

Prof.dr hab. med. Anna Stasiak-Barmuta  
Zakład Immunologii Klinicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Niniejsza recenzja została sporządzona na zlecenie Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. gen. Karola Kaczkowskiego w Warszawie z dnia 20 maja 2015. Pracę otrzymałam po 6 miesiącach, dnia 26 listopada 2015.

Recenzja rozprawy doktorskiej  
**mgr Piotra Orłowskiego**

Immunotropowe właściwości nanocząstek metali szlachetnych modyfikowanych kwasem taninowym w stosunku do komórek biorących udział w procesie gojenia  
skóry

Już w starożytności dowiedziono bakteriobójczego działania metali zwłaszcza srebra, miedzi, ołowiu czy rtęci. Srebro stosowano w celach leczniczych już 4000 lat przed naszą erą, przede wszystkim w leczeniu otwartych ran. W medycynie ajurwedyjskiej, która tradycją sięga kilka tysięcy lat wstecz, srebro jest stosowane po dziś dzień. Przechowywanie żywności w naczyniach ze srebra czy dodawanie do mleka i wody pitnej srebrnych monet zapobiegało ich zepsuciu. Obecnie, w nowoczesnych chłodziarkach stosuje się tworzywa sztuczne wzbogacone solami srebra tworzące tzw. powłokę antybakteryjną. Ze względu na ograniczoną, warunkowaną głównie zasobami materialnymi, dostępność, srebro określane było mianem „antybiotyku ludzi bogatych”.

W ubiegłym wieku nastąpił renesans terapeutycznego stosowania srebra, początkowo miejscowo jako środka stymulującego gojenie skóry i tkanek miękkich. W latach 70 XX wieku dowiedziano wpływu jonów srebra na blokowanie aktywności enzymów oddechowych w komórkach mikroorganizmów, w latach 90 w badaniach epidemiologicznych powiązano wzrost zapadalności na choroby o etiologii wirusowej, bakteryjnej czy grzybiczej z niskim stężeniem srebra w surowicy. Związki srebra są toksyczne dla komórek bakterii, wirusów i grzybów, ale również dla komórek ludzkich. Nadmiar srebra powoduje m.in. szare, przechodzące z czasem w błękit zabarwienie skóry i stąd swój rodowód wywodzi określenie przynależności do arystokracji „błękitna krew”.

Od lat trwają badania nad wyjaśnieniem mechanizmu toksyczności związków srebra. Udowodniono między innymi, iż reaktywne jony srebra mogą zmieniać strukturę ściany komórkowej bakterii, mogą też wiązać bakteryjne DNA czy RNA blokując replikację komórki.

W nurt poszukiwania mechanizmów działania metali szlachetnych wpisuje się rozprawa doktorska autorstwa mgr Piotra Orłowskiego zatytułowana: „Immunotropowe właściwości nanocząstek metali szlachetnych modyfikowanych kwasem taninowym w stosunku do komórek biorących udział w procesie gojenia skóry.”

Praca została dostarczona do recenzji w postaci opracowanego maszynopisu liczącego 156 stron, w tym 46 rycin (nr 43 został nadany dwóm niezależnym rycinom), 13 tabel oraz 301 pozycji piśmiennictwa. W sposób typowy dla prac doktorskich tekst rozprawy podzielony został na rozdziały obejmujące wstęp, cel pracy, materiał i metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie i piśmiennictwo uporządkowane według numerycznego stylu Vancouver. Pracę zamyka spis publikacji i doniesień kongresowych współautorstwa mgr Piotra Orłowskiego.

