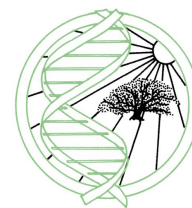




Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Fizjologii Zwierząt



ul. M. Oczapowskiego 1A, 10-718 Olsztyn, tel. 89-5233201, fax 89-5233937,

Olsztyn, 5 wrzesień 2014 r.

Prof. dr hab. Renata Ciereszko
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii UWM
10-718 OLSZTYN
ul. Oczapowskiego 1A

Ocena pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Knet

pt. "Wpływ antyandrogenu winklozoliny na funkcje jajnika świni – badania *in vitro*"

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej badano wpływ antyandrogenu, winklozoliny a także androgenów, testosteronu i dihydrotestosteronu, na ekspresję mRNA i białka receptora androgenowego (AR) w komórkach ziarnistych i pęcherzykach jajnikowych świni oraz na produkcję *in vitro* hormonów steroidowych przez te struktury. Ponadto, duża część pracy poświęcona została poznaniu mechanizmu apoptozy w oddziaływania winklozoliny i androgenów na wspomniane wyżej komórki i pęcherzyki. Badania te obejmowały morfologiczną ocenę budowy pęcherzyków jajnikowych, identyfikację komórek apoptotycznych na wczesnych i późnych etapach apoptozy, ekspresję białek pro- i antyapoptotycznych oraz pomiar aktywności wybranych enzymów związanych z apoptozą. W opisanych doświadczeniach, do badania poziomu steroidów w medium hodowlanym i płynie pęcherzykowym stosowano radioimmunologię, do badania ekspresji genów stosowano real-time PCR, a do badania ekspresji białek – immunohistochemię (IHH), immunocytochemię (ICH) oraz western-blotting (WB). Dodatkowo, w badaniach dotyczących wpływu winklozoliny i androgenów na mechanizm apoptozy wykorzystywano mikromacierze

białkowe, cytometrię przepływową, metodę TUNEL, barwienie hematoksyliną i eozyną, barwienie fluorescencyjne oraz ELISĘ.

Mimo zaangażowania dużej grupy badaczy oraz wieloletnich zmaganiań ukierunkowanych na poznanie mechanizmów determinujących rozwój pęcherzyków jajnikowych, takich jak rekrutacja, selekcja, dominacja czy atrezja, zagadnienia te nie są ciągle w pełni poznane. W ostatnich latach, wiele uwagi poświęca się zarówno roli androgenów w regulacji dojrzewania i degradacji pęcherzyków jajnikowych, jak i zaburzeniu tych procesów przez liczne substancje stosowane przez człowieka w przemyśle i rolnictwie. Winklozolina jest środkiem ochrony roślin zwalczającym przede wszystkim szarą pleśń, z tego powodu stosuje się ją w m.in. w Europie przy uprawie owoców, warzyw, roślin ozdobnych i trawy. Stwierdzono, że fungicyd ten indukuje degenerację oocytów i zaburza produkcję testosteronu u samic kilku gatunków ryb. Podobnie, niekorzystny wpływ winklozoliny na rozwój układu rozrodczego, steroidogenezę oraz funkcje jajnika opisano u wyższych kręgowców. Okazało się również, że zmiany indukowane przez badany w pracy fungicyd np. w plemnikach mogą być odziedziczone przez następne pokolenia. Winklozolina może być także interesującym narzędziem badawczym ze względu na jej właściwości antyandrogenne, szczególnie w kontekście zaangażowania androgenów w regulację rozwoju preantralnych pęcherzyków jajnikowych, jak i ich wpływu na losy pęcherzyków posiadających jamę. Z tych powodów, zagadnienia poruszane przez Doktorantkę w jej pracy doktorskiej są jak najbardziej aktualne i godne uwagi.

