

Warszawa, 28.02.2018 r.

Dr hab. inż. Piotr Ładyżyński, prof. nadzw. IBIB PAN
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej
im. Macieja Nałęcz Polskiej Akademii Nauk
Ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy: *Wpływ promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni na parametry krwi podczas hemodializy w modelu zwierzęcym*

Autor rozprawy: Mgr inż. Karolina Grzeszczuk-Kuć

Promotorzy: Prof. dr hab. Małgorzata Komorowska
Dr hab. inż. Jerzy Detyna, prof. nadzw. PWr

Promotor pomocniczy: Dr inż. Tomasz Walski

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć dotyczy badań, których ostatecznym celem jest przedłużenie życia osobom z chorobami nerek, poddawanych zabiegowi hemodializy, w szczególności cierpiącym na przewlekłą chorobę nerek. Jest to cel ambitny i bardzo istotny z medycznego i społecznego punktu widzenia. Liczbę osób dotkniętych przewlekłą chorobą nerek na świecie szacuje się na ponad 600 mln, w tym około 4,5 mln to osoby żyjące w Polsce. Wśród tych osób co najmniej 1,5 mln jest z tego powodu zagrożonych przedwczesną śmiercią. Co roku w naszym kraju 4 tys. osób rozpoczyna leczenie dializami. Hemodializa pozwala nielicznym osobom na przeżycie nawet 40 lat, ale zwykle osoby starsze, które dodatkowo cierpią na inne choroby przewlekłe, żyją przeciętnie kilka lat a młodsze, u których nie występują inne choroby przewlekłe prócz niewydolności nerek – 20 lat i dłużej. Ograniczony czas życia osób poddawanych hemodializie wynika stąd, że sztuczna nerka zastępuje zdrową naturalną nerkę w sposób niedoskonały. Niedoskonałość ta związana jest m.in. z koniecznością stosowania krążenia pozaustrojowego, tzn. wyprowadzenia krwi z układu krążenia pacjenta na zewnątrz do sztucznego środowiska o ograniczonej biozgodności, które oddziałując z krwią nie tylko oczyszcza ją ze szkodliwych substancji lecz również powoduje niekorzystną, z punktu widzenia zdrowia pacjenta, tj. m.in. aktywację jej składników morfotycznych. W swojej rozprawie doktorskiej mgr Karolina Grzeszczuk-Kuć postanowiła sprawdzić, czy znane z piśmiennictwa, choć jeszcze nie do końca zbadane, co sama Doktorantka zaznacza w pracy, mechanizmy działania promieniowania w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR) na żywe organizmy można wykorzystać, aby zapewnić „ochronę” składników morfotycznych krwi w trakcie hemodializy. Zgodnie z powyższym, Doktorantka sformułowała cel pracy, którym było zbadanie wpływu promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni na krew w hemodializie oraz postawiła tezę, że „promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni zastosowane w odpowiedniej dawce podczas zabiegu hemodializy, pozwala na ochronę składników morfotycznych krwi”. Warto podkreślić,

że zagadnienia związane z wpływem promieniowania NIR na komórki ludzkiego organizmu, w tym w szczególności komórki krwi leżą od wielu lat w kręgu zainteresowań zespołu Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej kierowanego przez prof. dr hab. Małgorzatę Komorowską, jednego z promotorów pracy. Rozprawa wpisuje się w tematykę badań prowadzonych w zespole Pani Profesor i stanowi oryginalne rozwinięcie prowadzonych wcześniej badań w warunkach *in vitro*.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć ma formę dzieła zwartej, liczącego łącznie 209 stron. Zasadnicza część rozprawy składa się z podziękowań, krótkich jednostronicowych streszczeń w języku polskim i angielskim, bardzo szczegółowego spisu treści, spisu najważniejszych skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy oraz 6. rozdziałów spisanych na 142. stronach. Część tę uzupełnia bardzo bogaty, liczący imponujące 470 pozycje, spis piśmiennictwa oraz 4 załączniki.

Pierwszy rozdział pracy stanowi krótkie wprowadzenie, w którym Doktorantka przedstawiła podstawowe dane na temat przewlekłej choroby nerek i hemodializy, podkreślając konieczność prowadzenia dalszych badań zmierzających do przeciwdziałania negatywnym skutkom ograniczonej biogodności materiałów stosowanych w trakcie tego zabiegu. Następnie znajduje się akapit wskazujący na potencjał zastosowania w tym celu promieniowania NIR. Rozdział kończy skrótowe przedstawienie celu pracy.

