycowych nadal utrzymuje wysokie ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych¹⁰². Reakcja zapalna przyczynia się do destabilizacji blaszki, jej pęknięcia i zatorów prowadzących do niedokrwienia. W odpowiedzi na te dane, w 2023 roku FDA (z ang. Food and Drug Administration) zatwierdziła terapię przeciwzapalną w formie niskiej dawki kolchicyny (0,5mg/dobę) jako uzupełnienie leczenia statynami⁷⁶. Mimo oczekiwanego działania przeciwzapalnego, kolchicina może powodować działania niepożądane, głównie ze strony układu pokarmowego.

W ostatnim etapie rozprawy doktorskiej zaproponowano innowacyjne rozwiązanie polegające na enkapsulacji kolchicyny w polimerowych nanocząstkach, co miało na celu zmniejszenie potencjalnych działań niepożądanych leku (Publikacja II). Do otrzymania nanocząstek wykorzystano polimer gwiaździsty, otrzymany w wyniku polimeryzacji laktydu, inicjowanej metylovaną β -cyklodekstryną, która dodatkowo pełniła funkcję kompleksującą, tworząc kompleks inkluzyjny z kolchicyną. Nanocząstki zostały wytworzone metodą mikroprzepływów, która pozwala na precyzyjną kontrolę procesu oraz zapewnia wysoką powtarzalność i efektywność enkapsulacji^{103,104}.

Otrzymane nanocząstki z załadowaną kolchicyną (NPs-C) charakteryzowały się wysoką stabilnością oraz korzystnym profilem uwalniania leku, gdyż kolchicina była uwalniana stopniowo, osiągając poziom uwalniania około 60% po 96 godzinach, z wyraźnym wzrostem stężenia w pierwszych 8 godzinach. Taki model kontrolowanego i długotrwałego uwalniania pozwala uniknąć gwałtownego wzrostu stężenia leku wewnątrz komórek. Ograniczenie gwałtownej ekspozycji na lek może znacząco zmniejszyć ryzyko wystąpienia działań cytotoksycznych, co jest szczególnie istotne przy długoterminowej terapii.

Działanie toksyczne wolnej kolchicyny wynika z jej wpływu na mikrotubule. Mechanizm ten zaburza dynamikę powstawania mikrotubul, jednocześnie podstawowe funkcje komórkowe, takie jak mitozę, transport wewnątrzkomórkowy i utrzymanie kształtu komórki¹⁰⁵.

Uzyskane w publikacji II wyniki wskazują, że kolchicina zamknięta, a następnie uwolniona z nanocząstek zachowuje swoją aktywność funkcjonalną i jest biozgodna oraz mniej toksyczna wobec wybranych komórek eukariotycznych, co wykazano na modelach *in vitro* i *in vivo*.

Otrzymane w pracy wyniki nie pozwalają określić mechanizmu jaki prowadzi do zmniejszenia toksycznego działania kolchicyny związanej i uwolnionej z nanocząstek. Po zamknięciu w nanocząstkach może zmieniać się konformacja kolchicyny, na korzyść zmniejszenia jej działania cytotoksycznego przy jednoczesnym zachowaniu aktywności przeciwzapalnej. Nie bez znaczenia dla osłabienia efektu cytotoksycznego kolchicyny może być stopniowe i długotrwałe uwalnianie leku z NPs. Konieczne są dalsze badania, które wyjaśnią te mechanizmy, ponieważ ich zrozumienie jest kluczowe dla dalszego rozwoju i zastosowania opracowanych nanocząstek.

