



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, 25 kwietnia 2016

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Marczyńskiej pt. „Rola metaloproteinazy ADAM17 w zależności od ICOSL odpowiedzi humoralnej”.

Badanie wpływu ograniczonej (modyfikującej) proteolizy na stan biologicznie ważnych białek w organizmie ludzkim i modelach zwierzęcych jest dyscypliną dość nową (liczącą zaledwie nieco ponad trzy dekady). Dopiero niedawno, z nadejściem zarówno nowych koncepcji jak też nowych technik badawczych m.in. z zakresu biochemii analitycznej, biologii komórki, proteomiki i genetyki doświadczalnej nastąpił jej szybki rozwój. Jednym z aspektów tej dyscypliny jest badanie mechanizmów i znaczenia proteolitycznej modyfikacji białek powierzchniowych w różnych typach komórek. Szczególną rolę w tych (intuicyjnie ważnych) procesach ewolucja „przypisała” endopeptydazom z rodziny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*). Opisano już 35 członków tej licznej rodziny, których zadania można streścić jako „przetnij białko w takim miejscu, aby powstał przynajmniej jeden biologicznie aktywny fragment”. Badany przez Doktorantkę enzym ADAM17 jest jednym z nie do końca jeszcze poznanych członków tej rodziny ważnych dla przebiegu procesów immunologicznych i zapalnych (a więc ogólnie obrony przed patogenami) w organizmach ssaków, ponieważ jego substratami są m.in. błonowe prekursorzy cytokin (np. TNF), ich receptory, czynniki wzrostu i ich receptory, a także cząsteczki adhezyjne. Reakcje komórek odporności wrodzonej i nabytej zależne są od interakcji pomiędzy tymi grupami cząsteczek i zmiany ich proporcji pod działaniem ADAM17, ADAM10 i podobnych enzymów mogą istotnie zmieniać tę reaktywność. *Z tego względu badanie przez Doktorantkę udziału ADAM17 w procesach odpornościowych uważam za celowe.*

Jednym z aspektów nabytej odpowiedzi immunologicznej jest odporność humoralna, czyli wytwarzanie przeciwciał przez limfocyty B i powstające z nich komórki plazmatyczne. Proces ten zależy nie tylko od kontaktu receptorów dla antygeny (BCR) ze swoistym antygenem, ale od interakcji wielu cząsteczek na powierzchni limfocytu B z odpowiednimi partnerami (rozpuszczalnymi jak cytokiny i obecnymi na innych komórkach odpornościowych). Zaistnienie i przebieg tych interakcji może więc zależeć od modulacyjnego działania ADAM17. Metaloproteinaza ADAM17 jest znanym dodatnim regulatorem procesu zapalnego, poprzez mechanizm uwalniania TNF z powierzchni komórek. Z kolei ta jedna z najważniejszych cytokin prozapalnych wpływa nie tylko na wydzielanie innych cytokin prozapalnych, ale także na aktywację pomocniczych limfocytów T, która z kolei decyduje o nasileniu odpowiedzi humoralnej. Dzięki tym zależnościom ADAM17 jest implikowana w patomechanizm przewlekłych chorób zapalnych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca i choroba Leśniowskiego-Crohna. W każdej z tych chorób istnieje mniej lub bardziej nasilona komponenta nieprawidłowej odpowiedzi humoralnej, co nawiązuje do tematyki rozprawy. Autorka zresztą *bardzo szeroko i poprawnie opisała zarówno samą ADAM17 i jej rodzinę, jak też procesy immunologiczne (z*

szerokim uwzględnieniem interakcji pomiędzy cytokinami i innymi ligandami a receptorami na powierzchni komórek odpornościowych, w tym pomiędzy parami CD40/CD40L oraz ICOS/ICOSL będącymi przedmiotem badań zawartych w rozprawie) i wreszcie znane już interakcje między proteazami ADAM a reaktywnością immunologiczną. Bardzo ciekawy jest także opis wykorzystanego w badaniach modelu mysiego myszy ADAM17^{ex/ex}. Recenzenta zainteresowała informacja (str 21), że u tych mutantów ilość ADAM17 wynosi około 5% jego ilości w typie dzikim i że to pozwala na uzyskanie żywych dorosłych myszy. Czy wiadomo, jakie istotne procesy (rozwojowe?) wymagają tej – stosunkowo niewielkiej - aktywności ADAM17?

