



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**  
Uniwersytet Łódzki

*dr hab. Paweł Stączek, prof. nadzw. UŁ*  
Kierownik  
Zakładu Genetyki Drobnoustrojów UŁ

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Witek pt. „Evaluation of activity of selected chalcogen-containing compounds against bacterial multidrug-resistance”.**

Pani mgr Karolina Witek wykonała swoją pracę doktorską w Zakładzie Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Jadwigi Handzlik, prof. UJ oraz Dr. Gniewomira Latacza w roli promotora pomocniczego.

Wraz z nieuchronnym wchodzeniem ludzkości w tzw. erę „post-antybiotykową”, wynikającą z szerzenia się rozległej antybiotykoodporności drobnoustrojów, coraz częściej pod znakiem zapytania staje skuteczność leczenia infekcji bakteryjnych, ale także bezpieczeństwo wszelkiego rodzaju interwencji medycznych. Aby przeciwstawić się temu niebezpiecznemu scenariuszowi, niezbędne jest prowadzenie intensywnych badań mających na celu opracowanie lub znalezienie, wśród naturalnie występujących związków, środków przeciwdrobnoustrojowych nakierowanych na nowe cele komórkowe, lub/ oraz nie poddających się dotychczas wykształconym mechanizmom lekooporności. Równie ważnym celem tego typu badań jest dogłębne zrozumienie mechanizmów działania takich nowych leków oraz przewidzenie możliwych przyczyn pojawienia się oporności przeciwko nim. Podjęta przez Doktorantkę tematyka pracy wpisuje się w ten nurt badawczy, zatem uważam ją za niezmiernie interesującą, aktualną i uzasadnioną.

Praca mgr Karoliny Witek została przygotowana w języku angielskim w postaci wydruku obejmującego 171 numerowanych stron, zawierającego streszczenia w języku angielskim i polskim, wykaz stosowanych skrótów oraz siedem głównych rozdziałów: Wprowadzenie, Cele i zadania badawcze, Materiały i Metody, Wyniki wraz z dyskusją, Wnioski, Opis części eksperymentalnej oraz Spis literatury. Jest to w zasadzie typowy układ dla biologicznych prac doświadczalnych, choć rozbieżność zagadnień metodycznych na dwa rozdziały – jeden, umieszczony przed częścią wynikową, opisujący podłoże teoretyczne prowadzonych analiz, i drugi, umieszczony po wnioskach końcowych, przedstawiający zastosowane w badaniach warunki eksperymentalne, jest dla mnie nieco niezrozumiałe, aczkolwiek akceptowalne. Prawdopodobnie, jest to nawiązanie do układu publikacji w czasopiśmie z zakresu chemii i nauk farmaceutycznych, gdzie opis części metodycznej znajduje się na końcu pracy. Całość tekstu opatrzone 36 tabelami i 48 rycinami.

We **Wstępie** pracy Doktorantka przedstawiła zjawisko lekooporności drobnoustrojów, w ciekawy i przystępny sposób opisała jego podstawowe mechanizmy, a także strategie mające na celu przezwyciężenie tego problemu terapeutycznego. Ponadto, dokonała przeglądu gatunków bakterii wykorzystanych w części eksperymentalnej pracy, szczególnie nacisk kładąc na gatunki należące do tzw. grupy ESKAPE – umownego zbioru patogenów stanowiących szczególne zagrożenie medyczne, m.in. ze względu na swoją rozległą lekooporność. Dokonała również charakterystyki pierwiastków należących do 16 grupy układu okresowego określanych jako tlenowce (chalkogeny), pod kątem przydatności ich pochodnych jako związków biologicznie czynnych, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału jako czynników przeciwdrobnoustrojowych. To szczególnie interesujący i ważny fragment pracy, ponieważ tego typu związki były przedmiotem badań mgr Karoliny Witek.