9. Literatura

1. Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Heart J* **39**, 508–579 (2018).
2. Libby, P. *et al.* Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 56 (2019).
3. Libby, P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature* **592**, 524–533 (2021).
4. Libby, P. & Theroux, P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation* **111**, 3481–3488 (2005).
5. Cimmino, G. *et al.* Non-Conventional Risk Factors: “Fact” or “Fake” in Cardiovascular Disease Prevention? *Biomedicines* **11**, 2353 (2023).
6. Wang, L., Lei, J., Wang, R. & Li, K. Non-Traditional Risk Factors as Contributors to Cardiovascular Disease. *Rev Cardiovasc Med* **24**, (2023).
7. Caesar, R., Fåk, F. & Bäckhed, F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *J Intern Med* **268**, 320–328 (2010).
8. Carnevale, R. *et al.* Localization of lipopolysaccharide from Escherichia Coli into human atherosclerotic plaque. *Sci Rep* **8**, 3598 (2018).
9. Lawson, J. S. Multiple Infectious Agents and the Origins of Atherosclerotic Coronary Artery Disease. *Front Cardiovasc Med* **3**, (2016).
10. Yoshiyama, H. & Nakazawa, T. Unique mechanism of for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect* **2**, 55–60 (2000).
11. Marshall, B. & Warren, J. R. UNIDENTIFIED CURVED BACILLI IN THE STOMACH OF PATIENTS WITH GASTRITIS AND PEPTIC ULCERATION. *The Lancet* **323**, 1311–1315 (1984).
12. Elbehiry, A. *et al.* Helicobacter pylori: Routes of Infection, Antimicrobial Resistance, and Alternative Therapies as a Means to Develop Infection Control. *Diseases* **12**, 311 (2024).
13. Sealy-Jefferson, S. *et al.* Antibody Levels to Persistent Pathogens and Incident Stroke in Mexican Americans. *PLoS One* **8**, e65959 (2013).
14. Longo-Mbenza, B. *et al.* Helicobacter pylori infection is identified as a cardiovascular risk factor in Central Africans. *Vasc Health Risk Manag* 455 (2012) doi:10.2147/VHRM.S28680.
15. Gonciarz, W., Krupa, A., Moran, A. P., Tomaszewska, A. & Chmiela, M. Interference of LPS H. pylori with IL-33-Driven Regeneration of Caviae porcellus Primary Gastric Epithelial Cells and Fibroblasts. *Cells* **10**, 1385 (2021).
16. Chmiela, M., Gajewski, A. & Rudnicka, K. *Helicobacter pylori* vs coronary heart disease - searching for connections. *World J Cardiol* **7**, 187 (2015).

17. Moyat, M. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* **20**, 5583 (2014).
18. Mnich, E. *et al.* Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by *Helicobacter pylori* antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion. *Acta Biochim Pol* **62**, 641–650 (2015).
19. Matusiak, A., Rechciński, T. & Bąk-Romaniszyn, L. Atherosclerosis and coronary heart disease - correlation with *H. pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections. *Helicobacter* **14**, 358–359 (2009).
20. Jamkhande, P. G., Gattani, S. G. & Farhat, S. A. *Helicobacter pylori* and cardiovascular complications: a mechanism based review on role of *Helicobacter pylori* in cardiovascular diseases. *Integr Med Res* **5**, 244–249 (2016).
21. Krupa, A. *et al.* *Helicobacter pylori* Infection Acts Synergistically with a High-Fat Diet in the Development of a Proinflammatory and Potentially Proatherogenic Endothelial Cell Environment in an Experimental Model. *Int J Mol Sci* **22**, 3394 (2021).
22. Franceschi, F. Role of *Helicobacter pylori* infection on nutrition and metabolism. *World J Gastroenterol* **20**, 12809 (2014).
23. Gonciarz, W. *et al.* Autoantibodies to a specific peptide epitope of human Hsp60 (<sc>ATVLA</sc>) with homology to *Helicobacter pylori* HspB in *H. pylori* - infected patients. *APMIS* **127**, 139–149 (2019).
24. Gonciarz, W. *et al.* Antibodies towards TVLLPVIFF Amino Acid Sequence of TNF Receptor Induced by *Helicobacter pylori* in Patients with Coronary Heart Disease. *J Clin Med* **11**, 2545 (2022).
25. Dang, B. N. & Graham, D. Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance: a WHO high priority? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 383–384 (2017).
26. Gonciarz, W., Chyb, M. & Chmiela, M. *Mycobacterium bovis* BCG increase the selected determinants of monocyte/macrophage activity, which were diminished in response to gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Sci Rep* **13**, 3107 (2023).
27. Gonciarz, W., Chyb, M. & Chmiela, M. Diminishing of *Helicobacter pylori* adhesion to *Cavia porcellus* gastric epithelial cells by BCG vaccine mycobacteria. *Sci Rep* **13**, 16305 (2023).
28. Gonciarz, W., Płoszaj, P. & Chmiela, M. *Mycobacterium bovis* BCG reverses deleterious effects of *H. pylori* components towards gastric barrier cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **178**, 117193 (2024).
29. Gonciarz, W., Chmiela, M., Kost, B., Piątczak, E. & Brzeziński, M. Stereocomplexed microparticles loaded with *Salvia cadmica* Boiss. extracts for enhancement of immune response towards *Helicobacter pylori*. *Sci Rep* **13**, 7039 (2023).
30. Ayada, K. *et al.* Chronic Infections and Atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **37**, 44–48 (2009).