Kolejny rozdział zatytułowany *Wstęp*, liczy 57 stron i jest najobszerniejszym rozdziałem rozprawy. Pierwsza jego część zawiera kompendium wiedzy na temat budowy i funkcji nerek, chorób nerek, w tym głównie ich ostrej i przewlekłej niewydolności, dostępnych rodzajów leczenia nerkozastępczego, w tym hemodializy, modeli zwierzęcych w badaniach eksperymentalnych ze szczególnym uwzględnieniem hemodializy. W drugiej części *Wstępu* opisano wpływ krążenia pozaustrojowego na krew podczas hemodializy, z uwzględnieniem aktywacji szlaku krzepnięcia, aktywacji układu dopełniacza, aktywacji i agregacji komórek krwi oraz produkcji reaktywnych form tlenu i rozwoju stresu oksydacyjnego. Ostatnia część tego rozdziału poświęcona jest promieniowaniu z zakresu NIR i mechanizmom jego działania na żywe organizmy, ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływania na krew. Rozdział 3 przedstawia, wspomniane wcześniej, cel i tezę pracy.

Począwszy od rozdziału 4. rozpoczyna się część rozprawy, w której Doktorantka przedstawia metodykę i wyniki własnych prac eksperymentalnych. Rozdział 4 poświęcony jest opisowi stosowanych metod i wykorzystywanego materiału doświadczalnego. W pierwszej jego części mgr Karolina Grzeszczuk-Kuć opisuje schemat przeprowadzonych eksperymentów. Następnie przedstawia wybrany model zwierzęcy (który stanowią dorosłe samce owcy rasy Merynos) oraz procedury związane z uzyskiwaniem dostępu naczyniowego i przeprowadzaniem obustronnej nefrektomii, a także metody prowadzenia zabiegów hemodializy (z uwzględnieniem wykorzystanych maszyn dializacyjnych i dializatorów) w grupie zwierząt ze sprawnymi nerkami oraz grupie zwierząt po obustronnej nefrektomii. W kojonych podrozdziałach zaprezentowana jest budowa i parametry techniczne systemu do naświetlania krwi promieniowaniem NIR w trakcie hemodializy oraz metodyka badań laboratoryjnych, z uwzględnieniem preparatyki krwi, oznaczeń stężenia wybranych jonów, badań morfologicznych krwi i wykonywania leukogramu, badania podatności osmotycznej erytrocytów i peroksydacji ich lipidów błonowych, a także badań biochemicznych krwi. W ostatniej części rozdziału Doktorantka prezentuje zastosowaną metodę oceny powierzchni czołowych dializatorów (opracowaną w celu ilościowego charakteryzowania intensywności wykrzepiania się krwi) oraz metody analizy statystycznej wykorzystane do oceny uzyskanych wyników. Informacje dotyczące materiałów i metod zawarte w tym rozdziale uzupełnia Załącznik I, pt. *Szczegółowy opis wykonanych oznaczeń*.