W liczącym 19 stron wstępie przybliżył Autor czytelnikowi pojęcie nanotechnologii, opisał metody syntezy nanocząstek i ich mikrobójcze właściwości, w sposób scholastyczny opisał budowę histologiczną skóry i jej rolę w odporności nieswoistej. Zilustrował to 5 rycinami, gdzie 4 i 5 niepozbawione są błędów tak

graficznych, jak i interpretacyjnych. Rycina 4 i jej opis nie oddaje istoty warstwy podwójnej, a jony hydratowane to 6 cząsteczek wody, nie osiem. Podobne uwagi odnoszą się do ryciny 5, która nie tłumaczy powstawania potencjału zeta (brak fazy dyfuzyjnej).

Celem pracy było, cytując: „określenie właściwości nanocząstek srebra modyfikowanych kwasem taninowym w stosunku do komórek skóry pod kątem ich zastosowania w procesach gojenia”. Szczegółowe cele pracy, będące raczej metodami prowadzącymi do realizacji założonego celu, przedstawił Doktorant na stronach 37 i 38 rozprawy. Metody te rozbudował o porównawczą ocenę wpływu nanocząstek złota na oceniane parametry laboratoryjne. W badaniach *in vivo* uzupełnił o dodatkową ocenę wpływu nanocząstek, prawdopodobnie srebra, modyfikowanych i niemodyfikowanych kwasem taninowym na błonę śluzową pochwy.

Kolejny rozdział rozprawy – Materiał i metody – w podrozdziale Nanocząstki charakteryzuje procesy otrzymywania nanocząstek złota i srebra o różnej wielkości, podaje ich charakterystykę elektrokinetyczną wyrażoną wielkością potencjału zeta. Z podanej charakterystyki wynika, iż zarówno potencjał zeta, jak i proporcje azotanu, cytrynianu i kwasu taninowego nie różniły się w sposób znamieny w przypadku nanocząstek srebra o średnicy 33 nm i 46 nm.

Na stronie 41 na przedstawionym wykresie „rozkładu średniego wielkości nanocząstek” – nanocząstki modyfikowane kwasem taninowym o średnicy 13 nm na cytowanym histogramie 6A nawet się do tej wielkości nie zbliżają, większość z nich ma wielkość 9-10 nm. Być może rzetelny opis parametrów nanocząstek z uwzględnieniem średnicy Sautera, odsetkowej zawartości nanocząstek o najmniejszej i największej średnicy w ich mieszaninie oraz odsetkowej zawartości każdej z tych frakcji z podaniem odsetka nanocząstek o średnicy poniżej średnicy najmniejszej i powyżej największej, pozwoliłoby na rozwianie powyższych wątpliwości. Na marginesie uwaga redakcyjna – potencjał zeta wyrażamy w mV nie, jak to napisał Autor na stronie 39 w nm.

Na stronie 42 pisze Autor, iż „badane koloidy nanocząstek charakteryzowały się dużą stabilnością w stosowanych mediach biologicznych”. Pojawia się pytanie o źródło tej wiedzy, a zatem metody w oparciu o które stabilność oceniano.

Na tejże stronie podaje Doktorant, iż „Nośnik dla nanocząstek srebra... stanowił wodny roztwór cytrynianu sodu (4,2g, 4%) kwasu taninowego (0,63g, 5%) oraz bromowodorku sodu (0,7g, 2%) w 100 g”. W zawiązku z powyższym pojawia się pytanie, czy kwas taninowy, którym z założenia modyfikowane były nanocząstki był jednocześnie ich nośnikiem? Wątpliwości dotyczące przyjętych założeń metodologicznych potwierdza sam Doktorant, pisząc str. 116 w rozdziale „Dyskusja”, iż „kwas taninowy znajdujący się w wolnej formie w badanych nośnikach nie jest dobrym systemem odniesienia dla procesów indukowanych przez modyfikowane kwasem taninowym nanocząstki. ...duża powierzchnia nanocząstek powoduje większą dostępność kwasu taninowego, który pochłaniany jest wraz z pobieranymi ze środowiska nanocząstkami”. Wobec cytowanych powyżej stwierdzeń modyfikowanie kwasem taninowym można uznać zatem za wielkość niestandardyzowaną, a ocena wpływu kwasu taninowego na oceniane w pracy parametry wydaje się co najmniej problematyczna.

