GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Lekarski
Katedra i Zakład Fizjopatologii
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk
tel./ fax. 058 349-15-10

Kierownik: Prof. dr hab. med. Jacek M. Witkowski

e-mail: jawit@gumed.edu.pl

Gdańsk, 23 września 2015

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Donejko

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Donejko dotyczy potencjalnie interesującego tematu niekorzystnego wpływu etanolu (EtOH) na czynność fibroblastów skóry i możliwości redukcji tego wpływu przez podaż kwasu hialuronowego (HA). Z racji rosnącej (ciągle) konsumpcji alkoholu i jej konsekwencji w społeczeństwie z jednej strony, a rosnącej częstości zabiegów polegających na doskórnej iniekcji HA z drugiej, temat ten ma ugruntowanie merytoryczne, zwłaszcza przy stosunkowym braku rzetelnych opracowań tematu w literaturze.

W rozbudowanym Wstępie autorka dostarcza szerokiej informacji na temat kolagenu i kwasu hialuronowego, ich właściwości fizykochemicznych, biosyntezy i degradacji. Autorka nie ustrzegła się w tekście wstępu stosunkowo nielicznych, aczkolwiek istotnych błędów.
I tak, na stronie 5 znajdujemy informację, że kolagen wpływa na „utrzymanie (...) elastyczności i wytrzymałości wielu narządów" – o ile wytrzymałość mechaniczna jest bezsprzeczną cechą kolagenu (zwłaszcza typu I), to elastyczność (sprężystość) jego cząsteczek jest wyjątkowo mała (inaczej np. ścięgna nie mogłyby pełnić swojej funkcji). Na str. 11 jako pierwsze zdanie podrozdziału 2.3 pojawia się stwierdzenie „W macierzy zewnątrzkomórkowej zawarta jest połowa wszystkich białek organizmu, z czego głównym białkiem skóry jest kolagen.". Zdanie to jest niepoprawne zarówno merytorycznie jak i stylistycznie, nie ma także żadnego związku z tematem podrozdziału („Degradacja kolagenu"). Kolejnym błędnym zdaniem jest ostatnie zdanie na str. 11: „Kolejno ulegają degradacji do drobnocząsteczkowych produktów w aparacie Golgiego, cytoplazmie komórki i cysternach szorstkiej siateczki śródplazmatycznej.", sugerujące niewłaściwą ścieżkę degradacji białek ulegających endocytozie. Drobnym, ale istotnym błędem jest (str. 12) podanie angielskiej nazwy naskórkowego czynnika wzrostu jako *endothelial* growth factor zamiast *epidermal* g.f. Dość kuriozalne jest zdanie na str. 15, w którym autorka pisze: „Hialuronian tworzy na powierzchni komórki otoczkę, która decyduje o adhezji komórkowej, migracji i kształcie komórek." Takich stwierdzeń nie ma w cytowanych w tym miejscu przez autorkę pracach źródłowych! W rzeczywistości komórki kontaktują się z hialuronianem przez obecne na swej powierzchni cząsteczki receptora CD44 i sygnalizacja z tego receptora może modyfikować ich migrację poprzez aktywność cytoszkieletu (a więc kształt). Nie ma mowy o „otoczce" z HA! Dalej (str. 15), nieprawdziwe jest stwierdzenie autorki, że kwas hialuronowy wiąże duże ilości wody na drodze osmozy. Faktycznie woda wnika do cytoplazmy dzięki procesom (quasi) osmotycznym, ale hydratacja HA do nich nie należy... Dalej, to nie hialuronian (jak podaje autorka na str. 18) tylko jego receptor jest markerem progresji pewnych nowotworów (co wynika z cytowanej przez autorkę pracy nr 74). W kolejnym podrozdziale (4.1) dotyczącym receptora beta1-integrynowego autorka niepoprawnie stwierdza (str. 18) że to fragment przezbłonowy integryn decyduje „o uznaniu białka jako receptorowe".