31. Padilla, C. *et al.* Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* **41**, 350–353 (2006).
32. Kilic, A., Onguru, O. & Tugcu, H. Detection of cytomegalovirus and Helicobacter pylori DNA in arterial walls with grade III atherosclerosis by PCR. *Pol J Microbiol* **55**, 333–337 (2006).
33. Rosenfeld, M. & Ann Campbell, L. Pathogens and atherosclerosis: Update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* **106**, 858–867 (2011).
34. Allahverdian, S., Chehroudi, A. C., McManus, B. M., Abraham, T. & Francis, G. A. Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis. *Circulation* **129**, 1551–1559 (2014).
35. Takahashi, Y., Zhu, H. & Yoshimoto, T. Essential Roles of Lipoxygenases in LDL Oxidation and Development of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **7**, 425–431 (2005).
36. Jebari-Benslaiman, S. *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **23**, 3346 (2022).
37. Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res* **114**, 1852–1866 (2014).
38. Ramos, C. L. *et al.* Direct Demonstration of P-Selectin– and VCAM-1–Dependent Mononuclear Cell Rolling in Early Atherosclerotic Lesions of Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Circ Res* **84**, 1237–1244 (1999).
39. Lin, J., Kakkar, V. & Lu, X. Impact of MCP -1 in Atherosclerosis. *Curr Pharm Des* **20**, 4580–4588 (2014).
40. Galkina, E. & Ley, K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* **27**, 165–197 (2009).
41. Peled, M. & Fisher, E. A. Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. *Front Immunol* **5**, (2014).
42. De Paoli, F., Staels, B. & Chinetti-Gbaguidi, G. Macrophage Phenotypes and Their Modulation in Atherosclerosis. *Circulation Journal* **78**, 1775–1781 (2014).
43. Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V. & Orekhov, A. N. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* **20**, 17–28 (2016).
44. Maitra, U., Parks, J. S. & Li, L. An Innate Immunity Signaling Process Suppresses Macrophage ABCA1 Expression through IRAK-1-Mediated Downregulation of Retinoic Acid Receptor α and NFATc2. *Mol Cell Biol* **29**, 5989–5997 (2009).
45. Kim, T. W. *et al.* The Critical Role of IL-1 Receptor-Associated Kinase 4-Mediated NF- κ B Activation in Modified Low-Density Lipoprotein-Induced Inflammatory Gene Expression and Atherosclerosis. *The Journal of Immunology* **186**, 2871–2880 (2011).
46. Bobryshev, Y. V. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* **37**, 208–222 (2006).

47. Bennett, M. R., Sinha, S. & Owens, G. K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 692–702 (2016).
48. Kong, P. *et al.* Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 131 (2022).
49. Tanase, D. M. *et al.* Portrayal of NLRP3 Inflammasome in Atherosclerosis: Current Knowledge and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* **24**, 8162 (2023).
50. Wang, S., Cao, C. & Peng, D. The various roles of TREM2 in cardiovascular disease. *Front Immunol* **16**, (2025).
51. Deng, H. *et al.* New Classification of Macrophages in Plaques: a Revolution. *Curr Atheroscler Rep* **22**, 31 (2020).
52. Guo, X. *et al.* TREM2 promotes cholesterol uptake and foam cell formation in atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **80**, 137 (2023).
53. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84 (2016).
54. Polyzos, S. A., Kechagias, S. & Tsochatzis, E. A. Review article: non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular diseases: associations and treatment considerations. *Aliment Pharmacol Ther* **54**, 1013–1025 (2021).
55. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* **64**, 1388–1402 (2016).
56. Garbuzenko, D. V. Pathophysiological mechanisms of cardiovascular disorders in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* **15**, 194–203 (2022).
57. Gehrke, N. & Schattenberg, J. M. Metabolic Inflammation—A Role for Hepatic Inflammatory Pathways as Drivers of Comorbidities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Gastroenterology* **158**, 1929–1947.e6 (2020).
58. Hirase, T. & Node, K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **302**, H499–H505 (2012).
59. Halcox, J. P. *et al.* Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. *BMC Cardiovasc Disord* **17**, 160 (2017).
60. Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J. & Tveden-Nyborg, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**, 3313–3327 (2018).
61. Dabravolski, S. A., Bezsonov, E. E., Baig, M. S., Popkova, T. V. & Orekhov, A. N. Mitochondrial Lipid Homeostasis at the Crossroads of Liver and Heart Diseases. *Int J Mol Sci* **22**, 6949 (2021).

