



Janina Gabrielska

Wrocław, 31.07.14 r.

Katedra Fizyki i Biofizyki

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

### Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jacka Grębowskiego

pt „Wyznaczenie stałych szybkości reakcji wysoko hydroksylovanego fulerenu  $C_{60}(OH)_{36}$  z produktami radiolizy wody i określenie mechanizmu jego oddziaływania na erythrocyty człowieka”

Fulerenole są hydroksylowanymi pochodnymi fulerenów, które dzięki swojej budowie chemicznej i związanym z nią właściwościom fizyko-chemicznym stały się w ostatniej dekadzie obiektem coraz to szerszych badań powiązanych z potencjalnym zastosowaniem w medycynie. Wykazują dualistyczny charakter, zależny od warunków badań, który polega na właściwościach antyoksydacyjnych i pro-oksydacyjnych. Doniesienia literaturowe wskazują na możliwość ich aplikacji m.in. w diagnostyce medycznej do przenoszenia substancji kontrastujących, do kierowanego transportu leków, jako neuroprotektorów, substancji radioprotekcyjnych także, jako radiouczulaczy. Wiele modyfikacji fulerenów  $C_{60}$ , zawierających w swojej strukturze 60 atomów węgla, do pochodnych rozpuszczalnych w wodzie polega na przyłączeniu określonych grup funkcyjnych takich jak: hydroksylowa (polihydroksyfulereny), glikol polietylenowy (PEG-fulereny) poliwinylpirolidon (PVP-fulereny). Zmodyfikowanie funkcjonalne np. ugrupowaniem  $-OH$ , nadaje tym cząsteczkom zdolność do ochrony przed wolnymi rodnikami. Niwelacja najbardziej reaktywnego wolnego rodnika ( $\cdot OH$ ) w stosunku do wrażliwych na utlenianie biomolekuł to stężeniowo-zależna funkcja antyoksydacyjna. Jeśli założyć, że generacja wolnego rodnika ( $\cdot OH$ ) w organizmie mogłaby się odbywać na drodze absorpcji promieniowania jonizującego, to w ochronie przed skutkiem tego promieniowania można by zastosować fulerenole, na co wskazują wykonane już badania na zwierzętach.

Dlatego celem podstawowym rozprawy doktorskiej było po pierwsze, wyznaczenie stałych szybkości reakcji wysoko hydroksylovanego fulerenolu  $C_{60}(OH)_{36}$  z produktami radiolizy wody: rodnikiem hydroksylowym ( $\cdot OH$ ) oraz elektronem uwodnionym ( $e_{aq}^-$ ) oraz oszacowanie energii aktywacji reakcji, po drugie określenie mechanizmu/sposobu oddziaływania tego fulerenolu z erythrocytami i ich błoną komórkową. Cele pracy zostały



sformułowane i dobrane bardzo interesująco a przedstawione zagadnienia do rozwiązania są ważne i aktualnie potrzebne. Mają charakter wielowątkowy i nowatorski. Ocenianą rozprawę doktorską stanowi zestawienie, przedstawione poniżej, trzech oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach specjalistycznych oraz w jednej 1 pracy przeglądowej, w których to udział Doktoranta potwierdzony oświadczeniami współautorów, można uznać za istotny:

1. Rate constants of highly hydroxylated fullerene  $C_{60}$  interacting with hydroxyl radicals and hydrated electrons. Radiation Physics and Chemistry (2014) 103, 146-152. Praca współautorska, z **Jackiem Grębowskim** na 1 pierwszym miejscu, **72 %** udziału.
2. Fullerenol could associate to band 3 protein of human erythrocyte membranes. Biochimica et Biophysica Acta (2013a) 1828 (9) 2007-2014. Praca współautorska, z **Jackiem Grębowskim** na 1 pierwszym miejscu, **55 %** udziału.
3. Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene. Biochimica et Biophysica Acta (2013b) 1828 (9) 2007-2014. Praca współautorska, z **Jackiem Grębowskim** na 1 pierwszym miejscu, **42%** udziału.