Cały ten rozdział, obejmujący 33 strony, stanowi niezbędną podbudowę teoretyczną, wprowadzającą czytelników w problematykę lekooporności drobnoustrojów i kierunków rozwiązywania tego problemu. Z tego punktu widzenia uważam go za bardzo cenny i przygotowany w oparciu o aktualną wiedzę. Ponieważ jednak recenzja pracy doktorskiej może, a nawet powinna, spełniać również funkcje dydaktyczne, chciałbym zgłosić dwie drobne uwagi odnoszące się do pewnych nie do końca ścisłych sformułowań, jakie znalazłem w tej części pracy:

1. Na stronie 7 Autorka pisze o udziale gyrazy i topoizomerazy IV jako enzymów odpowiedzialnych za replikację, transkrypcję, rekombinację i naprawę DNA. To pewien skrót myślowy, ponieważ po pierwsze enzymy te charakteryzują się odmiennymi aktywnościami, po drugie ich zaangażowanie w określone, globalne procesy wynika ze specyficznego, bardzo konkretnego mechanizmu działania. W związku z tym chciałbym prosić Doktorantkę o przybliżenie tej problematyki w trakcie publicznej obrony pracy.
2. Sugerowałbym nie używać określenia „rodzina” w odniesieniu do patogenów grupy ESKAPE (str. 12), ponieważ termin ten posiada taksonomiczne konotacje, tymczasem należące do niej patogeny wspólnie nie posiadają żadnego bliskiego powiązania taksonomicznego.

**Cel pracy** polegający na identyfikacji nowych związków wykazujących bezpośrednie działanie antybakteryjne, bądź też przywracanie, a nawet wzmacnianie aktywności znanych antybiotyków wobec lekoopornych patogenów z grupy ESKAPE został rozwinięty w oparciu o listę szczegółowych celów cząstkowych, a także uzupełniony wzorami chemicznymi poszczególnych klas badanych związków, oraz schematem, obrazującym strategię prowadzonych badań. To bardzo dobry zabieg, ułatwiający zrozumienie strategii podjętych badań.

W rozdziale **Materiały i Metody**, przedstawiono strukturę 66 z 73 (choć w końcowych wnioskach pojawia się z kolei liczba 75) badanych pod kątem aktywności biologicznej związków chemicznych, opisano podstawowe cechy użytych w badaniach mikrobiologicznych szczepów bakteryjnych, a także scharakteryzowano wykorzystywane w doświadczeniach antybiotyki. Ponadto, jak już wspomniałem powyżej, opisano teoretyczne podstawy oraz ogólną zasadę wykonywania poszczególnych technik badawczych, przenosząc opis konkretnych warunków eksperymentalnych dla poszczególnych metod do rozdziału 6.

Uwagi, jakie nasunęły mi się do tej części pracy, dotyczą przede wszystkim wykazu szczepów. W Tabeli 11. znalazł się bowiem szczep *S. aureus* BFR-6, która to nazwa nie występuje w części eksperymentalnej (prawdopodobnie używane oznaczenie to 5328), natomiast nie został uwzględniony szczep *S. aureus* opisany w części wynikowej jako COL. Ponadto, nie rozumiem, dlaczego część skrótów została wyjaśniona tylko pod Tabelami 11 i 12 (np. CC, MSSA), podczas gdy inne mają swoje wyjaśnienie tylko w wykazie skrótów (np. VISA, CA-MRSA, MRGN), a jeszcze inne w obu miejscach (np. MDR, XDR).

