



KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ

ul. Świątecznego 4
60-781 Poznań

tel.: + 48 61 854 66 20
fax: + 48 61 854 66 20
e-mail: vkrajka@ump.edu.pl

Poznań, 30 listopada 2018

Recenzja
osiągnięcia naukowego i całokształtu dorobku naukowego
dr Anny Marii Barbasz
w postępowaniu o nadaniu stopnia doktora habilitowanego

Dane biograficzne

Dr n. biologicznych Anna Barbasz jest absolwentką Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Tytuł magistra uzyskała na podstawie pracy pt „Badanie wiązania wielkocząsteczkowego kininogenu do powierzchni komórek mysich makrofagów RAW 264. 7”, wykonanej w Zakładzie Biochemii Analitycznej. W tej samej jednostce wykonywała pracę doktorską. Stopień dr n. biologicznych uzyskała na podstawie pracy pt. „Adsorpcja i aktywacja układu produkcji kinin na powierzchni monocytów i makrofagów”. Promotorem obydwu prac był prof. dr hab. Andrzej Kozik. Po uzyskaniu stopnia doktora w roku 2009 Kandydatka została zatrudniona na etacie adiunkta w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie, gdzie pracuje do chwili obecnej.

Ocena osiągnięcia naukowego

Jako podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego dr Anna Barbasz przedstawiła osiągnięcie naukowe pt: „Biochemiczne aspekty cytotoksyczności nanocząstek srebra i złota”.

Na „Osiągnięcie” składa się cykl siedmiu publikacji oryginalnych, opublikowanych w latach 2015-2018, prezentujących wyniki oceny cytotoksyczności nanocząstek srebra i złota oraz ich prekursorów w dwóch modelach: ludzkich komórkach nowotworowych oraz kalusie pszenicy. Prace zostały opublikowane w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu. Ich sumarycznym współczynnik oddziaływania IF wynosi 14, 556.

Łącznie wszystkie prace przedstawione jako osiągnięcie były cytowane 40 razy. W sześciu artykułach kandydatka jest pierwszym autorem, a w trzech korespondencyjnym. Swoją wkład w powstanie tych prac ocenia na 30-75%. Potwierdzają to w swoich deklaracjach współautorzy, choć wydaje się, że przynajmniej w pracach A1, A2 i A5 wkład dwóch pierwszych autorów jest równo cenny.

Prezentowany cykl prac będący osiągnięciem naukowym jest zasadniczo spójny tematycznie i koncentruje się na ocenie cytotoksyczności różnych form nanocząstek srebra (AgNPs) i ich prekursorów oraz niektórych parametrów, które mogą być powiązane z efektem cytotoksycznym. Jedna praca dotyczy nanocząstek złota.

Nie podjęto próby bliższego wyjaśnienia mechanizmu cytotoksyczności a jej ocenę, z jednym wyjątkiem, oparto wyłącznie na teście MTT.

Jako modele badawcze zastosowano dwie linie komórkowe wywodzące się z histiocytowego chłoniaka U-937 i ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej HL-60. Obydwie linie pod wpływem odpowiednich stymulatorów takich jak octan mirystynianu forbolu (PMA), a także związki polarne takie jak dimetylosulfotlenek (DMSO) różnicują się do komórek, które wykazują fenotypowe i funkcjonalnie podobieństwo do makrofagów i/lub granulocytów i monocytów.

Dr Barbasz w swoich badaniach wykorzystwała PMA i DMSO do różnicowania w kierunku makrofagów, granulocytów i monocytów. W przedstawionej pracy [A1] nie podano jednak informacji na temat weryfikacji różnicowania i żywotności komórek po stymulacji.

Ocena cytotoksyczności została przeprowadzona jak wyżej wspomniano w odniesieniu do wszystkich testowanych form nanocząsteczek i ich prekursorów z wykorzystaniem bromku 3- (4,5-dimetylotiazol-2-ilo) -2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT) wg nieco zmodyfikowanego protokołu. Istnieją dane wskazujące, że nanocząstki srebra mogą absorbować sól tetrazolową, modyfikować aktywność katalityczną dehydrogenaz i wpływać na pomiar spektrofotometryczny [Riaz-Ahmed et al. 2017].

