Prof. dr hab. Zenon Zduńczyk
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
Zakład Biologicznych Funkcji Żywności
ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Sławomira JAWORSKIEGO p.t. "*Wpływ grafenu na modulację szlaku indukcji apoptozy dwóch linii komórek glejaka wielopostaciowego (Glioblastoma multiforme)*", wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg na Wydziale Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Ocena strony formalnej rozprawy

Promotorka pracy oraz doktorant złożyli stosowne oświadczenia, co do zgodności opracowania z warunkami wymaganymi do przedstawienia rozprawy doktorskiej, w tym samodzielnego opracowania problemu badawczego, bez naruszania praw autorskich osób trzecich.

Na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską składają się 3 anglojęzyczne publikacje w czasopismach naukowych, w których Sławomir Jaworski jest pierwszym autorem, a pozostali współautorzy złożyli stosowane oświadczenia, wskazujące kluczową rolę Doktoranta w prowadzeniu badań i publikowaniu prac. Przedłożone publikacje uzupełniono polskojęzycznym omówieniem celów i metod realizowanych badań oraz podsumowaniem najważniejszych wyników.

Z przedstawionych do oceny prac, dwie opublikowano w *International Journal of Nanomedicine*, z IF 4,195 i 35 pkt. w ocenie parametrycznej MNiSzW oraz jedną w *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* (IF = 0,365, 20 pkt.). Wszystkie rozprawy są pracami zespołowymi, z dużą liczbą autorów, od 7 do 10. Promotor pracy deklaruje 10% udział a pracach, a pozostali 5% lub 2,5%. Z pewnością 5% jest wielkością zaniżoną w przypadku autora korespondencyjnego prac w *International Journal of Nanomedicine* (Andree Chwaliboga), mającego zwykle duży udział w sfinalizowaniu publikacji naukowej.

Deklaracje współautorów, poparte bardzo niskimi (w odczuciu recenzenta zbyt niskimi) wskaźnikami udziału w przygotowaniu publikacji, przyjmuję jako zamiar podkreślenia

kluczowej roli pierwszego autora, a zarazem doktoranta, w realizacji i podsumowaniu badań. We wszystkich publikacjach, w sekcji *Acknowledgment*, zamieszczono informację, że praca jest częścią doktoratu Sławomira Jaworskiego.

Mając powyższe na uwadze oraz ten fakt, że prace opublikowano w wysoko notowanych czasopismach naukowych, stwierdzam, że formalna strona przedstawionej rozprawy doktorskiej nie budzi wątpliwości.

Ocena merytoryczna rozprawy

1. Oryginalność tematyki i wartość poznawcza pracy

We wstępie polskojęzycznego opracowania, jak też w rozdziałach *Introduction* poszczególnych prac, zasygnalizowano najważniejsze zagadnienia dotyczące realizowanej tematyki badawczej, tj.: (1) rozwój nanotechnologii, której efektem jest grafen, szczególna odmiana alotropowa węgla o „płaskiej", pasmowej strukturze (2) struktura i potencjalne właściwości biologiczne grafenu, jako czynnika w hamowaniu rozwoju nowotworów oraz (3) genotypowe i fenotypowe zróżnicowanie glejaka wielopostaciowego oraz specyfika tego nowotworu, w tym chirurgiczne i farmakologiczne ograniczenia w zwalczaniu glejaka.

Autor zwraca uwagę na kluczową cechę, charakterystyczną dla większości nowotworów; zwiększoną, w porównaniu z komórkami zdrowych tkanek, oporność na apoptozę, będącą skutkiem spowolnienia lub nawet blokowania czynników aktywujących apoptozę w nowotworowo zmienionych komórkach. W tym kontekście, podjęta w pracy, a sygnalizowana w jej tytule, ocena przydatności nanopłatków grafenu w indukowaniu apoptozy komórek glejaka wielopostaciowego jest zamiarem bardzo ambitnym, o dużym potencjale poznawczym i praktycznym. Z tych samych względów, bardzo trafnie, do badań wybrano dwie linie komórek glejaka wielopostaciowego różniące się morfologicznie (co może oznaczać różną powierzchnię czynnego kontaktu z nanopłatkami grafenu) oraz aktywnością genów związanych z regulacją cyklu proliferacji i programowanej śmierci komórek.