**Wyniki i dyskusja.** Na samym początku tego rozdziału Autorka, ze względu na bardzo obszerną i różnorodną pulę badanych związków, w oparciu o ich obserwowaną aktywność biologiczną, dokonała podziału na cztery grupy: (i) związki nie posiadające istotnej aktywności antybakteryjnej, natomiast wykazujące się aktywnością tzw. antybiotykowych adjuwantów, tj. przywracających lub poprawiającą aktywność znanych lecz nieaktywnych, ze względu na wysoką lekooporność badanych szczepów, antybiotyków; (ii) związki posiadające wyłącznie aktywność antybakteryjną; (iii) związki o własnej aktywności antybakteryjnej i jednocześnie posiadające aktywność antybiotykowych adjuwantów; (iv) związki nie wykazujące aktywności antybakteryjnej i adjuwantowej. To dobry zabieg, ułatwiający zrozumienie wyboru analiz podejmowanych w kolejnych etapach pracy, pomimo, że podział został wykonany na podstawie doświadczeń opisanych dopiero w dalszych częściach tego rozdziału. W pierwszej z grup znalazły się zarówno nieorganiczne sole kwasów tworzonych przez tlenowce, jak i pochodne 5-arylidenoimidazolonu i 5-spirofluorenohydantoiny, 5,5-dimetylohydantoiny, 5-fenylohydantoiny. Zgodnie z przynależnością do tej grupy, nie wykazywały istotnej aktywności antybakteryjnej w teście oznaczania minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC), natomiast współobecność niektórych z nich (np.  $\text{Na}_2\text{TeO}_3$ , czy związku oznaczonego jako AK2) prowadziła niekiedy do znacznego uwrażliwienia niektórych szczepów lekoopornych gronkowców, na nieaktywne dotąd antybiotyki o różnej budowie chemicznej (wielokrotne obniżenie wartości MIC dla danego antybiotyku). W drugiej grupie, znalazły się związki takie jak sole selenazolinowe, naftochinony zawierające selen bądź tellur, pochodne fenotiazyny, chinazolinodiselenony oraz chinazolinoditony, wśród których oznaczenia MIC wskazały na obecność przedstawicieli cechujących się dobrą aktywnością przeciwbakteryjną ( $\text{MIC} < 1 \mu\text{g/mL}$ ) wobec wielu referencyjnych i klinicznych szczepów patogenów z grupy ESKAPE, z których większość była opisana jako szczepy wielolekooporne. W grupie trzeciej swoje miejsce znalazło 10 selenoestrów, a także selenowa pochodna bezwodnika ftalowego, natomiast tylko jeden z badanych związków (ED-71) wykazywał dobrą aktywność przeciwko badanym dwóm szczepom *S. aureus* ( $\text{MIC} = 3,9$  i  $31,2 \mu\text{g/mL}$ ) oraz przyczyniał się do istotnego wzrostu aktywności badanego antybiotyku – oksacyliny. Czwartą grupę związków, wśród których nie wykazano żadnej istotnej aktywności antybakteryjnej i adjuwantowej, stanowiło jedenaście związków będących fenylopiperazynowymi pochodnymi kwasu hydantoinooctowego. Wybrane związki z poszczególnych grup, w zależności od charakteru swojej aktywności, a w przypadku niektórych także, jak rozumiem, na podstawie wcześniejszych danych literaturowych, były poddawane dalszym analizom pod kątem m.in. ich zdolności do generowania reaktywnych form tlenu czy oddziaływania z grupami tiolowymi białek. W przypadku podejrzeń, że związki takie wykazują aktywność adjuwantową badano również ich zdolność do hamowania odpowiednich pomp wielolekowych m.in. poprzez testy wyrzutu lub akumulacji barwników fluorescencyjnych w postaci 1,2'-dinaftyloaminy oraz bromku etydyny i fleroksacyny, poprzez porównania

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

Zakład Genetyki Drobnoustrojów

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

tel. (42) 635 44 66

e-mail: pawel.staczek@biol.uni.lodz.pl

akumulacji badanego związku w obecności bądź braku inhibitora pompy wielolekowej, czy też poprzez badania zdolności do zwiększania przepuszczalności błony zewnętrznej bakterii gramujemnych w teście hydrolizy nitrocefiny. Świadczy to o opanowaniu przez Doktorantkę szeregu technik z zakresu biochemii i mikrobiologii molekularnej. Dodatkowo, badania niektórych aktywnych związków zostały poszerzone o analizy *in silico* w postaci ich dokowania do przewidywanych białkowych celów molekularnych, a także symulacji dynamiki molekularnej układu badany ligand-docelowe białko. To bardzo ciekawe i ważne uzupełnienie prowadzonych badań, jednakże, jak wynika z informacji zamieszczonej w pracy, analizy te zostały dokonane przez inną osobę. W związku z tym mogę oceniać jedynie wnioski, jakie Doktorantka wyciągnęła na ich podstawie i użyła podczas dyskusji swoich wyników.