Sugerowane są różne rozwiązania, tego problemu, Wirowanie przed odczytem zastosowane przez Habilitantkę mogło częściowo te problemy wyeliminować. Tym niemniej interpretacja prezentowanych wyników, wymaga dużej ostrożności, a w przyszłości ew. weryfikacji.

Porównując oddziaływania, różnych pod względem prekursora i reduktora użytego do syntezy, nanoczątek srebra na przeżycie komórek nie zróżnicowanych i zróżnicowanych Habilitantka stwierdziła większe wskaźniki przeżycia w przypadku komórek zróżnicowanych. AgNPs zwiększały także w większym stopniu w komórkach niezróżnicowanych poziom tlenu azotu oceniany na podstawie pomiaru stężenia azotynów i poziomu GSH co ew. może świadczyć o aktywacji syntazy tlenu azotu i zwiększeniu ochrony antyoksydacyjnej.

Porównanie cytotoksyczności nanocząstek srebra i ich prekursorów wskazało na mniejszą cytotoksyczność tych pierwszych, zarówno w promonocytach jak i promielocytach i wywodzących się z nich monocytach, makrofagach i granulocytach na co wskazywały wartości LD_{50} . Nie jest jasne dlaczego Habilitantka zdecydowała się na obliczanie tego właśnie parametru, który odnosi się zasadniczo do badań in vivo z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Bardziej adekwatna do badań komórkowych byłaby wartość IC_{50} . Ponadto w przypadku prekursorów stwierdzono większy poziom azotynów mierzonych odczynnikiem Griessa w porównaniu z nanocząsteczkami srebra [A2]. Należy jednak zauważyć, że i ta metoda może prowadzić do nieprawidłowej oceny ponieważ nanocząstki srebra zakłócają odczyt spektrofotometryczny. Tak więc niższe poziomy azotynów po traktowaniu komórek nanocząsteczkami srebra mogą wynikać z interferencji z odczynnikiem. Ta sama uwaga może dotyczyć poziomów azotynów oznaczanych po traktowaniu komórek nanocząsteczkami złota [A5]. Można przyjąć, że Habilitantka modyfikując protokół oznaczenia w pewnym stopniu zapobiegła temu efektowi.

W kolejnym etapie [praca A3] oceniano, jaki wpływ na cytotoksyczność niestymulowanych komórek obydwu linii komórkowych mają takie parametry jak czynniki stabilizujące zaadsorbowane na powierzchni nanocząstek i ich ładunek powierzchniowy.

W odniesieniu do oceny tych efektów wykorzystano najszerszy zestaw analiz, co w większym stopniu niż w pozostałych pracach uzasadnia tytuł „Osiągnięcia”. Poza testem MTT oraz oceną poziomu azotynów, oznaczono poziom LDH w medium hodowlanym, aktywność SOD oraz całkowitą aktywność antyoksydacyjną (test DPPH), peroksydację lipidów mierzoną poziomem TBARS oraz prozapalnej interleukiny IL-6. Uzyskane wyniki wskazywały na mniejszą cytotoksyczność nanocząstek dodatnio naładowanych w porównaniu z nanocząsteczkami obdarzonych ładunkiem ujemnym, co potwierdziła poza testem MTT, zwiększona aktywność LDH w medium hodowlanym. Wzrost poziomu IL-6 mógł dowodzić, że większa toksyczność nanocząstek otrzymanych przy użyciu borowodorku sodu (ładunek ujemny) mogła wiązać się z ich działaniem prozapalnym (wzrost IL-6). Większą cytotoksyczność wykazywały także nanocząstki srebra funkcjonalizowane cysteiną o zmiennym w zależności od pH ładunku [A4]. Te obserwacje dostarczają cennych informacji na temat powiązania sposobu przygotowywania nanocząstek srebra z ich efektem cytotoksycznym.

