



**dr hab. Michał Ciborowski**  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
Centrum Badań Klinicznych  
Laboratorium Metabolomiki

## **OCENA**

dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego  
w postępowaniu habilitacyjnym dr n. farm. Anny Roszkowskiej.

Oceny dokonałem w oparciu o otrzymane dokumenty:

1. Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych.
2. Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny.
3. Analizę bibliometryczną przygotowaną przez Bibliotekę Główną Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.
4. Kopie prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

### **Życiorys i przebieg pracy zawodowej**

Dr n. farm. Anna Roszkowska w roku 2003 uzyskała dyplom magistra farmacji na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny, GUMed). W latach 2003-2009 była Doktorantką w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej (Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Gdańsku) w ramach Dziennych Studiów Doktoranckich. Efektem tego było uzyskanie w roku 2009 dyplomu doktora nauk farmaceutycznych na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: *„Wpływ zmian stężenia jonów wodorowych i potasowych na właściwości kinetyczno – regulacyjne deaminazy AMP z dojrzałego łożyska ludzkiego”*. Od roku 2006 posiada prawo wykonywania zawodu farmaceuty wydane przez Gdańską Okręgową Izbę Aptekarską. W latach 2012 – 2015 była zatrudniona jako wykładowca, a następnie jako asystent w Katedrze i Zakładzie Farmakologii na Wydziale Lekarskim GUMed. Obecne miejsce pracy to Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym GUMed, gdzie zatrudniona jest od 2015 roku na etacie adiunkta. W międzyczasie (2016-2017) dr Roszkowska odbyła roczny staż podoktorski w grupie badawczej Prof. Pawliszyna na Uniwersytecie w Waterloo (Kanada).

## Ocena osiągnięcia naukowego przedstawionego w formie cyklu powiązanych tematycznie publikacji

Na osiągnięcie naukowe dr Anny Roszkowskiej zatytułowane „*Strategia analityczna w badaniach metabolomicznych, klinicznych i środowiskowych oparta na mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) w warunkach in vivo*” składa się 5 prac oryginalnych o sumarycznym Impact Factor 27,925 (460 pkt MNiSW). Wszystkie prace ukazały się w latach 2018-2019 i są efektem pracy Habilitantki w zespole Prof. Pawliszyna. Dr Roszkowska jest pierwszym autorem w 4 pracach, z czego w dwóch z nich ma równorzędne współautorstwo z drugim autorem. Natomiast w pracy nr 5 jest czwartym autorem. Zgodnie z przedstawionym wkładem merytorycznym Habilitantka brała udział w projektowaniu eksperymentów, wykonaniu doświadczeń i przeprowadzaniu analiz techniką chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS) oraz interpretacji uzyskanych wyników. Ponadto jej wkład obejmuje przygotowanie rycin i tabel, pisanie manuskryptów, i opracowywanie odpowiedzi na uwagi recenzentów. Przedstawiony wkład jest adekwatny do pozycji na liście autorów i wskazuje na duże zaangażowanie dr Roszkowskiej w powstanie tych prac. Charakter udziału pozostałych współautorów jest potwierdzony stosownymi oświadczeniami.

Elementem wspólnym cyklu prac jest zastosowanie techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (z ang. *solid-phase microextraction*, SPME) do ekstrakcji analitów z próbek biologicznych bez konieczności pobierania materiału do badań (*in vivo* SPME). Taka procedura polega na umieszczeniu włókna SPME bezpośrednio w organizmie żywym, gdzie dochodzi do adsorpcji związków drobnocząsteczkowych na złożu. Następnie przeprowadza się ich desorpcję do małej objętości rozpuszczalnika. Takie podejście pozwala na przeprowadzenie na badanym organizmie żywym wielokrotnych pomiarów w różnych odstępach czasu. Odpowiednia struktura złoża powoduje, iż adsorpcji nie ulegają wielkocząsteczkowe składniki matrycy, takie jak białka czy komórki, dzięki czemu dalsze przygotowanie próbki nie jest konieczne. Przeprowadzone przez Habilitantkę badania można podzielić na dwie części. Pierwsza to badania środowiskowe, w których SPME zostało zastosowane do ekstrakcji analitów z mięśni ryb, a druga część to badania kliniczne dotyczące oznaczania stężenia dokсорubicyny w płucach ludzkich.

