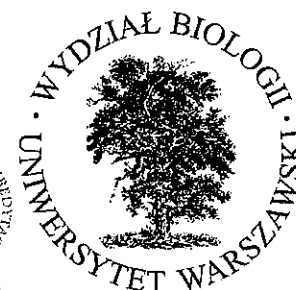




UNIwersytet Warszawski WYDZIAŁ BIOLOGII

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 55-41-104, FAX: (+22) 55-41-106



Dr hab. Nadzieja Drela, prof. nadzw.
Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii, Instytut Zoologii
Zakład Immunologii
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Piotra Orłowskiego pt.

„Immunotropowe właściwości nanocząstek metali szlachetnych modyfikowanych kwasem taninowym w stosunku do komórek biorących w procesie gojenia ran”

Praca wykonana w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. K. Kaczkowskiego w Warszawie

Promotor: dr hab. Małgorzata Krzyżowska, prof. nadzw.

Intensywny rozwój nanotechnologii przypada na XXI wiek. Wyzwaniem dla nanotechnologii jest synteza nanocząstek o różnej wielkości, kształcie, składzie chemicznym oraz potencjale aplikacyjnym w przemyśle, biologii i medycynie. Szczególny postęp dotyczy wykorzystania nanocząstek jako znaczników i wskaźników w testach diagnostycznych (nanodiagnostyka), systemów nośnikowych dla leków i tworzenia nowych nanoleków (nanofarmakologia), w terapii przeciwnowotworowej (nanoonkologia). Wykorzystuje się właściwości bakteriobójcze nanocząstek, co być może stanie się alternatywą dla antybiotykoterapii przy coraz częściej pojawiających się szczepach bakteryjnych opornych na antybiotyki. Dostrzeżono również immunomodulacyjne właściwości nanocząstek i nanomateriałów, co poszerza możliwości ich zastosowania w terapii poprzez działanie na układ odpornościowy.

Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera na 156 stronach wszystkie wymagane rozdziały. We Wstępie Doktorant charakteryzuje nanotechnologię jako nową dziedzinę nauki, opisuje wybrane metody otrzymywania nanocząstek metali metodami fizycznymi, chemicznymi oraz w procesach biosyntezy z wykorzystaniem żywych organizmów (bakterie, rośliny) oraz przedstawia ich cechy biologiczne. Autor wskazuje na takie właściwości nanocząstek, które mogą być wykorzystane w procesie gojenia ran: bakteriobójcze, cytotoksyczne oraz fizyko-chemiczne odpowiedzialne za ich zdolność do penetracji skóry. Właściwości bakteriobójcze jonów srebra znane są i wykorzystywane od dawna. Autor rozprawy zwraca uwagę na ważną rolę skóry w kontakcie organizmu ze środowiskiem

zewnątrznym i obronie przed patogenami. Skóra stanowi ważny element pierwszej linii obrony organizmu dlatego jej integralność jest ważnym czynnikiem utrzymania równowagi. Autor rozprawy szczegółowo opisuje budowę skóry ze szczególnym uwzględnieniem jej roli w odporności oraz w procesie gojenia ran, w którym reakcje odpornościowe z udziałem komórek skóry uznawane są za kluczowe. W niektórych stanach chorobowych, takich jak cukrzyca, niedobory odporności, choroby z objawami różnych typów nadwrażliwości, skóra jest szczególnie narażona na uszkodzenia. Celem badań prowadzonych przez Doktoranta było określenie roli nanocząstek metali szlachetnych w procesie gojenia ran z wykorzystaniem modeli doświadczalnych *in vitro* i *in vivo*. Zważywszy przeciwzapalne właściwości kwasu taninowego i jego wykorzystanie do gojenia ran, zbadano rolę nanocząstek srebra i złota modyfikowanych tym kwasem. W założeniach i celu pracy Autor zamieścił szczegółową listę badań z wykorzystaniem wybranych linii komórkowych i zwierząt doświadczalnych. Charakterystyka badanych nanocząstek oraz zastosowane techniki badawcze zostały szczegółowo opisane w rozdziale Materiały i metody. Wykorzystanie nanocząstek w medycynie budzi uzasadnioną troskę o możliwe skutki uboczne trudne do przewidzenia i trudne do oceny ze względu na brak wystandaryzowanych metod. Organizm człowieka jest wrażliwy na kontakt z naturalnie występującymi w środowisku cząstkami znacznie większymi od nanocząstek. Przedostają się one przez błony śluzowe, skórę i wpływają na aktywność układu odpornościowego i powiązanych z nim czynnościowo układów i narządów. Nanocząstki charakteryzują się o wiele większą przenikalnością, tym bardziej ich wpływ na komórki układu odpornościowego i czynnościowo z nim związane komórki tkanek może być większy. Zapewne z tego powodu zaplanowany przez Autora rozprawy doktorskiej zakres badań jest tak rozległy. Należy przypuszczać, że przed przystąpieniem do badań opracowano kryteria wyboru zarówno szczepu myszy jak i ustalonych linii komórkowych. W rozprawie nie znalazłam uzasadnienia wyboru ani zwierząt, ani linii komórkowych. Źródłem linii komórkowych są różne szczepy myszy, inne niż szczep wykorzystany w badaniach *in vivo*. Zastanawia mnie również uzasadnienie wyboru niektórych metod, które miały posłużyć do określenia aktywności biologicznej badanych nanocząstek:

- w celu określenia ekspresji TLR wykonano analizę RT-PCR. Czy poziom mRNA bezpośrednio koreluje z poziomem białka? Często takiej korelacji na poziomie białka nie ma z powodu post-transkrypcyjnej modyfikacji mRNA czy post-translacyjnej modyfikacji białka, która może skutkować jego degradacją

- zdolność do proliferacji użytych do badań *in vitro* komórek ustalonych linii określano na podstawie ekspresji Ki-67. Dokładna rola tego białka w cyklu komórkowym nie

jest poznana. Ulega ono ekspresji we wszystkich fazach cyklu komórkowego poza fazą G0. Ekspresja Ki-67 nie jest zatem markerem proliferacji komórek.

