

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: Anna Bodzoń-Kuśakowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne: z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2004 Dyplom magistra chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.
Tytuł pracy magisterskiej: „*Analysis of the proteome in morphine-dependent astrocytes*”.
Promotor: prof. dr hab. Jerzy Silberring

2009 Dyplom doktora nauk chemicznych w zakresie chemii, specjalność: biochemia, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.
Tytuł pracy dyplomowej: „*Analiza proteomu hodowli komórkowych astrocytów i neuronów w uzależnieniu od morfiny*”.
Promotor: prof. dr hab. Jerzy Silberring.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- **Asystent**

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, Zakład Neurobiochemii
etat stały: VI.2009 – II.2010,

- **Asystent**

AGH, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biochemii i Neurobiologii
etat tymczasowy: XII.2009 – XII.2010,

- **Adiunkt**

AGH, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biochemii i Neurobiologii
etat tymczasowy: XII.2010 – XII.2012,
etat stały: XII.2012 – obecnie.

4. Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki:

I. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Zastosowanie spektrometrii mas typu DESI do obrazowania materiału biologicznego

B) Publikacje lub inne prace będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego:

1. **Bodzon-Kulakowska A**, Drabik A, Ner J, Kotlinska JH, Suder P. "Desorption Electrospray Ionisation (DESI) for Beginners - How to Adjust Settings for Tissue Imaging.", *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 28(1), p.1–9. (2014), **(IF 2,25)**

Mój wkład w przygotowanie pracy był dominujący (ok. **70%**). Obejmował on przygotowanie materiału do analizy, wykonanie pomiarów DESI, interpretację i dyskusję otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu do druku oraz korespondencję z edytorem i odpowiedź na recenzje.

2. **Bodzon-Kulakowska A**, Mielczarek P, Suder P, Silberring J. "Drug Analysis by TLC-DESI MS", w monografii pt.: „Planar Chromatography-Mass Spectrometry”. Redakcja: Teresa Kowalska, Mieczysław Sajewicz, Joseph Sherma. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York 2015, ISBN 978-1-4987-0588-2.

Mój wkład w przygotowanie pracy był dominujący (ok. **70%**). Obejmował on wykonanie pomiarów DESI, interpretację otrzymanych wyników, oraz przygotowanie tekstu rozdziału do druku.

3. **Bodzon-Kulakowska A**, Drabik A, Marszałek M, Kotlinska JH, and Suder P. "DESI Analysis of Mammalian Cell Cultures—Sample Preparation and Method Optimisation." *Journal of Mass Spectrometry: JMS* 49(7), p. 613–21. (2014), **(IF 2,38)**

Mój wkład w przygotowanie pracy był dominujący (ok. **70%**). Obejmował on prowadzenie hodowli komórkowych, przygotowanie materiału do analizy, wykonanie pomiarów DESI, interpretację i dyskusję otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu do druku oraz korespondencję z edytorem i odpowiedź na recenzje.

4. **Bodzon-Kulakowska A**, Cichon T, Golec A, Drabik A, Ner J, and Suder P. "DESI-MS as a Tool for Direct Lipid Analysis in Cultured Cells." *Cytotechnology*, 67(6), p.1086-91, (2014), **(IF 1,86)**

Mój wkład w przygotowanie pracy był dominujący (ok. **70%**). Obejmował on pomoc magistrantom w hodowlach komórkowych i w przygotowaniu materiału do analizy, wykonanie pomiarów DESI, interpretację i dyskusję otrzymanych wyników, oraz przygotowanie manuskryptu do druku, korespondencję z edytorem i odpowiedź na recenzje.

5. **Bodzon-Kulakowska A**, Drabik A, Mystkowska J, Chlabicz M, Gacko M, Dabrowski JR, Silberring J, Suder P. „Desorption electrospray ionization-based imaging of interaction between vascular graft and human body". *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 104(1), p. 192-6, (2016) **(IF 2,88)**.

Mój wkład w przygotowanie pracy był dominujący (ok. **65%**). Obejmował on przygotowanie tkanki do analizy, wykonanie pomiarów DESI, interpretację i dyskusję otrzymanych wyników, przygotowanie odpowiedniej części manuskryptu do druku, oraz korespondencję z edytorem i odpowiedź na recenzje.

6. **Bodzon-Kulakowska A, Suder P.** „Imaging mass spectrometry: instrumentation, applications and combination with other visualization techniques.“ *Mass Spectrometry Reviews*, 35(1), p. 147-69, (2016) **(IF 9,35)**

Mój wkład w przygotowanie pracy był dominujący (ok. **80%**). Obejmował on napisanie znacznej części tekstu artykułu przeglądowego, oraz korespondencję z edytorem i odpowiedź na recenzje.