W dwóch ostatnich pracach cyklu składającego się na „Osiągnięcie” przedstawiono wyniki badań dotyczących oddziaływania AgNPs na komórki roślinne na przykładzie kalusa pszenicy. Wykorzystując stężenia AgNPs oraz jonów srebra podobne do tych, jakie stosowano w ludzkich komórkach nowotworowych oceniano morfologię komórek roślinnych, marker stresu osmotycznego prolinę, peroksydację lipidów oraz aktywność enzymów anty-oksydacyjnych.

Uzyskane wyniki wskazywały na podobne do komórek ludzkich oddziaływanie AgNPs i jonów srebra w komórkach roślinnych i jednocześnie sugerowały, że ich podłożem może być stres oksydacyjny.

Porównanie komórek kalusa podatnych i nie podatnych na stres nie wykazało między nimi istotnych różnic w ocenianych parametrach. Jednak negatywnie naładowane nanocząstki srebra były znacząco bardziej toksyczne dla komórek podatnych na stres. Tym samym Kandydatka udowodniła, że ładunek powierzchniowy ma istotne znaczenie w cytotoksycznym działaniu AgNPs zarówno w odniesieniu do ludzkich komórek nowotworowych jak i prawidłowych roślinnych.

Podsumowanie osiągnięcia

Mimo szerokiego stosowania aktywność biologiczna nanocząstek srebra i złota ciągle jest poznawana. Wiele czynników związanych z przygotowaniem NPs może mieć wpływ na ich cytotoksyczność. Uwzględnienie różnych aspektów przygotowania AgNPs oraz ich właściwości takich jak ładunek powierzchniowy w ocenie cytotoksyczności w modelach ludzkich komórek nowotworowych, w tym poddanych procesowi różnicowania oraz komórkach roślinnych to niewątpliwie największy atut prac przedstawionych, jako „Osiągnięcie”. Uzyskane dane przyczyniają się do poszerzenia wiedzy o elementach, które mogą mieć wpływ na efekt działania nanocząstek srebra i złota i stanowią indywidualny wkład dr Anny Barbasz w rozwój badań w tej dziedzinie. Wymienione w tytule aspekty biochemiczne wymagają jednak pogłębionej analizy i ostrożnej interpretacji. W tej pogłębionej analizie warto byłoby też uwzględnić komórki prawidłowe. Jest to związane z odmienną rolą czynnika Nrf2 w ekspresji genów kodujących enzymy anty-oksydacyjne w komórkach prawidłowych i rakowych.

Ocena dorobku naukowego

Na ogólny dorobek naukowy dr Barbasz składa się 18 artykułów oryginalnych o dosyć zróżnicowanej tematyce oraz jednej pracy z zakresu psychologii. Siedem z nich zostało włączonych w skład osiągnięcia. Część z nich nawiązuje do problematyki rozprawy doktorskiej, osoczowego układu kininogenezy, będącego obszarem zainteresowań naukowych Jej promotora. Te prace [B1, B2, B4, C5, C6, C7] opublikowane w prestiżowych czasopismach (m.in. *Biological Chemistry*), doczekały się największej liczby cytowań, co związane jest nie tylko z ich jakością, ale czasem, jaki upłynął od ich opublikowania. Już w ramach własnej ścieżki naukowej dr Barbasz analizowała skład związków biologicznie czynnych szczególnie anty-oksydantów w materiale roślinnym, oceniała ochronne działanie kwasu askorbinowego przeciw toksycznemu działaniu kadmu. Wykorzystała też modele badawcze zastosowane w pracach wskazanych, jako „Osiągnięcie”, czyli linie komórkowe U-937 i HL-60 i kalusa pszenicy. W odniesieniu do tego ostatniego badano wzajemne powiązanie pomiędzy poziomem poliamin, osmoprotektantów i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na indukcję stresu osmotycznego. Ta praca należy do najczęściej cytowanych w dorobku dr Barbasz. W przedłożonym do oceny zestawie prac brak jest artykułów poglądowych. Są natomiast pozycje o charakterze popularyzatorskim [C8] zarówno z zakresu nauki jak i zainteresowań pozanaukowych. Wyniki swoich badań Kandydatka prezentowała na konferencjach krajowych, bądź międzynarodowych organizowanych w Polsce. Wśród wymienionych w dorobku 29 komunikatów zjazdowych są jednak i 4 prezentowane zagranicą.

