

Prof. dr hab. Andrzej Sechman
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Al. Mickiewicza 24/28
Tel: 012 6333824
e-mail: a.sechman@urk.edu.pl

Kraków, 7.09.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zajdy pt. „**Określenie mechanizmu działania mieszaniny węglowodorów aromatycznych (WWA) w prawidłowych i nowotworowych komórkach warstwy ziarnistej**” wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Łucji Gregoraszczuk

Badania prezentowane w ocenianej rozprawie doktorskiej dotyczą oddziaływania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) na funkcje komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego. Autorka skupiła się przede wszystkim na wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów działania mieszaniny WWA zarówno w prawidłowych jak i nowotworowych ludzkich komórkach ziarnistych. Pomimo znaczącej liczby publikacji dotyczących wpływu WWA na czynność poszczególnych układów organizmu, jednym z najmniej poznanych zagadnień jest problem negatywnego oddziaływania WWA na żeński układ rozrodczy. Głównym źródłem tych związków, zaliczanych do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych, są procesy spalania w sektorze komunalnym i mieszkaniowym, jak również procesy produkcyjne, szczególnie produkcja koksu. W Polsce ponad 80% obecnych w powietrzu WWA jest wynikiem spalania paliw kopalnych. Istotne źródło stanowi także sektor transportu. Innym źródłem tych związków w organizmie jest palenie tytoniu oraz spożywanie żywności poddanej wędzeniu lub grillowaniu. Najlepiej poznanym i jednocześnie wskaźnikowym związkiem zaliczanym do grupy wysokocząsteczkowych WWA jest benzo(a)piren, który został sklasyfikowany przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem jako związek rakotwórczy, działający bezprogowo, tzn. narażenie na każde stężenie substancji może powodować zmiany nowotworowe. W literaturze światowej można znaleźć prace dotyczące obecności i wpływu pojedynczych WWA [szczególnie benzo(a)pirenu] na czynność pęcherzyków jajnikowych ludzi i zwierząt, jednak molekularny mechanizm działania WWA w jajniku nie został dostatecznie wyjaśniony. Badania prowadzone przez Autorkę pracy doktorskiej oraz Zespół kierowany przez Panią prof. Ewę Gregoraszczuk, promotora ocenianej dysertacji, po raz pierwszy wykazały, że we krwi kobiet i krwi pępowinowej występuje całe spektrum cząsteczek WWA, które nie tylko mogą być przyczyną poronień i problemów z płodnością, lecz także mogą wpływać na rozwój organizmu w okresie płodowym oraz w życiu postnatalnym, przyczyniając się do zaburzeń funkcji jajnika. Biorąc pod uwagę fakt, że we krwi kobiet WWA nie występują jako pojedyncze związki, lecz zawsze wszystkie jednocześnie, pani mgr Karolina Zajda postanowiła zbadać wpływ dwóch mieszanin WWA na funkcje komórek ziarnistych jajnika. Mieszanina pierwsza (M1) składała się ze wszystkich 16 nisko- i wysokocząsteczkowych znacznikowych WWA, których obecność stwierdzono we krwi kobiet, natomiast mieszanina druga (M2) z 5 niskocząsteczkowych związków oznaczonych w największym stężeniu w badanych próbkach krwi. Głównym celem badań było określenie molekularnego mechanizmu działania obu tych mieszanin w prawidłowych (linia HGrC1) i nowotworowych (linia COV434) komórkach ziarnistych jajnika oraz ich wpływu na procesy detoksykacji, proliferacji, apoptozy i steroidogenezy.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Zajdy obejmuje 92 strony w formacie B5. Została przygotowana w oparciu o trzy publikacje, które ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych: publikacja nr 1 w *Toxicology* (2017r.; IF=3,908; 100 pkt MNiSW), publikacja nr 2 w *Toxicology Letters* (2019r.; IF=3,620; 100 pkt) i publikacja nr 3 w *Human and Experimental Toxicology* (2020r.; IF=2,171; 70 pkt). Udział Doktorantki w tych pracach wynosił odpowiednio: 55, 70 i 85%. Badania były finansowane z grantu NCN OPUS 9 nr 2015/17/B/NZ7/02954 oraz projektu DS/MND/WBiNoZ/IŻ/39/2017. Wyniki badań zamieszczone w powyższych periodykach naukowych, zostały syntetycznie opisane i przedyskutowane przez Doktorantkę na kartach rozprawy doktorskiej. Praca ta została przygotowana niezwykle starannie pod względem merytorycznym i edytorskim, a zamieszczone schematy ułatwiają zrozumienie celu badań, przebiegu prowadzonych eksperymentów w warunkach *in vitro*, oraz uzyskanych wyników dotyczących molekularnego mechanizmu działania badanych mieszanin WWA w komórkach ziarnistych prawidłowych jak i nowotworowych, oraz mechanizmu związanego z antyestrogennym działaniem WWA w komórkach ziarnistych jajnika.