Zanim jednak przejdę do oceny przedstawionych wniosków muszę przedstawić pewne zastrzeżenia oraz mniej lub bardziej szczegółowe pytania, jakie nasunęły mi się podczas analizy części wynikowej:

- Zauważyłem pewną niekonsekwencję dotyczącą zamieszczania bądź niezamieszczania negatywnych wyników (np. rozdz. 4.1.1.3.1, 4.1.4.2.). Niektóre negatywne wyniki istotnie mogą zostać pominięte, tak jak pominięto informację o poszukiwaniu aktywności adjuwantowej soli selenazolinowych, skoro umieszczono je w kategorii związków o braku takich właściwości, ale w takim razie nie rozumiem po co pozostawiono taki opis w odniesieniu do zakwalifikowanych do tej samej kategorii naftochinonów zawierających selen i tellur (rozdz. 4.2.4.2.). Z kolei w przypadku rozdz. 4.2.3.2.1 umieszczenie jedynie dość ogólnikowych informacji o nieoczekiwanym braku produkcji ROS przez badane związki, użyciu AAPH jako pozytywnej kontroli (bez podania jakie wartości uzyskano dla tego związku, co mogłaby wskazać, czy prawidłowo przeprowadzono doświadczenie) oraz brak informacji, o rezultatach jakie uzyskano dla dodatkowej kontroli w postaci ebselenu, nie jest, moim zdaniem, właściwym zabiegiem. O ile w publikacjach pomijanie mniej istotnych wyników jest powszechnie stosowane i dopuszczalne, a wręcz wskazane z racji m.in. oszczędności miejsca, czy utrzymania rytmu narracji, o tyle w pracach magisterskich czy doktorskich zabieg ten raczej nie powinien być stosowany. Pełniejsza dokumentacja pozwala bowiem lepiej ocenić biegłość warsztatową autora pracy, a czasem pozwala zauważyć jakieś przeoczone zależności.
- Jaki był zamysł użycia ebselenu w doświadczeniu przedstawionym w Tab. 26.? Jeśli bowiem miał służyć jako związek kontrolny o wysokiej aktywności antybakteryjnej, to nie spełnił tego oczekiwania, ponadto uważam, że w takim wypadku lepiej wykorzystywać powszechnie stosowane antybiotyki, ewentualnie wskazując, że są mniej aktywne od związku badanego. Podobnie, w jakim charakterze ebselen pojawia się w doświadczeniach opisanych w rozdz. 4.2.3.1.2? Z opisu wynika raczej, że miał być porównany z badanymi związkami pod kątem generowania ROS, tymczasem jest on raczej uważany za związek o charakterze antyoksydacyjnym.
- Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka podczas wyboru szczepów bakteryjnych do swoich eksperymentów? Np. dla badania aktywności niektórych związków o charakterze adjuwantów wykorzystywane były bowiem 3 szczepy *S. aureus*, dla innej serii związków raz 10 szczepów tego gatunku, ale czasem tylko 9 szczepów (Tab. 17. i 18. vs. Tab. 19. i 20.), z kolei wśród związków o charakterze

wyłącznie antybakteryjnym niektóre były badane na pełnym zestawie patogenów z grupy ESKAPE (11 szczepów *S. aureus*, 3 szczepy *K. pneumoniae*, 3 szczepy *Acinetobacter* spp., 4 szczepy *P. aeruginosa* i 4 szczepy *E. coli*)(Tab. 25., 26.), inne tylko na 3 szczepach *S. aureus* (Tab. 27.), kolejne na 8 szczepach *S. aureus* (Tab. 28.), jeszcze inne na 11 szczepach *S. aureus*, 2 szczepach *P. aeruginosa* i 1 szczepie *A. baumannii*. Ponieważ w wielu przypadkach uzyskiwano niską aktywność badanych związków, rozumiem, że kwestia braku aktywności nie stanowiła tutaj kryterium doboru szczepów.

- Czy badano aktywność cytotoksyczną związków będących przedmiotem zainteresowania Doktorantki? Za wyjątkiem oznaczenia wartości  $IC_{50}$  dla tellurynu sodowego i kilku ogólnych wzmianek opartych o dane literaturowe, nie znalazłem żadnej informacji na temat tego istotnego parametru, wskazującego na przydatność badanego związku jako potencjalnego kandydata na lek przeciwdrobnoustrojowy. Przy okazji chciałbym spytać, czy w przypadku najbardziej obiecujących związków przewidywane są analizy innych aktywności biologicznych, np. aktywności bakteriobójczej (poprzez wyznaczanie współczynnika MBC), mutagenności czy genotoksyczności?
- Zabrakło mi dokumentacji detekcji cząsteczkowego telluru i selenu pod wpływem seleninu/tellurynu sodowego.
- Co przedstawiają wykresy zamieszczone na Ryc. 32.? Z podpisu wynika, że obrazują one akumulację badanych związków, niestety brak jest opisów osi wykresów, można się domyślać, że na osi odciętych przedstawiono długość fali światła, czy zatem jest to równocześnie analiza spektrum emisji badanych związków? Jak zatem wytłumaczyć różnice w charakterze krzywych uzyskanych przy braku i obecności CCCP dla związku BM-19 w zakresie ~320-400 nm?