**Praca przeglądowa:** Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine. Biomedicine Research International (2013c) 751913. Praca współautorska, z **Jackiem Grębowskim** na 1 pierwszym miejscu, **82%** udziału.

Prace oryginalne Doktoranta mają charakter doświadczalny, stanowią zwarty cykl monotematyczny zagadnień podstawowych związanych z realizacją postawionych celów doktoratu, natomiast praca przeglądowa prezentuje stan wiedzy w badaniach nad fulerenami oraz wskazuje ich możliwości aplikacyjne w aspekcie biomedycznym. Doktorant jest również współautorem 6 publikacji, które nie wchodzi do doktoratu, 28 doniesień konferencyjnych, w tym 4 zagranicznych. Wygłosił także 4 prezentacje na sympozjach i konferencjach w tym na letniej szkole w Grecji.

Waga zestawionych w ramach rozprawy doktorskiej prac, jeśli oceniać je na podstawie parametru Impact Factor jest wysoka i waha się od wartości ok. 1,3 poprzez ok. 2,7 do 3,9. Sumaryczna wartość tego parametru (prac wchodzących w skład doktoratu) wynosi  $IF = 11,819$ , czemu odpowiada 125 punktów MNiSzW a w przeliczeniu na zadeklarowany, w odpowiednich oświadczeniach, wkład doktoranta do tych publikacji równy jest  $IF=6,952$ . Należy także zaznaczyć, że całkowity IF bardzo bogatego dorobku publikacyjnego Doktoranta równy jest 19,307; zaś liczba punktów MNiSzW wynosi 243.



Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysława Puchały, jako promotora oraz przy udziale dr hab. Anity Krokosz będącej promotorem pomocniczym w Katedrze Biofizyki Molekularnej we współpracy z Międzyresortowym Instytutem Techniki Radiacyjnej na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej oraz z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych w Zakładzie Chemii Heterogennej PAN. Ośrodek macierzysty, w którym została przygotowana praca doktorska, funkcjonuje w ramach Instytutu Biofizyki UŁ, który należy do czołowych krajowych centrów, gdzie prowadzone są badania naukowe z dyscypliny biofizyka w różnych aspektach funkcjonowania membran biologicznych.

Pierwszy nurt badań Doktoranta, praca nr 1, to zagadnienia identyfikacyjne i charakterystyka fizyko-chemiczna struktury fulerenolu  $C_{60}(OH)_{36}$ , a także określenie podstawowej wielkości - stałej szybkości reakcji fulerenolu z produktami radiolizy wody (rodnikiem hydroksylowym i elektronem uwodnionym). Wartość stałej szybkości reakcji (wynosiła odpowiednio  $2,0 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  oraz  $2,5 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) z dobrym przybliżeniem, nawiązuje do tej wyznaczonej przez Goldiego i Asmusa z 1999 r. w przypadku rodnika hydroksylowego natomiast jest ok. 5-krotnie wyższa od danych literaturowych, gdy chodzi o elektron uwodniony (Mohan i wsp., 1998). Autor wnioskuje na podstawie porównań, że zdolności fulerenoli do wychwytywania produktów radiolizy wody (wolnego rodnika  $\cdot OH$  oraz elektronu uwodnionego  $e_{aq}^-$ ) wraz ze wzrostem stopnia hydroksylacji klatki węglowej  $C_{60}$  nie maleją. Są to bardzo ważne z poznawczego oraz praktycznego punktu widzenia odkrycia, które udowadniają zdolność do wychwytywania/niwelacji bardzo reaktywnego wolnego rodnika  $\cdot OH$  przez ten wysokohydroksylowany fulerenol oraz wskazują na ich potencjalne działanie ochronne/antyoksydacyjne przed RTF na poziomie organizmu.