CHARAKTERYSTYKA PRACY I UWAGI

Oceniana rozprawa obejmuje 165 stron maszynopisu, w tym 41 rysunków i schematów, 9 tabel oraz 260 pozycji piśmiennictwa i zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały. Na 25 stronach WSTĘPU, poprzedzonego streszczeniem i wykazem stosowanych w rozprawie skrótów, Doktorantka przedstawiła najpierw aktualny stan wiedzy na temat syntezy, mechanizmu działania i biologicznej roli androgenów u samic, szczególnie w procesach rozwoju i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych. Następnie, opisała mechanizm działania i wykorzystanie antyandrogenów oraz, bardziej szczegółowo, zaprezentowała efekty biologiczne winklozoliny. WSTĘP zawiera również opis struktury, powstawania, rozwoju i atrezji pęcherzyków jajnikowych, a także hormonalnej regulacji tych procesów. Ponadto, we Wstępie znajduje się obszerna charakterystyka molekularnych podstaw apoptozy. Ta część rozprawy doktorskiej zawiera 8 czytelnych rysunków/schematów i wprowadza w problematykę badanych zagadnień. Nie znalazłam jednak we Wstępie żadnych informacji na temat

dihydrotestosteronu, który jest jednym z trzech badanych w pracy czynników. Chciałabym też zauważyć, że apoptoza może być uruchamiana nie dwiema drogami (str. 38) ale przynajmniej pięcioma (szlak receptorowy-zewnętrzny, mitochondrialny-wewnętrzny, pseudoreceptorowy, sfingomielinowo-ceramidowy i indukowany stresem). Nie wiem też, jak w szlaku mitochondrialnym dochodzi do aktywacji kaspaz wykonawczych (rysunek 8), skoro szlak ten kończy się na kaspazie inicjującej 9, a inne odnogi szlaku hamują kaspazę 3.

Ogólne cele pracy przedstawiono w postaci trzech punktów, które następnie rozpisano na 18 szczegółowych zadań badawczych. Niestety, nie określono w celach pracy czy winklozolinę badano w tej pracy jako środek ochrony roślin obecny w środowisku i zdolny do zaburzania funkcji endokrynych i rozrodczych czy też jako antyandrogen - narzędzie służące do badania roli androgenów. A może oba te aspekty stanowiły obiekt zainteresowania Doktorantki? Sprawa ta jest ściśle związana z innymi częściami rozprawy. Wstęp i tekst sekcji Wyników nie sugerują prostej odpowiedzi na to pytanie, cele nie precyzują problemu, rysunki sekcji Wyniki (organizacja danych: androgen, antyandrogen i androgen+antyandrogen) wskazują na wersję o antyandrogenie; przeciwnie, prezentacja różnic statystycznie istotnych na tych rysunkach (porównanie grup eksperymentalnych tylko do kontroli) wskazuje na wersję o czynniku środowiskowym. Takie podejście bardzo utrudnia m.in. przeprowadzenie uporządkowanej Dyskusji.

Trzydzieści jeden stron rozdziału MATERIAŁ I METODY zawiera poprawny i szczegółowy opis metod badawczych, które wymieniłam już wcześniej. Opis każdej metody jest wzbogacony o wiadomości dotyczące stosownych kontroli. Przejrzystość tej części rozprawy dodatkowo zwiększają komunikatywne rysunki (n=4) i tabele (n=5). Praca zyskałaby jeszcze bardziej na przejrzystości gdyby Doktorantka zastosowała tę samą kolejność zadań badawczych w Celach, Materiałach i metodach, Wynikach i Dyskusji. Chciałabym podkreślić, że metody użyte w pracy są nowoczesne i właściwie dobrane do założonych zadań badawczych, a tzw. „experimental design” rozprawy doktorskiej został bardzo dobrze zaplanowany. I nawet jeżeli nie wszystkie możliwości, jakie daje dobrze zaplanowany eksperyment, zostały w pracy wykorzystane, to nie ma przeszkód by uczynić tak w trakcie przygotowywania wyników do poszczególnych publikacji. Sugeruję też rozważyć wykonanie nowej analizy statystycznej wyników prezentowanych w formie procentów. Rozkład takich danych zazwyczaj nie jest normalny i wymaga albo zastosowania nieparametrycznych odpowiedników analizy wariancji albo użycia transformacji procentów przez funkcję arcsin. Silnie sugeruję również nie używać określenia „metoda ilościowa” w odniesieniu do western blottingu. Metoda ta, podobnie jak komputerowa ocena intensywności barwienia używana w

