



Łódź, 24 sierpnia 2014 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej pana mgr Jacka Grębowskiego

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

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z 4 publikacji (w tym 3 oryginalnych prac badawczych), streszczenia, krótkiej listy odnośników literaturowych, wykazu dorobku naukowego Doktoranta, a także oświadczeń współautorów publikacji.

Najpierw chciałbym odnieść się do formy przedstawionej rozprawy.

Doktorant skorzystał z możliwości, jaką daje obecnie obowiązująca *Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*, i w miejsce jednolitego tekstu przedstawił rozprawę w formie spójnego tematycznie zbioru 4 artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Oczywiście formalnie jest to jak najbardziej w porządku. Jako recenzent muszę jednak wyrazić żal, że Doktorant nie napisał rozprawy w klasycznym znaczeniu tego słowa, a przecież ani nowa ustawa ani jej interpretacja w tej kwestii podana przez Centralną Komisję do Spraw Stopni i Tytułów tego nie zabrania, ani do takiego rozwiązania nie zniechęca.

Przyjęcie takiej formy rozprawy, to znaczy zbioru publikacji, nie ułatwia Doktorantowi udowodnienia, a recenzentowi przekonania się, że Doktorant istotnie spełnia wymagania określone w punkcie 1 artykułu 13 Ustawy. Publikacja naukowa, ze swojej natury zwięzła i skupiona na szczegółowym zagadnieniu, które jest jej tematem, nie jest optymalnym narzędziem, które umożliwia udowodnienie szerokiej wiedzy teoretycznej w danej dziedzinie, czyli w tym przypadku m.in. w dziedzinie kinetyki chemicznej i mechanizmów reakcji rodnikowych. Krótka i zwięzła publikacja najczęściej nie daje też możliwości zaprezentowania pełnej, obszernej i wielostronnej dyskusji nad danym zagadnieniem naukowym, wymienienia i rozważenia alternatywnych hipotez i interpretacji oraz pełnej dyskusji nad implikacjami otrzymanych wyników. A szkoda, bo jak wykazuję poniżej, przedstawione tu wyniki są tak ciekawe, że wydaje się naturalną potrzebą i wartością przedstawienia przez Doktoranta ich obszernej dyskusji. Przyjęcie takiej formy rozprawy ogranicza również możliwość popisania się erudycją naukową,



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Dr hab. inż. Piotr Ulański, prof. PŁ

umiejętnością prowadzenia dyskusji naukowej, profesjonalną dojrzałością i wreszcie opanowaniem umiejętności profesjonalnego prezentowania wyników, tym bardziej, że z oświadczeń Doktoranta i współautorów nie wynika, że był on jedynym Autorem tekstów publikacji. Pewnym remedium mogłoby być dołączenie, oprócz streszczenia, bardziej obszernego przewodnika po publikacjach stanowiących podstawę rozprawy.

Powyższe nie jest oczywiście formalnym zarzutem pod adresem Doktoranta – podkreślam, że z formalnego punktu widzenia Doktorant nie miał obowiązku przedstawienia rozprawy w klasycznej formie.

Na szczęście, w tym konkretnym przypadku, **bardzo wysoka wartość naukowa rozprawy**, to jest publikacji wchodzących w jej skład, a także życiorys naukowy i bogaty dorobek publikacyjny i konferencyjny mgr Jacka Grębowskiego **stanowią bardzo solidną podstawę dla recenzenta do pozytywnej oceny wiedzy i umiejętności Doktoranta.**

Oświadczenia Doktoranta i współautorów zasadniczo spełniają wymagania określone w paragrafie 5 punkt 3 *Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*, choć moim zdaniem w przypadku artykułu nr 1 oświadczenia nie są spójne i precyzyjne. Trudno jest na ich podstawie stwierdzić, kto był Autorem koncepcji pracy oraz kto przygotował końcową wersję manuskryptu tego artykułu. Oświadczenia do pozostałych prac nie budzą żadnych wątpliwości.