Bardzo ważną częścią rozprawy jest znalezienie częściowych odpowiedzi, w ramach drugiego zadania badawczego jakie zrealizował Doktorant i zaprezentował w pracach nr 2 i 3, wyjaśniających molekularny mechanizm oddziaływania fulerenolu  $C_{60}(OH)_{36}$  (w stosunkowo wysokich stężeniach, czyli w 50, 100 i 150 mg/L) z komórkami erytrocytów i ich błoną plazmatyczną. Podejścia eksperymentalne (praca nr 2, chronologicznie późniejsza) opierały się na analizach mikroskopowych i diagramów z cytometrii przepływowej w przypadku badań morfologicznych badanych obiektów (zmodyfikowanych erytrocytów), pomiarach stopnia hemolizy erytrocytów i stężenia jonów potasu wpływających z nich oraz

8



analizach elektroforetycznych profilu białek błonowych zmodyfikowanych erytrocytów. Natomiast podejście eksperymentalne w przypadku wcześniejszej pracy nr 3 opierało się na wyznaczeniu ilości fulerenu [w  $\mu\text{g}/\text{mg}$  białka] wbudowanego do błony erytrocytów oraz na analizach jego wpływu na aktywność ATPaz błon erytrocytów oraz na anizotropię (fluorescencji) znaczników fluorescencyjnych rozmieszczonych w różnych rejonach błony erytrocytów. W pełni podzielam zdanie Doktoranta, co do wskazania najważniejszych osiągnięć mających wyraz zarówno w konkluzjach prac nr 2 i 3 jak również w krótkiej dyskusji zawartej w ramach ok. 5 stronicowego streszczenia. Osobiście za szczególnie istotne osiągnięcia w ramach tej części rozprawy uważam udokumentowanie, niewielkich zmian w morfologii erytrocytów ludzkich indukowanych asocjacją fulerenolu  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$  z błoną (użytego w stosunkowo wysokich stężeniach), które skutkują zmianami w organizacji transbłonowej białek cytoszkieletu, w szczególności białka pasma 3, co czyni ten fulerenol potencjalnym nośnikiem leków. Natomiast inne ważne odkrycia, to wykazanie wbudowywania się fulerenolu do błony erytrocytów i możliwości jego migracji do wnętrza dwuwarstwy oraz inhibicja aktywności ATP-az ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -;  $\text{Ca}^{2+}$ - oraz  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPaz). Oznacza to bezpośrednie lub pośrednie oddziaływanie z enzymami błonowymi erytrocytów ludzkich, co może modulować jonową homeostazę, która reguluje śmierć komórek.

W nawiązaniu do opracowania doktoratu mam kilka pytań:

- 1). Czy w ramach zastosowanej procedury eksperymentalnej dla zbadania anizotropii fluorescencji sond ANS, TMA-DPH i DPH w błonach modyfikowanych wykonał Doktorant wstępne doświadczenia dla wykluczenia efektu gaszenia znaczników przez badany fulerenol o wzrastającym stężeniu od 50-150 mg/L? Nie ma nic na ten temat w procedurach pracy nr 3. Moje wątpliwości dotyczą w szczególności, istotnych w interpretacji, rezultatów z zastosowaniem sondy DPH. Wykazują one różnice istotne statystycznie dla stężeń 100 i 150 mg/L, zmniejszenie anizotropii w granicach tylko ok 13%.
- 2.) Doktorant nie podaje niepewności pomiaru takich wielkości jak stała szybkości reakcji fulerenolu  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$  z produktami radiolizy (odpowiednio  $2,0 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  i  $2,5 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) czy wartości procentowej inhibicji wpływu jonów potasowych z erytrocytów (20,3 %). Czy pomimo opublikowania tych danych nie może pokusić się o oszacowanie niepewności pomiarowej tych istotnych wielkości?



3). Proszę Doktoranta o próbę interpretacji rozbieżności uzyskanego wyniku wartości stałej szybkości reakcji badanego fulerenu z elektronem uwodnionym ( $2,5 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), która jest ok. 5-krotnie wyższa od danych literaturowych (Mohan i wsp., 1998).

4). Proszę Doktoranta o odpowiedź na trudne pytanie „Jakie badania zaproponowałby na przyszłość jako pilne, w aspekcie aplikacyjnym fulerenu  $C_{60}(OH)_{36}$ , jako nośnika leków chemoterapeutycznych o zmniejszonych skutkach ubocznych dla organizmu?