Sumaryczny impact factor: **18.72**

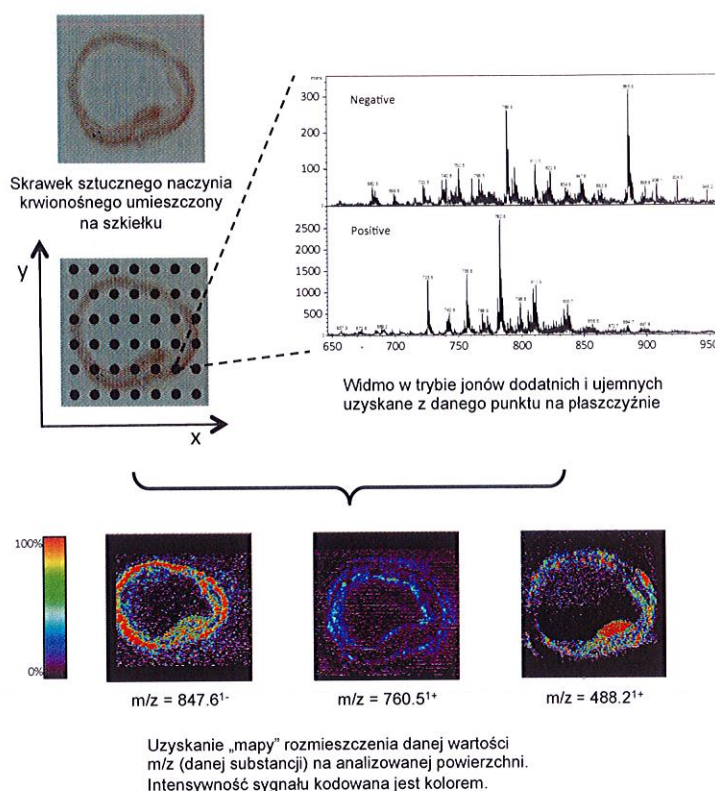
C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Tematem cyklu publikacji składających się na omawiane osiągnięcie naukowe jest zastosowanie metod obrazowania za pomocą spektrometrii mas do badania zmian molekularnych w obrębie tkanek i komórek w hodowlach *in vitro*. Obrazowanie za pomocą spektrometrii mas łączy ze sobą dwie istotne cechy. Pierwsza, to możliwość uzyskania widma masowego z określonego punktu na powierzchni. Widmo to daje nam informację o masach cząsteczek znajdujących się w analizowanym punkcie. Intensywność piku uzyskanego dla danej wartości m/z pozwala również w przybliżeniu ocenić ilość danej substancji w określonym miejscu. Dysponując opcją tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) można także dokonać pełnej identyfikacji wykrytych związków. Drugą cechą jest konstrukcja źródła jonów, która umożliwia ruch badanej powierzchni w płaszczyźnie x, y co pozwala na przeprowadzenie analizy dla siatki punktów regularnie pokrywających badaną powierzchnię. Połączenie tych dwóch cech pozwala na zobrazowanie rozmieszczenia każdej substancji podlegającej jonizacji na analizowanej powierzchni. Uzyskany zbiór danych umożliwia wykreślenie „mapy” intensywności piku charakterystycznego dla danej substancji w każdym punkcie na badanej płaszczyźnie (rys.1)¹. Tego typu techniki umożliwiają analizę zmian w ilości i dystrybucji różnego typu związków i tym samym stanowią znaczące uzupełnienie stosowanych do tej pory metod globalnej analizy (takich, jak na przykład metody proteomiczne), badających globalne zmiany w ekspresji makromolekuł. Dodatkowo, zachowanie informacji przestrzennej pozwala na precyzyjną lokalizację zachodzących zmian. Jest to niemożliwe w przypadku tradycyjnych technik analizy, gdzie homogenizacja próbki, z reguły poprzedzająca wszystkie kroki prowadzące do identyfikacji substancji, powoduje utratę informacji przestrzennej.

W pracach stanowiących podstawę habilitacji pokazuję praktyczne aspekty zastosowania jednej z metod obrazowania za pomocą spektrometrii mas - techniki DESI MS (ang. desorption electrospray ionisation mass spectrometry) - do analizy powierzchni, a następnie przedstawiam jej zastosowanie w analizie stresu oksydacyjnego w komórkach, w

¹ Chughtai, K., & Heeren, R. M. A. (2010). Mass Spectrometric Imaging for Biomedical Tissue Analysis, *110*(5), 3237–3277.

analizie substancji rozdzielonych na płytkach TLC i w identyfikacji molekularnych zmian, jakie towarzyszą wszczępieniu sztucznego naczynia krwionośnego do organizmu. Natomiast w artykule przeglądowym przedstawiam aktualny stan wiedzy dotyczący technik obrazowania za pomocą spektrometrii mas i możliwości ich połączenia z innymi metodami obrazowania tkanek. Mam nadzieję, że tak szybki rozwój technik obrazowania za pomocą spektrometrii mas pozwoli nam uzyskać kolejne narzędzie do poznawania fascynującej roli różnych molekuł w organizmach żywych.

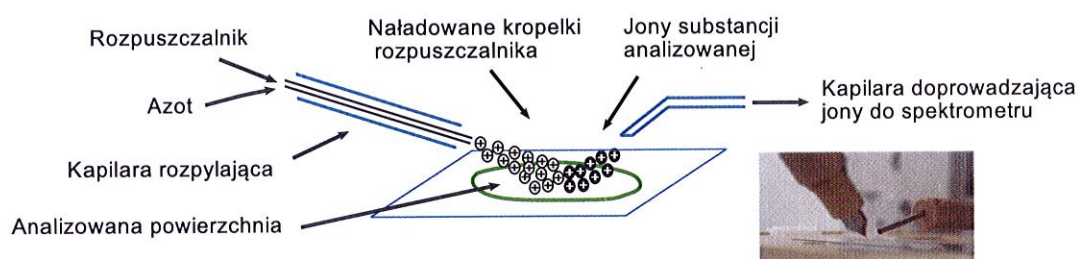


Rys.1. Idea obrazowania za pomocą spektrometrii mas. Na rycinie przedstawiono rozmieszczenie sfingomieliny SM d18:1/24:1 (m/z 847,6) i cholesterolu (reactive DESI, m/z 488,2). Rysunek zaczerpnięty z pracy B4.

Desorption Electrospray Ionisation (DESI) for Beginners - How to Adjust Settings for Tissue Imaging (*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, B1).

DESI (Desorption Electrospray Ionization) jest jedną z technik analizy i obrazowania za pomocą spektrometrii mas. Źródło jonów typu DESI składa się z kapilary rozpylającej (Rys.2), która generuje naładowane mikrokropelki rozpuszczalnika, tzw. krople pierwotne. Kierowane są one w stronę analizowanej powierzchni, gdzie tworzą cienką warstwę cieczy.

Na skutek zderzeń kolejnych kropli ze zwilżoną powierzchnią powstają krople wtórne, zawierające rozpuszczone i zjonizowane cząsteczki substancji znajdujących się w analizowanym punkcie. Jony te trafiają do spektrometru masowego, gdzie są analizowane ze względu na swoją wartość m/z , co pozwala na wygenerowanie widma masowego, charakterystycznego dla danego punktu². Istotną zaletą tego układu jest możliwość przeprowadzenia fragmentacji (tandemowa spektrometria mas) analizowanych związków i co za tym idzie - ich pełnej identyfikacji. Co więcej, źródło jonów typu DESI może pracować pod ciśnieniem atmosferycznym, co znacznie ułatwia przygotowanie próbek.



Rys. 2. Źródło jonów typu DESI (rysunek zaczerpnięty z pracy B1).