- ConA, kiedyś powszechnie stosowana jako poliklonalny aktywator limfocytów T, została użyta do indukcji proliferacji splenocytów i limfocytów węzłów chłonnych. Jak jest uzasadnienie użycia aktywatora poliklonalnego o niespecyficznym działaniu aktywującego wiele różnych komórek układu odpornościowego?

- do oznaczania odsetka komórek nekrotycznych i apoptotycznych zastosowano standardową metodę znakowania AnV i PI. Dlaczego komórki AnV+PI+ uznano za nekrotyczne? Jaki jest aktualny pogląd na przydatność tego znakowania do oceny nekrozy i apoptozy?

Wyniki badań przedstawiono na 37 rycinach i 10 tabelach. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo dobra dokumentacja ultrastruktury komórek eksponowanych na działania nanocząstek wykonana za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej oraz mikroskopii świetlnej z kontrastem fazowym, a także analiza lokalizacji nanocząstek w komórkach z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

Ważną i dojrzałą częścią pracy jest przeprowadzona na 19 stronach dyskusja wyników w oparciu o bogate piśmiennictwo, 301 pozycji literaturowych. Autor rozprawy wszechstronnie analizuje uzyskane wyniki przy zachowaniu dużej ostrożności przy ocenie potencjału aplikacyjnego badanych nanocząstek w procesie gojenia ran, w którym istotnym elementem jest stan zapalny. Autor formułuje wnioski końcowe w ścisłym powiązaniu z uzyskanymi wynikami badań. Jak z perspektywy kilkuletnich badań własnych oraz wyników badań innych autorów, można ocenić możliwości standaryzacji metod do oceny oddziaływania nanocząstek z układem odpornościowym, w celu ich wykorzystania w modulacji procesów, w których udział komórek odpornościowych jest kluczowy?

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na parę nieścisłości terminologicznych i błędów redakcyjnych komplikujących śledzenie wykonywanych badań i analizę ich wyników: tytuły podrozdziałów w Materiałach i metodach cechuje brak konsekwencji, raz odnoszą się badanego procesu np. Testy cytotoksyczności, a raz do stosowanej techniki np. znakowania komórek (Znakowanie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe) niezależnie od tego czy znakowanie zostanie wykorzystane do analizy fenotypu badanej komórki czy funkcji biologicznej. Należało wybrać jednolity schemat opisu odnoszący się do stosowanych technik lub badanych procesów, markerów komórek itp. ; Autor w rozdziale Wyniki popełnia dość powszechny błąd polegający na stosowaniu terminu „ekspresja” jednocześnie dla określenia odsetka komórek pozytywnych wykazujących ekspresję danego markera jak dla oznaczenia

poziomu ekspresji badanego markera mierzonego wartością MFI (Ryc. 35, 36); nie stosuje się terminu „układ APC” (str. 112), komórki prezentujące antygen to termin odnoszący się do jednej funkcji związanej ze zdolnością do przetwarzania i prezentowania antygeny limfocytom w kontekście MHC II, która cechuje niewiele komórek różniących się nawet pochodzeniem. Inne, drobne błędy edytorskie bez związku z wartością merytoryczną rozprawy całkowicie pomijam. Według mojej opinii przedstawiona do recenzji rozprawa nie posiada istotnych słabych stron.

Praca, pominiawszy wyżej wyszczególnione usterki, napisana jest starannie, logicznie, a poziom merytoryczny świadczy o dużej wiedzy Autora i umiejętności jej wykorzystania przy formułowaniu założeń pracy i dyskusji wyników. Analiza bieżącej literatury wskazuje, że pomysł zastosowania nanocząstek metali szlachetnych modyfikowanych kwasem taninowym nie jest powszechny wśród badaczy i publikacje autora rozprawy zajmują pierwszoplanową pozycję.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalnym i wartościowym dorobkiem pana Piotra Orłowskiego. Według mojej oceny spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595).

Na podstawie załączonego w rozprawie spisu publikacji i doniesień konferencyjnych mogę stwierdzić, że Pan Piotr Orłowski jest aktywnym badaczem, z dorobkiem naukowym w postaci 9 prac oryginalnych (zdecydowana większość w bardzo dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej), 2 rozdziałów w monografiach oraz 16 doniesień konferencyjnych (4 prezentowane zagranicą, 12 na konferencjach krajowych).

Dlatego z głębokim przekonaniem składam do Rady Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. K. Kaczkowskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Piotra Orłowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy, zatytułowanej „Immunotropowe właściwości nanocząstek metali szlachetnych modyfikowanych kwasem taninowym w stosunku do komórek biorących w procesie gojenia ran”. Pomimo szeregu uwag zamieszczonych w recenzji, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana Piotra Orłowskiego stosowną nagrodą ze względu na jej zalety poznawcze i wartość merytoryczną opublikowanych już prac oryginalnych.



Warszawa, 23.01.2016