immunofluorescencji czy immunohistochemii, jest najwyżej metodą półilościową. Zastanawiam się także dlaczego absorbancję przy ocenie aktywności kaspazy 3 odczytywano pięć razy co 30 minut a wyniki są przedstawione w postaci jednej tylko liczby. Pomiar z której minuty jest pokazany w Wynikach? Nie jestem też pewna czy hodowle komórek ziarnistych trwały 24 godziny (jak jest napisane na stronie 49, 78, 82 i innych) czy też 48 godzin, jak pokazuje schemat na stronie 47. Co to jest paletka wspomniana na stronie 50? Czy ilość hormonów steroidowych w płynie pęcherzykowym oznaczano po ekstrakcji, jeżeli tak, to jaka była wydajność ekstrakcji? Chciałabym także zauważyć, że wirowanie charakteryzuje się podając prędkość w wartościach „g”, a nie w obrotach na minutę (str. 72), jak również, że nie ma firmy „Victor Laboratories”. I na koniec tej części recenzji, prezentuję jeszcze dwie uwagi dotyczące formy: 1/ Materiały i metody powinny być pisane w czasie przeszłym w formie niedokonanej; 2/ Wstęp zawiera liczne zdania z problemami leksykalnymi, stylistycznymi, składniowymi i interpunkcyjnymi. Przykładem błędu leksykalnego jest np. użycie na stronie 53 słowa „rozpipetowano”, które powoduje błędne rozumienie tekstu.

Rozdział WYNIKI obejmuje 39 stron tekstu, 4 tabele i 29 rysunków lub fotografii, często złożonych z kilku wykresów lub zdjęć. W ramach swojej rozprawy doktorskiej pani mgr Małgorzata Knet potwierdziła, że głównym miejscem lokalizacji AR w pęcherzyku jajnikowym świni są komórki ziarniste i że AR w komórkach tych występuje zarówno w cytoplazmie, jak i jądrach komórkowych. Ponadto, wykazała, że androgeny, i w mniejszym stopniu winklozolina, zwiększają translokację AR do jądra oraz, że antyandrogen razem z T lub DHT powodują przemieszczanie się AR do jądra tylko w nielicznych komórkach ziarnistych co wskazuje na to, że jądrowa translokacja jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym do aktywacji transkrypcji. Z kolei, półilościowe metody, oparte o porównywanie intensywności reakcji barwnej oraz ilościowa analiza mRNA, posłużyły do stwierdzenia, że winklozolina i jej kombinacje z T lub DHT zwiększały ekspresję AR w komórkach ziarnistych na obu badanych poziomach. W pęcherzykach jajnikowych natomiast, winklozolina w kombinacji z androgenem podnosiła ekspresję AR mRNA, ale zmniejszała ekspresję białka. Analizę ekspresji mRNA i białka wykonywano po 24 godzinach hodowli komórek/pęcherzyków z badanymi czynnikami. Warto rozważyć w przyszłości badanie dynamicznych zmian w ekspresji genu i białka (tzn. badanie w kilku punktach czasowych). Niezbędna wydaje mi się natomiast zmiana sposobu pokazywania różnic statystycznie istotnych na większości rysunków prezentowanych w sekcji Wyniki. Grupy eksperymentalne powinny być porównywane nie tylko do grupy kontrolnej, ale także między sobą, co zresztą umożliwia stosowana w pracy analiza wariancji i testy post-hoc i sugeruje układ doświadczeń.

Takie podejście pozwoliłoby na określenie wpływu jaki wywiera antynadrogen na działanie androgenu.