Rozdział 5, poświęcony opisowi wyników eksperymentów przeprowadzonych przez Doktorantkę, liczy 45 stron i ilustruje go 1 rysunek oraz 50 wykresów. W rozdziale tym przedstawiono wyniki badań wpływu promieniowania NIR na składniki morfotyczne krwi podczas krążenia pozaustrojowego w trakcie hemodializy, przy wykorzystaniu modelu zwierzęcego w postaci owiec zdrowych posiadających obie nerki oraz owiec po obustronnej nefrektomii, symulującej końcową niewydolność nerek. Pierwszy cykl analiz dotyczył badania wpływu naświetlania krwi promieniowaniem NIR na formowanie się skrzepów widocznych na powierzchniach czołowych dializatorów. Doktorantka wykazała korzystny wpływ naświetlania krwi na redukcję powierzchni skrzepów. Efekt ten był wyraźniejszy w przypadku owiec zdrowych niż tych po nefrektomii. W kolejnych analizach Doktorantka wykazała zmniejszony spadek stężenia białka całkowitego i albuminy we krwi w trakcie hemodializ pod wpływem jej naświetlania promieniowaniem NIR u owiec zdrowych. U owiec po obustronnej nefrektomii hemodializa prowadziła do wzrostu stężenia białka całkowitego i albuminy niezależnie od zastosowania promieniowania NIR. Kolejne zabiegi hemodializy skutkowały stopniowym obniżaniem się stężenia białka całkowitego. Efekt ten był mniej nasilony w grupie owiec, których krew podlegała naświetlaniu promieniowaniem NIR. Analiza zawarta w podrozdziale 5.3 dotyczy wpływu naświetlania krwi promieniowaniem NIR na leukocyty. Doktorantka stwierdziła, że całkowita liczba leukocytów obniża się w ciągu pierwszych 15 min hemodializy, a następnie wzrasta, co wyjaśniła rozwijającym się w trakcie hemodializy stanem zapalnym. Spadek liczby leukocytów w początkowym okresie i wzrost ich liczby w dalszym przebiegu hemodializy były mniejsze w grupie owiec, których krew naświetlano promieniowaniem NIR. Analogiczne zmiany liczebności mgr Karolina Grzeszczuk-Kuć obserwowała w populacjach monocytów i neutrofilii. Na tej podstawie Doktorantka sformułowała hipotezę o zwiększonej obecności zniszczonych komórek i denaturowanych białek w trakcie hemodializy w przypadku braku naświetlania promieniowaniem NIR. Przeprowadzona w kolejnym podrozdziale analiza stężenia dialdehydu malonowego (MDA), jako markera stresu oksydacyjnego, w grupie owiec po obustronnej nefrektomii, wykazała istotnie niższe stężenie MDA, gdy krew podlegała naświetlaniu promieniowaniem NIR, co Doktorantka uznała za potwierdzenie wyników analizy liczby leukocytów. Następnie Autorka rozprawy przeanalizowała zmianę liczby erytrocytów. Stwierdziła, że liczba erytrocytów wzrasta w trakcie hemodializy, co wynika ze wzrostu hematokrytu będącego, m.in. konsekwencją ultrafiltracji. W przypadku owiec zdrowych w trakcie hemodializ średnia objętość erytrocytów wzrastała a ich średnia masa zmniejszała się w grupie kontrolnej w sposób istotnie większy niż w grupie naświetlanej promieniowaniem NIR. Naświetlanie przyczyniało się również do obniżenia podatności osmotycznej erytrocytów. Doktorantka uznała te zmiany za dowód na ochronne działanie promieniowania NIR na erytrocyty. W grupie owiec po obustronnej nefrektomii niezależnie od stosowania naświetlania liczba erytrocytów rosła w trakcie poszczególnych hemodializ. Liczba erytrocytów obniżała się z zabiegu na zabieg, a spadek ten był większy w grupie niepodlegającej naświetlaniu. Doktorantka wyjaśniła ten spadek brakiem wydzielania erytropoetyny, będącym konsekwencją usunięcia nerek, a różnice między grupami – ochronnym działaniem promieniowania NIR na erytrocyty. Działanie to potwierdzała także większa odporność erytrocytów zwierząt, u których stosowano naświetlanie, na stres osmotyczny. Analiza stężenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH), która była przedmiotem kolejnego podrozdziału rozprawy, wykazała, że w grupach naświetlanych NIR stężenie tego enzymu w trakcie dializ pozostawało na stałym poziomie a w grupach kontrolnych wzrastało. W trakcie poszczególnych zabiegów dializy stężenie LDH utrzymywało się na wyższym poziomie w grupach kontrolnych niż w grupach NIR. Zdaniem mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć powyższe wyniki mogą być skutkiem zarówno

zagęszczenia krwi w wyniku hemodializy jak i uwalnianiem LDH z leukocytów i rozpadających się erytrocytów. Doktorantka stwierdziła, że we krwi owiec naświetlanej promieniowaniem NIR liczebność płytek krwi po przejściu przez dializator obniżała się w mniejszym stopniu niż we krwi owiec stanowiących grupy kontrolne. Wyjaśnieniem tej różnicy może, zdaniem Doktorantki, być hamowanie aktywacji płytek krwi w przypadku jej naświetlania promieniowaniem NIR. Autorka rozprawy zauważyła również, że hemodializa pozwalała skuteczniej usuwać kreatyninę z krwi naświetlanej promieniowaniem NIR, co powiązała ze ograniczonym spadkiem wydajności filtracji wywołanym zatykaniem kapilar dializatora przez krzepnącą krew. Ostatnia część rozdziału dotyczyła analizy zmian stężenia jonów sodu, potasu, chloru i wapnia w trakcie hemodializy, której towarzyszyło bądź nie towarzyszyło naświetlanie krwi promieniowaniem NIR. Doktorantka stwierdziła istotny spadek stężenia jonów potasu w obydwu grupach, przy braku istotnych różnic między grupami. Wyniki dodatkowych analiz, które nie zmieściły się w zasadniczej części rozprawy zostały przedstawione w Załączniku II, pt. *Wyniki oznaczeń*, który liczy 14 stron i zawiera 33 wykresy.