We Wstępie rozprawy jest materiał na dobrą pracę poglądową, do napisania której zachęcam Autorkę. W związku z powyższym uważam zaproponowaną przez Doktorantkę tematykę i hipotezę badawczą (dotyczącą możliwości regulowania odpowiedzi humoralnej przez proteazę ADAM17) za uzasadnioną, ważną i ciekawą.

Jeśli zresztą chodzi o to „uzasadnienie” podjęcia powyższej tematyki, to trochę go brakuje (w konkretnie sformułowanej postaci) we Wstępie, a jeszcze gorzej pod tym względem wypada Streszczenie, z którego w ogóle nie wynika, dlaczego postawiono hipotezę „że ADAM 17 jest bezpośrednio zaangażowany w kształtowanie odpowiedzi humoralnej”. Oczywiście ten zarzut traci na znaczeniu w świetle faktu, że praca pod praktycznie identycznym tytułem została przez Autorkę i współpracowników opublikowana już w r. 2014 w prestiżowym Journal of Immunology, a więc uzyskała aprobatę surowych recenzentów tego czasopisma (w tejże publikacji zawarte jest logiczne uzasadnienie podjęcia tematyki).

Natomiast z faktu, iż rozprawa zawiera dane z w/w publikacji (Marczyńska et al., JI 2014, cytowana jako poz. 201) wynika jednak parę moich wątpliwości. Oczywiście dopuszczalne jest użycie przez doktoranta własnych wyników (nawet opublikowanych w publikacji zbiorowej sygnowanej oprócz Autorki przez trzynastoro współautorów, jak w tym przypadku) jako elementu rozprawy. Nie jest jasne jaką część przedstawionych w rozprawie wyników Autorka wygenerowała samodzielnie, a jaką wykorzystwała dzięki współpracy. Zastanawia także trochę czas pomiędzy złożeniem pracy do publikacji w JI (koniec października 2013) – gdy przynajmniej większość jeśli nie wszystkie dane ostatecznie zawarte w publikacji były już uzyskane – a przygotowaniem i złożeniem rozprawy, które miało miejsce w początkach roku 2016. Dlaczego Autorka nie wykorzystwała danych zawartych w publikacji do przygotowania rozprawy już w roku 2013-2014? Zawartość merytoryczna publikacji w JI w zupełności wystarczyłaby do napisania rozprawy może nie identycznej z przedstawioną do recenzji, ale bardzo do niej zbliżonej. Przecież na 22 rycin w rozprawie ilustrujące uzyskane wyniki (pomijam rycinę „techniczne”, jak np. strategię bramkowania w analizach cytometrycznych) co najmniej 14 jest dokładnym przedrukiem z publikacji a kolejne trzy są nieco zmienione (np. w ryc. 9 użyto wyniku innego z trzech opisanych w legendzie doświadczeń oceniających wpływ braku ADAM17 na poziom ekspresji L-selektyny (CD62L) na powierzchni mysich limfocytów B – por. Fig. 1B z publikacji w JI, a w Ryc. 22C dodano wyniki uzyskane z jednej dodatkowej myszy ADAM17^{wt/wt} i jednej ADAM17^{ex/ex}, co spowodowało statystyczną istotność różnicy liczby centrów rozrodczych w pachwinowych węzłach chłonnych pomiędzy myszami „dzikimi” i mutantami). W ryc. 22 Autorka użyła także innych mikrofotografii niż zamieszczone w publikacji (Fig. 2B), co zresztą uważam w tej sytuacji za błąd, ponieważ mikrofotografia z publikacji znacznie wyraźniej ilustruje tezę, iż w węzłach chłonnych myszy ADAM17^{ex/ex} jest więcej centrów rozrodczych.