Prawidłowe działanie źródła jonów typu DESI wymaga optymalizacji szeregu parametrów, związanych zarówno z działaniem samego źródła jonów, jak i z jego geometrią – czyli odpowiednim ustawieniem wszystkich elementów źródła w stosunku do analizowanej powierzchni. Do tych czynników należą, między innymi: ciśnienie gazu rozpylającego, szybkość przepływu rozpuszczalnika, różnica potencjałów pomiędzy kapilarami, kąt kapilary napylającej, jej wysokość nad powierzchnią próbki, oraz jej odległość od kapilary wprowadzającej jony do wnętrza spektrometru. Analiza prostych, łatwo jonizujących substancji, którymi są zwykle związki natywnie posiadające ładunek, co wynika z ich struktury (np. rodamina nałożona na szkło), polecanych do optymalizacji źródła jonów, może być w tym wypadku zadaniem stosunkowo prostym. Jednakże analiza złożonej próbki biologicznej stanowi poważny problem metodologiczny a prace na ten temat nie były publikowane przez inne ośrodki badawcze.

² Takáts, Z., Wiseman, J. M., & Cooks, R. G. (2005). Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 40(10), 1261–1275.

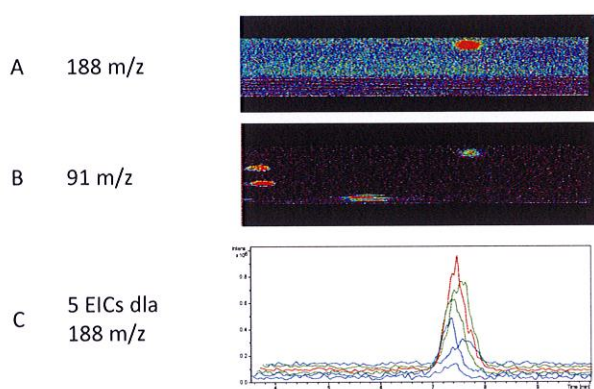
W pracy zatytułowanej: *“Desorption Electrospray Ionisation (DESI) for Beginners - How to Adjust Settings for Tissue Imaging”*, przedstawiono problemy techniczne takiej analizy, oraz zaproponowano schemat postępowania, pozwalający uzyskać widma o odpowiedniej jakości nawet ze złożonych próbek biologicznych (np. skrawków tkanek). Zwrócono tutaj przede wszystkim uwagę na fakt, że szeroki zakres wartości parametrów, które dają dobre rezultaty w przypadku próbek wzorcowych, nie sprawdza się w przypadku tkanek. Badając złożone próbki, konieczny jest precyzyjny dobór parametrów, a ich wartości bardzo często istotnie różnią się od tych, optymalnych dla wzorców.

Praca, przez pokazanie właśnie tej rozbieżności oraz optymalizację ustawień, może stanowić ogromne ułatwienie dla naukowców rozpoczynających pomiary materiału biologicznego za pomocą źródła jonów typu DESI. Prezentuje ona szczegółowo kolejne kroki prowadzące do optymalizacji jego działania i pokazuje sposoby radzenia sobie z najczęstszymi problemami.

Drug Analysis by TLC-DESI MS (*Planar Chromatography-Mass Spectrometry, B2*)

W rozdziale książki pod tytułem *“Planar Chromatography-Mass Spectrometry”*, pod redakcją: Teresy Kowalskiej, Mieczysława Sajewicza i Josepha Sherma, pokazano możliwość zastosowania techniki DESI do analizy substancji niskocząsteczkowych (w tym przypadku amfetaminy, metamfetaminy, para-metoksy-N-metylamfetaminy (PMMA) i selegiliny) rozdzielonych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). W chromatografii cienkowarstwowej spotykamy się często z problemem wizualizacji prążków, w celu wyznaczenia czasów retencji rozdzielanych substancji, czy z nakładaniem się rozdzielanych substancji w obszarze tego samego prążka. Połączenie bardzo prostej, szybkiej i niezawodnej techniki rozdzielania złożonych próbek jaką jest chromatografia cienkowarstwowa ze źródłem jonów typu DESI jako „detektorem” daje nowe, interesujące możliwości i pozwala wyeliminować wspomniane wcześniej problemy. Dzieje się tak, ponieważ spektrometr pozwala na jednoznaczną identyfikację rozdzielanych substancji (na podstawie ich wartości m/z , lub widma fragmentacyjnego), nawet jeżeli na płytce TLC ich prążki się nakładają lub są niewidoczne. Technika wykorzystująca obrazowanie MS pozwala dokładnie wskazać gdzie na płytce znajduje się rozdzielana substancja. Co więcej, źródło jonów typu DESI pozwala pracować pod ciśnieniem atmosferycznym i praktycznie nie wymaga specjalnego

przygotowania próbki, w przeciwieństwie do innych, rutynowo wykorzystywanych, źródeł do obrazowania (MALDI, SIMS). Jedynym warunkiem, koniecznym do przeprowadzenia tego typu analizy, jest możliwość jonizacji substancji w źródle jonów typu DESI, jako że nie wszystkie związki ze względu na swój chemiczny charakter pozwalają na uzyskanie jonów warunkach analizy. Rozdział w monografii miał za zadanie zobrazować możliwości analizy tego typu, niemniej jednak przedstawiono w nim sposób przygotowania płytki do pomiarów, zaprezentowano wpływ różnych rozpuszczalników na intensywność uzyskiwanych pików, oraz przedstawiono różne sposoby prowadzenia analizy (analiza „jednej linii”, lub obrazowanie całego prążka).