W pierwszej pracy z cyklu publikacji technika SPME została wykorzystana do oceny wpływu czasu (roczne przechowywanie tkanek w niskiej temperaturze) na profil lipidomiczny mięśni pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Porównany został również profil lipidomiczny tkanek przygotowanych techniką SPME oraz poprzez tradycyjną ekstrakcję ciało stałe-ciecz (z ang. *solid-liquid extraction*, SLE). Autorka wykazała, że długoterminowe przechowywanie próbek negatywnie wpłynęło na stabilność związków małowcząsteczkowych, co może wynikać z degradacji metabolitów. Kwasy tłuszczowe, hormony steroidowe czy niektóre witaminy obecne w żywych rybach nie zostały wykryte

w tkance mięśniowej po rocznym przechowywaniu w zamrażarce niskotemperaturowej. Profil lipidowy dla próbek po ekstrakcji SLE bogaty był w związki lipidowe o dużych masach cząsteczkowych, głównie fosfolipidy, które były nieobecne w ekstraktach SPME. Ekstrakcja SLE dostarcza zatem informacji o profilu metabolitów, które są składowymi komórek i tkanek, przez co nie zostają zaadsorbowane na włóknie SPME. W związku z tym, jak zauważa Autorka, do pełnego scharakteryzowania tkanki istotnym wydaje się zastosowanie obu technik – SPME i SLE. W kolejnych dwóch publikacjach dr Roszkowska skupiła się na analizie potencjalnego wpływu czynników egzogennych na zmiany metabolomiczne w mięśniach ryb. W jednej z prac była to ekspozycja pstrąga tęczowego na benzo[a]piren (BaP) w warunkach kontrolowanych, natomiast w drugiej badano ryby z rodziny czukuczanowatych (*Catostomus commersonii*) bytujące w rzece Athabasca przepływającej przez region przemysłowy związany z wydobyciem ropy, produkcją papieru, a także w okolicach oczyszczalni ścieków. Już po 14 dniach ekspozycji na subletalne stężenia BaP, który jest jednym z głównych czynników zanieczyszczenia środowiska, Habilitantka zaobserwowała zaburzenia procesów związanych z przemianami energii oraz osmoregulacją. Pełniąc istotną rolę w procesie beta oksydacji kwasów tłuszczowych acetylokarnityna była obecna jedynie w mięśniach ryb z grupy kontrolnej, co zdaniem Autorki może świadczyć o zaburzeniu metabolizmu lipidów u ryb narażonych na BaP. W przypadku badań na rybach z rzeki Athabasca technika *in vivo* SPME umożliwiła dr Roszkowskiej ekstrakcję wielu substancji toksycznych należących do różnych klas, w tym węglowodorów aromatycznych, pestycydów, czy plastyfikatorów. Chociaż substancje toksyczne były obecne w mięśniach ryb ze wszystkich badanych regionów, dr Roszkowska wskazuje, iż ryby żyjące w rejonie rzeki bezpośrednio powyżej miejsca wydobycia ropy naftowej miały ogólną mniejszą ilość związków toksycznych oraz brak substancji związanych z przemysłem naftowym.