Dla celów lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw obserwowanych właściwości badanych związków, mgr Karolina Witek przeprowadziła szereg wspomnianych powyżej testów biochemicznych i mikrobiologicznych, które pozwoliły jej na sformułowanie interesujących **wniosków**. Dyskutując swoje wyniki, ze znanstwem wspomagała się interesującymi danymi teoretycznymi uzyskanymi w ramach współpracy z dr. S. Podlewską i IF PAN w Krakowie. Wykazała się także bardzo dobrą znajomością literatury naukowej, cytując na potwierdzenie przedstawionych przez siebie koncepcji, szereg znaczących, aktualnych pozycji piśmiennictwa. Wydaje mi się jednakże, że w kilku miejscach Doktorantka wyciągnęła zbyt daleko idące wnioski, opierając swoją argumentację na dość ograniczonym zakresie danych eksperymentalnych, z kolei w innych, być może, mogła przedyskutować pewne zagadnienia nieco dogłębniej. W związku z tym prosiłbym o rozwianie niektórych z moich wątpliwości i ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

- Jako jedna z możliwych przyczyn działania tellurynu i seleninu sodowego wymieniane jest zjawisko redukcji tych związków do cząsteczkowego telluru i selenu, co wywołuje znaczący stres mechaniczny, jakiemu poddawane są komórki bakteryjne (str. 63), konsekwencją czego może być osłabienie komórki bakteryjnej (jak rozumiem w sensie przepuszczalności osłon komórkowych?) i zwiększenie jej podatności na użyte antybiotyki. Czym w takim razie wytłumaczyć znaczące różnice efektu adjuwantowego, obserwowane między tellurynem a seleninem sodowym, jakie przedstawiono w Tab. 14.? Czy krystaliczne nano- i mikrocząstki telluru mogą tak

znacząco różnić się swym działaniem, na komórki tego samego szczepu, zwłaszcza w świetle cytowanych na str. 61. pozycji literaturowych? Być może analiza porównawcza morfologii tych cząstek dałaby jakieś podpowiedzi.

- Na jakiej podstawie wytypowano związki AK1 i AK2 jako bardziej aktywne pod względem adjuwantowym od AK4? Podobnie, dlaczego za aktywniejszy uznano AR3 niż AR9? Jeżeli kryterium porównania stanowiłoby stężenie użytego związku, to związki AR3 i AR9 były testowane w podobnych stężeniach. Jeśli zaś porównanie było oparte na obliczeniach parametru A przedstawionego w Tab. 17-20., to bez pełnych danych dla 1/4 MIC każdego z badanych związków trudno wyciągać jakieś wnioski (w przypadku AK4 i AR9 nie wiemy, czy przy użyciu 1/4 MIC nie uzyskano by porównywalnych, a nawet lepszych wyników). Jest to tym istotniejsza kwestia, że rzutuje ona na kolejne wnioski stawiane w pracy.
- Dlaczego w teście RTE (rozdz. 4.1.4.3., Ryc.30.) nie zastosowano/nie przedstawiono żadnej kontroli, np. nie analizowano badanych związków w obecności PAβN, bądź też nie użyto szczepu z nieaktywną pompą AcrAB-TolC? Co Doktorantka rozumie pod pojęciem indukcji ekspresji pomp efflux (str.97) przez badane związki i ewentualnie, jakie doświadczenia zaproponowałaby dla udowodnienia swojej hipotezy?
- Jak wytłumaczyć wzrost akumulacji fleroksacyny w obecności związków BM-27 i P17a, przy jednoczesnym braku poprawy aktywności w takich warunkach innego antybiotyku z grupy fluorochinolonów, jakim jest norfloksacyna? Czy próbowano oznaczyć MIC dla fleroksacyny w odniesieniu do badanego zestawu szczepów oraz aktywność adjuwantową badanych związków wobec tego antybiotyku?
- Jeżeli założymy, że prawdą jest stwierdzenie, że przyczyną spadku aktywności przeciwgronkowcowej związku PA-1 wobec szczepu ATCC 25923 (Tab. 25. i str. 106) jest zdolność tego drobnoustroju do tworzenia biofilmu, to czy efekt ten nie powinien być obserwowany także dla związków PA-5, PA-6? Jaka mogłaby być przyczyna takich różnic?
- W analizie doświadczenia przedstawionego na Ryc. 36 wskazano na zależność pomiędzy reaktywnością związków PA-1, PA-6 oraz ebselenu wobec grup tiolowych, a ich działaniem wobec grupy patogenów z grupy ESKAPE. O ile istotnie PA-1 był aktywny wobec wszystkich badanych szczepów, jak i wygląda na najbardziej reaktywny wobec tioli, o tyle ebselen był generalnie znacznie słabszym związkiem antybakteryjnym, również wobec PA-6, jednak wykazywał od niego wyższą reaktywność wobec tioli (choć skala użyta na Ryc. 36 jest mało informatywna przy tak subtelnych różnicach). Byłbym zatem nieco ostrożniejszy w sugerowaniu jakichś silnych korelacji, podobnie zresztą jak w używaniu w pracy dość emocjonalnych określeń typu „spectacular compound” (str. 138).