Rys. 3. Różne sposoby obrazowania substancji rozdzielonych na płytce TLC. (a) i (b) – obrazowanie całej płytki TLC (160 linii – prezentacja danych w programie BioMap): (a) obrazowanie prążka dla selegiliny (m/z 188), (b) charakterystyczny fragment cząsteczki (tzw. kation tropyliowy – m/z 91) pochodzący od selegiliny, PMMA, metamfetaminy i amfetaminy rozdzielanych na płytce TLC. (c) – obrazowanie pojedynczych linii - 6 linii reprezentujących selegilinę (EIC dla m/z 188 – prezentacja danych w programie DataAnalysis). (rysunek zaczerpnięty z pracy B2)

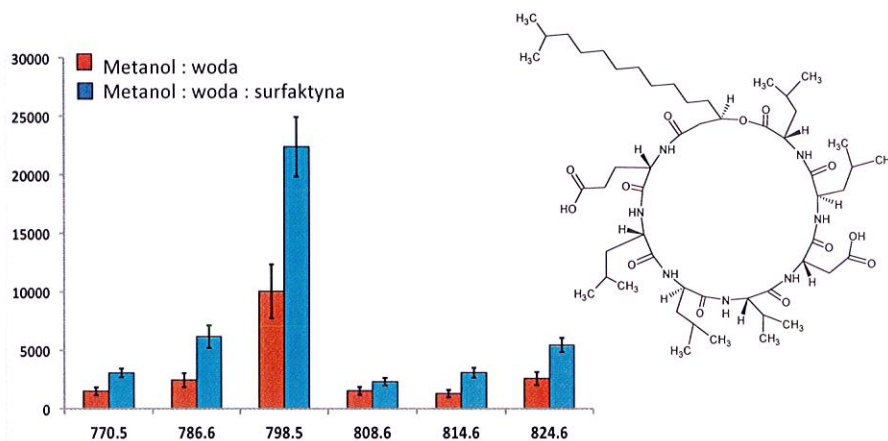
DESI Analysis of Mammalian Cell Cultures – Sample Preparation and Method Optimization (*Journal of Mass Spectrometry*, B3)

Hodowle komórkowe są cennym modelem stosowanym w naukach biologicznych. Pozwalają one na poznawanie molekularnych podstaw towarzyszących różnym zmianom fizjologicznym, jak i zmianom wywołanym przez działanie czynników zewnętrznych³. Jedną z zalet techniki DESI jest prosty sposób przygotowania badanego materiału do analizy. Źródło

³ Freshney, R. I. (2011). *Culture of Animal Cells*. Wiley-Blackwell.

jonów typu DESI, w przeciwieństwie do innych technik służących obrazowaniu za pomocą spektrometrii mas (MALDI-TOF, czy TOF-SIMS), nie wymaga utrzymywania wysokiej próżni do prawidłowego działania i może pracować pod ciśnieniem atmosferycznym. W kolejnej pracy zatytułowanej: *“DESI Analysis of Mammalian Cell Cultures – Sample Preparation and Method Optimization”*, pokazano, że tę technikę można łatwo zaadaptować do analizy substancji obecnych w hodowlach komórkowych. W pracy przedstawiono sposób przygotowania samej hodowli do takiej analizy, uwzględniając dobór odpowiedniej powierzchni, na jakiej powinny rosnać komórki. Opracowano też technikę usuwania medium hodowlanego z naczynek, które jest niezbędne komórkom do wzrostu w warunkach *in vitro*, ale jednocześnie stanowi źródło zanieczyszczeń przy tego typu analizie, ze względu na obecność dużych ilości niskocząsteczkowych soli i innych substancji niezbędnych komórkom do wzrostu. W pracy zaproponowano również dodatek do roztworu napylanego na powierzchnię próbki niewielkiej ilości surfaktanta (cykliczny lipopeptyd: surfaktyna). Pozwala to na otrzymanie stabilniejszych i bardziej intensywnych widm w przypadku stosowania trybu jonizacji dodatkowo, w porównaniu do tradycyjnie stosowanej mieszaniny metanolu z wodą.

Podsumowując, w pracy zaprezentowano, po raz pierwszy w historii analiz DESI-MS, możliwość zastosowania tego źródła jonów do bezpośredniej analizy hodowli komórkowej, bez konieczności zdejmowania komórek z podłoża i homogenizacji materiału. Co więcej, analiza zwykłego homogenatu za pomocą np. techniki ESI, bez uprzedniego pracochłonnego przygotowywania i rozdzielania próbki, nie pozwala na wykrycie lipidów obecnych w materiale, tak jak to umożliwia analiza DESI. Hodowla komórkowa może być w sposób łatwy i szybki przygotowana do tego rodzaju analizy, a innowacyjny dodatek surfaktyny pozwala poprawić jakość uzyskiwanych wyników. Badania te zostały wykorzystane przeze mnie do analizy komórek poddanych wpływowi morfiny.



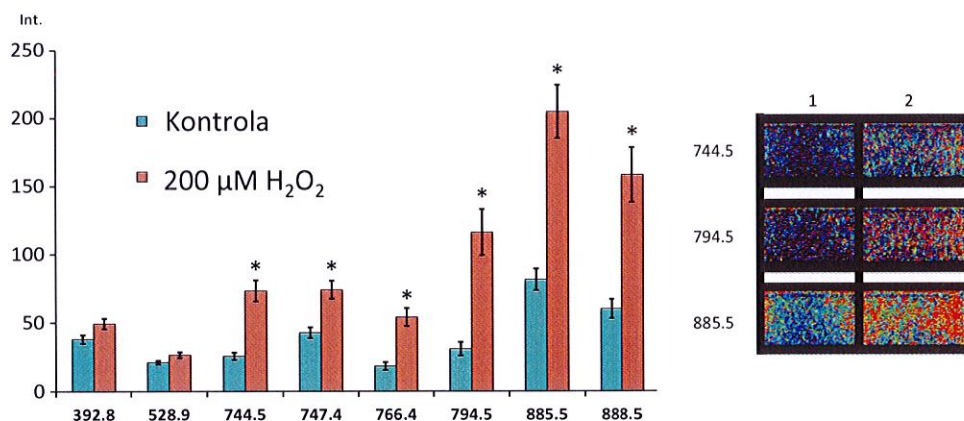
Rys. 4. Wyniki pokazujące pozytywny wpływ dodatku surfaktyny do standardowego roztworu do analizy DESI, który przyczynia się do wzrostu intensywności pików w trybie pozytywnym i zwiększeniu stabilności sygnału zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych. (rysunek zaczerpnięty z pracy B3).