W rozdziale 6 Autorka zaprezentowała dyskusję uzyskanych wyników oraz wnioski płynące z ich analizy.

Analizując zawartość rozprawy stwierdzam, że ma ona charakter wybitnie eksperymentalny, a komponent konstrukcyjny ograniczony jest do skompletowania układu eksperymentalnego, co nie umniejsza dokonań Doktorantki. Cel rozprawy został sformułowany w sposób właściwy i przejrzysty. Teza rozprawy jest oryginalna a jej słuszność została wykazana w toku wykonanych eksperymentów i przeprowadzonej analizy wyników. W sformułowaniu tezy Doktorantka użyła określenia „ochrona składników morfotycznych krwi”. Jest ono czytelne w połączeniu z lekturą całej rozprawy, ale teza powinna również być zrozumiała jako osobne twierdzenie, którego prawdziwość dowodzona jest w toku rozprawy. W tym kontekście sformułowanie to jest nieścisłe, gdyż nie precyzuje przed czym mają być chronione składniki morfotyczne krwi.

Treść dwóch początkowych rozdziałów rozprawy oraz przytoczone w niej, wyjątkowo bogate, piśmiennictwo wskazują na szeroką interdyscyplinarną wiedzę mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć w takich obszarach inżynierii biomedycznej, biologii i medycyny, jak: biopomiary, biofizyka, anatomia i fizjologia człowieka oraz wybranych ssaków, patofizjologia wybranych chorób, immunologia, biozgodność czy analityka laboratoryjna. Zawartość tej części rozprawy dowodzi, że Doktorantka posiada umiejętność przekazywania w przystępny sposób wiedzy z różnych dziedzin.

Oceniając zawartość rozdziałów rozprawy, zawierających opis wyników prac własnych mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć, stwierdzam, że najważniejszym i oryginalnym osiągnięciem Doktorantki jest wykazanie po raz pierwszy z wykorzystaniem modelu zwierzęcego w postaci owcy rasy Merynos, że promieniowanie NIR może ograniczać aktywację i uszkodzenie składników morfotycznych krwi w skutek ich kontaktu z materiałami o ograniczonej biozgodności, wykorzystywanymi w obwodzie krążenia pozaustrojowego w systemach do hemodializy. Osiągnięcie to jest tym cenniejsze, że zastosowany do badań, właściwie wybrany przez Doktorantkę, model zwierzęcy stwarza dużą szansę, iż uzyskane wyniki znajdą potwierdzenie w badaniach klinicznych. Takie potwierdzenie umożliwi opracowanie prostych systemów ograniczających niekorzystny wpływ kontaktu krwi osób dializowanych z materiałem dializatora i innymi elementami obwodu krążenia pozaustrojowego maszyn dializacyjnych, na składniki morfotyczne krwi.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że przeprowadzenie eksperymentów opisanych w rozprawie wymagało współpracy ze specjalistami z wielu dziedzin, a przedstawiona do oceny rozprawa jest dowodem na to, że Doktorantka prócz indywidualnych umiejętności badawczych posiada również zdolności interpersonalne, co stwarza dobrą podstawę do rozwoju Jej kariery naukowej w przyszłości.