Ze względu na fakt, że glejak wielopostaciowy należy do najgroźniejszych nowotworów u ludzi, naturalnym jest wrażenie, że praca mieści się w obszarze nauk medycznych. Z dwóch powodów zagadnienie to dotyczy również nauk zootechnicznych. Znane są przypadki występowania glejaka u krów i świń, a przede wszystkim u psów i kotów, zwierząt którymi coraz szerzej zajmuje się zootechnika, a które są szczególnie troskliwie traktowanie przez wielu ludzi. Drugi powód to wykorzystanie zarodków kurzych jako modelu w badaniach

inwazyjności, morfologii, histologii i mechanizmów śmierci komórek nowotworowych. Niezależnie od faktu częstego stosowania tego modelu w badaniach biologii nowotworów, opanowanie tego modelu może być użyteczne w wielu innych badaniach zootechnicznych, w tym biodostępności niektórych składników i toksyczności ksenobiotyków. Ponadto, eksperymenty służące wzbogaceniu wiedzy o mechanizmach apoptozy mają charakter badań podstawowych, ważnego elementu w rozwoju wielu dyscyplin, w tym zootechniki.

2. Zdefiniowanie hipotez/celów badawczych

Z zakresu zrealizowanych badań wynika, że ich celem była weryfikacja trzech hipotez badawczych: (1) ze względu na specyficzną budowę, nanopłatki grafenu mogą uszkadzać zarówno błonę zewnętrzną, jak i organelle komórek, a w ten sposób indukować szlak apoptozy w komórkach glejaka wielopostaciowego, (2) zróżnicowanie efektywności oddziaływania grafenu na komórki z różnych linii glejaka wielopostaciowego może być zarówno skutkiem różnic genotypowych komórek, jak również różnic w ich morfologii, ważnych w kontaktowym oddziaływaniu tej substancji oraz (3) ze względu na różnice fizykochemiczne tlenku i zredukowanego tlenku te formy grafenu mogą w różny sposób wpływać na żywotność komórek glejaka wielopostaciowego.

Wszystkie hipotezy zostały dobrze uzasadnione w przeglądzi piśmiennictwa, a ich weryfikacja była zasadna z poznawczych i praktycznych względów, co jednoznacznie rozstrzyga o wysokiej wartości naukowej i utylitarnej ocenianej rozprawy.

3. Zakres i metody badań

Część metodyczna badań, zarówno w załączonych publikacjach (co dość oczywiste), jak i w polskojęzycznym omówieniu przeprowadzonych doświadczeń jest wyczerpująca i precyzyjnie prezentuje wszystkie elementy badań, tj.:

- użyte materiały, jak grafen naturalny (uzyskany z firmy Skyspring Nanomaterials, Houston, USA), tlenek i zredukowany tlenek grafenu (uzyskane z Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie) oraz dwie linie glajaka wielopostaciowego (*Glioblastoma multiforme*) U87 i U118, spełniające oczekiwania metodyczne,

- układ i warunki przebiegu doświadczeń *in vitro* i *in ovo* z użyciem komórek glejaka i różnych form grafenu oraz

- użyte metody pomiarów, w tym zmian morfo- i histologicznych oraz proliferacji i mechanizmu śmierci komórek.

Przyjęte hipotezy weryfikowano poprzez następujące postępowanie:

- charakterystykę morfologii i histologii guzów, wyhodowanych na błonie komórkowo-omoczniowej zarodka kury z dwóch linii glejaka wielopostaciowego, wybranych do cyklu badań;

- zbadanie zmian morfologicznych i histologicznych oraz żywotności i typu śmierci komórek obu linii glejaka, w zależności od dawki i formy chemicznej grafenu;

- określenie zmian morfologicznych i histologicznych oraz żywotności i typu śmierci komórek wybranej linii glejaka (U87), inkubowanych na błonie kosmówkowo -omoczniowej zarodka kury;

- zbadanie zróżnicowania i mechanizmu śmierci komórek traktowanych nanopłatkami grafenu, z wykorzystaniem wybranych wskaźników apoptozy i nekrozy komórek.

Takie postępowanie odpowiadało współczesnej wiedzy, syntetycznie przedstawionej w pracach oryginalnych i polskojęzycznym omówieniu, a przede wszystkim odpowiadało tytułowi pracy i przyjętym hipotezom.