Nowe w stosunku do opublikowanych w 2014 wyniki dotyczą badania różnic w architekturze węzłów chłonnych i śledziony myszy ADAM17^{wt/wt} i ADAM17^{ex/ex}, przedstawionych na Ryc. 12-15 (rozmszczenie limfocytów T i B, a także struktur włóknistych i naczyń limfatycznych i wreszcie proporcja foliularnych komórek dendrytycznych do limfocytów B IgD+), jednak są to wyniki „negatywne” w tym sensie, że autorka nie wykryła różnic między tymi właściwościami w narządach limfatycznych myszy o różnym tle

genetycznym. Mimo tego wydzwięku są one ważne, ponieważ wykluczają pewne pośrednie aspekty działania niedoboru ADAM17 na stan limfocytów B. Nowe (w stosunku do publikacji) i ciekawe (choć także „negatywne” w powyższym sensie braku różnic) są także wyniki zaprezentowane na Ryc. 25, a dotyczące porównania zdolności limfocytów B myszy ADAM17^{wt/wt} i ADAM17^{ex/ex} do zasiedlania narządów limfatycznych myszy biorców wt/wt. **Nasuwa się tu jednak pytanie o doświadczenie uzupełniające – jak zachowałyby się limfocyty ADAM17^{wt/wt} i ADAM17^{ex/ex} w narządach myszy ex/ex - czy także nie byłoby różnic w poziomie zasiedlania między komórkami wt/wt i ex/ex? A może poziom zasiedlania narządów ex/ex różniłby się istotnie od poziomu zasiedlania narządów wt/wt? Czy Autorka planuje takie doświadczenie?**

Podobnie nowe są wyniki zaprezentowane na Ryc. 27, mające odpowiedzieć na pytanie czy strategia immunizacji (inna forma antygeny, inny adjuwant) prowadzi do zróżnicowanej produkcji antygenowo swoistych Ig u myszy dzikich i mutantów. I tutaj jednak autorka nie stwierdziła istotnych różnic.

W mojej opinii kluczowe w świetle tematu rozprawy są wyniki zaprezentowane na Ryc. 32 i 33. Autorka udowadnia tutaj, że istnieje bezpośrednia relacja między obecnością ADAM17 i ICOSL a poziomem odpowiedzi humoralnej na owoalbuminę (OVA). Co ciekawe, myszy zmutowane względem ADAM17 i z prawidłowym poziomem ICOSL produkują więcej Ig różnych klas niż myszy „dzikie” pod względem obydwu genów, myszy podwójnie zmutowane nie różnią się zaś pod tym względem od zwierząt wyposażonych w ADAM17, ale pozbawionych ICOSL; wreszcie te ostatnie myszy produkują wyraźnie mniej OVA-specyficznych Ig niż myszy „dzikie” pod względem obydwu genów. Na podstawie tych i wcześniejszych wyników wydaje się więc, że myszy o zredukowanej ekspresji ADAM17 i zachowanej ekspresji ICOSL odpowiadają najsilniej na challenge OVA. Wyniki te zgadzają się z obserwacjami morfologicznymi (zarówno makro jak i mikroskopowymi, wskazującymi na większe rozmiary, wyższą „komórkowość” i większą liczbę centrów rozrodczych w narządach mutantów. Tu uwaga: w Dyskusji (str 110) Autorka wspomina, że rozmiar narządów limfatycznych zwierząt ex/ex był „wielokrotnie większy od rozmiaru organów myszy typu dzikiego”. To stwierdzenie nie wynika z przedstawionych danych; zarówno pokazane na Ryc. 11 węzły chłonne jak i śledziona przykładowej myszy ex/ex nie są „wielokrotnie większe”, a tylko trochę większe od narządów myszy wt/wt. Te wyniki można było zobiektywizować, np. ważąc pobrane organy i porównując ich masy.