W swojej rozprawie doktorskiej pani mgr Małgorzata Knet wykazała również, że zarówno agonści, jak i antagonisty AR istotnie wpływają na produkcję hormonów steroidowych przez hodowane komórki ziarniste i hodowane pęcherzyki jajnikowe. Szczegółowa analiza tych wyników zajęłaby za dużo miejsca. Należy tylko zauważyć, że badane czynniki zaburzały przebieg steroidogenezy w sposób zależny od modelu doświadczalnego (hodowla komórek vs. hodowla pęcherzyków) oraz natury badanego czynnika (agonista vs. antagonisty, T vs. DHT). Także różnice między poziomami progesteronu i estradiolu w medium i płynie pęcherzykowym, które uzyskano po hodowli pęcherzyków, są bardzo interesujące. Chciałabym nadmienić, że wyniki dotyczące steroidogenezy zostały w tym roku przez Doktorantkę opublikowane w *Theriogenology*, czasopiśmie o wysokim IF. Na podkreślenie zasługuje fakt, że różnice statystyczne na wszystkich rysunkach, które znalazły się w tej publikacji, podobnie jak cele pracy, zostały przedstawione poprawnie, a dyskusja otrzymanych wyników przeprowadzona właściwie. Podejrzewam, że stało się tak dlatego ponieważ łatwiej jest ogarnąć materiał zawarty w jednym artykule niż w, zawierającej dużo więcej danych, pracy doktorskiej.

W części pracy dotyczącej apoptozy, Pani magister w pierwszej kolejności wykazała, że T, DHT i winklozolina powodują w pęcherzykach jajnikowych zmiany, które mogą świadczyć o atrezji, tzn. odrywanie się warstwy ziarnistej od warstwy komórek osłonki wewnętrznej oraz tworzenie w warstwie ziarnistej przestrzeni wolnych od komórek. Ponadto, stwierdziła, że niezależnie od badanej struktury (komórki vs. pęcherzyk) i stosowanej metody (cytometria przepływowa, TUNEL, barwienie przy pomocy Hoechst 33258), androgeny zwiększały liczbę apoptotycznych komórek ziarnistych lub liczbę ciałek apoptotycznych w tych komórkach, a winklozolina istotnie ograniczała ten efekt działania androgenów. Z kolei przy pomocy cytometrii przepływowej, zaobserwowano przeciwne działanie wymienionych czynników na liczbę komórek nekrotycznych (tzn. androgeny obniżały liczbę tych komórek, a winklozolina odwracała ten hamujący efekt T i DHT). Ponadto, wszystkie badane czynniki obniżały liczbę komórek żywych, a sama winklozolina zwiększała nekrozę w komórkach ziarnistych i indukowała apoptozę tych komórek badaną w pęcherzykach jajnikowych. Wyniki te wskazują na oddziaływanie agonistów i antagonisty AR na procesy programowanej śmierci komórki. W omawianym fragmencie pracy, nie wyjaśniono jednak czy winklozolina podana razem z androgenami działała na morfologię pęcherzyków w sposób podobny do działania tych

czynników kiedy podawano je oddzielnie. Nie wynika to ani z przedstawionych zdjęć (Tablica XV), ani z tekstu (str. 94).

W ostatniej i bardzo obszernej części rozprawy, Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia niektórych aspektów dotyczących mechanizmu apoptozy zachodzącej w komórkach ziarnistych świni pod wpływem agonistów i antagonisty AR. I tak, Pani magister wykazała, że kaspaza 9 (kaspaza inicjująca) i kaspaza 3 (kaspaza wykonawcza) są obecne w cytoplazmie komórek ziarnistych świni. Wykazała też, że w zdecydowanej większości badanych układów doświadczalnych androgeny i winklozolina zwiększały i ekspresję, i aktywność kaspazy 3, podstawowej kaspazy wykonawczej w co najmniej trzech głównych szlakach prowadzących do apoptozy. Przeciwnie, agoniści i antagonisty AR wpływali na ekspresję kaspazy 9 (kaspaza inicjująca przede wszystkim w szlaku mitochondrialnym) tylko w niektórych układach. Może to świadczyć o tym na przykład, że androgeny i winklozolina nie uruchamiają szlaku mitochondrialnego apoptozy.