DESI-MS as a Tool for Direct Lipid Analysis in Cultured Cells (*Cytotechnology*, B4)

Kolejna praca: „DESI-MS as a Tool for Direct Lipid Analysis in Cultured Cells” pokazuje praktyczne aspekty stosowania źródła jonów typu DESI do analizy zmian wywołanych przez dodatek czynnika zewnętrznego w komórkach w modelu *in vitro*. Posłużono się tutaj modelem stresu oksydacyjnego, wywołanego przez nadtlenek wodoru. Eksperyment ten przeprowadzono w związku z przesłankami, wskazującymi na możliwość wystąpienia stresu oksydacyjnego w uzależnieniu od morfiny. Celem była analiza zmian na poziomie molekularnym, towarzyszących stresowi oksydacyjnemu i odpowiedź na pytanie, czy takie same zmiany można zaobserwować w hodowlach komórkowych poddanych działaniu morfiny, co sugerowały dane literaturowe. Wyniki eksperymentów pokazały wzrost ilości niektórych lipidów w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Z pomocą tandemowej spektrometrii mas zidentyfikowano glicerofosfoetanolaminę (PE (18:0/18:1) i PE (18:0/20:4)), glicerofosfoglicerol (PG (18:0/18:1)), glicerofosfoinozytol (PI (18:0/20:4)) i sulfatyd (ST (18:1/24:1)) jako lipidy których ekspresja zwiększa się pod wpływem stresu oksydacyjnego. W kolejnych eksperymentach nie udało się potwierdzić podobnych zmian zachodzących w materiale pochodzącym z hodowli pierwotnych astrocytów i neuronów, poddanych działaniu morfiny.

Przeprowadzony, modelowy eksperyment pozwolił jednak pokazać potencjał obrazowania metodą DESI zmian w profilu lipidowym, towarzyszącym odpowiedzi komórek

na różne czynniki (Rys.5.). Ponieważ hodowle komórkowe są szeroko stosowane w wielu dziedzinach badań biologicznych i biochemicznych, tego typu technika może znaleźć szerokie zastosowanie, dzięki szybkości i prostocie analizy. W pracy po raz pierwszy przedstawiono praktyczne zastosowanie analizy DESI do rozwiązania problemu biologicznego, jakim było prześledzenie zmian spowodowanych przez stres oksydacyjny w hodowli komórkowej.

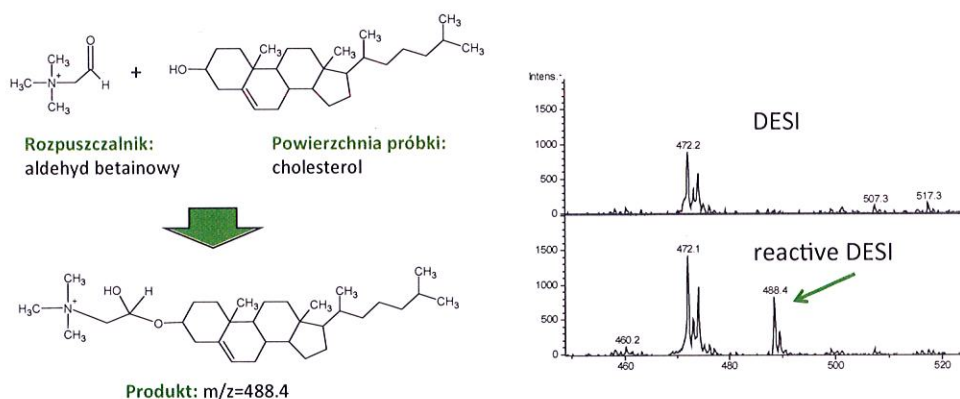


Rys. 5. Zmiany w ilości wybranych lipidów, związane z działaniem nadtlenu wodoru na błony komórkowe fibroblastów w hodowli *in vitro*. Obraz przedstawia rozmieszczenie lipidów o *m/z* 744.5, 794.5 i 885.5 w naczynku kontrolnym (1) i w naczynku, w którym komórki zostały poddane działaniu nadtlenu wodoru (2). Rysunek zaczerpnięto z pracy B4.

Desorption electrospray ionization-based imaging of interaction between vascular graft and human body (*Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, B5)

W omawianych do tej pory pracach, metoda DESI traktowana była jako wygodne narzędzie do analizy lipidów w hodowlach komórkowych. W pracy: „*Desorption electrospray ionization-based imaging of interaction between vascular graft and human body*”, dokonano innowacyjnej analizy materiału pochodzącego ze sztucznego naczynia krwionośnego, wszczepionego pacjentowi z zespołem Leriche’a (ang. *aortoiliac occlusive disease*, AIOD) i po dwóch latach odrzuconego przez jego organizm. Praca pokazała przydatność techniki obrazowania za pomocą DESI-MS w badaniach dotyczących oddziaływań żywych tkanek z biomateriałami. Technika ta nie tylko pozwoliła na wizualizację przestrzennego rozmieszczenia różnych lipidów na powierzchni badanego materiału, ale również na ich identyfikację za

pomocą tandemowej spektrometrii mas MS/MS. Dodatkowo, wykorzystując modyfikację techniki DESI zwaną *reactive DESI*, a polegającą na dodaniu do roztworu rozpylanego czynnika reagującego ze słabo jonizującym substratem obecnym na powierzchni próbki, zobrazowano rozkład stężenia cholesterolu w przekroju poprzecznym uzyskanego materiału (rys. 1 i 6).



Rys. 6. Zasada działania metody *reactive DESI* pozwalającej na wykrywanie cholesterolu na analizowanej powierzchni (rysunek umieszczony w pracy B5).

Porównanie otrzymanych wyników z rozmieszczeniem lipidów w materiale pochodzącym z naturalnego naczynia krwionośnego, również uszkodzonego przez zmiany miażdżycowe⁴, pokazało różnice między tymi dwiema próbkami. Podczas gdy w naturalnym naczyniu lipidy kumulują się głównie w blaszce miażdżycowej, analiza sztucznego naczynia krwionośnego ujawniła kumulację tych substancji w całej objętości sztucznego materiału, oraz w wytworzonej na jego wewnętrznej powierzchni blaszce miażdżycowej. Może to sugerować konieczność wprowadzenia zmian w materiałach wykorzystywanych obecnie do tworzenia sztucznych naczyń krwionośnych, tak żeby zmniejszyć w nich kumulację lipidów. Być może takie postępowanie nie dopuściło by do wytworzenia się w relatywnie krótkim czasie blaszki miażdżycowej, zmniejszenia drożności naczynia i tym samym konieczności jego operacyjnej wymiany. Analogiczne aplikacje możliwe są do zastosowania także np. w procesie konstruowania sztucznego serca.