Autorka przedstawia solidne dowody doświadczalne na wsparcie swojej hipotezy o modyfikującym działaniu ADAM17 na odporność humoralną (produkcję Ig) z udziałem cząsteczki ICOSL w limfocytach B, bazując na pomiarach produkcji Ig przez komórki myszy o różnej konfiguracji ADAM17 i ICOSL. Wydaje się jednak, że wyciągnięty przez Autorkę wniosek, że ADAM17 reguluje poziom (ekspresję) ICOSL na powierzchni komórek B nie jest poparty przedstawionymi wynikami i polega na częściowo mylnej interpretacji wyników badań cytometrycznych. I tak, na Ryc. 28 i 30 Autorka przedstawia ODSETKI komórek uznanych za ICOSL-pozytywne wśród limfocytów B śledziony myszy wt i ex/ex (kontrolnych i stymulowanych, a także pochodzących od myszy nieimmunizowanych i immunizowanych). **Jednak odsetek komórek pozytywnych względem danego markera nie mówi o poziomie tego markera na nich – równie dobrze, na 20% komórek wt/wt pokazanych jako pozytywne względem ekspresji ICOSL po działaniu PMA, ilość cząsteczek ICOSL nie musi się różnić od tej prezentowanej przez komórki kontrolne, a wytłumaczeniem obniżonego ODSETKA mogłoby być np. selektywne zabijanie komórek ICOSL+ przez PMA (nota bene, PMA ma tendencje do uśmiercania limfocytów, czy w tych badaniach przeprowadzano kontrolę żywotności badanych komórek? Jeśli byłaby ona niezmieniona pod wpływem stymulacji (PMA itd.), można by było warunkowo uznać że rzeczywiście dochodzi do obniżenia ekspresji ICOSL na tych komórkach; dodatkowym potwierdzeniem tezy mogłoby być zbadanie ilości ICOSL techniką Western blot). Właściwą miarą zmian ekspresji ICOSL na badanych komórkach nie jest więc odsetek komórek pozytywnych, tylko poziom średniej intensywności fluorescencji (MFI) sygnału pochodzącego od ICOSL lub, co dałoby jeszcze dokładniejszą**

odpowiedź na pytanie o wpływ ADAM17 na liczbę cząsteczek ICOSL na badanych limfocytach, użycie odpowiednio skalibrowanych ziaren fluorescencyjnych (np. QuantiBrite™) do bezpośredniego pomiaru tej liczby. Dziwi trochę, że także recenzenci JI nie wykryli tej nieścisłości (w publikacji znajdujemy stwierdzenie „IcosL is downregulated”) zwłaszcza, że Fig. 6 w tej publikacji wykazują, że ADAM17 nie hydrolizuje ICOSL, przynajmniej w dość sztucznych warunkach in vitro... Na dodatek, ani w rozprawie, ani w publikacji nie znajdujemy ilustracji (histogramu cytometrycznego) dla tzw. kontroli izotypowej, co uniemożliwia ocenę rzeczywistej skali zmian ekspresji ICOSL na badanych komórkach. Czy taka kontrola była przeprowadzona? Jest to niezmiernie ważne zwłaszcza w świetle wspomnianego na str. 119 faktu znacznego niespecyficznego wiązania się użytych przeciwciał anti-ICOSL do skrawków IHC. To oczywiście inna technika, ale ta informacja podaje wynik oznaczeń cytometrycznych w wątpliwość. Proszę o ustosunkowanie się przez Doktorantkę do tego ważnego zagadnienia w trakcie publicznej obrony.

Jeśli chodzi o opisy metodyki (str 46n) to są one zasadniczo poprawne. Bardzo ważny jest tu opis uzyskanych przez Autorkę i/lub jej współpracowników myszy o genotypach zróżnicowanych nie tylko pod względem ADAM17, ale także pod względem ICOSL (Tabela 3 str 50). Moje wątpliwości dotyczą kilku spraw:

Nie jest jasne, dlaczego Autorka używała dwóch różnych metod (duszenie CO₂ lub iniekcja ketaminy z ksylazyną, str.52) do eutanazji badanych myszy. W przypadku badania procesów, zależnych od działania enzymów, bardzo ważny jest także sposób eutanazji zwierząt doświadczalnych, gdyż np. kwasica wywołana oddychaniem CO₂, a także niektóre substancje usypiające mogą wpływać na aktywność badanych enzymów, a w konsekwencji na badane procesy, także po przeniesieniu komórek do środowiska testowego in vitro. Dlatego w przypadku tego typu badań zaleca się uśmiercanie zwierząt poprzez przerwanie rdzenia. Czy Autorka uwzględniła w swoich badaniach taką możliwość?