W recenzowanej pracy doktorskiej, badano również wpływ T, DHT i winklozoliny na ekspresję i aktywność kinaz, których aktywacja z reguły promuje przeżycie komórki, tzn. kinaz ERK1/2 i kinazy Akt. W tym doświadczeniu, zastosowany model doświadczalny obejmował pięć badanych grup (T, DHT, Vnz, T+Vnz, DHT+Vnz) i pięć punktów czasowych (1,5,15, 30 i 60 minut). W przypadku analizowania ekspresji aktywnych kinaz ERK1/2 i Akt, wzrost ekspresji uzyskano w siedemnastu (ERK1/2, Akt) na 25 badanych sytuacjach, a spadek, odpowiednio, w ośmiu (ERK1/2) i sześciu (Akt) sytuacjach. W przypadku badania aktywności tych enzymów, wzrost aktywności uzyskano, odpowiednio, w trzynastu (ERK1/2) i jedenastu (Akt) na 25 badanych sytuacjach, a spadek, odpowiednio, w dziewięciu (ERK1/2) i czternastu (Akt) sytuacjach. Analizując pojedyncze czynniki, wydaje się, że w większości przypadków, winklozolina zwiększała ekspresję białek obu kinaz oraz aktywność kinazy ERK1/2, ale obniżała aktywność kinazy Akt. Wyniki te są trudne do interpretacji, na pewno częściowo jest to spowodowane tym, że ekspresję i aktywność kinaz ERK1/2 i Akt pokazano w odmienny sposób. Aktywność analizowano porównując wpływ różnych czynników w obrębie pojedynczego punktu czasowego, a ekspresję analizowano w różnych punktach czasowych w obrębie jednego czynnika badanego. Poza tym, gdyby aktywność analizowano tak jak ekspresję, możliwe by było zastosowanie dwuczynnikowej analizy wariancji, gdzie jednym czynnikiem byłby czas, a drugim badany czynnik. Takie podejście dałoby szansę na głębsze spojrzenie na badany problem. Niezależnie od tego organizacyjno- statystycznego problemu, wyniki dotyczące kinaz ERK1/2 i Akt pokazują, że androgeny i winklozolina oddziałują na komórki ziarniste świni nie tylko przez AR, ale także w wyniku działania pozagenomowego.

Oprócz wspomnianych powyżej proapoptotycznych kaspaz i antyapoptotycznych kinaz serynowo-treoninowych, Pani M. Knet badała również, przy pomocy mikromacierzy białkowych wpływ agonistów i antagonisty AR na ekspresję kilkudziesięciu innych białek zaangażowanych w proces apoptozy. Jedenaście z tych białek zmieniło istotnie poziom swojej ekspresji w wyniku działania badanych czynników. Siedem z nich to białka proapoptotyczne, cztery to białka antyapoptotyczne. Większość badanych czynników obniżała ekspresję trzech białek antyapoptotycznych co jest zgodne z wynikami dotyczącymi ich wpływu na liczbę komórek i ciałek apoptotycznych. Zastanawiam się jednak jak Doktorantka tłumaczy zaobserwowane w tym doświadczeniu, obniżanie ekspresji białek proapoptotycznych, szczególnie przez DHT i winklozolinę. Być może zwiększenie tzw. wartości odcinającej (ang. cut off; zazwyczaj w przypadku mikromacierzy to jest „2”) ułatwiłoby interpretację wyników. Niestety w pracy wartość ta nie jest podana. Ponadto, tak jak w przypadku mikromacierzy DNA, gdzie wyniki dotyczące genów o wyraźnie zmienionej ekspresji weryfikuje się przy pomocy Real-time PCR, tak w przypadku mikromacierzy białkowych wyniki powinno się weryfikować np. przy pomocy innej metody, np. western blottingu. Pozwoliłoby to na zwiększenie pewności co do otrzymanych wyników. Pragnę również zauważyć, że w nauce nie istnieje statystycznie nieistotny wzrost czy spadek jakiegoś parametru – w takiej sytuacji mówi się po prostu o braku wpływu.