62. Saeed, A. *et al.* Remnant-Like Particle Cholesterol, Low-Density Lipoprotein Triglycerides, and Incident Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* **72**, 156–169 (2018).
63. Shulman, G. I. Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. *New England Journal of Medicine* **371**, 1131–1141 (2014).
64. Dasgeb, B. *et al.* Colchicine: an ancient drug with novel applications. *British Journal of Dermatology* **178**, 350–356 (2018).
65. Zhang, F. *et al.* Therapeutic potential of colchicine in cardiovascular medicine: a pharmacological review. *Acta Pharmacol Sin* **43**, 2173–2190 (2022).
66. Leung, Y. Y., Yao Hui, L. L. & Kraus, V. B. Colchicine—Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum* **45**, 341–350 (2015).
67. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* **381**, 2497–2505 (2019).
68. Imazio, M. & Nidorf, M. Colchicine and the heart. *Eur Heart J* **42**, 2745–2760 (2021).
69. Cronstein, B. N. *et al.* Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* **96**, 994–1002 (1995).
70. Astiawati, T. *et al.* The Emerging Role of Colchicine to Inhibit NOD-like Receptor Family, Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome and Interleukin-1 β Expression in In Vitro Models. *Biomolecules* **15**, 367 (2025).
71. Opstal, T. S. J. *et al.* Colchicine Attenuates Inflammation Beyond the Inflammasome in Chronic Coronary Artery Disease. *Circulation* **142**, 1996–1998 (2020).
72. Nidorf, S. M., Eikelboom, J. W., Budgeon, C. A. & Thompson, P. L. Low-Dose Colchicine for Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* **61**, 404–410 (2013).
73. Deftereos, S. G. *et al.* Colchicine in Cardiovascular Disease: In-Depth Review. *Circulation* **145**, 61–78 (2022).
74. Nidorf, S. M. *et al.* Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *New England Journal of Medicine* **383**, 1838–1847 (2020).
75. Nidorf, S. M., Ben-Chetrit, E. & Ridker, P. M. Low-dose colchicine for atherosclerosis: long-term safety. *Eur Heart J* **45**, 1596–1601 (2024).
76. Hughes Sue. FDA OKs Low-Dose Colchicine for Broad CV Indication. *Medscape* (2023).
77. Kučuk, N., Primožič, M., Knez, Ž. & Leitgeb, M. Sustainable Biodegradable Biopolymer-Based Nanoparticles for Healthcare Applications. *Int J Mol Sci* **24**, 3188 (2023).
78. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. & He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).

79. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* **19**, 477–489 (2019).
80. Kloc, M., Kubiak, J. Z. & Ghobrial, R. M. Macrophage-, Dendritic-, Smooth Muscle-, Endothelium-, and Stem Cells-Derived Foam Cells in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **23**, 14154 (2022).
81. Turnbull, I. R. *et al.* Cutting Edge: TREM-2 Attenuates Macrophage Activation. *The Journal of Immunology* **177**, 3520–3524 (2006).
82. Liu, W. *et al.* Serum soluble TREM2 is an independent biomarker associated with coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* **548**, 117499 (2023).
83. Aboonabi, A., Meyer, R. R. & Singh, I. The association between metabolic syndrome components and the development of atherosclerosis. *J Hum Hypertens* **33**, 844–855 (2019).
84. Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A. & Nasri, H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* **5**, 927–46 (2014).
85. Nègre-Salvayre, A. *et al.* Proatherogenic effects of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* **111**, 127–139 (2017).
86. Jiang, H. *et al.* Mechanisms of Oxidized LDL-Mediated Endothelial Dysfunction and Its Consequences for the Development of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* **9**, 925923 (2022).
87. Gajewski, A. Ł. *et al.* Accumulation of Deleterious Effects in Gastric Epithelial Cells and Vascular Endothelial Cells In Vitro in the Milieu of Helicobacter pylori Components, 7-Ketocholesterol and Acetylsalicylic Acid. *Int J Mol Sci* **23**, 6355 (2022).
88. Grebowska, A. *et al.* Potential role of LPS in the outcome of Helicobacter pylori related diseases. *Pol J Microbiol* **55**, 25–30 (2006).
89. Day, C. P. & Saksena, S. Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* **17 Suppl 3**, S377-84 (2002).
90. Pacifico, L. *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Carotid Atherosclerosis in Children. *Pediatr Res* **63**, 423–427 (2008).
91. Pais, R., Redheuil, A., Cluzel, P., Ratziu, V. & Giral, P. Relationship Among Fatty Liver, Specific and Multiple-Site Atherosclerosis, and 10-Year Framingham Score. *Hepatology* **69**, 1453–1463 (2019).
92. He, C. *et al.* Helicobacter pylori infection aggravates diet-induced nonalcoholic fatty liver in mice. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **42**, 360–367 (2018).
93. Kim, T. J. *et al.* A cohort study on Helicobacter pylori infection associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* **52**, 1201–1210 (2017).
94. Pirouz, T., Zounubi, L., Keivani, H., Rakhshani, N. & Hormazdi, M. Detection of Helicobacter pylori in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. *Dig Dis Sci* **54**, 1456–9 (2009).

95. Polyzos, S. A. *et al.* Helicobacter pylori infection in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **62**, 121–126 (2013).
96. Karasawa, T. & Takahashi, M. Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **24**, 443–451 (2017).
97. Paik, S. *et al.* Updated insights into the molecular networks for NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* **22**, 563–596 (2025).
98. Crowley, S. M., Vallance, B. A. & Knodler, L. A. Noncanonical inflammasomes: Antimicrobial defense that does not play by the rules. *Cell Microbiol* **19**, e12730 (2017).
99. Rhoads, J. P. *et al.* Oxidized Low-Density Lipoprotein Immune Complex Priming of the Nlrp3 Inflammasome Involves TLR and FcγR Cooperation and Is Dependent on CARD9. *The Journal of Immunology* **198**, 2105–2114 (2017).
100. Bissonnette, S. *et al.* Native low-density lipoproteins are priming signals of the NLRP3 inflammasome/interleukin-1β pathway in human adipose tissue and macrophages. *Sci Rep* **13**, 18848 (2023).
101. Milioti, N., Bermudez-Fajardo, A., Penichet, M. L. & Oviedo-Orta, E. Antigen-Induced Immunomodulation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Dev Immunol* **2008**, 1–15 (2008).
102. Ridker, P. M. The Time to Initiate Anti-Inflammatory Therapy for Patients With Chronic Coronary Atherosclerosis Has Arrived. *Circulation* **148**, 1071–1073 (2023).
103. Gao, H. *et al.* The inclusion mode, characterization and cytotoxic activity evaluation of host-guest complex by β-cyclodextrin trimer with podophyllotoxin. *J Mol Struct* **1315**, 138972 (2024).
104. Kost, B. *et al.* Stereocomplexed micelles based on polylactides with β-cyclodextrin core as anti-cancer drug carriers. *Eur Polym J* **120**, 109271 (2019).
105. Finkelstein, Y. *et al.* Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin Toxicol (Phila)* **48**, 407–14 (2010).

