



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski
Senat Uniwersytetu Jagiellońskiego
Wydział Chemii UJ
Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
✉ jdabrows@chemia.uj.edu.pl
☎ (+48)126862750

Recenzja
pracy doktorskiej Pani mgr Justyny Mączyńskiej pt. „Reakcja
fotoimmunologiczna z zastosowaniem cząsteczek Affibody w komórkach
nowotworów HER2-dodatnich”

Recenzowana praca powstała w Katedrze Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Saczko oraz w Zespole Przedklinicznego Obrazowania Molekularnego Instytutu Badań nad Rakiem w Londynie pod kierunkiem dr hab. Gabrieli Kramer-Marek. Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę wiąże się z jednym z istotniejszych wątków podejmowanych w obu laboratoriach, a mianowicie z biochemią i biofizyką nowotworów. Choroby nowotworowe należą do grupy chorób cywilizacyjnych i według WHO stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Z uwagi na złożoność, heterogenność, niestabilność genetyczną, zmienność nowotworu w czasie oraz konieczność personalizacji leczenia onkologicznego - poznanie patofizjologii oraz przyczyn transformacji nowotworowej, a tym samym określenie czynników odpowiedzialnych za odpowiedź guza na zastosowaną terapię oraz jej skuteczność stanowi jedno z najważniejszych zadań współczesnej medycyny. Pomimo dynamicznego postępu w dziedzinie biologii nowotworów oraz rozwoju metod diagnostycznych i terapeutycznych, aktualnie stosowane schematy leczenia oparte głównie o chemioterapię, radioterapię oraz chirurgię to metody inwazyjne, niespecyficzne oraz niestety nie zawsze skuteczne. Dodatkowo znacznym problemem klinicznym w przypadku leczenia systemowego opartego na lekach cytotoksycznych i antyproliferacyjnych jest ciągle obserwowany wzrost oporności wielolekowej (MDR). Obecny stan wiedzy na temat chorób nowotworowych pozwala wnioskować, że do osiągnięcia całkowitego sukcesu terapeutycznego konieczne jest zastosowanie innowacyjnych strategii działających wielokierunkowo, poprzez zróżnicowane mechanizmy biologiczne, ukierunkowane na zniszczenie nowotworu. Do takich rozwiązań należą omawiane w recenzowanej pracy doktorskiej terapia fotodynamiczna (PDT) oraz



fotoimmunoterapia (PIT). Umiejętne wykorzystanie procesów fotofizycznych oraz reakcji fotochemicznych, jakim ulegają fotosensybilizatory po ich wcześniejszym wzbudzeniu promieniowaniem z zakresu widzialnego lub bliskiej podczerwieni, daje możliwość zarówno precyzyjnej diagnostyki jak i skutecznego leczenia nowotworów. Właściwymi czynnikami aktywnymi w PDT i PIT są reaktywne formy tlenu (ROS), będące zasadniczo produktami fotoindukowanego przeniesienia elektronu lub/i przekazania energii ze wzbudzonego stanu trypletowego cząsteczek fotosensybilizatora na tlen cząsteczkowy. Możliwość kontrolowanego generowania ROS zależy w dużym stopniu od właściwości chemicznych i fotochemicznych zastosowanych fotosensybilizatorów. Wciąż prowadzone są intensywne poszukiwania nowych związków lub bardziej złożonych układów absorbujących promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni, charakteryzujących się zwiększoną selektywnością wobec mikrośrodowiska guzów, efektywnością w generowaniu zarówno tlenu singletowego jak i wolnych rodników tlenowych (anionorodnik ponadtlenkowy, rodniki hydroksylowe) oraz dużą skutecznością w terapii fotodynamicznej, fotoimmunoterapii czy teranostyce. Praca doktorska mgr Justyny Mączyńskiej wpisuje się w ten nurt poszukiwań i dotyczy ważnego, interdyscyplinarnego, a tym samym trudnego kierunku badań naukowych. Doktorantka miała okazję wykazać się niecodziennymi umiejętnościami w tak różnorodnych zagadnieniach jak otrzymywanie i określanie czystości i specyficzności koniugatu fotosensybilizatora ftalocyjaninowego z cząsteczkami affibody, badania metodami biologii molekularnej (cytometria przepływowa, western blot, elektroforeza żelowa, ELISA), detekcja ROS *in vitro* oraz badania biodystrybucji i aktywności fotodynamicznej w guzach nowotworowych zwierząt doświadczalnych. Nie ulega wątpliwości, że zgromadzenie przez mgr Mączyńską tak imponującego materiału doświadczalnego, było możliwe dzięki współpracy Doktorantki z zespołami posiadającymi duże doświadczenie badawcze w różnych dziedzinach i dysponującymi zaawansowaną, specjalistyczną aparaturą naukową.

