Prof. dr hab. Wiesław F. Skrzypczak
Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

OCENA
pracy doktorskiej mgr Sławomira Jaworskiego

wykonanej w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt,
Wydziału Nauk o Zwierzętach,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
pod kierunkiem promotora - pani prof. dr hab. Ewy Sawosz-Chwalibóg
oraz promotora pomocniczego – pani dr Marty Grodzik

nt.

Wpływ grafenu na modulacje szlaku indukcji apoptozy dwóch linii komórek glejaka wielopostaciowego (*Glioblastoma multiforme*)

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach,
SGGW w Warszawie (pismo Pani Dziekan z dnia 15.06.2015 roku)
zgodnie z wymaganiami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „*O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*"
(Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami)

1. Jednym z istotnych warunków prawidłowego funkcjonowania organizmu wielokomórkowego jest kontrola liczby fizjologicznie aktywnych komórek. Kontrola ta, związana jest z zapewnieniem równowagi pomiędzy procesami: podziałów komórkowych, różnicowania, wzrostu i śmierci. Są to procesy fizjologiczne, a ich sekwencja jest zakodowana genetycznie.

Śmierć komórek może następować na drodze dwóch głównych procesów: martwicy (śmierci nieprogramowanej – komórka ulega całkowitej destrukcji, a pozostałości najczęściej wywołują stan zapalny) i apoptozy – śmierci kontrolowanej genetycznie. Programowana śmierć komórki jest procesem aktywnym i uporządkowanym – poszczególne ścieżki metaboliczne wymagają sekwencyjnej ekspresji właściwych genów.

Apoptoza może być inicjowana na trzech drogach: szlaku receptorowym (z udziałem błonowych receptorów śmierci), mitochondrialnym (m.in. z udziałem białka p53) i pseudoreceptorowym (z udziałem perforyn i granzymu B). Jednak niezależnie od sposobu indukcji apoptozy główna rola przypada enzymom z grupy kaspaz (8 i 9 – tzw. indukujące oraz 3, 6 i 7 – tzw. wykonawcze).

Glejak wielopostaciowy (*Glioblastoma multiforme*) jest złośliwym nowotworem CUN, bogatokomórkowym, z przeważającym różnicowaniem astrocytarnym, charakteryzujący się atypią i pleomorfizmem jąder komórkowych, wysoką aktywnością mitotyczną oraz szybką angiogenezą. Ma charakter naciekający, co sprawia, że pomimo dość wyraźnego odgraniczenia od podłożą, jest niezwykle trudny do usunięcia. Pomimo chirurgicznej resekcji i agresywnej chemioterapii/napromieniowania (standard w leczeniu) szybko powraca, rośnie

i stopniowo upośledza pracę kolejnych części mózgowia. Rokowanie jest zatem zdecydowanie złe.

Z powyższych względów, w wielu ośrodkach naukowych i klinikach, poszukuje się alternatywnych metod terapii. Badania prowadzone od szeregu lat, w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt, Wydziału Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem pani prof. dr hab. Ewy Sawosz-Chwalibóg, w tym również praca doktorska mgr Sławomira Jaworskiego, mieszczą się właśnie w tym nurcie naukowych dociekań.

2. Pan mgr Sławomir Jaworski, jako oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, w rozumieniu art. 13 ust. 1 i 2 ustawy, z dnia 14 marca 2003 roku *„O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki"* (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) przedłożył rozprawę doktorską zatytułowaną: Wpływ grafenu na modulacje szlaku indukcji apoptozy dwóch linii komórek glejaka wielopostaciowego (*Glioblastoma multiforme*). Praca ta stanowi spójny tematycznie zbiór trzech opublikowanych, oryginalnych prac naukowych:

1. Jaworski S., Sawosz E., Grodzik M., Winnicka A., Prasek M., Wierzbicki M., Chwalibog A.. *In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells.* International Journal of Nanomedicine 8, 413-420, 2013.
2. Jaworski S., Sawosz E., Grodzik M., Kutwin M., Wierzbicki M., Włodyga K., Jasik A., Reichert M., Chwalibog A. *Comparison of tumour morphology and structure from U87 and U118 glioma cells cultured on chicken embryo chorioallantoic membrane.* Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 57, 593-598, 2013.
3. Jaworski S., Sawosz E., Kutwin M., Wierzbicki M., Hinzmann M., Grodzik M., Winnicka A., Lipińska L., Włodyga K., Chwalibog A. *In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma.* International Journal of Nanomedicine 10, 1585-1596, 2015.