10. Dorobek naukowy

10.1 Pozostałe publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej

- 2021 – „Interference of LPS *H. pylori* with IL-33 Driven Regeneration of *Caviae porcellus* Primary Gastric Epithelial Cells and Fibroblasts” Gonciarz W, Krupa A, Moran AP, **Tomaszewska A**, Chmiela M. Cells. 2021; 10(6): 1385. DOI: 10.3390/cells10061385
IF:6.600/MEIN:140
- 2022 – „Antibodies towards TVLLPVIFF Amino Acid Sequence of TNF Receptor Induced by *Helicobacter pylori* in Patients with Coronary Heart Disease.” Gonciarz W, **Tomaszewska A**, Krupa A, Rechciński T, Chałubiński M, Broncel M, Chmiela M. Journal of Clinical Medicine. 2022, 11(9): 2545. doi: 10.3390/jcm11092545 **IF:4.964/MEIN:140**
- 2023 – „Covalent segmented polymer networks composed of poly(2-isopropenyl-2-oxazoline) and selected aliphatic polyesters: designing biocompatible amphiphilic materials containing degradable blocks.” Kopka B, Kost B, Pawlak A, **Tomaszewska A**, Krupa A, Basko M. Soft Matter. 2023 Sep 5. doi: 10.1039/d3sm00948c
IF: 3.4/MEIN:140
- 2023 – „Clindamycin-Loaded Nanosized Calcium Phosphates Powders as a Carrier of Active Substances.” Słota D, Piętak K, Florkiewicz W, Jampilek J, Tomala A, Urbaniak MM, **Tomaszewska A**, Rudnicka K, Sobczak-Kupiec A. Nanomaterials. 2023, 13(9):1469. doi:10.3390/nano13091469
IF: 5.3 / MEIN: 100
- 2024 – „Biocompatible, porous hydrogels composed of aliphatic polyesters and poly(2-isopropenyl-2-oxazoline). Their application as scaffolds for bone tissue regeneration.” Kopka B, Kost B, Pawlak A, Bąk-Sypień I, Brzeziński M, **Tomaszewska A**, Krupa A, Józwiak P, Basko M. Soft Matter. 2024 Aug 22;20(33):6655-6667. doi: 10.1039/d4sm00615a
IF:2,9 / MEIN:100
- 2024 – „Crosslinked hybrid polymer/ceramic composite coatings for controlled release of clindamycin.” Słota D, Urbaniak MM, **Tomaszewska A**, Niziołek K, Włodarczyk M, Florkiewicz W, Szwed-Georgiou A, Krupa A, Sobczak-Kupiec A. Biomaterials Science. 2024, Oct 8;12(20):5253-5265. doi: 10.1039/d4bm00055b
IF:5,8 / MEIN:140

10.2 Projekty

Projekt: IDUB Uniwersytetu Łódzkiego Doktoranckie Granty Badawcze

Okres trwania: 11.2021–03.2023

Tytuł: „Inflamasom NLRP3 jako główny czynnik regulujący aktywność makrofagów piankowatych w patogenezie miażdżycy – zastosowanie innowacyjnych nanocząstek, sprzężonych z kolchicyną, w hamowaniu rozwoju i progresji zmian zapalnych i promiażdżycowych zachodzących w obrębie komórek makrofagowych.”

Rola w projekcie: Kierownik

Projekt: Projekt B+R z firmą Scope Fluidics

Okres trwania: 06.2021-08.2021

Tytuł: „Badanie walidacyjne sprzętu do automatycznego oznaczania lekowrażliwości szczepów klinicznych (400 izolatów) w odniesieniu do metody referencyjnej.”

Rola w projekcie: Wykonawca

Projekt: Projekt B+R z SUPROBION spółka z. o. o.

Okres trwania: 09.2022-11.2022

Tytuł: „Badanie skuteczności nowych formułacji oftalmologicznych: wieloskładnikowych nanoliposomalnych kropli oraz maści wzbogaconych o niesteroidowe składniki o działaniu przeciwzapalnym i antybiotycznym na króliczym modelu syndromu suchego oka.”

Rola w projekcie: Wykonawca

Projekt: Projekt B+R z SKOTAN S.A.

