

Gliwice, 4.08.2020 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Aleksandry KACZOROWSKIEJ

„Badanie mechanizmu działania inhibitorów metylacji DNA na zmianę właściwości biomechanicznych chemoopornych komórek ostrej białaczki szpikowej”

Promotorzy: dr hab. Marta Kopaczyńska, prof. PWr, dr hab. Wojciech Kałas, prof. PAN

Dziedzina: nauki inżynieryjno-techniczne

Dyscyplina: inżynieria biomedyczna

1. Problematyka naukowa oraz przedmiot rozprawy

Jednym z poważniejszych problemów, z jakimi zmagać się musi współczesna medycyna, jest wzrastająca zachorowalność na choroby nowotworowe. Nie do końca poznane są przyczyny tego zjawiska, a niezdrowy tryb życia i wysoki poziom zanieczyszczenia środowiska naturalnego nie wyjaśniają w pełni obserwowanego wzrostu. Naukowcy z całego świata prowadzą badania mające na celu z jednej strony zrozumienie istoty procesu nowotworzenia, z drugiej zaś wsparcie diagnostyki chorób oraz planowania efektywnych i jak najmniej toksycznych terapii. Od wielu już lat wiadomo, że choroby nowotworowe, ich przebieg oraz odpowiedź na terapię są bardzo zróżnicowane. Obserwowane różnice międzyosobnicze zależą oczywiście od typu choroby nowotworowej, jednak coraz częściej podnosi się problem lekooporności i nadmiernej lekowrażliwości pacjentów. Nie dotyczy to jedynie chemioterapii, podobne problemy sygnalizowane są również w przypadku radioterapii – tutaj mowa jest o radiowrażliwości i radiooporności pacjentów.

Medycyna personalizowana, stanowiąca rozszerzenie tzw. metody stratyfikacji pacjentów, zajmuje się dopasowaniem odpowiedniej terapii w odpowiednim czasie dla każdego pacjenta indywidualnie w odróżnieniu od klasycznego podejścia, w którym stosuje się jeden lek lub zestaw leków i kilka protokołów dawkowania zależnych od wieku, płci, wagi, stanu ogólnego zdrowia pacjenta lub zaawansowania choroby. Dobór odpowiedniej terapii, uwzględniającej indywidualne cechy pacjenta i choroby, znacznie zwiększa szanse na jej zahamowanie czy całkowite wyleczenie. Dzięki zindywidualizowanemu podejściu możliwe jest dobranie terapii, która nie tylko zwiększy szanse na wyleczenie pacjenta ale również zminimalizuje jej efekty uboczne. Proces optymalizacji terapii w przypadku większości chorób nowotworowych opiera się na analizie profili genetycznych i/lub transkryptomicznych pacjenta, jednak bardzo często nie jest to wystarczające do oceny skuteczności leczenia, nawet po uwzględnieniu czynników klinicznych i środowiskowych. W przypadku chemioterapii niezbędna jest np. dodatkowa wiedza o tym w jaki sposób substancja aktywna przenika do organizmu, jak jest w nim rozprowadzana, utrzymywana, metabolizowana i wydalana. Kluczowym jest również powiązanie farmakokinetyki leku z cechami osobniczymi pacjenta, które wpływać mogą na te zjawiska. Opracowanie testów, które pozwoliłyby przed rozpoczęciem terapii w prosty i szybki sposób ocenić niektóre z tych czynników jest zadaniem, nad rozwiązaniem którego pracuje wiele zespołów badaczy w całym świecie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej wpisuje się w ten obszar badań. Autorka podjęła zakończoną sukcesem próbę opracowania metod pomiaru właściwości biomechanicznych komórek ostrej białaczki szpikowej istotnych z punktu widzenia ich chemooporności. Następnie wykorzystała je do przeprowadzenia wyczerpujących analiz z wykorzystaniem danych rzeczywistych uzyskując interesujące wyniki biologiczne.

Rozważane w pracy zagadnienia wpisują się w zakres intensywnie rozwijającej się medycyny personalizowanej, gdzie narzędzia inżynierii biomedycznej odgrywają istotną rolę w procesie pozyskiwania informacji. Nie ulega też wątpliwości aktualność podejmowanych w rozprawie zagadnień.