O uznaniu białka powierzchniowego komórki za receptorowe decyduje jego zdolność do wiązania określonego ligandu, co zależy sterycznie od domeny zewnątrzkomórkowej. Autorka zresztą poprawnie pisze o tym procesie na str. 34. Kolejną zagadką jest dla mnie stwierdzenie autorki, iż „Receptory integrynowe przekazują sygnały do jądra komórkowego poprzez reakcje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej..."; białka macierzy są ligandami wiązanymi przez integryny, natomiast wytworzenie i przekazanie sygnału będącego konsekwencją związania receptora z ligandem dzieje się oczywiście wewnątrz komórki i wymaga procesu transdukcji sygnału. Dalej, na str. 25, w skądinąd poprawnie napisanym podrozdziale 5.3 dotyczącym szlaków sygnałowania receptora IGF-1R autorka niepoprawnie pisze „... które pobudza *zdysocjowane z nim* (?!) białko Sos." Czy autorka rozumie pojęcie dysocjacji? Z kolei w rozdziale 6.1 dotyczącym opisu właściwości prolidazy znajdujemy zdanie: „Aktywność enzymu obserwuje się powszechnie w narządach ludzi i zwierząt m.in. w fibroblastach." Fibroblasty to oczywiście komórki, a nie narządy; czy autorka mogłaby wyjaśnić, jakie narządy miała na myśli? Następnie, wymieniając (str.30) receptory posiadające domenę śmierci autorka podaje m.in. CD4 i CD5, co jest błędne. Opisując na str. 31 właściwości i działanie kaspaz, autorka pisze że degradują one cytoszkielet, co prowadzi do uszkodzeń błony komórkowej i odwodnienia komórek, co nie jest poprawne. I w końcu, w bardzo ważnym podrozdziale 8.0 pracy dotyczącym metabolicznych konsekwencji zatrucia etanolem, autorka pisze w ostatnim akapicie na str 34 na początku: „Ekspozycja fibroblastów serca na etanol skutkuje wzrostem proliferacji..." a w ostatnim zdaniu „Natomiast etanol nie oddziałuje na proliferację i nie kieruje fibroblastów serca na drogę apoptozy." Czytelnik może wiec mieć wątpliwości jakie rzeczywiście jest działanie etanolu na fibroblasty serca, a przecież te obserwacje mają (przy najmniej w rozumieniu recenzenta) tworzyć jakąś naukową podstawę dla prowadzonych przez autorkę badań, których zdefiniowanym celem (str. 35) jest „ocena mechanizmu zaburzeń metabolizmu kolagenu (...)w fibroblastach skóry ludzkiej poddanych działaniu różnych stężeń etanolu (...)".

Podsumowując, Wstęp zawiera dużo informacji, jednak przed ewentualnym przygotowaniem go do druku (np. jako pracy przeglądowej) wymagałby sporo korekt redakcyjnych i kilka merytorycznych. Mimo to zachęcam autorkę do jego przygotowania właśnie w formie publikacji.

Cel pracy sformułowany jest w formie jednego dość długiego i szczegółowego zdania, poprzedzonego dwoma krótkimi paragrafami wyjaśniającymi pokrótce koncepcję i celowość podjętych badań. Czytelnik (w tym recenzent) oczekiwałby raczej sformułowania celu pracy nie jako listy planowanych badań, ale jako zagadnienia, którego wyjaśnieniu te badania mają służyć.

Metodyka pracy przedstawiona została dość szczegółowo na kolejnych 9 stronach rozprawy. W założeniu opis metod stosowanych w celu uzyskania przedstawionych w późniejszej części pracy wyników powinien być na tyle szczegółowy, aby umożliwić zainteresowanym powtórzenie badań. Tu także niestety recenzowana rozprawa pozostawia wiele do życzenia.

I tak, autorka pisze, że do badań użyła fibroblastów skóry ludzkiej zakupionych w ATCC, ale nie podaje, czy była to linia pierwotna, a więc zbliżona do komórek naturalnie występujących w zdrowej skórze, czy unieśmiertelniona (jeśli tak, to w jaki sposób?) – czyli mająca charakter nowotworowy. Takie rozróżnienie może mieć znaczenie dla interpretacji wyników i dlatego informacja o charakterze badanych komórek jest niezbędna.