W rozdziale **Wstęp** Autorka dysertacji najpierw wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematyką badań; charakteryzuje badane węglowodory aromatyczne, przedstawia źródła WWA w środowisku, a następnie zapoznaje czytelnika z dotychczasowymi badaniami dotyczącymi negatywnego oddziaływania WWA na żeński układ rozrodczy. Autorka zauważa, że większość informacji o wpływie WWA na funkcję pęcherzyków jajnikowych pochodzi z badań na zwierzętach eksponowanych na pojedyncze związki zaliczane do grupy WWA. Najważniejsze publikacje z tego zakresu przedstawia w Tabeli 1, co pozwala na łatwe dotarcie do poszczególnych prac oraz zapoznanie się z wynikami tych badań. W dalszej części omawianego rozdziału Doktorantka koncentruje się na opisanu powszechnie obowiązującego kanonicznego mechanizmu działania WWA w komórkach. W mechanizmie tym zaangażowane są receptor AhR, jądrowy translokator receptora AhR (ARNT), sekwencja w DNA będąca elementem odpowiedzi na ksenobiotyki (XRE) oraz enzymy uczestniczące w I oraz II fazie metabolizmu ksenobiotyków. Modulatorem tej ścieżki sygnałowej jest jądrowy represor receptora AhR (AhRR), który hamuje działanie receptora AhR poprzez wiązanie się z białkiem ARNT lub sekwencją XRE. Opisując molekularny mechanizm działania WWA, Autorka pracy zwraca również uwagę na możliwość niekanonicznego mechanizmu działania WWA, który związany jest z: (i) indukcją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co w konsekwencji prowadzi do hamowania szlaku receptora AhR, ekspresji monoooksygenazy CYP1A1 i metabolizmu WWA oraz (ii) aktywacją receptorów estrogenowych: jądrowych (ER) lub błonowego - GPR30.

W kontekście przedstawionych danych literaturowych dotyczących negatywnego wpływu WWA na procesy zachodzące w jajniku, często prowadzące do inicjacji i progresji procesu nowotworowego oraz w oparciu o znajomość piśmiennictwa światowego Autorka dysertacji formułuje **hipotezę badawczą**, która mówi, że „*mieszaniny WWA, w realnych dawkach, działając poprzez receptor węglowodorów aromatycznych (AhR), po utworzeniu kompleksu AhR-WWA aktywują nie tylko kompleks AhR/ARNT, ale także represor receptora AhR (AhRR) lub czynnik transkrypcyjny NF- κ B, co z kolei prowadzi do zahamowania ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm WWA. Ponadto, mieszaniny WWA oddziałując przez receptory estrogenowe ER α /ER β oraz receptor błonowy GPR30 mogą działać jako związki czynne, w konsekwencji powodować zaburzenia steroidogenezy w komórkach ziarnistych jajnika*”. Hipoteza ta została prawidłowo sformułowana, chociaż zdaniem recenzenta można było w niej również uwzględnić wpływ WWA na badane procesy np. detoksykację, proliferację, aktywność lizosomalną, czy też apoptozę. W celu weryfikacji powyższej hipotezy badawczej w ostatnim podrozdziale Wstępu Doktorantka przedstawia trzy cele badawcze:

1. określenie możliwości kanonicznego bądź niekanonicznego mechanizmu działania mieszanin WWA w prawidłowych oraz nowotworowych komórkach ziarnistych jajnika, poprzez ich wpływ na ekspresję genów i białek zaangażowanych w szlak receptora AhR (AhR, AhRR, ARNT oraz CYP1A1 i COMT);
2. potwierdzenie niekanonicznego mechanizmu działania mieszanin WWA, w nowotworowych komórkach ziarnistych jajnika, poprzez ich wpływ na ekspresję białek I i II fazy metabolizmu (CYP1A1, CYP1B1, GSTM1) po wyciszeniu genów kodujących represor AhRR oraz czynnik transkrypcyjny NF- κ B;
3. określenie możliwości działania mieszanin WWA jako związków hormonalnie czynnych w prawidłowych komórkach, poprzez określenie sekrecji E2 oraz ekspresji genu CYP19A1 po wyciszeniu genów kodujących receptor AhR, ER α , ER β oraz GPR30.

Zostały one dobrze sformułowane, a następnie konsekwentnie realizowane w trzech etapach, których wyniki zostały opublikowane we wspomnianych trzech pracach naukowych.

W rozdziale **Materiał i metody**, Autorka najpierw charakteryzuje wykorzystane w doświadczeniach *in vitro* linie komórek ziarnistych jajnika: (i) prawidłowych - HGrC1 oraz (ii) nowotworowych - COV434. Linie te zostały starannie dobrane, gdyż obydwie posiadają receptory FSH, produkują estrogeny, natomiast nie posiadają receptorów LH i nie są zdolne do procesu luteinizacji. Ponadto wykazują ekspresję receptora AhR oraz enzymów uczestniczących w metabolizmie ksenobiotyków. W dalszej części tego rozdziału Pani mgr K. Zajda podaje najważniejsze informacje dotyczące oznaczania stężenia 16 znacznikowych WWA we krwi matek oraz krwi pępowinowej. Analizy te wykonał śp. prof. dr hab. inż. Adam Grochowalski metodą spektrometrii mas typu GC-MS/MS TSQ 8000 na Politechnice Krakowskiej. Materiałem do oznaczeń były próbki krwi pobrane od 20 kobiet dostarczone przez dr hab. n. med. Tomasza Milewicz, pracownika Katedry Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum UJ. W oparciu o wyniki tych oznaczeń do badań zastosowano mieszaninę wszystkich 16 znacznikowych WWA stwierdzonych we krwi matek oraz krwi pępowinowej, zarówno nisko- jak i wysokocząsteczkowych (mieszanina M1), oraz mieszaninę wybranych 5-ciu niskocząsteczkowych WWA (mieszanina M2: naftalen, fenantren, antracen, fluoranten oraz piren). W badaniach Doktorantka wykorzystwała nowoczesne metody analityczne: (a) qRT-PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem sond TaqMan do określenia ekspresji genów na poziomie transkrypcji; (b) Western blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych do pomiaru ekspresji białek; (c) testy kolorymetryczne do pomiaru aktywności enzymu COMT i aktywności lizosomalnej poprzez pomiar aktywności kwaśnej fosfatazy; (d) testy fluorymetryczne do pomiaru: aktywności monoooksygenazy CYP1A1, kaspazy-3 i proliferacji komórek; (e) transfekcję komórek specyficznymi siRNA w celu wyciszenia wybranych genów; (f) metodę immunoenzymatyczną (ELISA) do oznaczania poziomu E2 w medium hodowlanym.

Szkoda, że w tej części pracy Doktorantka nie zdecydowała się na opis metod statystycznych służących do ewaluacji uzyskanych wyników poszczególnych doświadczeń. Chociaż oczywiście są one podane w poszczególnych publikacjach.