Chciałbym się również odnieść do dokonanego przez Doktoranta wyboru prac stanowiących rozprawę doktorską. Pan mgr Grębowski, jako Autor 10 publikacji, miał z czego wybierać. Wydaje mi się, że bez szkody dla spójności tematycznej do tych czterech wybranych prac można by dołączyć jeszcze jedną publikację, zatytułowaną *The effect of fullereneol on the alcohol dehydrogenase activity irradiated with X-rays*, która ukazała się w bieżącym roku w *Radiation Physics and Chemistry*. Ta praca jest w pewnym sensie logiczną kontynuacją publikacji nr 2 z rozprawy, gdyż wskazuje, że głównym mechanizmem działania ochronnego fulerenolu jest faktycznie zmiatanie wolnych rodników, co podkreśla znaczenie i wartość pomiarów kinetycznych dotyczących reakcji fulerenolu z rodnikami, czyli właśnie takich badań, jakie zaprezentowano w publikacji nr 2.



Ogólna ocena rozprawy i dokonań naukowych Doktoranta

Moja ogólna ocena dokonań naukowych pana mgr Jacka Grębowskiego jest bardzo wysoka. Doktorant opublikował 10 prac, w tym 8 w międzynarodowych czasopismach naukowych o stosunkowo wysokim współczynniku oddziaływania (średni IF 1,93), jest współautorem 28 komunikatów konferencyjnych, uzyskał grant typu Preludium z Narodowego Centrum Nauki, był także stypendystą programu *Doktoranci – Regionalna Inwestycja w Młodych Naukowców*, w ramach programu operacyjnego Kapitał Ludzki. **Dorobek Doktoranta jest zdecydowanie ponadprzeciętny**, zarówno jeśli chodzi o liczbę publikacji i prezentacji konferencyjnych, jak i wysoki poziom tych prac, opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach.

Przedstawiona rozprawa dotyczy złożonych, interdyscyplinarnych zagadnień będących na pograniczu biologii, chemii i fizyki, a badania opisane w pracach składających się na rozprawę są na najwyższym poziomie, o czym oczywiście między innymi świadczy fakt opublikowania ich w bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach. **Uzyskane wyniki są ważne i ciekawe.** Uważam, że stanowią **oryginalny i znaczący wkład do wiedzy na temat bardzo ważnej klasy nanomateriałów, jakimi są fulereny i ich pochodne.** Wkład ten jest bogaty i wielowątkowy, bo dotyczy zarówno fizykochemii tych związków, jak i ich oddziaływań z układami biologicznymi.

Badania zostały prawidłowo zaplanowane, profesjonalnie wykonane, przy użyciu nowoczesnych i adekwatnie wybranych, zawansowanych technik badawczych, a uzyskane wyniki są w pełni wiarygodne. Analiza i dyskusja wyników jest wnikliwa (choć nie zawsze tak szeroka, jak można by było sobie życzyć), a sformułowane wnioski są poprawne, co nie znaczy, że z niektórymi z nich nie można by dyskutować. **Co zasługuje na szczególne podkreślenie, Autor w swoich pracach odważnie formułuje oryginalne hipotezy i w znaczącej części przekonująco dowodzi ich prawdziwości.** Mam tu na myśli szczególnie nowy mechanizm reakcji rodników OH z fulerenolem, a także mechanizm oddziaływania fulerenoli z białkami błon komórkowych erytrocytów.

Uwagi szczegółowe i dyskusja

Przedstawiona rozprawa jest bardzo ciekawa, i dlatego, nie tylko z obowiązku recenzenta, ale i z powodu mojego autentycznego zainteresowania wynikami uzyskanymi przez Doktoranta, chciałbym przedstawić kilka uwag krytycznych, o charakterze polemicznym, dotyczących poszczególnych części rozprawy.



Uwagi do pracy nr 2.