4. Wyniki badań i ich omówienie

Zakres i sposób prezentacji oraz omówienia wyników badań został pozytywnie zweryfikowany w postępowaniu kwalifikującym prace do druku. Do ważnych wyników omawianych badań, warunkujących zasadność dalszego postępowania, należy zaliczyć potwierdzenie przydatności błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, jako modelu badawczego w ocenie rozwoju fenotypowo i genotypowo zróżnicowanych komórek glejaka wielopostaciowego. Stwierdzono, że komórki wywodzące się z linii U87 i U118 wykazywały charakterystyczne cechy glejaka: polimorfizm komórek, wysoki indeks mitotyczny, atypię jąder i silnie rozwinięte naczynia krwionośne. Odnotowane, liczne różnice w morfologii i strukturze guzów glejaka wywodzących się z dwóch genetycznie różnych linii wskazują, że cechy fenotypowe tych linii mogą modyfikować antynowotworowy efekt takich substancji jak grafen, oddziaływujących poprzez bezpośredni kontakt z komórką nowotworową. W modelu *in vitro* wykazano duże powinowactwo grafenu do komórek nowotworowych, skutkujące zmianami morfologicznymi, a ostatecznie zamieraniem komórek drogą nekrozy i/lub apoptozy. Taki efekt zależał od dawki garfenu oraz formy tego związku.

W badaniach *in ovo*, z zastosowaniem tlenku i zredukowanego tlenku grafenu, potwierdzono filtracyjne właściwości grafenu w kontakcie z wewnętrznymi strukturami komórki, co mogło aktywować wewnętrzny (mitochondrialny) szlak aktywacji apoptozy, nie

związany z ekspresją genów p53, Bel-2 i p27. Autor słusznie zastrzega, że jest to zaledwie sygnał w zrozumieniu złożonego procesu, jakim jest apoptoza komórek nowotworowych.

Zasygnalizowane, jak również pozostałe, wyniki badań własnych kompetentnie skonfrontowano z pracami innych autorów, wykonanymi w ostatnich kilku latach.

5. Podsumowanie wyników badań

W polskojęzycznym omówieniu badań podsumowanie wyników zawarto w dwóch rozdziałach, zatytułowanych „*Podsumowanie*" oraz „*Wnioski*". Rozdziały te, w zasadniczej części, różni strona redakcyjna: w pierwszym zamieszczono podsumowanie opisowe, w drugim najważniejsze efekty zestawione w 7 punktach, a następnie zrekapitulowane je jako „*Uogólnienia*", w których stwierdzono: (1) płatki grafenu wykazują przeciwnowotworowe oddziaływanie zależne od genotypu komórek, (2) na zakres przeciwnowotworowego oddziaływania mają wpływ różnice w fizykochemicznych właściwościach tlenku i zredukowanego tlenku grafenu oraz (3) nanopłatki grafenu aktywują szlak apoptozy komórek glejaka wielopostaciowego.

„Uogólnienia" są rzeczywistymi wnioski z przedstawionych badań, będącymi odpowiedzią na postawione wcześniej hipotezy badawcze. Zdaniem recenzenta, wyniki badań upoważniają o rozszerzenia treści tych wniosków. W tym kierunku zmierzają poniższe pytania do autora:

- czy zróżnicowanie podatności komórek linii U87 i U118 na traktowanie grafenem wynikało z różnic morfologicznych, warunkujących aktywny kontakt ze strukturami grafenu?
- czy można wskazać, która forma grafenu znamionuje większą przydatność w hamowaniu proliferacji i w aktywacji szlaku apoptozy komórek glejaka i jakie właściwości danej formy mogą odgrywać kluczową rolę w tym oddziaływaniu?

Dodatkowo szersze pytanie, nie związane z wnioskami z pracy, jakie argumenty zdecydowały o wyborze gelejaka wielopostaciowego, jako modelu badawczego w podjętych badaniach?

Ocena końcowa

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Sławomira Jaworskiego p.t. "*Wpływ grafenu na modulację szlaku indukcji apoptozy dwóch linii komórek glejaka wielopostaciowego (Glioblastoma multiforme)*" jest podsumowaniem obszernych studiów eksperymentalnych, podporządkowanych ważnym celom poznawczym i praktycznym. W pracy wykorzystano właściwe, nowoczesne metody badawcze, pozwalające na uzyskanie

wiarygodnych wyników, poszerzających wiedzę o biologii jednego z ważnych nowotworów oraz możliwościach wykorzystania grafenu w terapii nowotworowej.

W podsumowaniu powyższych ocen stwierdzam, że oceniana praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, określonym w ustawie z dnia 14. marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym z zakresu sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 59, Dz. U. z 2005 nr 164, poz. 1365 oraz Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455) i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Sławomira Jaworskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, w uznaniu wysokich walorów poznawczych i praktycznych badań, zgłaszam wniosek o wyróżnienie przedstawionej pracy doktorskiej.

Olsztyn, 1.07.2015 r.