Dalej, autorka wymienia stężenia etanolu i innych odczynników, z którymi inkubowała badane komórki, ale nie podaje dlaczego wybrała te właśnie stężenia (czy np. na podstawie własnych badań pilotowych czy też skorzystała z sugestii zawartych w literaturze (w takim przypadku powinna być ona zacytowana). Z kolei zastanawiające jest, że autorka nie wspomina w jaki sposób komórki inkubowane z etanolem, wodoronadtlenkiem tert-butylu i/lub kwasem hialuronowym były odczepiane od podłoża –

czy używała np. enzymu (trypsyny), czy też metody mechanicznego „zdrapania" warstwy komórek z dna dołka (nie „oczka"!) w płytce hodowlanej? Obydwie metody są dopuszczalne, ale ta informacja również powinna znaleźć się w opisie metodyki. Dopiero na str. 44 w opisie metod znajdujemy informację, ze komórki były odczepiane od podłoża działaniem trypsyny (ale tylko w odniesieniu do testu ich przeżywalności); świadczy to o sporym chaosie w opisie metodyki. Dalej, pisząc że uzyskane komórki poddawane były działaniu ultradźwięków w celu ich rozbicia i otrzymania lizatów/homogenatów (nie „supernatantów" jak w tekście; supernatant to nadsącz z żywych, odwirowanych komórek, który może zawierać wydzielone przez nie produkty) do dalszych badań, autorka nie wspomina jakiego aparatu do sonikacji użyła, jaka była jego moc i producent.

W rozdziale 2.7, w którym opisana jest stosowana technika Western blotting (nie „Western Immunoblot"; określenie „immunoblotting" jest synonimem Western blotting), autorka pisze że „kolejno nitrocelulozę inkubowano (...) z I-rzędowymi przeciwciałami (...)" co sugeruje, że inkubacjom z kolejnymi przeciwciałami wykrywającymi różne białka poddawano tę samą membranę nitrocelulozową. Nie jest to niemożliwe, ale powinno być dokładnie opisane w tekście; ponadto w takim wypadku zwykle stosuje się eliminację już związanego przeciwciała przeciw pierwszemu antygenowi w procesie „stripping", zanim membranę podda się detekcji kolejnego białka i zwykle nie powtarza się takich operacji więcej niż dwa razy z racji narastania sygnału tła. Dodatkową wątpliwość w tym fragmencie budzi końcowa część opisu identyfikacji i detekcji badanych białek; autorka wspomina o zastosowaniu odczynnika „Amersham ECL" czyli techniki chemiluminescencyjnej, natomiast w następnym zdaniu pisze o „intensywności wybarwionego białka" (co samo w sobie jest sformułowaniem niepoprawnym) zamiast o poziomie luminescencji. Brakuje także elementów kontroli – jak potwierdzona została równomierność ilości białka lizatu/homogenatu nakładanego do kolejnych studzienek w żelu? Co był produktem referencyjnym (zwykle jest nim beta-aktyna)?

W następnym rozdziale 2.8 dotyczącym obrazowania morfologii badanych komórek autorka używa zaawansowanego instrumentarium (BD Pathway 855). Czytelnik nie może jednak na podstawie opisu zorientować się, jak przeprowadzono badanie (np. brak liczby komórek wprowadzonych do dołków „czarnych płytek") . Autorka podaje, że badane komórki znakowano przeciwciałem anty-FAK i odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z FITC, następnie wybarwiono jądra komórkowe znacznikiem DNA (Hoechst 33342), a w końcu obserwowano *autofluorescencję* badanych komórek. Z tego opisu nie wiadomo, co tak naprawdę autorka oglądała... chociaż opis wyników (poniżej) jest poprawny.

W kolejnym rozdziale (2.9) autorka oceniała aktywność replikacji DNA w badanych komórkach metodą oceny wbudowywania radioaktywnej 3H-tymidyny do nowych nici DNA. Nie jest jasne, dlaczego badania przeprowadzono „w atmosferze CO2" – czy był to czysty dwutlenek węgla?! Jakim licznikiem scyntylacyjnym posłużyła się autorka w tych badaniach?