Używając zaawansowanej techniki pomiarowej, jaką jest radioliza impulsowa, Autor wyznaczył drugorzędową stałą szybkości reakcji rodników $\cdot\text{OH}$ z badanym fulerenolem. Pomiary i obliczenia zostały zaplanowane i wykonane poprawnie i uważam, że można mieć pełne zaufanie do wyznaczonej przez Autora wartości. Szkoda jednak, że zabrakło dyskusji, dlaczego, w ramach radiolizy impulsowej, wybrano metodę polegającą na obserwacji narastania sygnału absorpcyjnego produktu, a nie na przykład bardziej popularną metodę kinetyki konkurencyjnej. Następnie Autor chciał sprawdzić, czy reakcja jest kontrolowana dyfuzyjnie, i w tym celu wyliczył teoretyczną wartość dyfuzyjnie kontrolowanej stałej szybkości reakcji $\cdot\text{OH}$ z fulerenolem na podstawie równania Smoluchowskiego-Einsteina. Ponieważ tak wyliczona wartość okazała się kilkakrotnie wyższa od wyznaczonej doświadczalnie, Autor przyjął, że reakcja nie jest kontrolowana dyfuzyjnie i w dalszej części pracy zaproponował, bardzo zresztą ciekawy, bardziej złożony mechanizm reakcji (do którego pozwolę sobie wrócić w dalszej części recenzji). O ile sposób postępowania jest tu całkowicie poprawny, o tyle można mieć wątpliwości co do wartości liczbowej otrzymanej z równania Smoluchowskiego-Einsteina. Tu pojawiają się dwa problemy. W pracy nie wyjaśniono, czy przyjęte literaturowe wartości współczynnika dyfuzji i promienia reakcji zostały wyznaczone dla takiego samego fulerenolu jak badany przez Autora, czyli fulerenolu o takim samym stopniu hydroksylacji. O ile wpływ stopnia hydroksylowania na wymiary cząsteczki jest prawdopodobnie niewielki, to nie wydaje się słuszne założenie o braku takiego wpływu na współczynnik dyfuzji. Można przypuszczać, że stopień hydroksylacji wpływa na hydrofilowość fulerenu, a co za tym idzie na jego oddziaływania z wodą jako rozpuszczalnikiem. Zmiana tych oddziaływań może modyfikować strukturę i liczbę warstw cząsteczek wody związanych z cząsteczką fulerenolu, które poruszając się razem z cząsteczką fulerenolu powodują wzrost promienia hydrodynamicznego i wolniejszą dyfuzję. Szkoda, że Autor nie zmierzył współczynnika dyfuzji dla badanego fulerenolu, na przykład za pomocą dynamicznego rozpraszania światła. Drugi problem to przyjęcie założenia, że fulerenol jest rozpuszczony cząsteczkowo w wodzie, czyli że każda jego cząsteczka osobno porusza się w roztworze i jest w pełni dostępna do ataku rodników OH , a promień takiej reakcji (w rozumieniu teorii Smoluchowskiego) jest równy promieniowi pojedynczej cząsteczki. Doniesienia literaturowe [m.in. Mohan i in. (1998) J.Chem. Soc. Faraday Trans. 94,359-363, ale także i cytowany przez Autora artykuł Guldiego i Asmusa (1999) Radiat. Phys. Chem. 56, 449-456] dotyczące badań nad rozpuszczalnymi w wodzie pochodnymi fulerenów wskazują, że o ile pochodne zawierające grupy karboksylowe i aminowe faktycznie rozpuszczają się cząsteczkowo i nie mają tendencji do agregacji, fulerenole wykazują taką tendencję. Oczywiście nie znaczy to, że w konkretnym badanym przypadku, to jest dla zsyntetyzowanego przez Autora fulerenolu i badanego zakresu



stężeń, mieliśmy do czynienia z daleko posuniętym procesem agregacji, ale na podstawie doniesień literaturowych można przypuszczać, że mogło tak być, i szkoda, że temu faktowi nie poświęcono w pracy uwagi. Jeśli agregacja miała miejsce, to wynik liczbowy otrzymany z równania Smoluchowskiego-Einsteina mógł być opatrzony dużym błędem.