3. Charakterystyka prac twórczych, będących podstawą ocenianej pracy doktorskiej.

3.1. Praca, pt. *In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells,* dotyczy wpływu płatków grafenu na morfologię, śmiertelność, przeżywalność oraz integralność błon komórkowych, komórek dwóch linii glejaka wielopostaciowego.

Wyniki badań własnych, a także wyniki badań innych autorów, pozwoliły na założenie hipotezy, że nanocząstki węgla mogą być skutecznym narzędziem w terapii nowotworowej. Grafen, jedna z odmian alotropowych węgla, posiada unikalne właściwości fizyko-chemicznych, wynikające zwłaszcza z dużej powierzchni, w stosunku grubości. Sprawia to, że płatki grafenu mają dwie biologicznie aktywne „części": powierzchnię i krawędzie.

W niniejszych badaniach wykorzystano(po raz pierwszy) grafen hydrofobowy (uzyskany metodą fizyczną, poprzez złuszczanie grafitu, bez utleniania). Jakość użytego grafenu autorzy badań sprawdzali za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Udokumentowano, że płatki grafenu były bardzo cienkie (najczęściej składały się z pojedynczej warstwy lub kilku warstw atomów), a ich powierzchnia wahała się od 0,45 do 1,5 μm.

W badaniach wykorzystano dwie linie glejaka wielopostaciowego (U87 i U118), zróżnicowane co do morfologii, tempa wzrostu i funkcji (m.in. różnią się ekspresją genów związanych z regulacją cyklu komórkowego i apoptozy np. *p53, p27, Bcl2, PTEN, PARP*. Morfologię komórek glejaka, hodowanych bez (grupa kontrolna) jak i z „dodatkiem" roztworu grafenu do medium hodowlanego (w pięciu stężeniach: 5. 10, 20, 50 i 100 μg/ml) oceniano przy pomocy mikroskopu optycznego. Wykazano, że komórki linii U87, w porównaniu do linii U118, rosły szybciej, były większe i miały mniej wypustek. Potwierdzono duże powinowactwo płatków grafenu do komórek glejaka i zdolność do adhezji, zwłaszcza do błony perykarionu.

Śmiertelność komórek glejaka oceniano testem z błękitem trypanu (wybarwia komórki martwe na kolor niebieski) i wyrażono jako procent martwych komórek, w stosunku do całkowitej ich liczby. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy liniami glejaka, natomiast wykazano różnice w zależności od dawki grafenu. Śmiertelność komórek była najwyższa dla dawki 100 μg/ml i wynosiła 42% (dla U87) i 52% (dla U118).

Żywotność komórek badano w oparciu o pomiar gęstości optycznej poszczególnych próbek, grupy kontrolnej oraz grup badawczych, z dodatkiem grafenu w wymienionych wyżej pięciu różnych stężeniach. Wykazano zależność tej cechy od dawki grafenu. Im wyższe było stężenie grafenu w roztworze inkubacyjnym, tym niższa żywotność. Najniższą zaobserwowano dla stężenia 100 μg/ml – 54% (dla U118) i 58% (dla U87).

Integralność błony komórkowej badano testem LDH (dehydrogenazy mleczanowej). Ten cytozolowy enzym, w warunkach fizjologicznych, nie jest uwalniany do środowiska zewnątrzkomórkowego, natomiast uszkodzenie błony komórkowej powoduje uwolnienie LDH z komórki. Jego stężenie w medium jest miarą toksyczności danej substancji względem komórek w hodowli. W doświadczeniu wykazano istotne różnice w zależności zarówno od linii glejaka, jak i od dawki grafenu. Większą wrażliwość na uszkodzenie wykazywały komórki linii U87. Autorzy sugerują, że efekt cytotoksyczny może w prostej linii zależeć od wielkości pola powierzchni komórki, na którym uległy adhezji płatki grafenu. Im wyższe jest pokrycie błony komórkowej, tym wpływ grafenu jest silniejszy.

