



prof. dr hab. Michał Dadlez  
Zakład Biofizyki, IBB PAN  
Pawińskiego 5A  
02-106 Warszawa

Warszawa 19.07.2017

Ocena osiągnięcia naukowego i dorobku naukowego oraz działalności organizacyjnej i dydaktycznej dr Anny Bodzoń-Kułąkowskiej w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia

### 1. Sylwetka kandydata

Dr Anna Bodzoń Kułąkowska ukończyła w roku 2004 studia magisterskie na kierunku chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Prace magisterską wykonała pod kierunkiem prof. Jerzego Silberringa. W 2009 roku uzyskała w tej samej jednostce stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii na podstawie wyróżnionej pracy doktorskiej pt. „Analiza proteomu hodowli komórkowych astrocytów i neuronów w uzależnieniu od morfiny”, której promotorem był także prof. Jerzy Silberring. Kandydatka krótko pracowała na stanowisku asystenta na wydziale Chemii UJ, a potem na Wydziale Inżynierii Materiałowej w Katedrze Biochemii i Neurobiologii Akademii Górniczo-Hutniczej, uzyskując promocję na stanowisko adiunkta w roku 2010. W tych latach prowadziła zajęcia seminaryjne i ćwiczenia dla studentów UJ, kontynuując pracę dydaktyczną na AGH.

### 2. Ocena osiągnięcia naukowego

Oceniane osiągnięcie naukowe pt. „Zastosowanie spektrometrii mas typu DESI do obrazowania materiału biologicznego” przedstawione zostało w cyklu sześciu artykułów naukowych (oznaczonych symbolami B1—B6). Wszystkie te artykuły pochodzą z ostatnich trzech lat (2014-2016), 5 z nich opublikowano w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) jeden stanowi rozdział w monografii specjalistycznej. Ich

sumaryczny IF wynosi 18.7 (średnio 3.7 na pracę — od 1.9 do 9.3). Listę tę powiększa jeszcze jedno ostatnio opublikowana praca dodana zgodnie z informacją w liście wystosowanym 16.05, zwiększając sumaryczny IF prac proponowanych jako osiągnięcie naukowe do 23.5 Liczby cytowań nie podano, ale liczba taka odnosząca się do prac z okresu 2014-2016 nie byłaby i tak miarodajna. Artykuły te są kilkuautorские (2-8 autorów), jednak w nich wszystkich habilitantka jest autorem pierwszym. Autorem korespondencyjnym w sześciu jest p. dr hab. Piotr Suder, a w jednej prof. Jerzy Silberring. Autorzy korespondencyjni swój wkład określają jako: „optymalizacja schematu analiz i korekta tekstu”- B1, „dyskusja dotycząca koncepcji”, „konsultacje” – B2, „ustawienie wstępnych parametrów pomiaru” – B3, „kontrola pracy spektrometru” – B4, „przygotowaniu skrawków materiału przy pomocy mikrotomu” – B5, „opracowanie części podrozdziałów” – B6. Prowadzi to do wniosku, że wkład Habilitantki znacznie wykracza poza rolę wykonawczą i jej ocena wkładu własnego w zakresie 65-80% jest zgodna z oświadczeniami współautorów. Jej udział w powstawaniu prac był kluczowy i ściśle zdefiniowany. Główną metodą badawczą stosowaną i ulepszaną przez Habilitantkę jest desorpcyjna jonizacja przez elektrorozpylanie sprzężona ze spektrometrią mas, którą w skrócie myślowym Habilitantka nazwała w tytule swego osiągnięcia „spektrometrią mas typu DESI”, podczas gdy jest to jedynie jeden z etapów pomiaru mas. Ten sposób jonizacji cząsteczek, poprzedzający pomiar mas, jest rozwijany od wielu lat przez kilka zespołów i powoli (od roku 2006) zyskuje zainteresowanie szerszego grona użytkowników. Zalety tego sposobu jonizacji to praca w ciśnieniu atmosferycznym i brak konieczności modyfikowania preparatu przed analizą. Zaletą jest też możliwość jej połączenia z obrazowaniem ilościowym danej masy cząsteczkowej na powierzchni preparatu, pozwalając mapować dystrybucję danej cząsteczki np. w tkance.