Bardzo ważnym aspektem pracy jest ocena przeżywalności komórek traktowanych etanolem bez i w obecności kwasu hialuronowego. W rozdziale 2.11 Metod autorka opisuje test przeżywalności badanych komórek z zastosowaniem instrumentu Nucleo-Counter NC-300™ i kompleksowego barwienia jodkiem propidyny (PI), oranżem akrydyny (AO) oraz barwnikiem VB-48. Jedynie ten ostatni wybarwia grupy tiulowe; pozostałe są wyznacznikami życia lub śmierci badanych komórek. Dalej autorka pisze o pobieraniu do barwienia ww odczynnikiem *homogenatu* fibroblastów (str. 44) – albo wiec autorka nie rozumie pojęcia „homogenat", albo też błędnie wykonała oznaczenie. Ostatecznie autorka mierzy ww aparatem „zawartość" fluorescencji... Wydaje się więc, że autorka nie do końca poznała stosowaną, bardzo ważną w kontekście celu pracy, metodykę.

Kolejnym ważnym elementem stosowanej techniki badawczej jest test zymografii żelatyny, pozwalający na półilościową ocenę zawartej w homogenacie badanych komórek aktywności żelatynolitycznej. Przedstawiony w rozprawie opis metody jest zasadniczo poprawny; należy jednak zwrócić uwagę, że efektem enzymatycznego trawienia substratu (w tym wypadku żelatyny) w żelu jest lokalne pojawienie się prążka (w miejscu migracji enzymu(ów) żelatynolitycznego (ych)), który nie barwi się błękitem Coomassie (ulega odbarwieniu po ekspozycji na roztwór metanolu ze stężonym kwasem octowym). Opis miejsc aktywności enzymu jako „wybarwionych prążków" nie jest więc prawidłowy. Część opisu metodyki z niezrozumiałego dla recenzenta powodu znalazła się w rozdziale Wyniki. I tak na stronie 46 znajdujemy opis metody, którą autorka wykorzystała do oceny wpływu badanych substancji na biosyntezę kolagenu (metoda uwzględniająca użycie radioaktywnej proliny). Ten opis powinien znaleźć się w rozdziale 2.3 (str 38/39).

Opis wyników jest chaotyczny i dość trudny do zrozumienia, przynajmniej na początku. Np. opisując zahamowanie produkcji kolagenu przez etanol (a dokładnie wbudowywania radioaktywnej proliny) autorka podaje wyniki jako zahamowanie „o 58% (2.39% +/-SD)". Taki zapis jest wysoce niekonwencjonalny i utrudnia percepcję wyników! W legendzie ilustrującej te wyniki ryc. 1 (str 47) autorka podaje parametr znamienności statystycznej różnicy ($p<0.05$) jednak nie jest jasne, do których par wyników się on odnosi (choć oczywiście można to odgadnąć na podstawie samego wykresu słupkowego). Należy jednak podkreślić, że przedstawione na tej rycinie wyniki przekonywająco potwierdzają hipotezę o ochronnej wobec produkcji kolagenu roli kwasu hialuronowego. Podobne zastrzeżenia (brak oznaczenia par wyników porównywanych w celu wykazania istnienia lub braku statystycznej znamienności) dotyczą ryciny 2. Tu autorka wykazała, że etanol jest toksyczny dla fibroblastów, a dodanie kwasu hialuronowego zmniejsza cytotoksyczność alkoholu. Powstaje więc pytanie, czy prezentowana na ryc. 1 redukcja syntezy kolagenu jest wynikiem śmierci fibroblastów pod wpływem EtOH, czy też alkohol działa na procesy biosyntetyczne ZANIM zabije komórki? Pewną odpowiedzią na to pytanie może być wynik badań przedstawionych na ryc. 3, gdzie autorka wykazuje istotny (?) hamujący wpływ EtOH na aktywność prolidazy i ochronny efekt HA. Podobnie na ryc. 12 (dlaczego dopiero tutaj?) autorka zilustrowała redukcję replikacji DNA w fibroblastach poddanych działaniu EtOH i ochronę tego procesu przez HA (w legendzie tej ryciny autorka nie ustrzegła się błędu, wspominając o pożywce zawierającej radioaktywną prolinę a nie o trytowanej tymidynie). Warto jednak byłoby pokusić się o analizę korelacji badanych parametrów.