Wykorzystując cytometrię przepływową, oceniano ilościowo proces apoptozy i nekrozy, w próbkach kontrolnych i hodowanych z dodatkiem grafenu, w ilości 100 μg/ml. Metoda ta pozwoliła zróżnicować komórki martwe, na komórki apoptotyczne i na komórki nekrotyczne, bowiem we wczesnym stadium apoptozy następuje przeniesienie fosfatydyloseryny, umiejscowionej w cytozolowej monowarstwie błony komórkowej,

do monowarstwy zewnętrznej, do której dołącza się aneksyna. Dodany do prób jodek propidyny, barwiący DNA, wnika przez zdestabilizowaną błonę martwych komórek. Równoczesne podanie jodku propidyny i aneksyny pozwoliło na rozróżnienie zdrowych komórek, komórek nekrotycznych oraz wczesno i późno-apoptotycznych. Wykazano, że płatki grafenu w obu liniach komórkowych glejaka indukują apoptozę i nekrozę, jednak procesy te przebiegają w obu liniach odmiennie (co do ilości i jakości). Na szczególne podkreślenie zasługuje wykazanie, że w linii U118, grafen w dawce 100 µg/ml indukuję blisko 100 procentową apoptozę komórek.

Do istotnych wyników tych badań zaliczam przede wszystkim wykazanie: (i) cytotoksycznego działania hydrofobowej formy płatków grafenu oraz działania zależnego od dawki; (ii) że oddziaływanie grafenu na komórki glejaka zależy od bezpośredniego kontaktu grafenu z komórką nowotworową, a efektywność przylegania płatków grafenu do komórek glejaka zależy od struktury morfologicznej komórek; (iii) możliwości indukowania grafenem wewnątrzkomórkowych szlaków molekularnych, modyfikujących m.in. sposób eliminacji komórek z organizmu, tj. procesy apoptozy i nekrozy.

Korzystając z przywileju recenzenta chciałbym poprosić doktoranta o krótki komentarz do następujących zagadnień: (i) jak mógłby być przenoszony sygnał: grafen-komórka i jakie mogły by być główne ogniwa wewnątrzkomórkowej kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do apoptozy; (ii) jakie były przesłanki do supozycji (str. 419), że wpływ grafenu na „mechanizm" śmierci komórek może być związany z systemem oddychania komórkowego i stresem oksydacyjnym; (iii) jak wyjaśnić dane przedstawione na ryc. 3 i 4 – przy wyższej śmiertelności obserwuje się wyższą przeżywalność?

3.2. Druga praca pt. *Comparison of tumour morphology and structure from U87 and U118 glioma cells cultured on chicken embryo chorioallantoic membrane*, dotyczy porównania morfologii i ultrastruktury guzów glejaka linii U87 i U118, w doświadczeniu *in vivo*, z wykorzystaniem modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury (CAM – ang. *Chorioallantoic Membrane*).

Glejak wielopostaciowy charakteryzuje się dużą heterogennością komórek zarówno pod względem cech morfologicznych jak i fizjologicznych. Zatem aby można było prowadzić skuteczną terapię należy poznać biologię nowotworów. Doświadczenie zostało przeprowadzone na kurczętach linii mięsnej Ross 308. Materiał badawczy stanowiło 120 zarodków kur podzielonych na dwie grupy (U87 i U118). Zapłodnione jaja inkubowano w czasie 7 dni, a następnie, na silikonowy krążek, nanoszono 30 µL roztworu zawierającego 3-4 x 10^6 komórek glejaka, jednej bądź drugiej linii. Po kolejnych dziesięciu dniach inkubacji powstałe guzy wycinano i poddawano badaniom. Łącznie przebadano 49 guzów obu linii komórek glejaka. Wykorzystując mikroskop stereoskopowy dokonano pomiarów i zdjęć guzów, a następnie szacowano ich objętość.