Na uznanie natomiast zasługuje umieszczenie w omawianym rozdziale skróconych opisów oraz schematów poszczególnych eksperymentów przeprowadzanych w kolejnych etapach badań, których wyniki zostały opublikowane w trzech pracach naukowych wchodzących w skład ocenianej dysertacji. Biorąc pod uwagę fakt, że publikacje te były już recenzowane przez co najmniej 6 niezależnych recenzentów, oceniam je w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny naukowej.

Celem pierwszej publikacji, która ukazała się w 2017 roku w czasopiśmie *Toxicology*, było określenie mechanizmu działania wspomnianych wcześniej dwóch mieszanin WWA (M1 i M2) w prawidłowych (HGrC1) oraz nowotworowych (COV434) komórkach ziarnistych

jajnika. W publikacji tej najpierw postanowiono określić podstawową ekspresję genów oraz białek zaangażowanych w szlak zależny od receptora AhR (AhR, AhRR, ARNT, CYP1A1 i COMT) w obu liniach komórek ziarnistych. Wyższą ekspresją genów ARNT, CYP1A1, COMT oraz białek AhR, CYP1A1 i COMT charakteryzowały się komórki nowotworowe, natomiast nie było różnic w ekspresji genu i białka represora AhRR. Ekspozycja komórek ziarnistych na działanie mieszaniny M1 i M2, a następnie pomiar ekspresji wspomnianych genów, ich białek oraz procesu proliferacji wskazała na znaczące różnice w mechanizmie działania tych dwóch mieszanin WWA w badanych liniach komórkowych. Wyniki badań pokazały, że w komórkach ziarnistych prawidłowych ekspozycja na mieszaninę M1 uruchamia kanoniczny mechanizm odpowiedzi komórkowej poprzez aktywację receptora AhR oraz enzymów I i II fazy metabolizmu, co prowadzi do stymulacji procesu proliferacji prawdopodobnie przez powstałe metabolity WWA. Natomiast w komórkach nowotworowych COV434 zanotowano zmniejszenie ekspresji receptora AhR oraz monooksygenazy CYP1A1 po ekspozycji na obie mieszaniny. Co ciekawe podobny hamujący efekt na ekspresję AhR zanotowano po ekspozycji komórek prawidłowych na mieszaninę M2 składającą się z 5-ciu niskocząsteczkowych WWA. Wyniki te skłoniły Doktorantkę do wysunięcia hipotezy dotyczącej możliwości niekanonicznego działania mieszanin WWA w nowotworowych komórkach ziarnistych jajnika poprzez interakcję receptora AhR z represorem AhRR oraz czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B2. Hipotezę tę postanowiła sprawdzić w kolejnych eksperymentach, których wyniki stały się podstawą następnej publikacji.

W pracy tej (*Toxicology Letters*, 2019) badano wpływ mieszanin M1 i M2 na ekspresję receptora AhR, białka ARNT oraz białek I (CYP1A1 i CYP1B1) i II (GSTM1) fazy metabolizmu w komórkach ziarnistych linii nowotworowej COV434 z wyciszonym genem kodującym represor AhRR. Następnie zbadano wpływ obu mieszanin WWA na ekspresję białka NF- κ B2 oraz białek AhR, AhRR, CYP1A1 oraz CYP1B1 po wyciszeniu genu NFKB2. Ponadto, określano ekspresję białek receptorów ER α i AR oraz interakcję między receptorem AhR a tymi dwoma receptorami steroidowymi po wyciszeniu genu kodującego receptor AhR. Badano również proliferację nowotworowych komórek ziarnistych jajnika po wyciszeniu genów AHR, ESR1, AR oraz NFKB2. Wykazano, że aktywacja represora AhRR lub czynnika transkrypcyjnego NF- κ B jest odpowiedzialna za zaburzenie metabolizmu WWA, jednak efekty te zależą od składu zastosowanej mieszaniny. Mieszanina M1 (16 związków WWA) hamuje ekspresję receptora AhR oraz enzymu CYP1A1 zarówno za pośrednictwem NF- κ B jak i represora AhRR, natomiast mieszanina M2 (5 niskocząsteczkowych WWA) stymuluje jedynie ekspresję NF κ B, który hamuje indukowaną przez AhR ekspresję CYP1A1. Wyniki te potwierdziły niekanoniczny schemat działania WWA, a także pokazały, że nie tylko wysokocząsteczkowe, lecz również niskocząsteczkowe WWA stanowią potencjalne czynniki o działaniu pronowotworowym. W badaniach tych wykazano również interakcję między receptorami AhR a ER α po ekspozycji na obydwie mieszaniny, a także z receptorem AR w przypadku ekspozycji komórek na mieszaninę M2.