Zaproponowany przez Autora ciekawy i prawdopodobny mechanizm reakcji jest zgodny z danymi eksperymentalnymi, aczkolwiek powinien być traktowany jako hipoteza, ponieważ nie wykazano doświadczalnie występowania zaproponowanego produktu przejściowego. Trudno oprzeć się wrażeniu, że w publikacji dyskusję alternatywnych możliwości wyjaśnienia wyników, zwłaszcza danych termodynamicznych, potraktowano nieco zdawkowo. Nie wyjaśniono dokładnie czy i dlaczego Autorzy odrzucają możliwość reakcji jednoetapowej z niewielką barierą aktywacyjną.

O ile poprawność wyznaczenia stałej szybkości reakcji fulerenolu z elektronem uwodnionym nie budzi wątpliwości, szkoda że w publikacji zabrakło choćby kilku zdań dyskusji o tym, czym może być spowodowany znaczny wzrost tej wartości towarzyszący hydroksylowaniu fulerenu. Podobnie, prawdopodobnie ograniczenie objętości publikacji nie pozwoliło Autorowi na podjęcie nieco szerszej dyskusji dotyczącej porównania właściwości antyoksydacyjnych (choćby w sensie stałych szybkości reakcji z $\cdot\text{OH}$) różnych form fulerenów, w tym także pochodnych hydrofilowych o innej budowie niż fulerenole, dla których te stałe szybkości są znane m.in. z prac Guldiego i Asmusa, Mohana i in., Bensassona i in. oraz Lu i in.

Uwagi do pozostałej części pracy

U podstaw koncepcji tych prac i w ogóle całej rozprawy leży idea, że być może w przyszłości pochodne fulerenu, a w szczególności fulerenole, znajdą zastosowanie terapeutyczne jako antyoksydanty. Jest to ciekawa idea, ale sądzę, że jej zasadność nie jest oczywista i wymaga przedyskutowania, i to w kilku aspektach.

Autor pisze w Streszczeniu, że spośród oksydantów występujących w komórkach najniebezpieczniejszy jest rodnik hydroksylowy. Sądzę, że i ta teza nie jest oczywista i wymaga dyskusji. Z faktu, że rodniki te posiadają bardzo wysoki potencjał oksydacyjny, nie wynika wprost, że to one bezpośrednio dokonują największych szkód w komórkach czy tkankach, czyli z dużą wydajnością atakują DNA czy białka, zwłaszcza w warunkach stresu oksydacyjnego o umiarkowanym nasileniu. Rodniki OH reagują z szybkością kontrolowaną dyfuzyjnie niemalże z każdą napotkaną cząsteczką organiczną, a także i z wieloma jonami metali, i w ten sposób są szybko zmiotane, dlatego też ich selektywny atak na najważniejsze komponenty komórki jest mało prawdopodobny. Ich droga dyfuzji od miejsca wygenerowania do miejsca reakcji w



układach biologicznych jest bardzo krótka i ich czas życia jest bardzo krótki (np. w porównaniu z anionem ponadtlenkowym $O_2^{\cdot-}$). To nie przemawia za tym, by same rodniki $\cdot OH$ miały istotnie w każdej sytuacji być najniebezpieczniejszym oksydantem *in vivo*, być może z wyjątkiem takich przypadków, jak działanie promieniowania jonizującego o stosunkowo dużej mocy dawki.

Jest oczywiste, że *in vitro*, w wodzie, fulerenole są skutecznymi zmiataczami rodników $\cdot OH$, choć jeśli przyjrzeć się stałym szybkości reakcji, można stwierdzić, że istnieją setki, jeśli nie tysiące prostych i złożonych związków organicznych i nieorganicznych, których reaktywność względem $\cdot OH$ jest tak samo wysoka lub wyższa, a spośród nich na pewno można by wybrać co najmniej dziesiątki lub setki związków o charakterze nietoksycznym. Powstaje zatem pytanie, na które nie znajdujemy przekonującej odpowiedzi w publikacjach Autora, dlaczego akurat fulerenole (dość skomplikowane w otrzymaniu i kosztowne) miałyby być szczególnie pożądanymi zmiataczami rodników OH w układach biologicznych.