Rozprawa doktorska zatytułowana „Reakcja fotoimmunologiczna z zastosowaniem cząsteczek affibody w komórkach nowotworów HER2-dodatnich” została zredagowana na 169 stronach maszynopisu i składa się z 8 rozdziałów, przy czym dwa ostatnie rozdziały to spis cytowanej w rozprawie literatury (334 pozycje) oraz suplement zawierający wykaz skrótów, rycin i tabel. Rozprawa jest bogato ilustrowana zdjęciami, wykresami i schematami (59 ilustracji). Praca ma typowy dla tego rodzaju opracowań format i zawiera: wstęp literaturowy; krótki rozdział, w którym



doktorantka podaje cele badań; wnikliwy opis stosowanych materiałów i metod oraz 60-stronicową część składającą się z dwóch rozdziałów poświęconych oddzielnemu omówieniu wyników badań, oraz ich analizie i dyskusji. Merytoryczną część rozprawy kończą zwięźle sformułowane wnioski.

Rozpoczynające rozprawę streszczenie w języku polskim i angielskim, w mojej ocenie nie do końca odpowiada postawionym w pracy celom, osiągniętym wynikom oraz najważniejszym wnioskom. Autorka za główny cel pracy uważa „zbadanie skuteczności PIT opartej o koniugat Affibody ukierunkowany na komórki charakteryzujące się nadekspresją receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu HER2”. Abstrahując od tego, że zdanie to jest sformułowane niepoprawnie, uważam, że za główne cele pracy należy raczej uznać otrzymanie koniugatu Afii_{Her2}-IR700, określenie jego specyficzności, lokalizacji komórkowej, ocenę możliwości generowania różnych reaktywnych form tlenu po wzbudzeniu koniugatu oraz określenie mechanizmu śmierci komórkowej wywołanej efektem fotodynamicznym. Nie jest też jasne, co Autorka miała na myśli pisząc o „badaniach potwierdzających słuszność koncepcji”, a wniosek, iż „fotoimmunoterapia doprowadziła do znaczącego zahamowania wzrostu nowotworu” wydaje się być stwierdzeniem zdecydowanie na wyrost, gdyż analiza Kapłana-Maiera (Ryc. 4.46) tego nie potwierdza, a wskazuje raczej na nieznaczny efekt terapeutyczny, nawet po dwukrotnym przeprowadzeniu procedury PDT. Badania biodystrybucji oraz skuteczności fotodynamicznej są w mojej ocenie uzupełnieniem badań *in vitro* i można je potraktować jako badania pilotażowe. W tym miejscu chciałbym też zwrócić uwagę, iż z punktu widzenia chemika tytuł rozprawy jest raczej niefortunny, sugeruje bowiem, iż mamy do czynienia z jedną reakcją, podczas gdy w przypadku fotoimmunoterapii dochodzi do szeregu skomplikowanych pierwotnych i wtórnych procesów i reakcji chemicznych, które finalnie mogą doprowadzić nie tylko do zniszczenia nowotworu, ale też do odpowiedzi immunologicznej, dzięki której możliwe jest całkowite wyleczenie organizmu.