Ze względu na dynamicznie rozwijające się badania związane z biomateriałami, DESI

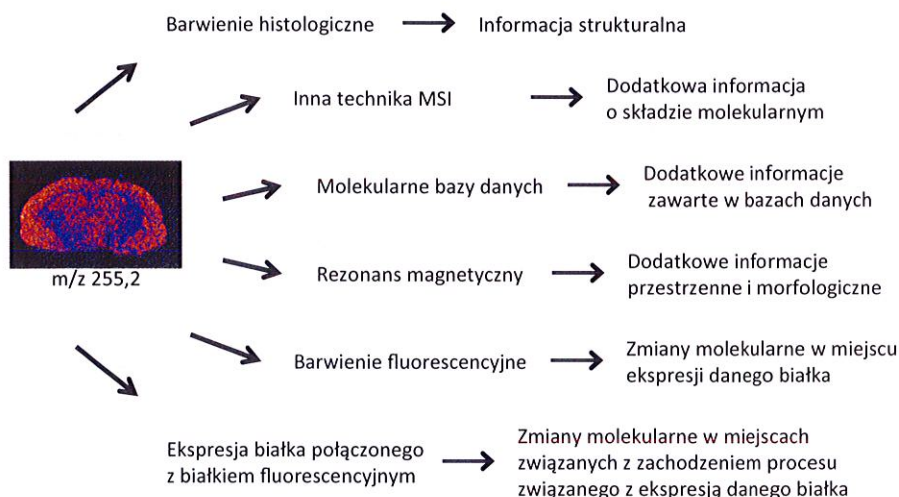
⁴ Manicke, N. E., Nefliu, M., Wu, C., Woods, J. W., Reiser, V., Hendrickson, R. C., & Cooks, R. G. (2009). Imaging of Lipids in Atheroma by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(21), 8702–8707.

może stanowić bardzo ciekawą technikę analityczną w tego typu eksperymentach. Jak pokazano w niniejszej pracy analiza taka jest szybka, nie wprowadza do badanego materiału żadnych obcych substancji (tak jak np. technika obrazowania za pomocą MALDI MS), a zachowanie przestrzennej informacji o rozmieszczeniu różnych cząsteczek pozwala dokładnie wskazać miejsce zachodzących zmian i tym samym uzyskać wartościowe dane.

Imaging mass spectrometry: instrumentation, applications and combination with other visualization techniques (*Mass Spectrometry Reviews*, B6).

Ostatnia praca: „Imaging mass spectrometry: instrumentation, applications and combination with other visualization techniques.” jest pracą przeglądową opartą o 157 oryginalnych doniesień naukowych. Pokazuje ona różne typy obrazowania za pomocą spektrometrii mas, zasady ich działania, zalety oraz ograniczenia. Skupia się również na typach makromolekuł, których rozmieszczenie może być obrazowane przez obecnie dostępne techniki. Najciekawszy, w mojej opinii, dział pokazuje obecne trendy związane z łączeniem danych, uzyskanych za pomocą technik obrazowania MS z informacjami uzyskanymi dzięki innym, klasycznym metodom analizy powierzchni. Może to być na przykład połączenie informacji na poziomie molekularnym, otrzymanej w wyniku analiz MS z informacją o strukturze tkanki uzyskaną dzięki barwieniu histochemicznemu, czy z informacją przestrzenną uzyskaną poprzez skanowanie próbki metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Istnieje również możliwość odniesienia danych otrzymanych dzięki technikom obrazowania MS do informacji dostępnych w różnego typu molekularnych bazach danych (jak np. Allen Brain Atlas)⁵. Praca ta daje wyobrażenie o tym jak szybko rozwijają się techniki obrazowania za pomocą spektrometrii mas i jak duże praktyczne zastosowanie mogą one znaleźć w przyszłości.

⁵ Škrášková, K., Khmelinskii, A., Abdelmoula, W. M., De Munter, S., Baes, M., McDonnell, L., et al. (2015). Precise Anatomic Localization of Accumulated Lipids in Mfp2 Deficient Murine Brains Through Automated Registration of SIMS Images to the Allen Brain Atlas. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(6), 948–957.



Rys. 7. Różne techniki, które mogą zostać połączone z metodami obrazowania za pomocą spektrometrii mas, oraz informacje jakie możemy uzyskać dzięki takiemu połączeniu.

Podsumowanie

W czasie badań stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

- Opracowano protokół optymalizacji działania źródła jonów typu DESI, w celu uzyskania jak najlepszych pomiarów ze złożonych próbek biologicznych. Pokazano rozbieżności między parametrami optymalizacji uzyskiwanymi dla standardowych substancji (zwykle rodaminy), a tymi optymalnymi w przypadku analizy tkanek. Zwrócono uwagę na problemy, które mogą się pojawić, w wyniku optymalizacji źródła jonów przy uwzględnieniu jedynie substancji wzorcowych.
- Opracowano metodykę przygotowania tkanek do tego typu analiz.
- Opracowano metodykę pozwalającą na analizę hodowli komórkowych metodami obrazowania za pomocą spektrometrii mas. Pozwala ona na analizę hodowanego materiału bezpośrednio w naczynkach hodowlanych. Wykazano, że dodatek surfaktyny do roztworów napylanych przez źródło jonów DESI pozwala na znaczącą poprawę jakości analizy.
- Opracowano metodykę pozwalającą na analizę tkanek metodą DESI MS i badanie rozmieszczenia lipidów w tego typu materiale.
- Pokazano jakie zmiany w lipidach komórkowych powoduje stres oksydacyjny. Tym samym pokazano praktyczne zastosowanie źródła jonów typu DESI do analizy zmian wywołanych w komórkach *in vitro* przez dodatek czynnika zewnętrznego.
- Dzięki technice obrazowania pokazano różnice w rozmieszczeniu lipidów pomiędzy naturalnym naczyniem krwionośnym, a naczyniem sztucznym. Tym samym zaprezentowano potencjał obrazowania za pomocą spektrometrii mas w badaniach

biomateriałów.

- W Katedrze Biochemii i Neurobiologii AGH zbudowano profesjonalne laboratorium obrazowania DESI-MS,

Wybrane pozostałe projekty, nie związane z badaniami przedstawionymi jako podstawa rozprawy habilitacyjnej.