Pobrane wycinki guzów zostały wykorzystane do badań histologicznych (wybarwianie hematoksyliną i eozyną) i immunohistochemicznych (wykorzystano przeciwciała dla antygenu jądrowego proliferacji komórkowej PCNA). Analizę morfometryczną i mikroskopową wizualizację komórek PCNA pozytywnych przeprowadzono 20-krotnie, dla każdej próbki. Indeks mitotyczny, jako procent komórek dzielących się w populacji wszystkich komórek, szacowano z obserwacji prowadzonych na powierzchni 40 μm^2. Skrawki guzów wizualizowano również w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Ponadto, wykorzystując mikroskop optyczny analizowano morfologię, wybarwionych metodami May-Grünwalda i Giemsy, komórek glejaka linii U87 i U118.

Potwierdzono, że komórki obu linii glejaka różnią się tempem wzrostu i budową morfologiczną. U87 rosną szybciej, są większe, mają dłuższe wypustki i mogą tworzyć sferoidy o dużej gęstości.

Guzy wywodzące się z obu linii miały kształt owalny z widocznymi naczyniami krwionośnymi na powierzchni, jednak różniły się wielkością (U87 były zdecydowanie większe), gęstością komórkową (struktura U87 bardziej zwarta) i aktywnością proliferacyjną (wyższa dla U87 – 74,6%). Badania histologiczne wykazały, że komórki glejaka charakteryzują się nietypowym jądrem komórkowym, a także obecnością wielojądrzastych komórek olbrzymich, z charakterystycznym, podzielonym jądrem, o zmiennym kształcie.

Uzyskane w badaniach wyniki potwierdziły także, że model błony kosmówkowo-owodniowej zarodka kury może być użytecznym narzędziem w poznawaniu biologii nowotworów.

3.3. Trzecia praca pt. *In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma*, dotyczy wpływu tlenku grafenu i zredukowanego tlenku grafenu na komórki glejaka wielopostaciowego.

Asumpt do postawienia hipotezy o cytotoksycznym wpływie płatków tych form grafenu, w stosunku do komórek glejaka wielopostaciowego stanowiły, poza danymi z (nielicznego) piśmiennictwa, przede wszystkim wyniki badań własnych (m.in. pracy nr 1. tej rozprawy).

Doświadczenie przeprowadzono w dwóch częściach: *in vitro* oraz *in vivo*. W pierwszej części badano wpływ płatków tlenku grafenu (GO) i zredukowanego tlenku grafenu (rGO) na morfologię, ultrastrukturę, żywotność, tempo proliferacji oraz zdolność do indukowania apoptozy, w komórkach glejaka wielopostaciowego dwóch linii U87 i U11.

Do istotnych wyników tej części badań zaliczam wykazanie, że żywotność oraz tempo proliferacji komórek obu linii glejaka zależy od dawki grafenu. Zwiększenie stężenia GO i rGO powodowało zmniejszenie żywotności oraz zmniejszenie proliferacji komórek, w obu typach komórek glejaka. Zarówno tlenek, jak i zredukowany tlenek grafenu zwiększały natężenie procesu apoptozy, równomiernie w komórkach obu badanych linii glejaka, przy

czym wpływ hydrofobowego rGO był około pięciokrotnie wyższy. Nie stwierdzono wpływu obu form grafenu na intensywność procesu nekrozy. Analiza w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazała, że zarówno GO jak i rGO powodują zmiany ultrastruktury komórek glejaka, w tym m.in. szorstkiego retikulum endoplazmatycznego i mitochondriów. Autorzy zaobserwowali obecność płytek grafenu w cytoplazmie komórek (GO; rGO) oraz wakuolach (GO).