Podczas lektury rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć nasuwają się następujące uwagi i pytania:

1. Opis wpływu promieniowania NIR na żywe organizmy, a w szczególności opis jego oddziaływania na komórki krwi zawarty w Rozdziale 2 jest szczegółowy i udokumentowany obszerną liczbą cytowanych publikacji, ale jednocześnie zabrakło w nim wyraźnego uporządkowania czy przeprowadzenia analizy wyników znanych z literatury z uwzględnieniem celu pracy. Ponieważ efektem, na którym zależało Doktorantce było osłabienie reakcji komórek krwi na kontakt z materiałami o ograniczonej biogodności (tj. inhibicja tej reakcji), w rozdziale tym, prócz wiedzy niezbędnej do lektury kolejnych rozdziałów, powinna znaleźć się próba odpowiedzi na pytanie, jaka powinna być charakterystyka promieniowania użytego do naświetlania krwi w trakcie hemodializ, aby osiągnąć zamierzony efekt. Z jednej strony Doktorantka jest świadoma, że wpływ promieniowania NIR na żywe komórki zależy od wielu parametrów (w pracy pojawia się w tym kontekście określenie: „ogrom możliwości kombinacji”) a z drugiej strony w tabelach podsumowujących oddziaływanie promieniowania NIR na poszczególne typy komórek wymieniono jedynie długość fali zastosowanego promieniowania i rodzaj uzyskanego efektu, tj. inhibicję bądź stymulację. Czytając tę część rozprawy odnosi się wrażenie, że to długość fali promieniowania decyduje o rodzaju uzyskiwanego efektu, podczas gdy na podstawie prawa Arndta-Schultza można stwierdzić, że parametrem decydującym o efekcie biologicznym promieniowania o danej długości fali jest dawka zaabsorbowanego promieniowania.
2. Pytania dotyczące planu przeprowadzonych eksperymentów:
 - a) Dlaczego zastosowano inny schemat badania zwierząt zdrowych i tych po obustronnej nefrektomii, a w szczególności, dlaczego zróżnicowano czas trwania i częstotliwość zabiegów hemodializy?
 - b) W opisie przeprowadzonych eksperymentów brakuje informacji czy zwierzęta były przydzielane do poszczególnych grup w sposób losowy. Jeżeli tak, to powstaje pytanie, jaką metodę randomizacji zastosowano, a jeżeli nie – to w jaki sposób decydowano o przydzieleniu zwierząt do poszczególnych grup?
 - c) Ze schematu 4.2 wynika, że w grupie owiec zdrowych doświadczenia zorganizowano w schemacie badania krzyżowego (ang. *cross-over*). Dlaczego analizując te wyniki nie posłużono się metodami statystycznymi przeznaczonymi dla tego typu schematu badania, tj. nie przeprowadzono oceny istotności efektu leczenia (ang. *treatment effect*), efektu czasu / okresu badania (ang. *period effect*) i nie zweryfikowano istotności efektu przeniesienia (ang. *carry-over effect*) oraz dlaczego pomiędzy poszczególnymi grupami dializ nie zastosowano okresu przejściowego (ang. *wash-out period*)?
 - d) W rozprawie brakuje uzasadnienia dla wyboru parametrów promieniowania NIR użytego do naświetlania. Opis zawarty w rozprawie sugeruje, że wybór podyktowany był dostępnością takiego a nie innego urządzenia.
 - e) Zastosowany schemat przeprowadzania nefrektomii jest inny niż przedstawione w rozdziale 2 schematy stosowane w zwierzęcych modelach niewydolności nerek. Zastosowanie tego schematu nie zostało w rozprawie uzasadnione. Brakuje również dyskusji czy i w jakim stopniu jego wybór mógł mieć wpływ na uzyskane wyniki.
 - f) W trakcie hemodializ stosowano dwa typy maszyn dializacyjnych i dwa typy dializatorów. Powstaje pytanie, czy wykluczono wpływ typu dializatora na uzyskiwane wyniki a jeśli tak, to w jaki sposób tego dokonano.