W podrozdziale 4.3 opisuje Doktorant testy toksyczności. Cytotoksyczność nanocząstek oceniano testem wychwyty czerwieni obojętnej; w ocenie cytometrycznej analizowano odsetek komórek wykazujących ekspresję aneksyny V koniugowanej z fluorochromem, którym był prawdopodobnie izotiocyjanian fluoresceiny (FITC) i komórek wykazujących ekspresję jodku propidyny. W opisie cytogramów używa się pojęcia komórki np. aneksynopoztywne lub aneksynododatnie nie „komórki pozytywne pod względem aneksyny” (str. 44 i kolejne). Na stronie 45 przedstawił Autor błędną interpretację cytogramu w postaci tzw. *dot plot*. Według przyjętych standardów komórki z kwadrantu górnego prawego określa się mianem późnoapoptotycznych nie nekrotycznych, dla których z kolei zarezerwowany jest kwadrant górny lewy. Wobec błędów interpretacyjnych cytogramu pojawia się pytanie o wiarygodność opisywanych w rozdziale „Wyniki”

rezultatów oceny cytogramów obrazujących stopień apoptozy i nekrozy ocenianych subpopulacji komórkowych.

Poza oceną stopnia apoptozy i nekrozy analizowano potencjał mitochondrialny prawdopodobnie ocenianych populacji monocytów, keratynocytów i fibroblastów. W populacjach, prawdopodobnie wymienionych powyżej, oceniano również produkcję reaktywnych form tlenu i ekspresję receptorów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych. Powtarzane przez autora kilkakrotnie słowo określające mechanizm dziurawienia błony czy ściany komórkowej to permeabilizacja nie permablizacja.

Receptory dla fragmentu Fc immunoglobuliny G blokowane były przez przeciwciała CD16 i CD32. Ponieważ ekspresja cząsteczki CD16, receptora o niskim powinowactwie dla fragmentu Fc immunoglobuliny G (FcγRIII), występuje na komórkach NK, neutrofilach, monocytach i makrofagach, a ekspresja CD32 (FcγRII) charakteryzuje komórki dendrytyczne, monocyty/makrofagi, limfocyty T i limfocyty B, komórkami na których blokowano receptory Fc były w niniejszej pracy prawdopodobnie monocyty i komórki dendrytyczne, czego w podrozdziale nie podano. Podobna uwaga dotyczy metody opisującej ocenę stopnia ekspresji antygenów wewnątrzkomórkowych. Znowu w opisie metody oceny cytometrycznej standardem jest podawanie liczby komórek poddanych ocenie, np. każdorazowo oceniano  $10^5$  komórek. Do oceny populacji wychwytyjących dane przeciwciało skoniugowane z określonym fluorochromem stosuje się również każdorazowo tzw. kontrolę izotopowo negatywną lub ocenia się FMO (Fluorescence Minus One), co, poza zamieszczoną tabelą, powinien zawierać również opis metody.

Kolejny podrozdział opisuje „wykrywanie cytokin w mediach hodowlanych” tytuł może nieco niefortunny, lepiej brzmiałby zapewne jako ocena stężenia cytokin w mediach hodowlanych. W podrozdziale nie podano jakie cytokiny „wykrywano” ?

Również podrozdział opisujący wpływ (powinno być raczej ocena wpływu) nanocząstek na proliferację splenocytów w odpowiedzi na miogen niepozbawiony jest błędów. I tak splenocyty hodowano w medium „oraz/bez 2,5 mg/ml AgNP lub

AuNP - powinno być chyba oraz z/bez itd. Podawany do hodowli mitogen to konkanawalina nie, jak podaje Autor konkawalina. „Hodowlę prowadzono przez 72 godziny po czym zmierzono emisję fluorescencji” itd. – pytanie czego emisję fluorescencji mierzono ?