Okres trwania: 01.2023-03.2023

Tytuł: „Badanie wpływu biomasy i składników komórek drożdży *Yarrowia lipolytica* Novel Food na odporność i stymulację układu immunologicznego”

Rola w projekcie: Wykonawca

Projekt: Projekt B+R z

Okres trwania: 03.2024-06.2024

Tytuł: „Fulvic Acid-Mediated Inhibition of Inflammation: Implications for Tissue Regeneration and Microbiome Homeostasis”

Rola w projekcie: Wykonawca

Projekt: Projekt B+R z firmą ATMAT

Okres trwania: 09.08.24–30.08.24

Tytuł: „Badanie cytozgodności surowców i wydruków 3D z polikaprolaktonu i hydroksyapatytu modyfikowanego cynkiem przeznaczonych do zastosowań w medycynie regeneracyjnej tkanki kostnej”

Rola w projekcie: Wykonawca

11. Załączniki

Łódź, 23.06.2025

mgr Agata Tomaszewska
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Weronika Gonciarz, Tomasz Rechciński, Magdalena Chmiela, Anna K. Kurdowska, Agnieszka Krupa, pt. *Helicobacter pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet opublikowanej w czasopiśmie *Scientific reports*, 14(1), 5764 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56308-7>, oświadczam, iż mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował 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.



Podpis

Łódź, 23.06.2025

dr hab. Weronika Gonciarz, Prof. UL
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Weronika Gonciarz, Tomasz Rechciński, Magdalena Chmiela, Anna K. Kurdowska, Agnieszka Krupa, pt. *Helicobacter pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet opublikowanej w czasopiśmie *Scientific reports*, 14(1), 5764 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56308-7>, oświadczam, iż mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował wykonanie badań in vivo, a także redagowanie treści manuskryptu, zarówno na etapie przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

.....
Gonciarz Weronika

Podpis

Łódź, 23.06.2025

dr hab. Agnieszka Krupa, Prof. UŁ
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Weronika Gonciarz, Tomasz Rechciński, Magdalena Chmiela, Anna K. Kurdowska, Agnieszka Krupa, pt. *Helicobacter pylori* components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet opublikowanej w czasopiśmie *Scientific reports*, 14(1), 5764 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56308-7>, oświadczam, iż mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował współtworzenie koncepcji badawczej, opracowanie metodologii badań, wykonania badań in vivo, analizę uzyskanych wyników, a także redagowanie treści manuskryptu, zarówno przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

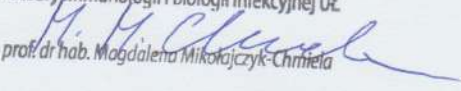
Łódź, 23.06.2025

prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela,
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Weronika Gonciarz, Tomasz Rechciński, Magdalena Chmiela, Anna K. Kurdowska, Agnieszka Krupa, pt. *Helicobacter pylori components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet* opublikowanej w czasopiśmie *Scientific reports*, 14(1), 5764 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56308-7>, oświadczam, iż mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował współtworzenie koncepcji badawczej, analizę uzyskanych wyników, a także redagowanie treści manuskryptu zarówno przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

KIEROWNIK
Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ

prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

.....
Podpis

Łódź, 24.06.2025

dr hab. Tomasz Rechciński
Klinika Kardiologii Katedry Kardiologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Weronika Gonciarz, Tomasz Rechciński, Magdalena Chmiela, Anna K. Kurdowska, Agnieszka Krupa, pt. *Helicobacter pylori components increase the severity of metabolic syndrome and its hepatic manifestations induced by a high fat diet* opublikowanej w czasopiśmie *Scientific reports*, 14(1), 5764 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56308-7>, oświadczam, iż mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował wykonanie pomiarów sztywności naczyń kawii domowych, a także redagowanie treści manuskryptu, zarówno na etapie przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Tomasz Rechciński

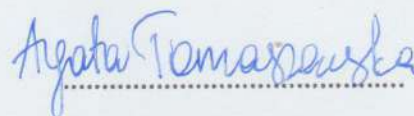
.....
Podpis

Łódź, 18.06.2025

mgr Agata Tomaszewska
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Lucja Balcerzak, Sława Gliška, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa, pt *Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy: In Vitro and In Vivo Evaluation* wysłanej do czasopisma Scientific Reports, oświadczam, że mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował współtworzenie koncepcji badawczej, opracowanie metodologii, przeprowadzenie badań *in vitro* i *in vivo*, analizę uzyskanych wyników, a także redagowanie treści manuskryptu, zarówno przed, jak i po recenzji.