Ogólnie, prace prowadzone w ramach osiągnięcia naukowego można zakwalifikować do grupy prac metodycznych usiłujących zoptymalizować i zroutynizować metodykę analiz DESI-MS tak by wzbudzić zainteresowanie innych grup z dziedziny nauk biomedycznych. Osiągnięciem jest tu zatem wykazanie możliwości prowadzenie analiz DESI-MS wprost w materiale biologicznym, hodowlach komórkowych, biomateriałach, tkankach i rozszerzenie tej analizy z peptydów na lipidy, co znacznie zwiększa liczbę grup badawczych, które mogą zainteresować się zastosowaniem metod DESI-MS. Wyniki biologiczne, uzyskane w toku prac optymalizacyjnych i prezentowane w publikacjach nie są w rozprawie omawiane, autorka skupia się na osiągnięciach metodycznych.

Metody obrazowania sprzężone ze spektrometrią mas szybko zdobywają popularność. Wykorzystują one różne metody jonizacji, takie jak MALDI czy SIMS. Metoda DESI powoli

zdobywa zwolenników i wysiłki optymalizacji jej procedur są potrzebne by można było należycie ocenić jej przydatność w badaniach w biomedycynie, a być może w aplikacjach a znaczeniu medycznym. Prace Autorki przyniosły jej rozpoznawalność wśród grup zajmujących się propagowaniem zastosowań techniki DESI, o czym świadczy opublikowanie pracy przeglądowej omawiającej różne techniki obrazowania MS w prestiżowym czasopiśmie *Mass Spectrometry Reviews* (IF 9.3).

Publikacja B1, pomyślana jako podręcznik DESI dla początkujących, zawiera opis eksperymentów optymalizacyjnych przeprowadzonych z użyciem próbek biologicznych (tkanka wątroby szczura) i niebiologicznych. Technika wymaga żmudnej optymalizacji szeregu parametrów głównie układu jonizacji, być może dlatego zainteresowanie tą techniką wzrasta powoli. Specyfika tego typu jonizacji i geometria źródła powoduje silną zależność od tych parametrów, do tego stopnia, że jak piszą autorzy może istnieć konieczność ich optymalizacji dla każdego typu próbek. Problem sprzężeń między parametrami, gdy zmiana wartości jednego z parametrów zmienia też położenie optymalnych wartości innych parametrów, nie został poruszony, pozostawiając czytelnika w niepewności czy należy brać tę trudność pod uwagę podczas optymalizacji. Autorzy zaznaczają jedynie, że kolejność, w jakiej parametry są optymalizowane może mieć znaczenie, co wskazuje na istnienie takich sprzężeń. Wynikiem pracy jest szereg wskazówek i zestaw wartości optymalnych parametrów dla niebiologicznej próbki kontrolnej i dla próbki tkanki, zestawy te różnią się od siebie. Autorzy zaznaczają jednocześnie, że dla innych systemów i typów próbek optymalizacja i tak musi być niezależnie przeprowadzona. Oświadczenie Habilitantki o jej wkładzie w wykonanie pracy jest zgodne z oświadczeniami współautorów.

Powyższy schemat analityczny powtarza się w pracy B2, tyle że obiektem analizy są rozdziały związków niskocząsteczkowych w chromatografii cienkowarstwowej. Wskazane są jednak tylko parametry wyjściowe do procesu optymalizacji, a konkluzja pracy to stwierdzenie, że DESI może znaleźć zastosowanie jako bezpośredni specyficzny detektor rozdziałów w tego typu chromatografii.