Przedstawione przez Habilitantkę zastosowanie techniki *in vivo* SPME w badaniach klinicznych dotyczy monitorowania stężenia doksorubicyny w płucach ludzkich w trakcie zabiegu perfuzji płuc *in vivo* (z ang. *in vivo lung perfusion*, IVLP). Perfuzja płuc doksorubicyną jest nowatorską metodą leczenia przerzutów. W pierwszej z prac w tej części cyklu publikacji dr Roszkowska wraz z zespołem naukowców opracowała szczegółowy protokół użycia włókien *in vivo* SPME do pobierania próbek celem bezpośredniego oznaczania stężenia doksorubicyny w płatach płuc w czasie rzeczywistym (podczas zabiegu IVLP), aby możliwe było określenie właściwych dawek terapeutycznych leku. Badania dr Roszkowskiej polegały na optymalizacji metody SPME tak, by docelowo mogła zostać wykorzystana w warunkach *in vivo* na sali operacyjnej. Opracowana przez Habilitantkę metoda SPME radykalnie upraszcza etap przygotowania próbki i eliminuje potrzebę biopsji tkanki. Uzyskane wyniki sugerują, że metoda ta może być użyteczna do monitorowania i dostosowywania dawek leków podczas zabiegu perfuzji płuc celem dobrania skutecznych i bezpiecznych stężeń doksorubicyny. W ostatniej pracy

z cyklu publikacji, zespół badawczy z dr Roszkowską w składzie, zajął się analizą mechanizmu i kinetyki ekstrakcji doksorubicyny z tkanki płucnej oraz pomiaru jej wolnej frakcji w narządzie docelowym. Dzięki przeprowadzonym badaniom laboratoryjnym i symulacjom matematycznym powstał model umożliwiający określenie kinetyki ekstrakcji leku, obliczenie stopnia wiązania leku z takimi elementami tkankowymi jak białka, DNA czy błony komórkowe, a także pozwalający na wyznaczenie stężenia wolnej frakcji leku w tkance płucnej. Zoptymalizowana metoda ekstrakcji doksorubicyny z tkanki płucnej i opracowany model matematyczny zostały z sukcesem zastosowane u dwóch pacjentów poddanych procedurze IVLP w szpitalu w Toronto. Razem z doksorubicyną na włóknie zostały zaadsorbowane endogenne związki drobnocząsteczkowe, które dostarczyły informacji o zmieniającym się metabolomie pacjentów poddanych terapii IVLP. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Journal of Pharmaceutical Analysis* (praca dostępna on-line od 2 września 2020 roku), a dr Roszkowska jest jednym ze współautorów tej publikacji.

Wykorzystanie techniki SPME w badaniach *in vivo*, zwłaszcza w badaniach klinicznych, jest ciągle podejściem nowatorskim. Przeprowadzone przez dr Roszkowską eksperymenty (praca H1) pokazują, że metabolom tkanki uzyskany przez pobranie próbki metodą *in vivo* SPME jest pozbawiony informacji o metabolitach będących składowymi komórek. Dzięki temu, w porównaniu do ekstrakcji całej tkanki, próbka jest mniej złożona. Powinno to pozytywnie wpływać na jakość uzyskiwanych danych w związku z mniejszym efektem matrycy. Ponadto, ten sposób pobierania materiału do badań pozwala na poznanie poziomu metabolitów w „żywej tkance”, bez wpływu etapów procesowania i przygotowywania próbki, a także procesu ischemii, który rozpoczyna się zaraz po pobraniu materiału do badań. Zastosowanie techniki *in vivo* SPME, jak przedstawiono w pracach H4 i H5, pozwala też na pomiar w czasie rzeczywistym stężenia leku w badanym narządzie, w tym przypadku w płucach. Technika *in vivo* SPME ma ogromny potencjał w badaniach klinicznych i biomedycznych. Dlatego ważne jest, iż zdobyta przez Habilitantkę wiedza i doświadczenie są już wykorzystywane w badaniach prowadzonych w kraju we współpracy z Katedrą Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej (Collegium Medicum w Bydgoszczy) oraz Katedrą i Zakładem Anatomii GUMed.