Obejmujący 21 stron rozdział DYSKUSJA zawiera interpretację uzyskanych wyników. Dyskusja jest podzielona na trzy podrozdziały. Pierwszy dotyczy ekspresji AR, drugi steroidogenezy i trzeci, najdłuższy, mechanizmu apoptozy. Dyskusja wskazuje na duże odczytanie Doktorantki w zakresie przedmiotu swojej pracy. Szkoda, że jej nieuporządkowanie powoduje, że nie jest przyjazna dla czytelnika. Wynika to głównie z nie postawienia wyraźnej linii między winklozoliną będącą fungicydem obecnym w środowisku a winklozoliną będącą antyandrogenem. Nie pomaga też to, że poszczególne akapity zawierają dyskusję więcej niż jednego problemu, a część akapitów nie jest zakończona wnioskiem lub istniejący wniosek nie wynika bezpośrednio z treści zawartych w akapicie. Poza tym zarówno Dyskusja, jak i pozostałe części pracy zawierają dużą liczbę błędów stylistycznych i składniowych. Dyskusja zakończona jest podsumowaniem i wnioskiem. Główne punkty podsumowania są zbieżne z celami pracy. Bardzo obszerne podsumowanie nie jest jednak wolne od nieścisłości. Przede wszystkim, należy być ostrożnym w wyciąganiu wniosków z, niepotwierdzonych innymi metodami, wyników doświadczeń przeprowadzonych z użyciem mikromacierzy białkowych. Poza tym, podsumowanie, mimo tego, że jest bardzo długie, nie zawiera wszystkich istotnych informacji i sprawia wrażenie chaotycznego. Alternatywą mogłoby być przejście na nieco

wyższy stopień uogólnienia. Wniosek, z kolei, wydaje mi się bardzo wybiórczy i nie uwzględniający złożoności ocenianej rozprawy. Szkoda również, że w żadnym miejscu rozprawy nie podkreślono tego co w pracy nowe.

Praca zawiera także załącznik wykazujący jedną pracę oryginalną, w której opublikowano już, w czasopiśmie z IF, część wyników. Sugeruje to, że pozostałe wyniki uzyskane przez Doktorantkę również będą opublikowane w znaczących czasopismach, szczególnie, że we wspomnianej publikacji Doktorantka nie popełniła tych błędów związanych ze sposobem pokazania niektórych wyników czy ich interpretacji, które stały się przedmiotem zastrzeżeń recenzenta. Nie mam wątpliwości, że wynika to z tego, że rozprawa doktorska zawiera przytłaczającą ilość danych, które, po pierwsze trudno ogarnąć i uporządkować w jednej pracy, a po drugie, w pełni i zadowalająco przedyskutować na ograniczonej przestrzeni.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu "Oceny pracy" należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają naszą dotychczasową wiedzę w nowe informacje na temat: 1/ sposobu oddziaływania androgenów na komórki ziarniste świni, 2/ znaczenia winklozolin jako fungicydu stosowanego w ogrodnictwie i rolnictwie a także jako antagonisty AR dla procesów zachodzących w jajniku świni oraz 3/ mechanizmu apoptozy uruchamianego przez T, DHT i winklozolinę w badanych komórkach. Duża wartość rozprawy wynika z kompleksowego podejścia do rozpatrywanego problemu oraz zastosowania odpowiednio dobranych, nowoczesnych metod. Kompleksowe podejście polegało na zastosowaniu więcej niż jednego modelu doświadczalnego (hodowla komórek i hodowla pęcherzyków) oraz zastosowaniu więcej niż jednej metody dla przetestowania danego problemu badawczego np. obecność komórek lub ciałek apoptotycznych badano przy pomocy cytometrii przepływowej, analizy TUNEL i barwienia przy użyciu Hoechst 33258. Oceniana rozprawa nie tylko dostarcza danych, które wzbogacają już istniejącą wiedzę w nowe informacje, ale również, prezentowane tu wyniki stanowią doskonałą podstawę do dalszych badań, zmierzających do pełniejszego poznania niezwykle złożonego procesu apoptozy.

W ocenianej pracy Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy jak pracowitość i dociekliwość. Przedstawione zaś powyżej uwagi i pytania nie zmieniają bardzo wysokiej oceny pracy. Wskazują jedynie na niedociągnięcia związane z

procesem redagowania pracy oraz stanowią głos w dyskusji nad złożonymi procesami zachodzącymi w komórkach żywego organizmu.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca pt. "Wpływ antyandrogenu winklozoliny na funkcje jajnika świni – badania in vitro" spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Małgorzaty Knet do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "R. Knet", is centered on a light yellow rectangular background.