2. Analiza treści rozprawy oraz uzyskanych wyników.

2.1. Treść rozprawy

Praca składa się z 11 rozdziałów, streszczeń w języku polskim i angielskim, spisu tabel, rysunków, skrótów oraz obszernego, liczącego 147 pozycji wykazu literatury zawartych łącznie na 128 stronach. Struktura rozprawy dobrze oddaje kolejne etapy realizacji przyjętych w rozprawie celów.

W rozdziale pierwszym, włączonym do części I nazwanej „Wprowadzeniem”, autorka przedstawia podstawowe informacje dotyczące zachorowalności i diagnostyki białaczek w Polsce. Przedstawione zostało bardzo szczegółowe zestawienie podtypów ostrych białaczek szpikowych,

z uwzględnieniem ich cech morfologicznych, immunofenotypowych oraz nieprawidłowości molekularnych i cytogenetycznych komórek nowotworowych. Omówiono też powiązanie podtypów białaczki z ich rokowaniem. W rozdziale 1.2 opisano strukturę i sposób oddziaływania na komórki antracyklin, rodziny antybiotyków przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu ostrych białaczek. Przedstawiono również szczegóły stosowanych w praktyce chemioterapii, z podziałem na chemioterapię indukującą remisję oraz leczenie poremisyjne oraz omówiono powiązanie ich skuteczności z grupami ryzyka pacjentów. Wprowadzono również pojęcie chemooporności i przedstawiono postępowania terapeutyczne stosowane w takiej grupie pacjentów oraz w przypadku nawrotów choroby.

W rozdziale drugim rozprawy skupiono się na przedstawieniu szczegółów diagnostyki i terapii chemooporności w ostrych białaczkach szpikowych. Podkreślono, że aktualnie stosowana klasyfikacja nie jest zadowalająca a diagnostyka kosztowna i czasochłonna. Powszechnie stosowana diagnostyka chemooporności w ostrych białaczkach szpikowych opiera się na analizie frakcji przeżywającej po podaniu jednej lub dwóch cykli intensywnej chemioterapii. Nie można zatem z wykorzystaniem tej metody ocenić poziomu lekooporności przed rozpoczęciem terapii, tym samym nie można zastosować tej techniki diagnostycznej w procesie indywidualizacji terapii. W rozdziale tym zdefiniowano główne cele diagnostyki chemooporności w kontekście tematyki rozprawy, pierwszy - cytuję: „... wykorzystanie autorskiej koncepcji badań właściwości biomechanicznych komórek białaczkowych jako czynnika prognostycznego i swoistego markera chemooporności”; drugi “opracowanie spersonalizowanego i szybkiego testu identyfikującego komórki odporne na antybiotyki antracyklinowe na podstawie wewnątrzkomórkowej lokalizacji leku” oraz trzeci: „opracowanie autorskiej koncepcji terapii chemoopornych pacjentów z ostrą białaczką szpikową poprzez uwrażliwienie komórek chemoopornych na cytostatyki za pomocą decytabiny.”

Rozdział trzeci poświęcony jest omówieniu nowoczesnych technik optycznych w zastosowaniu do oceny właściwości biomechanicznych i optycznych komórek nowotworowych. Autorka szczegółowo przedstawiła ideę działania holograficznej pęsety optycznej oraz omówiła jej wykorzystanie do pomiaru sztywności komórek nowotworowych i jąder komórkowych. Przedstawiono tutaj również przykłady wykorzystania techniki cytometrii przepływowej FACS w hematologii, oraz wspomniano o autorskiej koncepcji wykorzystania cytometrii przepływowej do oceny wewnątrzkomórkowej lokalizacji leku i śledzenia procesu jego uwalniania z komórek. W podrozdziale 3.3 przedstawiono pokrótce nowatorską koncepcję zastosowania trzeciej z technik, fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej, do oszacowania korelacji pomiędzy jądrową lokalizacją leków przeciwnowotworowych a właściwościami biomechanicznymi komórek.



Rozdział czwarty, zamykający część I rozprawy, zawiera szczegółowo określony cel i tezy pracy. W kilku zdaniach nakreślono docelową grupę pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki szpikowej jaką są pacjenci z nawrotową lub pierwotnie oporną białaczką, dla której opracowane narzędzie diagnostyczne jest kluczowe gdyż pozwoliłoby na dostosowanie (indywidualizację) chemoterapii. Postawione trzy tezy uważam za jasno i poprawnie sformułowane, a ich oryginalność w świetle aktualnej wiedzy nie budzi zastrzeżeń.