Do oznaczania poziomów OVA-specyficznych Ig Autorka użyła techniki ELISA z wykorzystaniem sandwicha z aż 3 kolejnych przeciwciał. **Czy chodziło tu o zwiększenie czułości metody? A jeśli tak, co było kontrolą pozytywną, a zwłaszcza negatywną?**

Na str. 57 Autorka opisuje metodykę doświadczenia polegającego na transferze fluorescencyjnie znakowanych, uprzednio wysortowanych limfocytów B od myszy wt/wt i ex/ex do biorców wt/wt. Fluorochromem użytym do znakowania komórek było CFSE, jednak Autorka nie podaje (także na liście odczynników) pełnej nazwy, a także źródła procedury znakowania (np. odsyłając do własnej publikacji, jeśli użyta procedura była „własną”). Ponadto w tej metodzie, gdy znakowane komórki są wstrzykiwane do żyły ogonowej, większość z nich trafia do płuc zwierzęcia i tam zostaje. Jest to o tyle istotne, że komórki B o różnej aktywności ADAM17 mogą mieć (co wynika także z opisu we Wstępie) potencjalnie różne właściwości adhezyjne do naczyń i tkanki płucnej; w takim przypadku wyniki przedstawione na Ryc. 25 byłyby bardzo trudne do interpretacji. **Czy badano poziom zatrzymania limfocytów ex/ex i wt/wt w płucach ?**

Czy w przypadku oznaczeń IHC stosowana była kontrola negatywna, a jeżeli tak to jaka?

Na Ryc. 15 Doktorantka przedstawia wyniki analizy morfometrycznej zmian liczebności/powierzchni zajmowanej przez komórki dendrytyczne do tej zajmowanej przez limfocyty IgD+. **Dlaczego nie zastosowano tej samej techniki morfometrycznej w przypadku Ryc. 12??**

Zupełnie niejasna jest strategia bramkowania limfocytów B B220+ oraz T CD4+ przedstawiona na Ryc. 16 (str 79). Ze względu na bardzo złą jakość reprodukcji cytometrycznych wykresów dwuparametrowych przedstawionych w tej rycinie, nie można się zorientować np., jakie parametry posłużyły do wyznaczenia pierwszej bramki pokazanej na lewym panelu. Zwyczajowo są to parametry rozproszenia światła na komórkach – FSC i SSC, i ich zróżnicowanie pozwala z dobrym przybliżeniem na odróżnienie limfocytów od innych komórek obecnych w zawieszynie śledziny czy węzła chłonnego. Autorka jednak włączyła do ww bramki praktycznie wszystkie komórki, które pokazał instrument (w tym

także resztki (debris) po lizie erytrocytów oraz duże, ziarniste komórki jądorzaste, prawdopodobnie makrofagi, komórki dendrytyczne itp., co czyni tę bramkę bezwartościową, a na dodatek może doprowadzić do przekłamania wyników wyrażanych jako odsetek danej populacji w innej. Przykładem może być bramka opisana jako określająca limfocyty CD3+CD4+, w której przy takim wyborze bramki wstępnej znajduje się dość spora liczba komórek o niskiej ekspresji CD4 (prawdopodobnie właśnie makrofagów). Wprawdzie wyniki związane z tym błędem (pokazane na Ryc. 17 i 18) zostały już opublikowane w JI, ale w tamtej publikacji nie pokazano strategii bramkowania, która z pewnością wzbudziłaby czujność recenzentów. **Ponieważ, jak się domyślam, surowe pliki danych cytometrycznych zostały zarchiwizowane, bardzo proszę Autorkę o ich powtórne przeanalizowanie z założeniem poprawnych bramek w celu przekonania mnie o rzeczywistym braku różnic w odsetkach limfocytów CD4+ i B u myszy ex/ex i wt/wt.**

Spore wątpliwości budzą analizy statystyczne przedstawione w rozprawie, częściowo z powodu niedoboru informacji. I tak, w rozdziale poświęconym metodyce nie znalazłem podrozdziału dotyczącego statystyki (jakie testy i dlaczego, jaki program obliczający istotność?). Co gorsza, tylko w niektórych opisach rycin zawierających statystycznie porównywane wyniki Autorka podaje, że wykresy słupkowe oznaczają średnie z zaznaczonym odchyleniem standardowym (SD). **Problem w tym, że jeśli przyjmujemy tę informację jako obowiązującą dla wszystkich podobnych rycin, pokazane wartości średnich i SD dla podanej liczebności grup (N=9) różnią się istotnie z zastosowaniem testu t Studenta (np. Ryc. 20, liczebność komórek B GC u wt/wt i ex/ex), a różnica oznaczona jest jako ns?! Jest to bardzo ważne m.in. w świetle porównania wyników na Ryc.22 w rozprawie z wynikami Fig.2B w publikacji w JI, gdzie dodanie wyników z jednej dodatkowej myszy dzikiej i jednej ex/ex spowodowało pojawienie się istotności różnicy dla liczby centrów rozrodczych w pachwinowych węzłach chłonnych! Proszę o ustosunkowanie się.**