W pierwszej części obszernego wstępu literaturowego Autorka przedstawia podstawowe informacje dotyczące nowotworów, przy czym charakterystyka nowotworów piersi i jajnika omówiona jest bardziej szczegółowo, następnie wnikliwie omawia receptorowe kinazy tyrozynowe, w szczególności rodzinę receptory ludzkich naskórkowych czynników wzrostu HER (*human epidermal growth factor receptor*), aby zakończyć na opisie terapii ukierunkowanych na receptory HER2. Materiał ten został opracowany w sposób zrozumiały, zwięzły, elegancki i zawiera jedynie drobne potknięcia językowe. Następnie mgr Mączyńska scharakteryzowała istotę terapii



fotodynamicznej nowotworów zwracając uwagę na właściwości fizykochemiczne i biologiczne fotosensybilizatorów pierwszej, drugiej i trzeciej generacji. Pokrótkie omówione są konsekwencje fotowzbudzenia fotosensybilizatorów zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*, przy czym doktorantka zwraca uwagę na znaczenie ich efektywnej absorpcji promieniowania w bliskiej podczerwieni dla skutecznej terapii fotodynamicznej nowotworów. Przedstawiony na ryc. 1.5. Diagram Jabłońskiego nie do końca jest prawidłowy, co w konsekwencji skutkuje pojawieniem się błędów w jego interpretacji (np. „stosunkowo trwałe stan wzbudzony-trypletowy (S₂)”, „przejście bezpromienne”, „reakcja trypletu z cząsteczką substratową”). Uważam, że należałoby tu raczej zacytować prace fotochemików, które z pewnością umożliwiają lepsze zrozumienie istoty mechanizmów PDT. Po lekturze tego opracowania nie mam pewności czy Autorka rozumie czym są przejścia elektronowe, jakie są ścieżki dezaktywacji stanów wzbudzonych cząsteczek i co to znaczy, że cząsteczki fotosensybilizatora znajdują się we wzbudzonym stanie singletowym czy trypletowym. Jestem jednak przekonany, że moje wątpliwości zostaną rozwiane podczas egzaminu doktorskiego.

Na stronie 32 oraz 35 Autorka pisze o podwójnej selektywności PDT, uzyskanej poprzez specyficzną akumulację PS w komórkach zmienionych chorobowo oraz poprzez dostarczanie zlokalizowanego przestrzennie światła. Zgadzam się ze stwierdzeniem odnośnie selektywności wynikającej z naświetlania określonego obszaru chorobowego, jednak z zastrzeżeniem, iż niezbędne jest zastosowanie odpowiedniego marginesu naświetlania guza, podobnie jak w leczeniu chirurgicznym. Tylko takie podejście umożliwi efektywne dostarczanie fotonów, a tym samym generowanie ROS w całej powierzchni guza (również na jego brzegach). Preferencyjna akumulacja PS w komórkach nowotworowych nie zawsze jest czynnikiem krytycznym, szczególnie w badaniach *in vivo*. O ile w przypadku nowotworów takich jak glejaki, czy nowotwory trzustki selektywność jest kluczowym elementem, to w przypadku dobrze unaczynionych guzów (np. nowotwory prostaty), nie ma ona zasadniczego znaczenia. Dla przykładu, palladowa pochodna bakteriofobidinu w ogóle nie wnika do komórek nowotworowych (czas od podania PS do naświetlania to tylko 10-15 min), a jest jednym z najbardziej skutecznych fotosensybilizatorów stosowanych obecnie w praktyce klinicznej. Tabela 2 na stronie 36 zawiera sporo błędów w nazewnictwie fotosensybilizatorów/preparatów i jest już nieaktualna. Przykładowo, Padoporfin (Tookad, WST09) po nieudanej III fazie badań klinicznej został zastąpiony bardziej hydrofilową



po pochodną o nazwie INN Padeliporfin (Tookad Soluble, WST11), która została zaakceptowana do stosowania w terapii fotodynamicznej w wielu krajach na świecie.

Dalsza część wstępu poświęcona jest aspektom biologicznym PDT. Ze zrozumiałych względów zagadnienia dotyczące immunogennej śmierci komórkowej (ICD) omówione są bardziej dokładnie. Jest to rzetelne opracowanie zagadnień dotyczących ICD i w zasadzie nie mam większych zastrzeżeń, poza niefortunnymi sformułowaniami wynikającymi z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego, np. „limfocyt T naiwny”. Zapewne Doktorantka miała na myśli tzw. limfocyty T dziewicze, czyli takie, które nie miały jeszcze kontaktu z określonym antygenem. Na koniec omówiono podstawy fotoimmunoterapii oraz diagnostyki fluorescencyjnej. Nie rozumiem tylko dlaczego tematyka poświęcona ‘chirurgii wspomaganą obrazowaniem’ jest podrozdziałem ‘Fotoimmunoterapii’. Mimo wymienionych błędów i pewnych niezręczności, rozdział ten spełnia swoją rolę, gdyż umożliwia czytelnikowi rozprawy doktorskiej zrozumienie istoty podjętych przez Nią badań i stanowi odpowiednie wprowadzenie w ich złożoną tematykę. Wstęp jest również świadectwem dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki do realizacji ambitnych i zróżnicowanych badań.