1. Badania związane z rozmieszczeniem cholesterolu w tkankach mózgu szczura z wykorzystaniem metody TOF-SIMS

Metoda obrazowania powierzchni przy użyciu techniki TOF-SIMS pozwala, z ogromną rozdzielczością przestrzenną, obserwować rozmieszczenie na powierzchni materiału badanego substancji niskocząsteczkowych, takich jak cholesterol lub witamina E. W tej metodzie jony pierwotne, generowane przez działło jonowe, emitowane są w kierunku analizowanej powierzchni i powodują wybitcie z niej jonów wtórnych, które następnie analizowane są w spektrometrze.

Głównym problemem tej techniki jest występowanie intensywnej fragmentacji obserwowanych cząsteczek podczas procesu jonizacji, w wyniku bombardowania powierzchni przez jony pierwotne. Żeby zmniejszyć ten efekt, pokrywa się analizowaną powierzchnię różnymi substancjami. Mogą to być metale: np. złoto, lub matryce, analogiczne do wykorzystywanych w technikach jonizacji MALDI, np. kwas synapinowy.

W pracy opublikowanej w książce „*Biomacromolecular Mass Spectrometry*” pod redakcją Simone Köing przedstawiono optymalizację metody pomiarowej do celów analizy cholesterolu w tkankach. Stwierdzono, że napylenie powierzchni tkanki złotem daje ogromną poprawę czułości analizy, jeżeli chodzi o tę cząsteczkę. Cholesterol odgrywa istotną rolę w komórce, będąc jedną z substancji odpowiedzialnych za płynność błony komórkowej. Cząsteczka ta zaangażowana jest również w wiele procesów przebiegających w mózgu, takich jak synaptogeneza czy mielinizacja. Stąd znalezienie optymalnej metody analizy jego ilości i rozmieszczenia w próbce może być bardzo pomocne w poprawnym przeprowadzaniu tego typu eksperymentów. Eksperymenty związane z omawianymi badaniami były wykonywane w czasie pobytu w laboratorium prof. Rona Heerena, jednego z autorytetów w dziedzinie obrazowania za pomocą spektrometrii mas.

2. Badania związane z analizą TOF-SIMS powierzchni modyfikowanych PEG-yłowanymi peptydami.

Celem badań była analiza powierzchni krzemu modyfikowanej peptydami (macierze peptydowe), oraz efektywności ich trawienia przez proteiny. W czasie badań opracowano procedurę pozwalającą na analizę takich materiałów metodą TOF –SIMS. Badania przeprowadzane były we współpracy z dr hab. Romanem Pędrysem z Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy: „*Synthesis and Characterisation of PEG-Peptide Surfaces for Proteolytic Enzyme Detection.*”, R. Trzcinska, P. Suder, **A. Bodzon-Kulakowska**, M. Skalska, A. Marcinkowski, J. Kubacki, R. Pedrys, J. Silberring, A. Dworak, and B. Trzebicka. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, no. 28, **2013**: 9049–59.

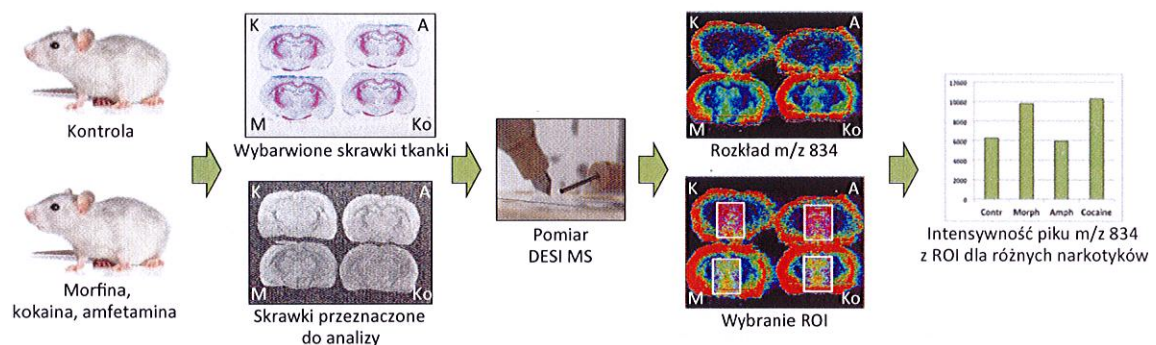
3. Badania związane z analizą DESI pierwotnych hodowli astrocytów i neuronów uzależnionych od morfiny.

Celem badań było określenie wpływu morfiny na profil lipidowy komórek ośrodkowego układu nerwowego. Analizy prowadzono techniką DESI MS. Hodowle astrocytów i neuronów poddawano działaniu morfiny przez 5, 7 i 10 dni. Niestety nie udało się zaobserwować statystycznie istotnych zmian w profilach lipidowych komórek poddanych działaniu morfiny. Eksperymenty związane z tymi badaniami były wykonywane pod moją opieką w ramach pracy magisterskiej zatytułowanej: „*Analiza astrocytów za pomocą DESI – MS*”, przez panią mgr inż. Joannę Mąkosę, a także w czasie pobytu w laboratorium prof. Rona Heerena.

4. Badania skrawków mózgow szczerów uzależnionych od morfiny, kokainy i amfetaminy metodą DESI MS.

Badania miały na celu analizę potencjalnych zmian w profilach lipidowych, zachodzących w mózgu szczerów uzależnionych od morfiny, kokainy i amfetaminy, przez 5, 10 i 15 dni identyfikowanych metodami obrazowania DESI MS. Analizy pozwoliły na wskazanie i identyfikację szeregu lipidów, których ekspresja zmienia się pod wpływem uzależnienia od wyżej wymienionych narkotyków. Jest to pierwsze tego typu badanie, pokazujące zastosowanie obrazowania za pomocą spektrometrii mas do analiz biochemicznych

związanym z uzależnieniem od substancji psychoaktywnych i może mieć znaczenie w zrozumieniu molekularnych podstaw tego zjawiska. Artykuł jest obecnie po pierwszej turze recenzji. W ramach przygotowań do przeprowadzenia tak szeroko zakrojonych badań, porównano dostępne oprogramowanie służące do analiz obrazów uzyskanych technikami obrazowania za pomocą spektrometrii mas. Porównanie to miało na celu wyłonienie najwygodniejszego oprogramowania do analizy ogromnej ilości danych. Spośród programów branych pod uwagę, z naszego punktu widzenia najlepszy okazał się BioMap firmy Novartis. Przeprowadzoną analizę oraz jej wyniki szeroko opisano w artykule „*Comparison of two freely available software packages for mass spectrometry imaging data analysis using brains from morphine addicted rats*”, A. Bodzon-Kulakowska, M. Marszałek-Grabska, A. Antolak, A. Drabik, J. Kotlinska, P. Suder. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2016.