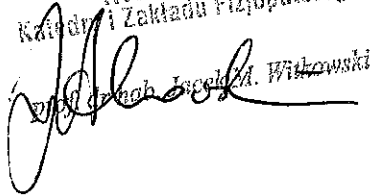
Z pewnym zdziwieniem nie znalazłem w pracy wydzielonego podrozdziału zawierającego podstawowe wnioski wynikające z przedstawionych wyników badań. Oczywiście czytelnik może wysnuć z wyników własne wnioski, ale **na tym etapie rozwoju naukowego ocenie podlega także umiejętność prawidłowego formułowania wniosków z własnej pracy. Dlatego uprzejmie proszę Doktorantkę o ich sformułowanie i przedstawienie podczas publicznej obrony.**

Moje wnioski są następujące: a, Autorka udowodniła, że niedobór ADAM17 o myszy nasila produkcję antygenowo swoistych przeciwciał; b, istnieje zależność – o nieznanym mechanizmie - między poziomem ADAM17 a udziałem ICOSL w odpowiedzi humoralnej. Niestety proponowany na Ryc. 34 model działania ADAM17 jest mylący, ponieważ nie dotyczy on działania (proteolitycznego) tego enzymu, a tylko skutku jego niedoboru. Ciekawa jest koncepcja interakcji między ICOS na komórkach T i ICOSL na limfocytach B jako podłoża migracji tych pierwszych do centrów rozrodczych (Dyskusja, Ryc.35); system ICOS/ICOSL stawałby się tu zespołem cząsteczek adhezyjnych lub układem analogicznym do układu chemokina/receptor chemokinowy. **W każdym takim przypadku jednak mamy do czynienia z gradientem jednego ze składników takiego układu i szkoda, że Autorce nie udało się go wykazać mimo prób (str. 119). Być może do czasu obrony Autorka będzie już dysponowała wynikami potwierdzającymi tę hipotezę.**

I na koniec prosba do Doktorantki o ustosunkowanie się do następującego pytania: w jakim stopniu wyniki uzyskane w badanym modelu mysim przystają do działania ludzkiego systemu odpornościowego, w szczególności do kontroli aktywacji limfocytów B? Oczywiście Autorka wspomina o relacjach ADAM17 do ludzkiej patologii – m.in. choroby Leśniowskiego-Crohna czy reumatoidalnego zapalenia stawów, ale sam fakt takich relacji nie oznacza analogicznych mechanizmów. **Czy więc są dostępne dowody, że ADAM17 działa w ludzkich komórkach B podobnie lub identycznie do opisanego w rozprawie działania tej proteazy w limfocytach mysich?** Recenzent ma doświadczenie z proteazami innej grupy (kalpainami), których zachowanie w komórkach mysich i ludzkich jest przeciwstawne,

dlatego takie pytanie wydaje się uzasadnione. Modele zwierzęce mają umożliwić nam lepsze poznanie biologii nas samych, zwłaszcza w warunkach gdy, jak w tym przypadku, niemożliwe jest przeprowadzenie analogicznych doświadczeń „na ludziach”. **Bardzo proszę o ustosunkowanie się do tego pytania na publicznej obronie.**

Niezależnie od tych dość licznych wątpliwości i uwag krytycznych uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Marczyńskiej pt. „Rola metaloproteinazy ADAM17 w zależnej od ICOSL odpowiedzi humoralnej” jest samodzielną, nowatorską **pracą naukową spełniającą ustawowe wymogi stawiane tego rodzaju opracowaniom i w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr inż. Joanny Marczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Fizjopatologii

mgr Jerzy A. Witkowski