Rozdziały 5, 6 i 7 rozpoczynają część II pracy, określoną jako „Część eksperymentalna”, i poświęcone są przedstawieniu materiału, metod i odczynników oraz aparatury wraz z oprogramowaniem wykorzystywanych do eksperymentalnego zweryfikowania tez rozprawy doktorskiej. Bardzo szczegółowo omówiono laboratoryjne procedury eksperymentalne wykorzystywane w poszczególnych etapach badań. Tylko w niektórych przypadkach przedstawiono protokół optymalizacji procedury (np. w celu badania lokalizacji daunorubicyny w komórkach białaczkowych z wykorzystaniem cytometrii przemysłowej) można zatem przypuszczać, że są to oryginalne procedury pomiarowe opracowane na potrzeby rozprawy.

Rozdział 8 zawiera główne, oryginalne osiągnięcia Autorki.

W części 8.1 przedstawiono i omówiono wyniki dotyczące oceny sztywności komórek nowotworowych w warunkach kontrolnych oraz po jednorazowym podaniu dwóch leków będących inhibitorami topoizomerazy II: daunorubicyny oraz epirubicyny. Badanie wykonano w grupie siedmiorga pacjentów o różnym poziomie ryzyka oraz różnych profilach genetycznych i immunofenotypowych. Potwierdzono, że za pomocą pęsety optycznej można ocenić sztywność komórek oraz zaobserwowano, że na podstawie pomiaru sztywności komórek nowotworowych w warunkach kontrolnych nie można oszacować stopnia chemooporności. Zaobserwowano również, że po poddaniu komórek działaniu leków sztywność komórek ulega zmianie w zależności od leku oraz profilu genetycznego i immunofenotypowego pacjenta. Odnotowano pewne regularności jednak ze względu na małą liczebność próby nie przeprowadzono szczegółowych analiz statystycznych. W kolejnym eksperymencie skupiono się na jądrach komórkowych jako potencjalnych miejscach oddziaływania antracyklin na komórki nowotworowe. Powtórzono więc eksperyment pomiaru sztywności dla różnych dawek daunorubicyny. Stwierdzono, że zmiana sztywności jąder komórkowych nie jest liniowo zależna od dawki DNR, dla dawek małych (1 i 5 μM) nie zaobserwowano wpływu, dopiero zwiększenie dawki do 10 μM spowodowało istotny wzrost sztywności jąder komórkowych. Wynik jest bardzo interesujący, szkoda, że eksperyment ten przeprowadzono jedynie dla jednej linii komórkowej (AML-New-007). Dla tej samej linii komórkowej oceniono również zmiany sztywności jąder komórkowych pod wpływem inhibitorów metylacji DNA. Do analizy wybrano dwa związki: azacytydynę oraz decytabinę a plan eksperymentu przewidywał przebadanie ich wpływu na sztywność jąder komórkowych dla trzech różnych dawek.

Odnotowano, że już relatywnie niewielkie dawki leków (na poziomie $0,2 \mu\text{M}$) powodują wzrost sztywności jąder komórkowych, jednak odpowiedź komórkowa jest niejednorodna. Zwiększanie dawek leków nie zwiększa sztywności komórek ale trochę stabilizuje ich reakcję.