W trzeciej publikacji, która ukazała się w bieżącym roku w czasopiśmie *Human and Experimental Toxicology*, modelem badawczym była linia prawidłowych komórek ziarnistych (HGrC1), która posłużyła do określenia wpływu obydwu mieszanin WWA, jako związków hormonalnie czynnych, na podstawową oraz stymulowaną przez FSH sekrecję E2 oraz ekspresję białek receptorów FSHR, ER α i ER β oraz GPR30, a także aromatazy P450. W celu wykazania udziału poszczególnych receptorów hormonalnych na działanie mieszaniny M1 i M2 określano podstawową i stymulowaną przez FSH sekrecję E2 po wyciszeniu genu ESR1, ESR2, GPER1, a także ekspresję białka P450arom po wyciszeniu wspomnianych genów oraz dodatkowo genu AHR. Wykazano, że niezależnie od składu obie mieszaniny regulowały indukowaną przez FSH ekspresję receptora FSHR. Ponadto stymulowały podstawową i indukowaną FSH ekspresję receptora ER α , nie wpłynęły natomiast na ekspresję receptorów

ER β i GPR30. Obie mieszaniny zmniejszyły sekrecję E2 oraz ekspresję aromatazy. Hamujący wpływ WWA na sekrecję E2 został zniesiony po wyciszeniu genów receptorów ER α i GPER1, a wyciszenie genów AHR, ESR2 oraz GPER1 znosiło hamujący wpływ WWA na ekspresję białka P450arom. Wyniki te pokazały, że mieszaniny złożone z nisko- i wysokocząsteczkowych WWA oraz samych niskocząsteczkowych związków posiadają właściwości antyestrogenne, a ich działanie w prawidłowych komórkach ziarnistych związane jest nie tylko z hamowaniem ekspresji jądrowych receptorów ER α , lecz również błonowych receptorów GPR30.

W odniesieniu do wyników badań chciałbym prosić Doktorantkę, aby w czasie obrony pracy odpowiedziała na następujące pytania:

- *w jaki sposób mieszanina złożona z samych wysokocząsteczkowych WWA mogłaby wpływać na procesy zachodzące w komórkach ziarnistych?*
- *czy można się spodziewać, że w innych liniach komórek nowotworowych, np. KGN, reprezentujących formę dorosłą ziarniszczaka jajnika w III stadium zaawansowania molekularne mechanizmy działania badanych mieszanin WWA będą podobne jak w komórkach linii COV434?*
- *w pracy przedstawiono wpływ WWA na syntezę E2 w prawidłowych komórkach ziarnistych, czy nie warto byłoby zbadać wpływ obu mieszanin na syntezę tego steroidu w komórkach nowotworowych linii COV434?*
- *czy mieszaniny WWA mogą wpływać na ekspresję i/lub aktywność innych enzymów procesu steroidogenezy?*

W rozdziale **Dyskusja**, Doktorantka w logiczny i umiejętny sposób przedstawiła analizę uzyskanych przez siebie wyników badań oraz skonfrontowała je z danymi literaturowymi. Lektura tego rozdziału dowodzi erudycji Autorki, znajomości przedmiotu badań oraz dojrzałości naukowej. Czytelnikowi zaś ułatwia prześledzenie znaczenia uzyskanych wyników dotyczących wpływu badanych mieszanin WWA na funkcję komórek ziarnistych oraz molekularne mechanizmy związane z oddziaływaniem WWA na ekspresję genów i białek należących do szlaku transdukcji receptora AhR, reprezentującego kanoniczny mechanizm działania WWA, a także represora AhRR oraz białka NF- κ B, które uczestniczą w niekanonicznym mechanizmie działania badanych związków w nowotworowych komórkach ziarnistych, prowadzącym do zahamowania ich detoksykacji. Ponadto dobrze opracowane schematy, znajdujące się w rozdziale prezentującym wyniki poszczególnych publikacji, ułatwiają czytelnikowi zrozumienie interakcji pomiędzy receptorem AhR, represorem AhRR, czynnikiem transkrypcyjnym NF κ B i receptorami hormonów steroidowych (ER i GPR30).