W rozdziale „Materiały i metody” znajduje się krótki opis stosowanych procedur badawczych, hodowli komórkowych oraz doświadczeń przeprowadzonych na modelu zwierzęcym. Ponadto zamieszczono informacje dotyczące charakterystyki linii komórkowych pod względem ekspresji receptora HER2, opis metodologii określania stężenia, czystości, specyficzności wiązania oraz wyznaczania stałej dysocjacji koniugatu. W części poświęconej metodyce badań biologicznych, doktorantka opisuje stosowane przez Nią testy do określania przeżywalności komórek poddanych działaniu badanego koniugatu w warunkach stresu fotodynamicznego oraz metodologię detekcji ROS *in vitro*. Rozdział ten kończy się opisem badań *in vivo*, w którym znajduje się informacja o implantacji guzów doświadczalnych u myszy, pomiarze kinetyki wzrostu guzów, pomiarach biodystrybucji fotosensybilizatorów oraz stosowanych protokołów terapeutycznych u zwierząt doświadczalnych. Uważam, że opis stosowanych materiałów i metod spełnia swoją zasadniczą rolę, ponieważ zawiera niezbędne informacje umożliwiające odtworzenie warunków badań przez niezależnych badaczy. Nasunęło mi się jednakowoż kilka uwag o charakterze dyskusyjnym, wynikających z czystej ciekawości badacza. Charakterystyka wybranych linii komórkowych być może mogłaby zostać uzupełniona o informacje pod kątem ekspresji badanych receptorów. Warto byłoby tu od razu



napisać, że cechą charakterystyczną komórek MDA-MB-231 jest właśnie brak receptorów dla estrogenów, progesteronu i HER-2, przez co określa się je mianem komórek linii potrójnie negatywnej (TNBC). Z drugiej strony, komórki BT-474 posiadają ekspresję antygenu Her-2/neo i receptora progesteronu, przy jednoczesnym braku ekspresji receptora dla estrogenu. Bardzo dobrą do tego typu badań byłaby też linia komórek SK-BR-3 (ludzki rak sutka z charakterystyczną ekspresją antygenu Her-2/neo, przy braku ekspresji receptorów dla estrogenu i progesteronu), jedna z najbardziej popularnych linii stosowana w badaniach nad HER-2. Na stronie 54 została opisana metoda hodowli sferoidów na płytkach o nadzwyczaj słabej przyczepności (*ultra-low attachment plates*). Czy sprawdzano możliwość tworzenia sfer przez komórki wybranych linii metodą hodowli rotacyjnej, z dodatkiem np. rusztowania takiego jak żele białkowe lub mieszanina białek macierzy zewnątrzkomórkowej typu Matrigel, GelTrex? Szkoda, że nie ma podanej średnicy sfer, które wybierano do eksperymentu oraz ich podstawowej charakterystyki. Zabrakło również opisanej metody selekcji wybranej cząsteczki spośród biblioteki peptydów randomowych, co jest standardowe w tego typu badaniach. Nie ma też podanej struktury i sekwencji aminokwasowej, która rozpoznaje receptory, nie wyjaśniono mechanizmu powinowactwa i wiązania tej konkretnej cząsteczki affibody do wybranego receptora. Zastanawiają mnie również warunki naświetlania komórek oraz sfer 3D. Czy naświetlanie prowadzono w medium komórkowym, czy w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej, po wcześniejszym ich przepłukaniu? Zastosowane techniki w procedurze wyznaczania stałej dysocjacji są komplementarne i nie budzą moich wątpliwości, jednak najczęściej w tego typu badaniach K_d wyznacza się w testach z danym receptorem (na czystym białku rekombinowanym), a dopiero później potwierdza się w układzie *in vitro*, na komórkach wykazujących ekspresję receptora. Nasuwa się też pytanie dlaczego wybrano takie warunki eksperymentu (1 h inkubacji w temperaturze 4°C)? Wydaje mi się, że po godzinnej inkubacji bez surowicy w 4°C część komórek może być martwa. Czy były przeprowadzone równoległe testy żywotności komórek w tych warunkach? Warto na to zwrócić uwagę, ponieważ przy zmianach w błonie komórkowej (obkurczenia komórek, wczesna apoptoza), 'targetowana' jest tylko domena zewnątrzkomórkowa receptora HER2. W paragrafie 3.4.3. opisującym eksperymenty detekcji ROS *in vitro* nie podano szczegółowych warunków hodowli komórek. SOSG nie przechodzi przez błony komórkowe, i generalnie nie wnika do komórki. Aby było to możliwe, należy zastosować procedurę opisaną w pracy *Gollmer et al. Photochem. Photobiol. 2011*. Z opisu nie wynika czy komórki przed