3. Pomijając ewentualne konsekwencje pytania 2c, w opisie metod analizy statystycznej brakuje informacji, na jakim poziomie wyniki testów uznawano za statystycznie istotne (taka informacja pojawia się jednak w opisie wyników poszczególnych eksperymentów). Dużo istotniejszym mankamentem jest jednak to, iż niektóre analizy statystyczne wykonano z naruszeniem założenia o losowości próby leżących u podstaw stosowanych testów, gwarantującego, że dane do analizy są reprezentatywną, losowo zebraną próbką badanej populacji. Zastrzeżenie to dotyczy wyników większości analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem testu t-Studenta, w których do analizowanych grup trafiały wyniki pochodzące od tej samej owcy uzyskane podczas kolejnych sesji hemodializy (np. te zilustrowane na rys. 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 i wielu innych). Istnieje kilka metod pozwalających na przeprowadzenie tego typu analiz w sposób gwarantujący wyższy stopień spełnienia założeń, a w konsekwencji uzyskanie bardziej miarodajnych wyników.
4. Analizując liczby punktów pomiarowych, które były wykorzystywane w trakcie poszczególnych testów zwracają uwagę ich znaczne rozbieżność, co implikuje pytanie o przyczyny tych rozbieżności. Zwykle, jeśli w badaniu uczestniczy n zwierząt podzielonych na 2 grupy i dla każdego z nich wykonywane jest k badań, to liczba analizowanych danych wynosi w każdej grupie $n \times k$. Jeżeli z jakichś przyczyn liczba analizowanych danych jest inna, to należy podać przyczynę tej rozbieżności albo w opisie metod (jeśli wynika ona z przyczyn metodycznych) albo w opisie wyników. W analizowanej rozprawie takiej informacji nie zamieszczono.
5. Sposób prezentacji danych na większości rysunków, zawierających wykresy ilustrujące uzyskane wyniki, utrudnia właściwą percepcję i interpretację prezentowanych informacji:
 - a) Punkty danych na rysunkach ilustrujących zmiany wartości badanych parametrów w trakcie pojedynczej sesji hemodializy (np. Rys. 5.6 i podobne) połączone są liniami prostymi, co sugeruje próbę interpolacji zmian wartości tych parametrów w okresach pomiędzy chwilami wykonywania poszczególnych pomiarów. Byłoby to uzasadnione w przypadku stosowania liniowej skali na osi odciętych. Ponieważ jednak skala nie jest liniowa (ta sama odległość na osi może symbolizować 15 min jak i 210 min) punkty nie powinny być łączone. Ogólnie, typem wykresu, który lepiej obrazuje tego typu dane jest np. wykres słupkowy. Ten typ wykresu można by również zastosować na rysunkach ilustrujących wyniki uzyskane podczas kolejnych sesji dializy.
 - b) Poszczególne punkty pomiarowe są przesunięte równolegle do osi odciętych (reprezentującej, zależnie od rysunku, czas hemodializy lub poszczególne sesje hemodializy) zgodnie ze zwrotem tej osi lub przeciwnie do niego, co sugeruje, szczególnie w odniesieniu do rysunków ilustrujących wyniki uzyskiwane w trakcie pojedynczych sesji dializy, że pomiary w obu grupach wykonywane były w innym czasie. Można się domyślać, że celem Doktorantki było uniknięcie nakładania się na siebie słupków błędów, ale cel ten można osiągnąć również innymi metodami bez wprowadzania „sztucznych” zmian w położeniu punktów pomiarowych.
 - c) Aby zinterpretować opisy osi rzędnych na niektórych wykresach trzeba odwoływać się do opisów w tekście (np. „Zmiana stężenia białka całkowitego”). Co więcej, te same opisy na różnych wykresach oznaczają różne parametry. Wykresy powinny zawierać wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia prezentowanych na nich danych. Dodatkowo, opisy pojawiające się na niektórych rysunkach (np. 4.12 oraz 5.3 i następne) są zbyt małe by móc je komfortowo odczytać. Analizy wykresów nie ułatwia również stosowanie kilku różnych parametrów do opisu zmienności wyników (np. SEM, SD czy 95% przedział ufności), które nie jest uzasadnione merytorycznie.

Powyższe wątpliwości i uwagi nie pozostają bez wpływu na moją ocenę rozprawy, ale ich relatywnie niewielka waga w porównaniu z aktualnością podjętej tematyki, oryginalnością postawionej tezy i wykazaniem jej słuszności w toku wymagających badań eksperymentalnych nie zmienia mojej ogólnie pozytywnej opinii na temat rozprawy i przedstawionych w niej dokonań Doktorantki, które łączą walory poznawcze z potencjałem aplikacyjnym.

Rozprawa napisana jest zrozumiałym i na ogół zwięzłym językiem, chociaż w kilku miejscach Doktorantka użyła trochę nazbyt kwiecistych sformułowań, takich jak „*najbardziej optymalny*” (str. 74 i 81), „*ogromne ilości wody*” (str. 29) czy „*wielkim plusem prowadzenia badań...*” (str. 36).