W drugiej części (badania *in vivo*), analizowano wpływ płatków tlenku grafenu i zredukowanego tlenku grafenu na komórki glejaka linii U87, na modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. W doświadczeniu wykorzystano 60 zarodków podzielonych na trzy grupy (n=20): kontrolną i dwie grupy badawcze (dla GO i r GO). Po 6 dniach inkubacji na błonę kosmówkowo-omoczniową implementowano komórki glejaka, a po kolejnych 7 dniach nanoszono roztwory GO i rGO. Po 3 dniach guzy wycinano i poddawano analizie. Szacowano objętość guzów, masę, gęstość komórek i indeks mitotyczny. Wykonano analizy histologiczne i immunohistochemiczne, a skrawki guzów wizualizowano w transmisyjnym i skaningowym mikroskopie elektronowym. Ponadto wykonano badanie (western blot) ekspresji wybranych białek: kaspazy-3, Bcl-2, Becliny 1, czynnika jądrowego kappa B oraz oceniono istotność tych zmian (oprogramowanie Quantity One).

Do istotnych wyników badań *in vivo* zaliczam wykazanie, że obie formy grafenu powodują zmniejszenie objętości guza (o ponad połowę), obniżenie jego masy i gęstości oraz indeksu mitotycznego. Potwierdzono duże zróżnicowanie struktury komórkowej glejaka U87, w tym obecność wielojądrzastych komórek olbrzymich oraz obecność płytek grafenu pomiędzy komórkami nowotworu. Obie formy grafenu spowodowały zróżnicowanie morfologiczne komórek glejaka oraz struktur wewnątrzkomórkowych, w tym jąder, mitochondriów, szorstkiego retikulum. Obserwowano obecność pęcherzyków charakterystycznych dla procesu autofagii. Obie formy grafenu widocznie ograniczały angiogenezę. Należy podkreślić, że nie stwierdzono różnic w ekspresji białek: Becliny 1, Bcl-2 oraz czynnika jądrowego kappa B między grupami: kontrolną i traktowanymi grafenem, a wykazano istotny wzrost (o 96%) ekspresji kaspazy-3, w grupie z dodanym zredukowanym tlenkiem grafenu. Z powyższych stwierdzeń wynika, że cytotoksyczność tlenku grafenu dla komórek glejaka jest niższa w porównaniu do rGO, a indukcja apoptozy przez rGO wskazuje na tę formę grafenu jako potencjalny terapeutyk.

Podsumowanie

Scharakteryzowane wyżej prace są współautorskie, jednak we wszystkich, doktorant jest pierwszym współautorem, a jego udział w pracach jest znaczący i wynosi odpowiednio: 70, 65 i 55%. Współautorzy wszystkich prac zgodnie oświadczyli, że udział mgr. Sławomira Jaworskiego w tych pracach był „wiodący".

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, o czym świadczy łączny IF, który wynosi

$8{,}755_{[2014]}$, a suma punktów wg wykazu MNiSW wynosi $90_{[2014]}$. Należy także zauważyć, że pierwsza praca była już cytowana 14-krotnie (liczba cytowań wg. bazy Web of Science wynosi 15).

4. Ocena rozprawy doktorskiej pt. Wpływ grafenu na modulacje szlaku indukcji apoptozy dwóch linii komórek glejaka wielopostaciowego *(Glioblastoma multiforme)*.

W rozdziale pierwszym *(Wstęp)* autor, wprowadził czytelnika w dziedzinę badań, następnie nieco szczegółowiej opisał istotę apoptozy oraz właściwości grafenu i scharakteryzował wybrane cechy linii komórkowych glejaka wielopostaciowego (U87 i U118), wykorzystane w badaniach.

Następnie przedstawił, wspólną dla prezentowanego cyklu prac, hipotezę badawczą, sformułował cel i zakres badań (rozdział 2). Założonym celem tego cyklu badań było cyt. „określenie wpływu nanopłatków grafenu na komórki glejaka wielopostaciowego linii U87 i U118 na poziomie morfologiczno-funkcjonalnym i molekularnym, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na mechanizmy szlaku indukcji apoptozy". Tak sformułowany cel pracy uważam za wyjątkowo istotny, zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Dla porządku jednak dodam, że założony przez autora zakres badań (str. 17) oraz przyjęty układ doświadczeń, nie pozwolił na określenie cyt. „mechanizm[ów] szlaku indukcji apoptozy".