Z kolei w części 8.2 podjęto się zadania powiązania chemooporności komórek z lokalizacją wewnątrzkomórkową leku wykorzystując do tego celu mikroskopię konfokalną oraz cytofluorymetrię. W tym celu przeprowadzono dwie serie pomiarów mikroskopem konfokalnym dla linii komórkowych wyprowadzonych z komórek białaczki pacjenta wrażliwego na chemioterapię (AML-New-001) oraz pacjenta opornego na chemioterapię (AML-New-020). Zaobserwowano jednoznaczne powiązanie poziomu fluorescencji daunorubicyny w obrębie jąder komórkowych z poziomem chemooporności komórek. Komórki wrażliwe na działanie antracyklin akumulowały w jądrach kilkakrotnie więcej antybiotyku aniżeli komórki niewrażliwe. Badanie to jest badaniem pilotażowym, którego wyniki wskazują na duży potencjał diagnostyczny proponowanej metody, jednak wymagają weryfikacji na znacznie większej próbie oraz automatyzacji technik oceny ilościowej wyników testu. W trakcie dalszych badań zweryfikowano również hipotezę o możliwym powiązaniu ocenianej wcześniej sztywności komórek białaczkowych z wewnątrzkomórkową lokalizacją leków. Zaobserwowano, że w przypadku daunorubicyny u większości pacjentów (a konkretnie wyprowadzonych z ich komórek białaczkowych linii komórkowych) odnotowano akumulację leku w obrębie jądra komórkowego (z wyjątkiem trzech przypadków), natomiast akumulacja epirubicyny w jądrach komórkowych nie była już tak częsta (wystąpiła tylko w jednym przypadku). W grupie pacjentów z nowo zdiagnozowaną ostrą białaczką szpikową zwiększona sztywność komórek, obserwowana po podaniu leku wiązała się z obecnością leku w obrębie jąder komórkowych, jednak oddziaływanie leku wydaje się zmniejszać wraz ze wzrostem poziomu ryzyka cytogenetyczno-molekularnego. Trudno jest to jednak ocenić bez ilościowych wskaźników akumulacji. W kolejnym kroku postawiono sobie za cel zweryfikowanie hipotezy o powiązaniu sztywności komórek z wewnątrzkomórkową lokalizacją leku wykorzystując autorską, bardziej dokładną niż mikroskopia konfokalna metodę pomiaru za pomocą FACS. Opracowaną i zoptymalizowaną procedurę barwienia i pomiaru zastosowano do analizy dwóch przykładowych linii komórkowych: pacjenta wrażliwego na działanie DNR (AML-New-007) oraz linii komórkowej K562 (linia oporna na działanie leków). Wprowadzono współczynniki A oraz B, będące miarą zmiany fluorescencji DNR po izolacji jąder komórkowych i pośrednio oceną ilości leku w cytoplazmie. Większe wartości współczynników wskazują na znaczny spadek fluorescencji leku po izolacji jąder ze względu na jego akumulację w obrębie cytoplazmy. Zaobserwowano, zgodnie z oczekiwaniami, że wartość wskaźnika $A \cdot B$ była znacznie niższa dla linii wrażliwej ($6,7 \pm 1,8$) w porównaniu do wartości obserwowanych dla linii odpornej ($10,8 \pm 3,3$) – wartość efektu 1,5 (duży). Przeprowadzony eksperyment potwierdził, że możliwe jest wykorzystanie cytometrii

przepływowej do oceny ilościowej obecności daunorubicyny w jądrach komórkowych i cytoplazmie komórek nowotworowych przy znacznie niższych stężeniach leku.

Ostatnia część rozdziału 8.2 dotyczyła kwestii oceny ilościowej procesu uwalniania daunorubicyny z komórek białaczkowych. Jest to kolejny czynnik farmakokinetyczny mogący, według aktualnej wiedzy, wpływać na lekooporność komórek, podobnie jak rozpraszanie, utrzymywanie i metabolizm leku. Z wykorzystaniem komórek linii AML-New-007 oraz pomiaru fluorescencji technikami cytometrii przepływowej w czasie dla różnych temperatur hodowli wpływających na poziom metabolizmu komórek (4°C oraz 37°C) potwierdzono, że proces uwalniania leku jest procesem aktywnym a proces wnikania leku odbywać się może aktywnie oraz poprzez bierną dyfuzję. Eksperyment przeprowadzono zarówno na wyhodowanych pierwotnych białaczkowych liniach komórkowych wrażliwych na działanie daunorubicyny jak i bezpośrednio na komórkach białaczkowych wyizolowanych z płynnej biopsji. Eksperyment na komórkach szpiku kostnego pacjentów potwierdził z jednej strony duże zróżnicowanie komórek i występowanie do kilku subpopulacji komórkowych u jednego pacjenta (co może mieć związek z klonalnością nowotworu) z drugiej zaś potwierdzono powiązanie wielkości spadku fluorescencji daunorubicyny po 1 godzinie uwalniania leku z temperaturą inkubacji. Zaobserwowano również związek szybkości uwalniania leku z komórek z poziomem chemooporności komórek wskazując na ten parametr jako na czynnik prognostyczny skuteczności terapii.