Schemat monotonicznie powtarza się w pracy B3, której celem jest wykazanie przydatności metody jonizacji DESI do analiz wykonywanych wprost na szalkach stosowanych do hodowli komórkowych. Testowano wpływ rodzaju materiału użytego do produkcji szalek, sposobu odsolenia i dehydratacji preparatu oraz efekt dodawania surfaktantów. Pokazano wyniki optymalizacji dla czterech kroków optymalizacyjnych, wykazując obecność sygnałów związków lipidowych w zakresie  $m/z$  725-950 i określono tożsamość 6 z nich. Interpretacji wyników uzyskanych w innych zakresach  $m/z$  nie

przedstawiono. W konkluzji wskazano ogólne zalecenia przystosowania hodowli komórkowych do tego typu analizy.

Stwierdzenie możliwości detekcji sygnałów lipidowych było eksplorowane dalej, w następnej publikacji B4 w modelowym układzie stresu oksydacyjnego, o którym wiadomo, że powoduje zmiany peroksydację lipidów, które mogą się uzewnętrznić zmianami w lipidomie. Wykonano mapowanie mas w hodowli kontrolnej i poddanej stresowi oksydacyjnemu, zidentyfikowano z zastosowaniem fragmentacji kolizyjnej szereg sygnałów pochodzących od związków lipidowych. Wskazano grupę pięciu związków, których zmiany ilościowe można wykryć stosując detekcję DESI. Podkreślono zalety metody tj. brak konieczności modyfikowania materiału przed analizą i relatywnie prosty protokół preparatyki, ale też i ograniczenia takie jak rozdzielczość na poziomie 100  $\mu\text{m}$ . Znaczenia biologicznego wykrytych zmian nie interpretowano. Dopiero następna praca, dołączona w toku postępowania habilitacyjnego (Bodzoń-Kułakowska et al. (2017) BBA, 686), zawiera bardziej rozbudowaną prezentację wyników mapowania MS tkanki mózgowej szczurów laboratoryjnych poddanych działaniu morfiny, kokainy i amfetaminy z uwzględnieniem interpretacji biologicznej zauważonych zmian.

Podobnie mapowano lipidy w innego typu materiale biologicznym (praca B5), mianowicie pochodzących z pobranego od pacjenta implantu naczyniowego pozwalającego na badanie styku między tkanką pacjenta a materiałem implantu. Podstawa analizy były skrawki mikrotomowe. Mapowano obecność cholesterolu, fosfocholiny i sfingozylfosfocholiny, zidentyfikowanych na podstawie analizy MS/MS i wiedzy literaturowej, na przekroju naczynia poddanego wszczepieniu implantu.

Wiodący wkład habilitantki w tych publikacjach jest zgodny z oświadczeniami wszystkich współautorów. Ostatnie dwie prace B4,B5, choć najbardziej interesujące, są bardzo krótkie, prezentacja rezultatów nie zajmuje więcej jak 5-6 krótkich akapitów.

Powyższe prace dały podstawę do napisania i opublikowania pracy przeglądowej omawiającej różne metody obrazowania wykorzystujące spektrometrię mas (praca B6), porównując różne metody jonizacji używane w technice obrazowania w dwuwymiarowego, MALDI, SIMS, DESI, etc. Habilitantka określa swój wkład jako dominujący, co zgadza się z oświadczeniem współautora, określającym swój wkład jako nie wyższy niż 20%.

Zestaw prac cechuje wyraźna specjalizacja zmierzająca do rozpowszechnienia techniki jonizacji DESI jako narzędzia obrazowania MS. W każdej z prac rolę Habilitantki jest optymalizacja warunków analizy DESI i wykazanie obecności pożądaných sygnałów w widmach. Osiągnięcie należy zatem raczej do kategorii ulepszeń technicznych niż odkryć z

dziedziny nauk podstawowych, stawiając do dyspozycji grup badawczych w dziedziny nauk biologicznych nowe narzędzie analityczne o nie do końca rozpoznany potencjał. Prace ewoluują z czasem w stronę coraz bardziej zaawansowanych zastosowań, jednak na ocenę wartości naukowej uzyskiwanych rezultatów trzeba jeszcze poczekać i może to być związane z przełamaniami pewnych barier technologicznych, takich jak rozdzielczość metody na poziomie 0.1 mm.