pomiarem przepłukiwano, aby usunąć niezwiązaną sondę. Do detekcji pozostałych ROS Autorka zastosowała sondę fluorescencyjną DCFDA, co oczywiście nie jest błędem, ale sugerowałbym zastosowanie bardziej selektywnych wobec rodników hydroksylovych sond takich jak APF czy HPF.

Na wyróżnienie zasługuje bardzo dokładny opis badań *in vivo*, w szczególności procedura naświetlania guzów, obejmujący również zdjęcia myszy podczas zabiegu terapii fotodynamicznej. Dzięki tak dokładnej dokumentacji, możliwe jest znalezienie popełnionych błędów, a następnie odpowiednia korekta protokołów PDT. Jak już wcześniej wspominałem, aby PDT była efektywna, należy stosować odpowiedni margines naświetlania. W przeciwnym razie zarówno głębokość penetracji, jak i stężenie ROS na obrzeżach guza są niewystarczające do pełnego sukcesu PDT. Może dojść wówczas do ponownego wzrostu guzów kilka dni po terapii, co prawdopodobnie miało miejsce w przypadku opisanego w pracy eksperymentu. Ostatnia uwaga do tej części pracy dotyczy stosowanej terminologii. Na stronie 70 Autorka pisze, że „badano farmakokinetykę Affi^{HER2}- IR700” podczas, gdy w pracy nie ma informacji, ani o pobieraniu próbek krwi, ani tym bardziej o wyznaczaniu parametrów farmakokinetycznych. To co zostało opisane w pracy to badania biodystrybucji. Być może w przyszłości warto byłoby rozszerzyć zakres badań i porównać parametry farmakokinetyczne czystej ftalocyjaniny i koniugatu.

Dla skuteczności PDT istotne znaczenie mają zarówno farmakokinetyka i farmakodynamika fotosensybilizatorów, ale również ich właściwości spektroskopowe i fotofizyczne. Na samym początku opisu wyników zabrakło mi przedstawienia elektronowych widm absorpcyjnych i emisyjnych badanej ftalocyjaniny oraz koniugatu. Ich właściwości optyczne były później wykorzystywane zarówno do wyznaczania K_d jak też do badań metodą mikroskopii fluorescencyjnej oraz do badań biodystrybucji, dlatego zamieszczenie takich danych ułatwiłoby interpretację uzyskanych wyników. Przeprowadzone przez Autorkę badania przy pomocy skaningowej mikroskopii konfokalnej wskazały na gromadzenie się badanego koniugatu początkowo w błonie komórkowej, a po 4 godzinach ich inkubacji z komórkami również w lizosomach. Zastanawia mnie dlaczego nie sprawdzono lokalizacji subkomórkowej w innych organellach, szczególnie w ER, co ma znaczenie w kontekście późniejszych badań nad immunogenną śmiercią komórki. Mechanizm ICD zależy od aktywności markerów HMGB1, białek szoku cieplnego, a to z kolei związane jest z uszkodzeniami i kaskadą sygnalizacyjną charakterystyczna dla stresu siateczki endoplazmatycznej (*Kepp, Garg et al. Consensus guidelines for*



the detection of immunogenic cell death, Oncoimmunology 2014). Dodatkowo, dobrym potwierdzeniem byłoby wykazanie, że po PDT z zastosowaniem affibody-IR700 występują indukowane terapią zmiany w ekspresji EIF2A, BAX, BAK, VAMP czy SNAP25.