Dr Barbasz brała udział w realizacji 6 projektów badawczych w tym jednym w ramach akcji COST. Nie kierowała jednak samodzielnie żadnym projektem badawczym.

Odbyła jeden staż krajowy (Instytut Fizjologii Roślin PAN). Jednak większość Jej prac była wykonywana we współpracy z instytucjami naukowymi w kraju, ale także zagranicą, co świadczy o umiejętności nawiązywania kontaktów naukowych.

O tym, że jest znana w środowisku specjalistów szczególnie z obszaru nanocząstek świadczy również powierzenie Jej recenzji artykułów składanych do redakcji czasopism z tej dziedziny.

Ocena dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego

Dr Barbasz od momentu zatrudnienia w Uniwersytecie Pedagogicznym prowadziła i prowadzi nadal zajęcia w formie ćwiczeń i wykładów dla kilku kierunków studiów i szerokiego zakresu przedmiotów takich jak Biochemia, Analiza instrumentalna, Technologia informacyjna, Hodowla komórek i tkanek, Toksykologia komórkowa, Techniki mikroskopowe i fluorescencyjne, Wybrane zagadnienia z Chemii medycznej, Molekularne podstawy enzymologii. W odniesieniu do niektórych opracowała program i była inicjatorką ich wprowadzenia do programu studiów.

Sprawowała opiekę nad studentami wykonującymi prace licencjackie. Była promotorem 15 prac magisterskich, a recenzentem 7.

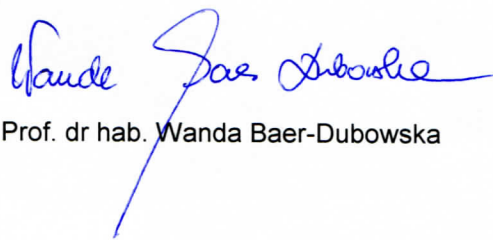
Bierze aktywny udział w pracach organizacyjnych na rzecz uczelni. Jest m.in. członkiem komisji rekrutacyjnej i angażuje się w działania promocyjne i popularyzujące naukę takie jak Festiwal Nauki i Sztuki Festiwal i pokazy dla uczniów szkół średnich i podstawowych. Brała udział w organizacji małopolskiego Festiwalu Innowacji (2014)

Ocena autoreferatu

Literatura przedmiotu dotyczącego „Osiągnięcia” jest bogata i obejmuje opublikowane w ostatnich latach bardzo obszerne artykuły pogładowe. Kandydatka w swoim autoreferacie w większości przypadków odwołuje się do pozycji sprzed 6 lat lub jeszcze wcześniejszych. Z tego być może powodu pomija problemy analityczne związane z oceną cytotoksyczności nanocząstek. Wiele sformułowań w autoreferacie nie jest uzasadnione przedstawionymi wynikami i prowadzi do zbyt daleko idących wniosków np. trudno na podstawie testu MTT mówić o „zmniejszeniu mitochondrialnych funkcji komórek”. Ta sama uwaga dotyczy schematu przedstawiającego mechanizm działania nanocząstek bazującego tylko na jednej własnej pracy oraz wniosków końcowych – podsumowania najważniejszych osiągnięć.

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, dorobek naukowy dr Anny Barbasz spełnia podstawowe wymogi stawiane kandydatom w postępowaniu habilitacyjnym w dziedzinie nauk biologicznych, określone ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr65 poz.595 ze zm.). Uzyskanie pełnej samodzielności naukowej powinno przyczynić się do rozwinięcia Jej własnych obszarów zainteresowań z bardziej pogłębioną analizą badanych zjawisk. Wnoszę, zatem do Wysockiej Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie dr Anny Barbasz do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.



Prof. dr hab. Wanda Baer-Dubowska