Załączony w rozdziale **Literatura** spis pozycji literaturowych cytowanych w pracy obejmuje ważne, dobrze dobrane publikacje naukowe, w większości z ostatniej dekady, natomiast w przypadku prac dawniejszych, ich umieszczenie w wykazie znajduje uzasadnienie w historycznym charakterze zawartych w nich danych.

## Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została napisana w języku angielskim, w zwięzły, zrozumiały, dobry stylistycznie sposób i opatrzona bardzo przejrzystą i w znaczącej większości przypadków bardzo obrazową szatą graficzną. Również strona edycyjna pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Oprócz niewielkiej liczby błędów literowych i kilku innych drobnych pomyłek redakcyjnych (np. urwane zdanie na str. 91, brak nazwy czasopisma w poz. 41 spisu literatury) nie znalazłem znaczących uchybień. Wysoko oceniam użycie szerokiego spektrum badanych związków i wiążący się z tym faktem nakład pracy, choć na przyszłość nakłaniałbym Doktorantkę, aby dysponując limitem czasowym, próbowała ograniczyć „szerokość frontu pracy” na korzyść bardziej dogłębnej analizy. Doceniam także przeprowadzenie interesujących analiz zależności aktywności badanych związków od ich struktury. Za ważne osiągnięcia pracy uważam zidentyfikowanie wśród przedstawicieli soli selenazolinowych związków o wysokiej aktywności bakteriostatycznej przeciwko szerokiej gamie lekoopornych szczepów z grupy ESKAPE, wykazanie aktywności adjuwantowej dla antybiotyków z grupy  $\beta$ -laktamów w lekoopornych szczepach *S. aureus*, a także opracowanie warunków eksperymentalnych testu akumulacji EtBr w szczepie *S. epidermidis* dla celów badania hamowania aktywności pompy Msr(A) przez badane związki.

Pomimo pewnych krytycznych uwag i wątpliwości, które przedstawiłem powyżej, uważam pracę mgr **Karoliny Witek** za interesującą i mającą ciekawy walor poznawczy, wynikający z podjęcia bardzo ważnego z punktu widzenia współczesnej mikrobiologii medycznej i farmakologii problemu badawczego. Potwierdzeniem słuszności wyboru tej drogi naukowej i sprawnego poruszania się w obrębie zgłębianej tematyki może być fakt, że Doktorantka jest już współautorką siedmiu publikacji zamieszczonych w bardzo dobrych, międzynarodowych czasopismach z listy JCR, w tym dwukrotnie była autorem wiodącym. Przedstawiona mi do recenzji praca odpowiada wymogom formalnym stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora, zatem przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr **Karoliny Witek** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
ZAKŁADU GENETYKI DROBNOUSTROJÓW UŁ  
  
dr hab. Paweł Staczek, prof. nadzw. UE