Jako tzw. „zszywka” rozprawa nie pozostawia wiele pola Doktorantowi do wykazania się talentem edytorskim. Chcę jednak zaznaczyć, że części formalne rozprawy zostały zredagowane jasno i dość starannie. W moim odczuciu zaproponowałabym pewne korekty, które mogą uczynić płynniejszym czytanie streszczenia:

- 1) Str. 3, 4 wiersz od góry: Proponuję przeredagowanie istniejącego zdania na: Białka reagują z produktami radiolizy wody:  $e^-_{aq}$ ,  $H^+$ ,  $^{\bullet}OH$  z relatywnie wysokimi stałymi szybkości reakcji w przedziale wartości pomiędzy  $10^9$ – $10^{11} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ... zamiast: Białka reagują z produktami radiolizy wody:  $e^-_{aq}$ ,  $H^+$ ,  $^{\bullet}OH$  z dość dużymi stałymi szybkości reakcji między  $10^9$ – $10^{11} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ...
- 2) Str. 3, 9 wiersz od góry: w zdaniu brak orzeczenia, w tym przypadku słówka „jest”
- 3) Str. 3, 10 wiersz od góry: Zdanie zawiera podmiot domyślny „on”, który należałoby zamienić na rodnik hydroksylowy, ponieważ zdanie poprzedzające traktuje o mechanizmach enzymatycznych w komórkach
- 4) Str. 3, 15 wiersz od góry: zmieniałabym składnię zdania, ponieważ zawiera ono powtórzenia słowa „przez”
- 5) Str. 13, 17 wiersz od góry: Zdanie zaczynające się od cyt. ‘Nie jest jednak określona...’warto z powodzeniem zastąpić dwoma prostymi zdaniami
- 6) Str. 4, wiersz 10 od góry: Zdanie zmieniałabym na następujące: „Oddziaływanie fulerenu  $C_{60}(OH)_{36}$  z błoną plazmatyczną erytrocytów określono przy użyciu metod: elektroforetycznej, mikroskopowej i spektroskopowych.” Zamiast „Oddziaływanie fulerenu  $C_{60}(OH)_{36}$  z błoną plazmatyczną erytrocytów określono przy użyciu metod: elektroforetycznych, mikroskopowych i spektroskopowych.”
- 7) Str. 4 wyniki przedstawione w punktach: 1 i 2 przedstawiłabym w postaci 2 zdań - każdy punkt
- 8) Str. 5, wyniki punkt 4: końcowa sentencja tego punktu, słowo „mówią” zmieniałabym na „wskazują na”
- 9) Str. 7 – przedostatnie zdanie streszczenia nazwane „Podsumowanie i wnioski” jest stylistycznie niedopracowane
- 10) Str. 16 cyt. 17 oraz strony 17-18 cyt. 1,4,6, i 9, występują tzw. literówki

Formułując konkluzję chciałabym stwierdzić, że pan mgr Jacek Grębowski przedstawił wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych oraz ważkich wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych. Wymagały one od eksperymentatora dużej wiedzy z zakresu biofizyki oraz umiejętności praktycznych z zakresu preparatyki



biochemicznej oraz nabycia szerokich umiejętności prowadzenia badań przy użyciu wielorakich technik i metod. Opublikowane już wyniki prac badawczych w ramach tej rozprawy wnoszą do nauki światowej z obszaru biofizyki oraz nauk biomedycznych wiele nowych i cennych informacji także o dużym medycznym potencjale aplikacyjnym. Oceniam ją na bardzo dobry.

Należy dodać, że badania w ramach tej pracy doktorskiej były między innymi współfinansowane: 1) przez NCN, projekt Preludium, zrealizowany w latach 2012-2013, pod kierownictwem Doktoranta; 2) przez Unię Europejską, w ramach programu Operacyjnego Kapitał Ludzki Priorytet VIII, Projekt Doktoranci – Regionalna Inwestycja w Młodych naukowców – Akronim D-RIM, 3) przez Uniwersytet Łódzki, w ramach badań własnych na podstawie dwóch umów.

Wobec powyższego stwierdzam, że Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie pana Jacka Grębowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Janina Gabrielska*