W dalszych etapach ocenie poddał Doktorant poziom ekspresji receptorów TLR według metody Real Time PCR, w mikroskopie kontrastowo-fazowym oceniał morfologię komórek poddanych działaniu nanocząstek, a w mikroskopie elektronowym oceniał ultrastrukturę ich powierzchni. Inaczej niż w hodowlach komórkowych preparaty do transmisyjnej mikroskopii elektronowej komórek RAW264.7, 291.03C poddawano 24 godzinnej inkubacji w medium zawierającym nanocząstki, w opisie hodowli komórkowych była to ekspozycja 48 godzinna (str. 43). Czy był to zabieg zamierzony ?

W badaniach *in vivo* w modelu rany ciągłej skóry i modelu błony śluzowej oceniał wpływ nanocząstek na histologię ocenianych tkanek. Podane zwierzętom doświadczalnym roztwory nanocząstek występują tu w stężeniu innym niż w ocenie *in vitro*. Pytanie zatem, czy stosowane stężenie poparte jest wcześniejszymi doświadczeniami własnymi czy też wynika z przyjętych założeń opisanych w literaturze, czego tu nie podano ?

Takie samo pytanie dotyczy oceny bezpieczeństwa stosowania nanocząstek na skórę, gdzie wykorzystano zmodyfikowany test lokalnych węzłów chłonnych (str. 52). Stosowano tu stężenia 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koloidu nanocząstek; w hodowlach komórkowych stosowano stężenia od 2,5 do 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Ponieważ w żadnym z podrozdziałów rozdziału „Materiał i metody” nie podano literatury nasuwa się pytanie czy stosowane metody były metodami autorskimi Doktoranta ?

Dużym mankamentem rozdziału i całej pracy jest brak liczby hodowli komórkowych czy też liczby zwierząt poddanych kolejnym eksperymentom, o których pisze Autor, iż każdy „wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach.”

Czy znaczy to, że dla każdej wielkości i stężenia ocenianych nanocząstek uzyskano tylko po trzy wyniki? Jest to o tyle interesujące, iż dalej, w podrozdziale „Analiza statystyczna”, pisze Autor o tzw. dopasowaniu rozkładu i obliczeniach w oparciu m.in. o test t-Studenta.

Rozdział wyniki obejmuje analizę żywotności poddanych działaniu nanocząstek linii keratynocytów, fibroblastów i monocytów w teście wychwytu czerwieni obojętnej oraz teście barwienia aneksyną i jodkiem propidyny w odczycie cytometrycznym. Obowiązującym i zarazem eleganckim sposobem prezentacji wyników cytometrycznych jest poprzedzenie oceny np. dwukolorowej, w tym wypadku aneksyna V - FITC i jodek propidyny, oceną dwuparametrową obrazującą wielkość (FS) i ziarnistość (SS) ocenianych subpopulacji. Pozwala to czytającemu ocenić rodzaj komórek poddanych ocenie i uwiarygodnić dalsze procedury ich analizy.

Z przedstawionych na stronie 54 rezultatów wynika, iż o toksyczności nanocząstek w głównej mierze decydują kwas taninowy i nośnik, którym również jest m.in. kwas taninowy. Same nanocząstki, niezależnie od ich wielkości efektu cytotoksycznego na oceniane komórki linii keratynocytów, fibroblastów czy monocytów nie wywierały. Ponieważ w metodach statystycznych nie stosowano testów oceniających korelację – zdanie „toksyczność rosła wraz ze zmniejszeniem rozmiaru, zwiększeniem stężenia nanocząstek i była zależna od modyfikacji kwasem taniowym” jest nieuprawnione. Podobnie nieuprawnione jest zdanie ze strony 63 – „badanie zmian potencjału mitochondrialnego .... wykazało spadek potencjału wprost proporcjonalny do wzrastającego stężenia nanocząstek”, kolejno str. 98 był „odwrotnie proporcjonalny ...” itd.