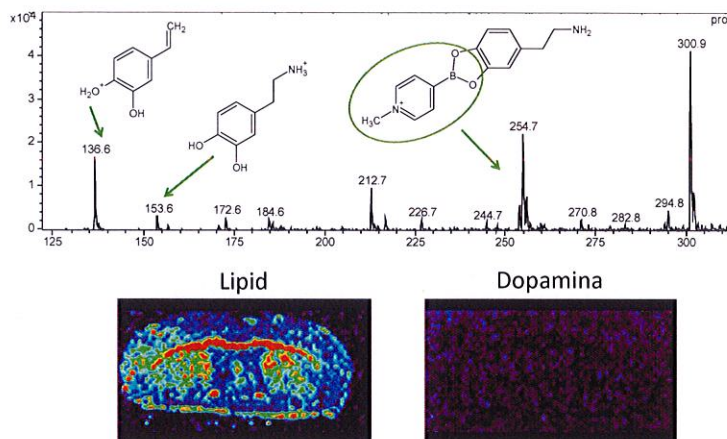


Rys. 8. Schemat przeprowadzanych eksperymentów. ROI – region of interest – obszar zaznaczany w BioMapie z którego zliczana była intensywność pików. C – skrawek mózgu kontrolnego, A – skrawek mózgu amfetaminowego, M – skrawek mózgu morfinowego, Co – skrawek mózgu kokainowego.

5. Badania związane z wykrywaniem dopaminy technikami obrazowania za pomocą spektrometrii mas

W ramach grantu pt.: „Therapy and research on pathomechanisms of idiopathic Parkinson’s disease involving induced Pluripotent Stem cells” (nr. grantu: UMO-2015/17/B/NZ5/00294) zajmujemy się problematyką oznaczeń dopaminy w skrawkach mózgow w mysim modelu choroby Parkinsona. Na obecnym etapie badań, głównym problemem jest znalezienie odpowiedniego odczynnika derywatyżującego dopaminę, który pozwoliłby na uzyskanie intensywnego sygnału od natywnej cząsteczki. Pierwsze próby

przeprowadzono z kwasem pirydyno-N-metyloborowym, niestety pomimo obiecujących doniesień literaturowych nie dały one pozytywnych rezultatów (Rys. 9). Obecnie przeprowadzać będziemy eksperymenty z innym odczynnikiem: 2,4-difenylo-pyranylium tetrafluoroboranem (DPP-TFB), który według danych literaturowych dawał pozytywne wyniki przy obrazowaniu za pomocą techniki MALDI.



Rys.9. Derywatyżacja dopaminy kwasem pirydyno-N-metylo borowym – standardy, wraz z obrazowaniem tkanki – niemożność wykrycia natywnej dopaminy (badania własne).

6. Badania związane ze zmianami proteomicznymi w uzależnieniu od narkotyków

Poza badaniami związanymi z obrazowaniem za pomocą spektrometrii mas uczestniczyłam również w projekcie badającym zmiany w proteomie centralnego układu nerwowego pod wpływem morfiny (Grant NCN Opus. Identyfikacja krytycznych szlaków metabolicznych centralnego układu nerwowego w patofizjologii uzależnienia od opioidów. Numer grantu: 2012/07/B/NZ4/01468). Projekt ten miał na celu, w oparciu o dostępne badania proteomiczne, znaleźć białka i szlaki metaboliczne zaangażowane w proces uzależnienia. Warunkiem było, żeby zidentyfikowane białka nie były jednostkowymi przypadkami identyfikacji. Ich udział w procesach uzależnienia powinien być potwierdzony przez badania co najmniej dwóch niezależnych laboratoriów (swoisty rodzaj walidacji wyników). W ramach tego projektu została zaktualizowana i unowocześniona baza www.addiction-proteomics.org zbierająca informację o białkach których ekspresja ulega zmianie pod wpływem morfiny. Korzystając z bioinformatycznej analizy umieszczonych tam białek wykazano, że duża ich część należy do enzymów kontrolujących przemiany energetyczne w komórkach. Następnie wybrano najbardziej interesujące z nich i

wykonano analizę, żeby określić czy obserwowane zmiany w ekspresji białek przekładają się na zmiany w ich aktywności, co wydaje się istotniejsze z biologicznego punktu widzenia. Otrzymane wyniki zostały przedstawione na dwóch konferencjach naukowych (punkty 16, 18, 22, 23, 24 w podpunkcie L) i obecnie oczekują na recenzje i publikację w czasopismach.

Podsumowanie:

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- **22** artykułów w czasopismach naukowych z listy JCR
łączny **IF: 77,32**
h-index = **8**, cytowania - **290**, bez autocytowań - **270**
- Redakcja **1** monografii, w której jestem autorem lub współautorem **10** rozdziałów,
- **20** rozdziałów, których jestem autorem lub współautorem w **10** innych monografiach o tematyce związanej ze spektrometrią mas i proteomiką.
- Wygłoszenie **2** wykładów na zaproszenie z innych ośrodków (m. in. Wydziału Chemometrii, Uniwersytetu Śląskiego),
- Wygłoszenie **1** referatu na konferencji tematycznej,
- Współautorstwo **4** referatów wygłoszonych na konferencjach tematycznych,
- Autorstwo lub współautorstwo **18** posterów prezentowanych na konferencjach tematycznych,
- Wypromowanie **6** prac magisterskich i **8** prac inżynierskich.
- Wykonanie **7** recenzji artykułów naukowych dla **4** czasopism znajdujących się na liście filadelfijskiej na zaproszenie Redakcji.

Anna Bodzoń-Kuśkowska