Badania biologiczne *in vitro* Doktorantka przeprowadziła na komórkach charakteryzujących się zróżnicowanym poziomem ekspresji receptora HER2 tj. SKOV-3, BT-474, MDA-MB-175, MDA-MB-231 i MDA-MB-468. W celu określenia ich przeżywalności po efekcie fotodynamicznym posłużyła się metodą bioluminescencyjną z zastosowaniem testu CellTiter-Glo®. Pierwszy raz spotykam się z zastosowaniem tego testu i interesuje mnie jakie są jego zalety w porównaniu do tradycyjnych testów typu MTT, Alamar Blue czy LDH? Wyniki, jakie otrzymała Autorka pozwoliły stwierdzić, iż opracowany koniugat Affi_{HER2}-IR700 wykazuje brak cytotoksyczności oraz dużą fototoksyczność wobec komórek badanych linii komórkowych. Zaobserwowany efekt fotodynamiczny zależny był od dawki promieniowania oraz rodzaju linii komórkowej, przy czym komórki charakteryzujące się zwiększoną ekspresją receptora HER2 charakteryzowały się większą wrażliwością na działanie stresu oksydacyjnego związanego ze wzbudzeniem Affi_{HER2}-IR700 promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni.

Pracę kończy dyskusja wyników i wnioski. Pomimo iż dyskusja przeprowadzona jest w sposób szczegółowy i dojrzały, zabrakło mi w niej porównania uzyskanych w pracy wyników z analogicznymi wynikami badań nad fotosensybilizatorami stosowanymi w praktyce klinicznej. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na dość liczne literówki, przeoczenia redakcyjne i drobne błędy gramatyczne, które z całą pewnością wynikały z pośpiechu Doktorantki w przygotowaniu rozprawy doktorskiej. Przykładowo, na stronach 32 i 56 jest odpowiednio anion nadadtlenkowy (O_2^-) oraz $O_2^{\bullet-}$, a powinien być anionorodnik nadadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$). Na stronie 46 pojawiło się niefortunne stwierdzenie „ze względu na fluorescencyjność”, a na stronie 59 „wysoka fluorescencja” oraz „producent tlenu singletowego”. Na stronie 35 natomiast Autorka zaliczyła kwas 5-aminolewulinowy do fotosensybilizatorów drugiej generacji, podczas gdy związek ten nie jest fotosensybilizatorem, a jedynie prekursorem protoporfiryny IX. Wszystkie pozostałe, szczegółowe uwagi przekazałem Doktorantce w formie suplementu do niniejszej recenzji.

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa prezentuje wysoki poziom badań i zawiera elementy nowości naukowej. Na podkreślenie zasługuje umiejętność wykorzystania zdobytej wiedzy teoretycznej i nowoczesnych technik pomiarowych do praktycznego



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski
Senat Uniwersytetu Jagiellońskiego
Wydział Chemii UJ
Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
✉ jdabrows@chemia.uj.edu.pl
☎ (+48)126862750

rozwiązywania skomplikowanych problemów naukowych w zakresie interdyscyplinarnej tematyki. Ponadto na wyróżnienie zasługuje bogata szata graficzna pracy. Większość zarzutów, które podniosłem w niniejszej recenzji należy traktować jako zaproszenie do dyskusji podczas obrony doktorskiej, nie zaś jako istotne błędy merytoryczne wpływające na końcową ocenę dysertacji. Uważam, że jest to wartościowa praca, zawierająca obszerny materiał doświadczalny o niewątpliwiej wartości naukowej, który po odpowiedniej korekcie protokołów terapeutycznych *in vivo* powinien zostać opublikowany w prestiżowym czasopiśmie naukowym, a w przyszłości być może znajdzie zastosowanie praktyczne. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Justyny Mączyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 18.01.2019. *Janusz Dąbrowski*