Podpis

Łódź, 18.06.2025

dr Bartłomiej Kost
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Lucja Balcerzak, Sława Glińska, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa, pt. *Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy: In Vitro and In Vivo Evaluation* wysłanej do czasopisma Scientific Reports, oświadczam, że mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował: opracowanie metodologii syntezy polimerów wykorzystanych w badaniach, przeprowadzenie doświadczeń związanych z ich charakterystyką fizyko-chemiczną, a także redagowanie treści manuskryptu zarówno na etapie przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Łódź, 18.06.2025

prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela,
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Lucja Balcerzak, Sława Glińska, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa, pt. *Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy: In Vitro and In Vivo Evaluation* wysłanej do czasopisma Scientific Reports, oświadczam, iż mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował współtworzenie koncepcji naukowej, udział w analizie uzyskanych wyników, a także redagowanie treści manuskryptu zarówno przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

KIEROWNIK
Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ

prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

.....
Podpis

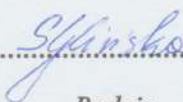
Łódź, 18.06.2025

dr Sława Gliška,
Pracownia Obrazowania Mikroskopowego
i Specjalistycznych Technik Biologicznych
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Łucja Balcerzak, Sława Gliška, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa, pt. *Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy: In Vitro and In Vivo Evaluation* wysłanej do czasopisma Scientific Reports, oświadczam, że mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował wykonanie obrazowania nanocząstek oraz komórek THP1, stymulowanych badanymi preparatami, z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, a także wizualizację tych komórek przy użyciu mikroskopii świetlnej

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

.....

Podpis

Łódź, 18.06.2025

dr hab. Agnieszka Krupa, Prof. UŁ
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Łucja Balcerzak, Sława Glińska, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa, pt. *Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy: In Vitro and In Vivo Evaluation* wysłanej do czasopisma Scientific Reports, oświadczam, iż mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował tworzenie koncepcji badawczej, opracowanie metodologii, przeprowadzenie badań *in vivo* na mysim modelu zwierzęcym, analizę uzyskanych wyników, a także redagowanie treści manuskryptu zarówno przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

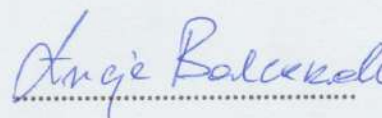
Łódź, 18.06.2025

dr Lucja Balcerzak,
Pracownia Obrazowania Mikroskopowego
i Specjalistycznych Technik Biologicznych
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Lucja Balcerzak, Sława Glińska, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa, pt. *Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy: In Vitro and In Vivo Evaluation* wysłanej do czasopisma Scientific Reports, oświadczam, że mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował wykonanie obrazowania nanocząstek oraz komórek THP1, stymulowanych badanymi preparatami, z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, a także wizualizację tych komórek przy użyciu mikroskopii świetlnej

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.



Podpis

Łódź, 18.06.2025

Dr hab. Marek Brzeziński, prof. CBMMiM

Centrum Badań Molekularnych

i Makromolekularnych PAN

Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy naukowej - Agata Tomaszewska, Bartłomiej Kost, Marek Brzeziński, Martyna Nowicka, Maja Krupa, Tomasz Rechciński, Łucja Balcerzak, Sława Glińska, Magdalena Chmiela, Agnieszka Krupa, pt. *Targeted and Safe Delivery of Colchicine via Polymeric Nanocarriers for Potential Atherosclerosis Therapy: In Vitro and In Vivo Evaluation* wysłanej do czasopisma Scientific Reports, oświadczam, że mój indywidualny wkład w przygotowanie oraz przedstawienie pracy w formie publikacji obejmował: opracowanie metodologii syntezy nanocząstek wykorzystanych w badaniach, przeprowadzenie doświadczeń związanych z ich charakterystyką fizyko-chemiczną, a także redagowanie treści manuskryptu zarówno na etapie przed, jak i po recenzji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. publikacji przez mgr Agatę Tomaszewską do rozprawy doktorskiej jako część spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Marek
Brzeziński

Digitally signed by
Marek Brzeziński
Date: 2025.06.18
11:06:12 +01'00'

.....
Podpis