Dla kompletności eksperymentu i pełnej weryfikacji postawionej w rozprawie tezy 2, przeprowadzono analizę porównawczą procesu uwalniania leku z komórek w materiale po rozmrożeniu oraz w pierwotnych wyprowadzonych liniach komórkowych. Możliwość wykorzystania w teście diagnostycznym komórek nowotworowych wcześniej zamrożonych jest niezwykle istotna z punktu widzenia diagnostyki i z pewnością zwiększa obszar zastosowania opracowywanych metod. Przeprowadzone serie pomiarów potwierdziły wprowadzić aktywną formę procesu uwalniania daunorubicyny z komórek, jednak uzyskane wyniki wykazały, że nie jest możliwe śledzenie procesu uwalniania leku, i tym samym pośrednia ocena chemooporności, na materiale wcześniej zamrożonym. Pomiar ten można przeprowadzać jedynie na świeżo wyizolowanych komórkach lub na wyhodowanych liniach komórkowych.

Rozdział 8.3 przedstawia wyniki części eksperymentalnej dotyczącej postawionej w rozprawie tezy trzeciej, w której stwierdzono, że „... inhibitory metylacji DNA przywracają wrażliwość chemoodpornych komórek ostrej białaczki szpikowej na cytostatyki stosowane w chemioterapii indukującej.” Korzystając z wyników wcześniej przeprowadzonych eksperymentów dotyczących wpływu azacytydyny i decytabiny na sztywność jąder komórkowych, zdecydowano się na kontynuację badań nad decytabiną, jako wykazującą się większą stabilnością reakcji komórkowej. Wykorzystując ponownie linie komórkowe AML-New-007 oraz AML-New-009, zbadano

toksyczność decytabiny (mierzoną poprzez wskaźnik żywotności komórek po 2 dniach inkubacji w obecności leku) w zależności od jej dawki. Wobec niejednoznacznych wyników testów MTS (dla komórek linii AML-New-007 zaobserwowano zmniejszenie żywotności komórek wraz ze wzrostem stężenia leku, jednak nie potwierdziło się to dla linii komórkowej AML-New-009) przeprowadzono dodatkowo badanie wpływu leku na morfologię komórek białaczkowych. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, mocno wykształcone wypustki komórkowe mogą świadczyć o silnym potencjale proliferacyjnym komórek. Wyniki eksperymentu dla linii AML-New-007 poświadczyły słuszność tego twierdzenia, komórki traktowane decytabiną były mniejsze oraz miały mniejszą liczbę krótszych wypustek komórkowych. Zauważono też istotne zmiany w cytoszkieletcie komórek.

Ostatni z przedstawionych w rozdziale 8.3 eksperymentów stanowił próbę odpowiedzi na pytanie czy terapia, w której łączy się kilka leków o różnej ścieżce oddziaływania (w tym przypadku cytostatyków i leków epigenetycznych). Nie zaobserwowano jednak istotnej synergii leków dla modelowej linii komórkowej AML-New-007.

Rozdziały 9 i 10 stanowią podsumowanie rozprawy, natomiast w rozdziale 11 przedstawiono szczegółowo dorobek naukowy Doktorantki.

2.2. Najważniejsze wyniki przedstawione w rozprawie.

Za najważniejsze wyniki przedstawione w rozprawie uznać można:

1. Opracowanie autorskiej metody badania sztywności komórek i jąder komórkowych z wykorzystaniem holograficznej pęsety optycznej.
2. Opracowanie autorskiej metody oceny wewnątrzkomórkowej lokalizacji daunorubicyny w komórkach białaczkowych za pomocą cytometrii przepływowej jako alternatywy dla technik bazujących na mikroskopii konfokalnej.
3. Określenie związku pomiędzy właściwościami biomechanicznymi jąder komórkowych a obecnością inhibitorów topoizomerazy II oraz leków epigenetycznych.
4. Wskazanie na własności biomechaniczne komórek nowotworowych i/lub ich jąder jako potencjalnego czynnika prognostycznego chemooporności.
5. Zbadanie charakteru procesu uwalniania daunorubicyny z komórek białaczkowych i opracowanie metody jego oceny ilościowej.
6. Potwierdzenie, drogą eksperymentalną, wpływu decytabiny na żywotność komórek białaczkowych poprzez, m.in. zmianę morfologii komórek AML.