W analizie cytometrycznej udowodnił Autor, iż cytotoksyczność nanocząstek srebra manifestowała się głównie poprzez wpływ na linię monocytów.

Na keratynocyty linii 291.03C cytotoksyczny wpływ wywierały nanocząstki srebra niezależnie od modyfikacji kwasem taninowym, a obserwowanym typem śmierci komórki była według Autora nekroza, co potwierdzają zamieszczone na

stronie 57 cytogramy. Mierną apoptozę fibroblastów potwierdzoną cytogramami zamieszczonymi na stronie 58 można natomiast tłumaczyć niewłaściwym, przyjętym przez Autora sposobem jej oceny. Mechanizm apoptozy obserwowany w przypadku fibroblastów to tzw. „nietypowa apoptoza”. Poza fibroblastami mechanizm ten dotyczy również np. komórek epitelialnych. W tych przypadkach tzw. złotym standardem oceniającym apoptozę jest nadal analiza mikroskopowa potwierdzająca charakterystyczne cechy morfologiczne komórek.

Na stronie 60 ocenia Doktorant wpływ nanocząstek srebra na rodzaj śmierci monocytów pisząc, iż „inkubacja monocytów ze wzrastającymi stężeniami nanocząstek zazwyczaj skutkowała wyższym odsetkiem komórek nekrotycznych niż apoptotycznych”. Kolejno na tejże stronie „natomiast ekspozycja komórek linii RAW 264.7 skutkowała wzrostem odsetka komórek apoptotycznych raczej niż nekrotycznych”. W rozprawie naukowej, jaką jest dysertacja doktorska używanie zwrotów niemierzalnych jak „zazwyczaj” czy „raczej” nie powinno mieć miejsca.

W kolejnym podrozdziale ocenia Autor wpływ nanocząstek na poziom potencjału mitochondrialnego ocenianych linii komórkowych. W przypadku każdej z poddanych ocenie linii komórkowych, znamieny wpływ na wielkość potencjału mitochondrialnego miały według Autora: wielkości nanocząstek oraz ich modyfikacja kwasem taninowym.

W kolejnym podrozdziale szacowano wielkość dawki toksycznej TC50 w odniesieniu do ocenianych linii komórkowych. W cytowanym podrozdziale pisze Doktorant, np., iż „dawki TC50 samych nośników nanocząstek okazały się wyższe niż badanych NP.” Wobec wyników przedstawionych w tabelach obserwacja ta wydaje się być prawdziwa, trudno jednak o jednoznaczny osąd w sytuacji kiedy nie podano liczby obserwacji i nie poparto powyższej analizy żadną oceną statystyczną. Tego typu obserwacja stanowić może jedynie zachętę do prowadzenia dalszych badań i przeprowadzenia wnioskowania statystycznego.

W kolejnym podrozdziale prezentuje Autor wpływ nanocząstek na morfologię ocenianych linii komórkowych. Podrozdział został opracowany starannie, a



zmisszczone zdjecia z mikroskopu kontrastowo-fazowego i elektronowego pozwalaja na ocene depozycji nanocząstek w wodniczkach, mitochondriach, cytoplazmie czy jądrze komórkowym ocenianych linii komórkowych. Bezpośredni opis pod zdjęciami, wyjątkowo skromny, nie pozwala natomiast na pełną ocenę obserwowanych zjawisk.

Ciekawe, mogące mieć bezpośrednie przełożenie praktyczne, informacje zawarł Doktorant w podrozdziale dotyczącym oceny wpływu nanocząstek na wielkość syntezy cytokin w ocenianych liniach komórkowych fibroblastów, monocytów i keratynocytów. Jednak znowu, jak poprzednio używanie zwrotów np. „spadek odsetka komórek z ekspresją IL-1 $\beta$  był odwrotnie proporcjonalny do stężenia NP”, z racji braku oceny korelacji, jest nieuprawnione.