Na ryc. 4 autorka pokazuje wynik badania poziomu ekspresji receptora beta1 integryny w komórkach poddanych działaniu EtOH bez i w obecności HA. Wyniki te są dość przekonywające (sam EtOH hamuje ekspresję, w obecności HA ten efekt jest zniesiony); należy zwrócić uwagę , że jakość prezentowanego zdjęcia blotu jest nieakceptowana (niepublikowalna); brakuje także kontroli jednolitego ładowania kolejnych ścieżek materiałem białkowym. To samo zastrzeżenie dotyczy wyników dotyczących ekspresji IGF-1R zaprezentowanych na ryc 5 oraz ekspresji Akt (ryc. 9 – tu wystąpił błąd w numeracji ryciny, powinna być ryc. 8) i Erk1/2 (właściwa i poprawnie oznaczona ryc.9). Te ostatnie wyniki autorka słusznie interpretuje jako brak istotnego efektu EtOH na ekspresję białka Akt i – odpowiednio – wpływ EtOH na fosforylowaną formę Erk, ale nie na formę natywną. Wreszcie ryc. 10 wykazuje stymulację ekspresji NFkB w komórkach eksponowanych na EtOH – to ciekawy wynik wymagający przedyskutowania jego przyczyn. W legendach wszystkich tych ilustracji brakuje informacji o liczbie powtórzeń doświadczeń – czy są to wyniki pojedynczych doświadczeń, czy tez wyniki reprezentatywne (jeśli tak, to dla ilu powtórzeń)?

Wynik zymografii żelatynowej przedstawiony na ryc. 11 wygląda przekonywająco (brak efektu EtOH ani hialuronianu na aktywność proteolityczną). Brak niestety kontroli negatywnej i pozytywnej

swoistości badanej aktywności a także jakiegokolwiek dowodu, że zaobserwowane i pokazane na rycinie wytrawione prążki odpowiadają aktywnością metaloproteinaz MMP2 i MMP9.

Bardzo efektowne są wyniki analizy obrazowej migracji kinazy FAK pomiędzy cytoplazmą i jądrem badanych komórek w kontekście ich ekspozycji na EtOH i hialuronian (Ryc. 6 i 7). Jednoznacznie, etanol hamuje migrację kinazy i efekt ten jest odwracany przez obecność HA. Drobne zastrzeżenia recenzenta dotyczą sposobu prezentacji tych wyników. Po pierwsze, fluorescencja barwnika Hoechst jest w rzeczywistości niebieska (nie zielona jak na zdjęciach), zaś fluorescencja FITC jest właśnie zielona, a nie czerwona jak na zdjęciach. Dobór kolorów (z natury arbitralny w takich badaniach, gdzie instrument rejestruje tylko intensywność, a nie barwę fluorescencji) jest wiec niekonwencjonalny; można go jednak wytłumaczyć chęcią uzyskania lepszego kontrastu barwnego. W przypadku użycia tych wyników w publikacji będzie to musiało być dokładnie wyjaśnione. Wydaje się także, że korzystniejsze dla percepcji wyników byłoby zestawienie obrazów komórek poddanych działaniu samego EtOH oraz EtOH i hialuronianu (czyli np. panelu A z ryc. 6 i 7, następnie panelu B z obydwu rycin itd). Czy autorka zechciałaby użyć sugerowanej formy prezentacji podczas publicznej obrony?