Podsumowując, zestaw prac Habilitantki stanowi osiągnięcie spełniające warunki określone w odpowiedniej ustawie.

### 3. Ocena pozostałego dorobku naukowego

Przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitantka była współautorem 8 artykułów opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), w tym trzech prac przeglądowych i pięciu rozdziałów w wydawnictwach monograficznych. Wśród czasopism z bazy JCR, dwa mają  $4 < \text{IF} < 10$ , zaś jedna praca przeglądowa ma IF 10,9. Liczby cytowań dla tego zestawu publikacji nie podano. Główną tematyką badawczą pierwszej fazy badań było stosowanie metod proteomicznych do badania molekularnego podłoża efektu podawania morfiny na modelowe układy biologiczne. W większości wypadków wkład Habilitantki jest wysoki, powyżej 50%. Wyniki tych badań stanowiły podstawę Jej rozprawy doktorskiej.

Po doktoracie, oprócz sześciu artykułów zaliczanych do osiągnięcia naukowego, Habilitantka opublikowała 10 prac eksperymentalnych, w tym 8 w czasopismach z bazy JCR (IF między 1 a 5). Oprócz pracy nr 9 wkład Habilitantki w powstanie tych publikacji oscyluje w okolicy 10% i obejmuje pomoc na różnych etapach powstawania tych publikacji. Habilitantka w tym okresie dużo pracy poświęca pisaniu rozdziałów do monografii. Powstaje ich w tym okresie 14. W tym okresie, dr Anna Bodzoń-Kuślakowska była zaproszona do wygłoszenia prezentacji ustnych na 2 krajowych konferencjach oraz brała aktywny udział w 23 konferencjach, prezentując swoje rezultaty bądź w formie plakatu bądź wykładu (7 wykładów).

Liczbowe podsumowanie całej działalności publikacyjnej Habilitantki: Sumaryczny impact factor według listy JCR wg roku opublikowania: 77; Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: 290, (bez autocytań) 270; indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 8. Parametry te mieszczą się w standardzie dla tego etapu kariery naukowej.

Habilitantka była członkiem komitetu organizacyjnego dwu konferencji, recenzentem Europejskiego Funduszu Społecznego. Recenzowała też 7 manuskryptów, 6 prac magisterskich i 6 inżynierskich. Ponadto, dr Anna Bodzoń-Kułakowska była kierownikiem dwóch projektów — Iuventus Plus (MNiSzW) i POMOST (FNP), wykonawcą w czterech innych projektach. 5-krotnie odbywała staże zagraniczne

#### 4. Ocena dorobku organizacyjnego i dydaktycznego

Dorobek dydaktyczny p. dr Anny Bodzoń-Kułakowskiej jest poważny, uhonorowany trzykrotnie nagrodami zespołowymi AGH. Jest on też właściwy dla osoby, której kariera naukowa jest związana z uczelniami. Habilitantka w ramach zajęć ze studentami UJ opracowała, przygotowała, prowadziła trzy kursy związane ze spektrometrią w ogólności a spektrometrią mas w szczególności. Na potrzeby AGH zorganizowała pięć kursów laboratoryjnych i dwa wykłady, na uwagę zasługuje rozpiętość tematyczna tych zajęć: od „Biochemii” do „Wybranych zagadnień z neurobiologii”. Prowadziła też zajęcia popularyzatorskie na poziomie przedszkolnym. Była promotorem 6 prac magisterskich i 8 prac inżynierskich. Brała udział w pracach komitetów organizacyjnych 7 krajowych konferencji. Działalność dydaktyczną i popularyzatorską Habilitantki należy ocenić wysoko.

#### 5. Wniosek końcowy

W mojej opinii, osiągnięcie naukowe jak i pozostały dorobek naukowy, a także dydaktyczny i organizacyjny dr Anny Bodzoń-Kułakowskiej spełniają kryteria art. 16 ust. 4 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. Zwracam się więc do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.



prof. dr hab. Michał Dadlez