Uzupełnieniem pracy jest ocena wpływu nanocząstek na morfologię i aktywność komórek dendrytycznych linii JAWSII. W doświadczeniach dodatkowo używano, jako układu odniesienia dla nanocząstek srebra, nanocząstki złota. Zgodnie z rozdziałem Materiał i metody (str. 41 i 42) średnica nanocząstek srebra modyfikowanych kwasem taninowym to 13, 33 i 46 nm ~~dla~~ i 10-65 nm dla niemodyfikowanych, dla nanocząstek złota to 10, 33 i 65 nm – wszystkie modyfikowane kwasem taninowym. Z racji chociażby różnej średnicy nanaocząstek obu metali, co w sposób oczywisty przekłada się na zmianę ich powierzchni np. 530,9 nm<sup>2</sup> przy średnicy 13 nm Ag i 314,2 nm<sup>2</sup> przy średnicy 10 nm Au, oraz modyfikację kwasem taninowym, analizowane w podrozdziałach wyniki porównawcze nie do końca noszą znamiona obiektywizmu.

W pierwszym etapie oceny analizuje Doktorant cytotoxycznosc i dawke TC50 nanocząstek obu metali wobec ocenianej linii komórek dendrytycznych. I tu znowu, jak poprzednio używa nieuprawnionych, z racji braku oceny korelacji, podsumowań w rodzaju „spadek potencjału był odwrotnie proporcjonalny do rozmiaru nanocząstek”. Zaprzeczeniem powyższej obserwacji jest chociażby rysunek 32 A, gdzie owej zależności liniowej nie obserwowano dla nanocząstek srebra w stężeniu 10  $\mu$ g/ml. W ocenie wpływu nanocząstek obu metali modyfikowanych kwasem

taninowym na ultrastrukturę powierzchni komórek dendrytycznych linii JAWSII średnicę nanocząstek mianuje Doktorant jako 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (str. 93).

W kolejnym etapie oceny bada Doktorant wpływ nanocząstek obu metali na stopień ekspresji wykładników dojrzałości komórek dendrytycznych. Ocenia powierzchniową ekspresję antygenów MHC kl. I i II, ekspresją cząsteczek kostymulacyjnych – CD40, antygenów z rodziny B-7 – CD80 i CD86.

Po 24 godzinnej ekspozycji komórek dendrytycznych na nanocząstki obserwowano cytując „istotne zmniejszenie odsetka komórek pozytywnych pod względem tego markera ( $p < 0,01$ )”. Graficznie opisany fenomen przedstawiono na ryc. 35 A i B, gdzie nanocząstki opisywane są jako S, M i L – prawdopodobnie małe, średnie i duże ? Kolejna uwaga dotycząca nieuprawnionego podsumowania – „wzrost ekspresji ...odwrotnie proporcjonalny do wielkości”, jak wyżej - nie poparto rzetelną analizą statystyczną w oparciu o ocenę korelacji. W opisie wpływu ocenianych nanocząstek na stopień powierzchniowej ekspresji receptora CD86 pisze Doktorant: „co ciekawe, stymulacja 33 nm AgNP powodowała ośmiokrotny wzrost ekspresji CD86 (do  $80,46 \pm 3,48\%$ ) ( $p = 0,000$ ) ... w porównaniu do nieeksponowanej kontroli ( $13,78 \pm 0,96\%$ ).” Dzieląc 80,46 na 13,78 otrzymujemy wynik 5,8 nie 8,0. Trudno również wnosić o istotności różnic w zakresie obserwowanych wartości średnich nie znając np. liczby pomiarów.

Ostatnim etapem analizy wpływu nanocząstek obu metali na komórki dendrytyczne była ocena ekspresji TLR 2,4, i 9 w oparciu o test RT-PCR oraz ocena stężenia wybranych przez Doktoranta cytokin, a nie jak pisze Autor „wpływ nanocząstek ... na profil wydzielanych cytokin”. I tu znowu, jak na ryc. 35 nanocząstki definiowane są jako S, M i L.