W mojej ocenie w publikacjach, w których wykonano badania metabolomiczne czy lipidomiczne, brakuje oznaczeń przeprowadzonych w negatywnej polaryzacji. W przypadku zastosowania jonizacji metodą elektrorozpylania, tak jak w tych badaniach, część związków lepiej (lub tylko) jonizuje się w trybie jonów ujemnych. Ponadto, w przypadku lipidów fragmentacja MS/MS w negatywnej polaryzacji jest kluczowa, by uzyskać informacje o kwasach tłuszczowych wchodzących w skład cząsteczki. Zatem wykonanie analiz również w trybie jonów ujemnych dostarcza istotnych

informacji, które pozwalają na pełniejszą charakterystykę badanych próbek. Ponadto dopiero w pracy H3 wzorce cząsteczek lub widma MS/MS zostały wykorzystane do identyfikacji metabolitów. Identyfikacja związków przeprowadzona tak jak opisano w pracach H1 i H2 jest tylko szacunkowa i może być błędna. Wspomniane uwagi nie obniżają jakości przeprowadzonych badań, a jedynie wskazują dodatkowe możliwości, które mogą pozwolić na dokładniejszą charakterystykę metabolomu badanej próbki.

Podsumowując uważam, że osiągnięcie naukowe dr Anny Roszkowskiej pt.: *„Strategia analityczna w badaniach metabolomicznych, klinicznych i środowiskowych oparta na mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) w warunkach in vivo”* jest spójne tematycznie, posiada znaczące cechy nowości naukowej i wskazuje na istotny rozwój zawodowy Habilitantki predysponujący do samodzielności naukowej.

#### **Ocena dorobku naukowego**

Dorobek naukowy dr Anny Roszkowskiej składa się z 18 prac pełnotekstowych (w tym jedna praca przeglądowa) o łącznej punktacji Impact Factor 49,212 (738 pkt MNiSW). Habilitantka jest też współautorem rozdziału w monografii naukowej oraz 27 komunikatów zjazdowych. Liczba cytowań wg Web of Science wynosi 119 (bez autocytowań), a indeks Hirscha 7.

Swoje pierwsze badania naukowe Pani dr Roszkowska prowadziła pod kierunkiem prof. dr hab. Krystiana Kalety, początkowo w ramach realizacji pracy magisterskiej, a następnie doktorskiej. Badania te dotyczyły deaminazy AMP (AMPD), enzymu przemiany puryn pełniącego istotną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego komórki. Dr Roszkowska najpierw oceniała wpływ wybranych efektorów allosterycznych na aktywność i właściwości regulacyjne AMPD, a następnie skupiła się na badaniach nad właściwościami kinetycznymi, regulacyjnymi i strukturalnymi tego enzymu. Ten etap pracy naukowej pozwolił Habilitantce nie tylko zapoznać się z metodami chromatograficznymi czy spektrofotometrycznymi, ale także z takimi narzędziami biologii molekularnej jak Northern i Western blotting, izolacja i elektroforeza RNA czy reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym. Efektem tych badań są 3 prace oryginalne i 3 prace popularno-naukowe.

Po uzyskaniu stopnia doktora, zainteresowania Habilitantki skupiły się na wykorzystaniu techniki LC-MS do oznaczania związków endogennych oraz substancji leczniczych w materiale biologicznym. Dr Roszkowska zajmuje się w szczególności opracowywaniem nowych metod analitycznych z uwzględnieniem etapu przygotowania próbki do badań. Uczestniczyła w opracowaniu