2.3. Uwagi merytoryczne.

Praca napisana jest poprawnie, a poniższe uwagi mają charakter dyskusyjny i nie wpływają w istotny sposób na wartość wyników w niej zaprezentowanych. Oto niektóre z nich:

1. Zawarte w rozdziale 1.1 szczegółowe informacje o istniejących podtypach białaczek, aczkolwiek bardzo interesujące i sumiennie przedstawione, wydają się nie być niezbędne i mogą wprowadzać potencjalnego czytelnika w błąd jako istotne z punktu widzenia rozprawy. W żadnym miejscu nie znalazłam bezpośredniego odwołania do tej części poza wspomnianymi w rozdziale 8.1.1. genetycznymi czynnikami rokowniczymi.
2. Brak jest w części dotyczącej materiału (rozdział 6) tabeli, w której zamieszczono by szczegółowe informacje o badanej grupie pacjentów, a w szczególności od ilu pacjentów pobrano szpik kostny, z których biopsji wyprowadzono linie komórkowe, jakie były dla każdego z pacjentów typy wg FAB, jaki był jego status z punktu widzenia chemooporności mierzonej wg standardowych procedur, jaki był wiek i ocena kliniczna pacjenta, czy pacjent przeszedł wcześniej terapię przeciwnowotworową, jaki był profil genetyczny i immunofenotypowy pacjenta itd. Uporządkowanie tej wiedzy i zebranie informacji w jednym miejscu bardzo ułatwiłoby śledzenie wyników.
3. W pracy wykonano bardzo dużo bardzo interesujących eksperymentów pozwalających na opracowanie holistycznego obrazu analizowanych procesów. Zauważyłam jednak, że wykorzystywane w poszczególnych eksperymentach linie komórkowe i/lub komórki szpiku kostnego pochodzą od różnych pacjentów, tylko w nielicznych przypadkach powtarzają się wybrane linie (np. AML-New-007). Czy mogę prosić o wyjaśnienie co jest tego przyczyną? Wobec niewielkiej liczebności analizowanych różnych linii/komórek siłą projektu byłoby przeanalizowanie posiadanych linii komórkowych pod kątem wszystkich omawianych elementów.
4. Przedstawione w pracy wyniki eksperymentalne nie zostały poddane analizie statystycznej z powodu, jak przypuszczam, małej liczebności próby. Omawiane są jedynie opisowo, najczęściej bez podania jakichkolwiek miar ilościowych wspierających wnioski. Może warto w przyszłości sięgnąć do zaproponowanej w latach osiemdziesiątych dwudziestego wieku przez Jacoba Cohena teorii efektów jako alternatywy dla podejścia probabilistycznego?

2.4. Uwagi redakcyjne.

Rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Kaczorowskiej została napisana w sposób poprawny językowo. Nie zawiera poważniejszych błędów redakcyjnych, choć zwraca uwagę forma przedstawienia celu pracy w rozdziale 4. Czytelnik znajduje tam zamiast zwięźle przedstawionego celu pracy tekst stanowiący raczej podsumowanie przeprowadzonych badań, gdyż Autorka używa



określeń: „wyniki badań skorelowano”, „stosowano jednocześnie inne techniki badawcze”, „zastosowanie pozwoliło na określenie zależności” itp.

3. Podsumowanie i ocena końcowa.

Jak już zostało to wcześniej zasygnalizowane, przedstawione powyżej uwagi nie obniżają wartości rozprawy i nie mają istotnego wpływu na wagę oraz jakość przedstawionych w niej wyników. Podjęty w rozprawie doktorskiej temat uważam za niezwykle istotny i aktualny oraz wpisujący się w obszar inżynierii biomedycznej. Zastosowane przez Autorkę metody badawcze są właściwe dla podjętej problematyki a dobór cytowanej literatury nie budzi zastrzeżeń. Przedstawione wyniki w pełni potwierdzają słuszność sformułowanych w części początkowej tez.

Pani mgr inż. Aleksandra Kaczorowska wykazała się dojrzałym warsztatem badawczym oraz rozległą wiedzą z zakresu biologii, medycyny oraz biotechnologii a oceniając oryginalność przedstawionych wyników należy podkreślić fakt, że część z nich została opublikowana w renomowanych czasopismach naukowych.

W związku z powyższym stwierdzam, że praca spełniają wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora w dyscyplinie inżynieria biomedyczna (poprzednio biocybernetyka i inżynieria biomedyczna) określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami) i stawiam wniosek o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na względzie poziom naukowy rozprawy, oryginalność postawionych hipotez badawczych i zastosowanych metod badawczych oraz dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

prof. dr hab. inż. Joanna Polańska