W pracy Autorka zamieściła również osobny rozdział pt. **Podsumowanie i wnioski**, w którym w sposób syntetyczny przedstawiła wyniki badań i konkluzje. Zamieściła również wniosek końcowy, w którym zwróciła uwagę na znaczenie uzyskanych wyników badań. Wyniki te dowodzą, że WWA poprzez oddziaływanie na procesy zachodzące w komórkach ziarnistych jajnika mogą być odpowiedzialne nie tylko za zaburzenia płodności, ale także za inicjację i progresję nowotworu jajnika u kobiet żyjących w środowisku o wysokim stopniu narażenia na te związki. W rozdziale tym Autorka zdecydowała się również wykazać mocne i słabe strony badań przedstawionych w dysertacji, co dowodzi Jej krytycznego podejścia do uzyskanych wyników i dojrzałości naukowej.

W rozdziale zatytułowanym **Bibliografia** Autorka cytuje 124 pozycje piśmiennictwa anglojęzycznego i 2 pozycje piśmiennictwa krajowego. Obejmują one szeroki wachlarz najnowszych publikacji naukowych ściśle związanych z tematem pracy doktorskiej

i wykorzystanych przez Doktorantkę w trakcie przygotowania manuskryptów trzech prac naukowych wchodzących w skład ocenianej dysertacji.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego; jest obszernym i wartościowym działem naukowym zawierającym oryginalne wyniki badań, które zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych z zakresu toksykologii. Autorka rozprawy wykazała się umiejętnościami wykorzystania wielu metod badawczych i technik laboratoryjnych, opracowania uzyskanych wyników badań oraz doskonałą znajomością piśmiennictwa, co pozwoliło Jej na przygotowanie publikacji do druku. Konkludując, uważam przedstawioną mi do oceny pracę doktorską Pani mgr Karoliny Zajdy za nowatorską rozprawę naukową, pokazującą po raz pierwszy molekularne mechanizmy działania realnych mieszanin WWA w prawidłowych i nowotworowych komórkach ziarnistych jajnika oraz ich oddziaływanie na procesy detoksykacji, proliferacji i steroidogenezy w komórkach ziarnistych jajnika. Doktorantka wykazała po raz pierwszy, że w komórkach tych mieszaniny WWA mogą działać nie tylko w sposób kanoniczny, ale również niekanoniczny poprzez aktywację białek nienależących do szlaku receptora AhR. Ponadto wykazała, że nie tylko wysokocząsteczkowe WWA, ale również związki niskocząsteczkowe mogą zaburzać funkcje jajnika, co w konsekwencji może prowadzić do inicjacji i progresji procesu nowotworowego. Praca napisana została w sposób przejrzysty i zrozumiały, a Autorka potrafiła przedstawić trudne zagadnienia w przystępnej formie. Mając powyższe na uwadze stwierdzam jednoznacznie, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pt. *"Określenie mechanizmu działania mieszaniny węglowodorów aromatycznych (WWA) w prawidłowych i nowotworowych komórkach warstwy ziarnistej"* spełnia wymogi określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Wnioskuje zatem o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie Pani mgr Karoliny Zajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość naukową, szeroki zakres prowadzonych eksperymentów, świadczący o dużej samodzielności naukowej i badawczej Autorki, a przede wszystkim opublikowanie wyników badań w wysoko punktowanych czasopismach naukowych, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą określoną przepisami obowiązującymi w Uniwersytecie Jagiellońskim.

..........