W trzecim rozdziale *(Metodyka badań)* autor szczegółowo opisał wykorzystane w doświadczeniach rodzaje płatków grafenu i podał ich właściwości fizyko-chemiczne. Ponadto scharakteryzował wykorzystane w badaniach dwie linie komórkowe glejaka wielopostaciowego. Następnie przedstawił układ trzech doświadczeń, które stanowiły podstawę publikacji „doktorskich", podał ich cel i główne założenia metodyczne. W dalszej części opisał stosowane procedury oraz metody analityczne i statystyczne. Podsumowując ten rozdział stwierdzam, że układ doświadczeń był poprawny, a metody eksperymentalne i analityczne właściwe. Chciałbym podkreślić, że w badaniach wykorzystano innowacyjną aparaturę i technicznie zaawansowane urządzenia badawcze, a także wysokospecjalistyczne procedury i metody analitycznych oraz aplikacje bioinformatyczne.

W rozdziale 4. *„Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych"* autor odniósł się w kolejności do: (i) różnic morfologii i struktury guzów glejaka wielopostaciowego linii U87 i U118, hodowanych na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury; (ii) toksycznego wpływu nanopłatków grafenu na komórki glejaka linii U87 i U118, ze szczególnym uwzględnieniem typu śmierci komórki; (iii) toksyczności nanopłatków tlenku grafenu i zredukowanego tlenku grafenu, na guzy glejaka wielopostaciowego linii U87, ze szczególnym uwzględnieniem aktywacji procesu apoptozy. Z satysfakcją stwierdzam, że doktorant bardzo dobrze wywiązał się z tego zadania. Z dużą znajomością przedmiotu, w sposób merytoryczny, poprowadził dyskusję otrzymanych wyników z wynikami

wcześniejszych badań zespołu oraz wynikami innych autorów. Wymiernym efektem tej pracy jest wzbogacenie naszej wiedzy o istotne, szczegółowe dane, które mogą przyczynić się do lepszego poznania procesu nowotworzenia oraz biologicznej roli nanocząstek w tych procesach, jako potencjalnych terapeutyków.

Zwieńczeniem pracy są: *Podsumowanie* (rozdział 5) oraz *Wnioski* (rozdział 6). Rozdziały te stanowią odpowiedź na założony cel pracy i rozstrzygają prawdziwość przyjętej hipotezy badawczej. Wnioski mają pełne uzasadnienie w przeprowadzonych doświadczeniach i zdaniem recenzenta, powinny stanowić inspirację do dalszych badań.

Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. Poza wymienionymi wyżej rozdziałami praca zawiera również streszczenie (w języku polskim i angielskim), wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wykaz stosowanych skrótów oraz wybrane pozycje piśmiennictwa dotyczące przedmiotowych zagadnień. Ponadto zamieszczono oświadczenia wszystkich współautorów prac będących podstawą rozprawy doktorskiej, o ich udziale w badaniach i publikacjach.

Usterki, przede wszystkim o charakterze redakcyjnym, zaznaczyłem w maszynopisie rozprawy – nie umniejszają one w żadnym stopniu wartości merytorycznej pracy.

5. KONKLUZJA

Rozprawę doktorską pt. Wpływ grafenu na modulacje szlaku indukcji apoptozy dwóch linii komórek glejaka wielopostaciowego (*Glioblastoma multiforme*) oceniam bardzo wysoko. Podjęty przez doktoranta temat jest niezwykle istotny, zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Stwierdzam, że założenia metodyczne, wykorzystane techniki eksperymentalne, metody analiz laboratoryjnych i obliczeń statystycznych, umożliwiły uzyskanie wiarygodnych wyników. Wysoko oceniam również poprawność prowadzenia dyskusji i wnioskowania.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pt. Wpływ grafenu na modulacje szlaku indukcji apoptozy dwóch linii komórek glejaka wielopostaciowego (*Glioblastoma multiforme*), spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, o przyjęcie pracy doktorskiej pana mgr Sławomira Jaworskiego i dopuszczenie pracy do publicznej obrony.

Jednocześnie, ze względu na innowacyjność badań i istotność uzyskanych wyników, składam wniosek, do Wysokiej Rady Wydziału, o wyróżnienie rozprawy.

Szczecin, dnia 2 lipca 2015 roku

Prof. dr hab. Wiesław F. Skrzypczak