Dodatkowo, niejako obok głównego nurtu pracy przedstawił w omawianym rozdziale „wpływ nanocząstek srebra i złota modyfikowanych kwasem taninowym na aktywację splenocytów. W podsumowaniu stwierdził, iż 24 inkubacja splenocytów z nanocząstkami obu metali „skutkowała znaczącym obniżeniem zdolności do aktywacji w odpowiedzi na miogen”. Kolejno „obserwowano istotnie

silniejsze zahamowanie aktywacji” wobec braku rzetelnej analizy statystycznej z podaniem liczby obserwacji wydaje się w tym miejscu nieuprawnione.

W badaniach *in vivo* oceniano wpływ nanocząstek, już tylko srebra, na indukcję miejscowego odczynu zapalnego ocenianego testem lokalnych węzłów chłonnych.

Najciekawszą obserwacją niniejszej pracy z jej praktycznymi implikacjami wydaje się potraktowana przez Doktoranta trochę marginalnie ocena wpływu podaży nanocząstek na gojenie ran skóry w modelu rany ciągłej. W ciekawych doświadczeniach dowiedziono wpływu stosowanych nanocząstek srebra na zmniejszanie nacieku zapalnego skóry skutkującego szybszym, niż w kontroli naskórkowaniem ran. Obserwowany mechanizm zilustrowano ciekawymi zdjęciami wykonanymi techniką autometalografii.

Uzupełnieniem badań *in vivo* była ocena podaży nanocząstek srebra na błonę śluzową pochwy. Efekty owej podaży obserwowano w preparatach mikroskopowych oceniając histologię błony śluzowej i lokalizację nanocząstek w jej komórkach.

Licząca sobie 19 stron „Dyskusja” stanowi próbę interpretacji i podsumowania otrzymanych wyników. Prowadzić ma również konsekwentnie do uzasadnienia przyjętego w pracy celu, którym było „określenie właściwości nanocząstek srebra modyfikowanych kwasem taninowym w stosunku do komórek skóry pod kątem ich zastosowania w procesach gojenia”.

W rozdziale uzasadnia Autor wybór metod badawczych pozwalających na ocenę wpływu nanocząstek srebra, kolejno złota na komórki biorące udział w procesach prezentacji antygeny. W kolejnych akapitach omawia uzyskane wyniki i przedstawia ich interpretację w konfrontacji z danymi literaturowymi.

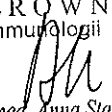
Wieńczących pracę 7 wniosków jest bardziej podsumowaniem uzyskanych w pracy wyników.

Najciekawszym aspektem przedstawionej mi do recenzji pracy jest próba udowodnienia udziału keratynocytów w procesie zapalnym, poprzez sygnalizowany szlak aktywacji zarówno w drodze prezentacji antygeny, jak i kostymulacji. Wyniki przedstawione przez mgr Piotra Orłowskiego staną się zapewne przyczynkiem do dalszych badań nad rolą keratynocytów w indukowaniu procesu zapalnego. Badania zaś oceniające immunotropowe właściwości nanocząstek metali, z definiowaniem ich lokalizacji w komórkach i jej poszczególnych organellach stać się mogą przyczynkiem do opracowania ewentualnych aplikacji klinicznych.

Pracę doktorską mgr Piotra Orłowskiego oceniam pozytywnie, pomimo wskazanych wcześniej uwag, wątpliwości i pytań. Uzyskane wyniki korespondują z założonym celem pracy.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Piotra Orłowskiego spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy 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, z późn. zm.), zatem przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Piotra Orłowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łączę wyrazy szacunku,

KIEROWNIK  
Zakładu Immunologii Klinicznej  
  
prof.dr hab.n.med. Anna Stasiak-Barmuta