Ostatni, aczkolwiek nie najmniej ważny w kontekście sensu pracy jej aspekt to badanie procesów stresu i śmierci (w tym apoptozy) fibroblastów skóry poddanych działaniu etanolu, tBHP i kwasu hialuronowego, przedstawiony w rozdziale 12. Autorka wykazuje, że ekspozycja fibroblastów in vitro na rosnące stężenia EtOH powoduje istotny wzrost odsetka komórek apoptotycznych (ulegających programowanej śmierci) „przy proporcjonalnym zmniejszeniu procenta komórek żywych" (str. 71) oraz, że kwas hialuronowy podobnie jak w innych testach ma istotne działanie protekcyjne. Niestety tu również zauważyłem znaczne błędy metodyczne. I tak, wybarwienie komórek jodkiem propidyny (składnik PI zestawu stosowanego przez autorkę rozprawy) dotyczy komórek o uszkodzonej błonie, a więc nekrotycznych, a nie apoptotycznych; interpretacja odsetka tak zabarwionych komórek jako apoptotycznych jest niepoprawna. Następnie, autorka pisze o redukcji odsetka komórek żywych, jednak na podstawie ryc. 13 odsetek ten można wywnioskować tylko pośrednio, jako dotyczący komórek niezabarwionych PI. Jest to o tyle dziwne, że stosowany zestaw barwiący (VB48-PI-AO) zawiera oranż akrydyny (AO) – barwnik, który przez swoją zieloną fluorescencję pozwala na jednoznaczne odróżnienie żywych komórek (od czerwono fluoryzujących komórek martwych wybarwionych PI), zwłaszcza jeśli własciwie zinterpretowano wyniki otrzymane aparatem NucleoCounter. Wreszcie, barwnik VB-48 znakuje grupy tiolowe, których ilość maleje w komórkach ulegających stresowi metabolicznemu. Autorka zupełnie nie odniosła się w pracy do tego wyniku, a już pobieżna analiza ryc. 13 wskazuje, że zarówno w obecności samego etanolu lub tBHP, jak też gdy w hodowlach jest dodatkowo obecny kwas hialuronowy, dochodzi do wyraźnych zmian zawartości tioli w badanych fibroblastach. Bardzo proszę, aby autorka włączyła ten aspekt analizy do swojej prezentacji podczas publicznej obrony. „Technicznym" problemem jest znacznie mniejsza liczba zanalizowanych komórek w próbkach inkubowanych z etanolem w różnych s tężeniach ni z w próbkach kontrolnych lub traktowanych HA. Czy to znaczy, że doszło do dezintegracji znacznej części komórek w obecności etanolu bez „ochrony" kwasu hialuronowego?

O indukcji procesów apoptotycznych w fibroblastach poddanych działaniu EtOH (i o przeciwstawnym, ochronnym działaniu HA) mogą świadczyć wyniki oceny aktywacji kaspazy-9 przedstawione w rozdziale 13 i na ryc. 14. Zgodnie z opisem metodyki, autorka użyła tu testu WB stosując przeciwciało skierowane przeciwko aktywnej formie kaspazy-9 (pojawiającej się w komórkach rozpoczynających proces apoptozy). Podkreślenia tego faktu brakuje (z niezrozumiałego dla recenzenta powodu) zarówno w opisie tekstowym jak i w legendzie ryc. 14, a jest on kluczowy; wyniki nie wskazują

na wzrost ekspresji (a w zasadzie ilości) całkowitej kaspazy-9 w komórkach traktowanych EtOH, a na jej AKTYWACJĘ narastającą w obecności rosnących stężeń etanolu.

W dość krótkiej (jak na tę ilość uzyskanych wyników) Dyskusji autorka zasadniczo poprawnie odnosi swoje wyniki do istniejącej już wiedzy. Recenzent byłby zainteresowany odpowiedzią na parę nasuwających się pytań, której to odpowiedzi w dyskusji zabrakło. I tak: jakie minimalne stężenie etanolu dawało mierzalne efekty w fibroblastach in vitro? Czy użyte stężenie etanolu (25 mM i większe) mogą wystąpić w organizmie osoby nadużywającej (lub tylko używającej) napojów alkoholowych (potwierdzenie tego faktu, a więc w konsekwencji niekorzystnego działania konsumowanego EtOH na fibroblasty in vivo byłoby dodatkowym argumentem dla kampanii antyalkoholowej)? I wreszcie – o czym świadczy podobieństwo wyników uzyskanych dla fibroblastów narażonych na działanie etanolu i tBHP? Ciekawa byłaby też próba spekulacji odnośnie mechanizmu ochronnego działania kwasu hialuronowego...

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Magdaleny Donejko jest merytorycznie ciekawa i zawiera oryginalne elementy, z pewnością warte publikacji. Praca niestety bardzo traci na niestarannym opisie użytych technik badawczych i uzyskanych wyników, co może być konsekwencją niewielkiego doświadczenia publikacyjnego zarówno doktorantki, jak i jej opiekunów. Pomimo to uważam przedstawioną do oceny rozprawę doktorską mgr Magdaleny Donejko za spełniającą wymogi obowiązującej ustawy o stopniach i tytule naukowym i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Fizjopatologii
prof. dr hab. Jacek M. Witkowski