Układ pracy jest czytelny i dość przejrzysty, a praca mogłaby dodatkowo zyskać, gdyby udało się zmniejszyć stopień zagnieżdżenia podrozdziałów do trzech lub czterech poziomów i uniknąć prezentowania wyników w rozdziale opisującym materiały i metody (np. na str. 79). Sugerowałbym również zamianę kolejności rozdziałów 4.1.2 i 4.1.1 oraz przeredagowanie rozdziału 6., w którym w części zatytułowanej *Konkluzje* występuje fragment tekstu wyróżniony pogrubioną czcionką wymieniający jako pierwszy cel rozprawy dobranie modelu zwierzęcego. Tymczasem cel rozprawy przedstawiony w rozdziale 3 nie zawiera tego typu sformułowania.

W trakcie lektury rozprawy mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć zauważyłem kilka błędów redakcyjnych, stylistycznych i pomyłek merytorycznych, które wymieniam poniżej:

- wyrażenie „*wyznaczenie wielkości współczynnika GFR*” (str. 20) zamiast „*wyznaczenie wartości GFR*”,
- brak konsekwencji w stosowaniu symboli jednostek, które albo występują bezpośrednio za liczbami, których dotyczą albo są od nich oddzielone spacją; brak konsekwencji w stosowaniu skrótów (część z nich pochodzi od nazw w języku polskim a część – w języku angielskim),
- wyrażenie: „*błona półprzepuszczająca*” (str. 23) zamiast „*błona półprzepuszczalna*”,
- wyrażenie: „*ilość milimetrów płynu*” (str. 25),
- sformułowanie: „*nieregularne szybkości przepływu krwi*” (str. 26),
- powtórzenie definicji współczynnika ultrafiltracji (str. 25 i str. 34),
- powtórzenie opisu wad świni jako zwierzęcego modelu w hemodializie (str. 39),
- użycie słowa „*gatunek*” zamiast „*rodzaj*” w odniesieniu do owcy (str. 40),
- sformułowanie: „*Inaczej mówiąc*” (str. 42),
- sformułowanie: „*Niewielkie stężenia czynnika VIIa krążą normalnie we krwi*” (str. 47),
- fragment: „*W skład leukocytów wchodzi granulocyty i agranulocyty. Pierwszą grupę można podzielić na limfocyty i monocyty...*” (str. 50) – zamieniona kolejność opisów granulocytów i agranulocytów,
- skrót: „*R/NIR*”, który nie został objaśniony przed pierwszym użyciem,
- opis, z którego wynika, że komórki hoduje się w atmosferze 5% tlenu węgla (CO) (str. 63) – powinno być prawdopodobnie CO₂,
- powtórzenie tych samych informacji na str. 71 i 72,
- wyrażenie „*zgodę komisji bioetycznej*” (str. 73) zamiast „*zgodę komisji etycznej*” (komisje bioetyczne wydają zgody na badania z udziałem ludzi lub ludzkiego materiału biologicznego),
- sformułowanie: „*w pełnym zasięgu promieniowania*” (str. 82),
- brak wyjaśnienia znaczenia symboli 1-7 w legendzie schematu 4.1,
- sformułowanie: „*a co za tym idzie*” (str. 93),
- błędne podpisy pod rys. 5.3 i 5.4 – zamiast „*albumina*” występuje „*kreatynina*”,
- sformułowanie: „*okres czasu*” (str. 95),

- wyrażenie: „wzrost obydwu rodzajów komórek” (str. 116) zamiast „wzrost liczby komórek obydwu rodzajów”,
- brak cytowanej w tekście pracy w spisie publikacji (str. 141) – publikacja ta znajduje się na liście publikacji Doktorantki w Załączniku IV.

Oceniając dorobek publikacyjny Doktorantki można stwierdzić, że spełnia on wymogi stawiane kandydatom na stopień doktora nauk. W 3 publikacjach, które ukazały się w czasopiśmie indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports* Doktorantka jest odpowiednio 5. i 4. spośród 8. oraz 3. spośród 4 współautorów. Na podkreślenie zasługuje udział Doktorantki w trzech projektach badawczych.

Podsumowując, stwierdzam na podstawie przeprowadzonej oceny, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Grzeszczuk-Kuć pt. „Wpływ promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni na parametry krwi podczas hemodializy w modelu zwierzęcym” stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie biocybernetyka i inżynieria biomedyczna oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Doktorantkę pracy naukowej, a tym samym spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z tym, wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

P. Ładziński