Ale sądzę że najważniejsze pytanie jest następujące. Z prac Autora (m.in. z cytowanej powyżej pracy Krokosz i in. w *Radiat. Phys. Chem.* z bieżącego roku) wynika, że działanie ochronne, antyoksydacyjne, fulerenoli względem rodników $\cdot OH$ opiera się prawdopodobnie na prostej konkurencji między reakcją $\cdot OH$ z biomolekułami i z fulerenolem. Taka hipoteza ma istotne konsekwencje dla idei stosowania fulerenoli jako egzogenego antyoksydanta. W komórkach są obecne w wysokich stężeniach naturalne antyoksydanty, na przykład tiolu takie jak glutation, których stałe szybkości reakcji z $\cdot OH$ są również wysokie. Stężenie tioli w komórkach zwierzęcych jest rzędu 5 milimoli na litr. Powstaje zatem pytanie, jakie musiałyby być stężenie w komórkach czy ogólnie w tkankach podanego z zewnątrz fulerenolu, aby mógł on wywierać działanie antyoksydacyjne wyraźnie wyższe od tego, które wynika z naturalnej obecności endogennych antyoksydantów. Zakładając, że aktywność antyoksydacyjna fulerenolu jest podobna do aktywności tioli, takie stężenie fulerenolu musiałyby być rzędu 5 milimoli na litr, to jest mniej więcej 5 gramów na kilogram masy ciała. Czy jest w ogóle możliwe, i w jaki sposób, wprowadzenie do organizmu takich ilości fulerenoli, by były one obecne w tkankach w tak wysokich stężeniach? Zakładając że jest to możliwe, trzeba by zapytać, czy jest to racjonalne i bezpieczne. Z drugiej strony, zwłaszcza w publikacji przeglądowej (nr 1) Autor podaje przykłady prac, których wyniki wydają się wskazywać na antyoksydacyjne działanie fulerenoli podawanych w umiarkowanych (choć nie niskich) stężeniach. Jeśli tak jest, to czy mechanizmem ich działania w tych przypadkach było zmiatanie rodników? Szkoda, że te zagadnienia, istotne jak sądzę z punktu widzenia tezy o możliwości zastosowania fulerenoli w terapii, nie zostały szczegółowo przedyskutowane w rozprawie.



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Dr hab. inż. Piotr Ulański, prof. PŁ

Chciałbym stanowczo podkreślić, że **wymienione wyżej uwagi krytyczne mają wyłącznie charakter dyskusyjny i w żadnej mierze nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej.**

Podsumowanie

Jak wykazałem powyżej, praca doktorska pana mgr Jacka Grębowskiego dotyczy zagadnień bardzo istotnych z punktu widzenia poznawczego i praktycznego, a założone bardzo ambitne cele badawcze zostały w pełni zrealizowane. Praca stanowi poważny wkład do stanu wiedzy na temat fizykochemii pochodnych fulerenów i ich oddziaływań z układami biologicznymi. Rozprawa zawiera istotne elementy nowości naukowej, a jej elementy zostały zawarte w wielu publikacjach naukowych w liczących się międzynarodowych czasopismach naukowych. Analiza przedstawionej rozprawy, a także innych prac Autora oraz bogatej listy jego dorobku upoważniają mnie do stwierdzenia, że **pan mgr Jacek Grębowski wykazał, iż dysponuje szeroką wiedzą, posiada umiejętność planowania, prowadzenia i interpretacji wyników badań naukowych o wysokim stopniu złożoności, krytycznej oceny uzyskanych rezultatów, prowadzenia dyskusji naukowej i formułowania wniosków.**

Stwierdzam, że **przedstawiona rozprawa spełnia formalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim**, a w szczególności wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w paragrafie 5 *Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora* i **wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie pana mgr Jacka Grębowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Rozprawa doktorska pana mgr Jacka Grębowskiego zarówno swoim zakresem, poziomem, jak i rangą osiągniętych wyników wykracza poza poziom typowych prac doktorskich. Dlatego **zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie tej rozprawy.**

Dr hab. inż. Piotr Ulański