metody do jednoczesnego oznaczania w próbce krwi witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, która została wykorzystana w badaniach prowadzonych na dzieciach chorych na mukowiscydozę. Opracowała metodę do oceny poziomu wybranych neurotransmiterów w próbkach osocza u pacjentów z neuroblastomą oraz w guzach Wilmsa z wykorzystaniem dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz do przygotowania próbki. Ponadto brała udział w badaniach mających na celu ocenę poziomu amin biogennych, ich prekursorów i metabolitów w osoczu i moczu pacjentów pediatrycznych. Podczas stażu podoktorskiego w grupie profesora Pawliszyna, oprócz badań przedstawionych w cyklu publikacji, Dr Roszkowska brała również udział w innych projektach prowadzonych we współpracy z różnymi jednostkami z Toronto General Hospital, w których wykorzystywano technologię SPME. Badania z wykorzystaniem tej techniki kontynuuje również po powrocie do kraju. Należy podkreślić, iż Habilitantka ciągle doksztalca się i nabywa nowe umiejętności poprzez udział w licznych kursach i szkoleniach, zarówno krajowych jak i zagranicznych.

W trakcie pobytu na Uniwersytecie w Waterloo, Dr Anna Roszkowska była współwykonawcą w dwóch grantach finansowanych przez Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada i Canadian Institutes of Health Research (CIHR), a także Environmental Damages Fund. Ponadto, w ramach finansowania badań własnych, była kierownikiem projektu na Akademii Medycznej w Gdańsku.

Dr Anna Roszkowska jest laureatką dwóch Zespołowych Nagród Naukowych Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za rok 2009 i 2016. W roku 2018 otrzymała nagrodę za najlepszą prezentację posterową podczas XXV Konferencji Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed. Jej publikacja *"Metabolome profiling of fish muscle tissue exposed to benzo[a]pyrene using in vivo solid-phase microextraction"* została wyróżniona jako jedna z pięciu najlepszych prac opublikowanych w 2018 roku w czasopiśmie Environmental Science & Technology Letters. Dorobek naukowy Habilitantki obejmuje również recenzje publikacji m.in. dla tak prestiżowych czasopism jak TrAC - Trends in Analytical Chemistry czy Analytica Chimica Acta.

### **Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej**

Dr Anna Roszkowska prowadziła zajęcia ze studentami GUMed z takich przedmiotów, jak Biochemia, Farmakologia i Toksykologia oraz Farmakologia Kliniczna. Niektóre z tych przedmiotów były prowadzone również w języku angielskim. W latach 2017-2020 była opiekunem 3 prac magisterskich wykonywanych przez studentów Wydziału Farmaceutycznego GUMed. Od roku 2015 prowadzi zajęcia w ramach Studenckiego Koła Naukowego działającego przy Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GUMed. Ponadto uczestniczyła w wielu kursach i szkoleniach mających na

celu rozwój kompetencji dydaktycznych, m.in.: „Nowoczesne metody aktywizacji studentów”, „Kurs e-learningu” czy „Kurs z zakresu zaawansowanych prezentacji multimedialnych”.

Habilitantka wykazuje się również działalnością organizacyjną. Dwukrotnie (w roku 2019 i 2020) była członkiem Komitetu Organizacyjnego Międzynarodowego Konkursu Wiedzy Neurobiologicznej Brain Bee. Ponadto była członkiem Komitetu Organizacyjnego międzynarodowej konferencji naukowej CECE'2019: 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, która odbyła się w Gdańsku, a aktualnie jest członkiem Komitetu Organizacyjnego XXVI Konferencji Naukowej Wydziału Farmaceutycznego, która odbędzie się w dniach 28-29 stycznia 2021 roku.

### **Wniosek końcowy**

Działalność naukowa Dr Anny Roszkowskiej dotyczy głównie wykorzystania chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas do pomiaru endogennych (metabolity, lipidy) i egzogennych (leki) związków drobnocząsteczkowych w materiale biologicznym. W swoich badaniach Habilitantka skupia się na opracowywaniu nowych metod analitycznych, a cykl publikacji stanowiący osiągnięcie naukowe jest istotnym wkładem w rozwój badań nad wykorzystaniem techniki SPME w badaniach *in vivo*. Biorąc pod uwagę dorobek publikacyjny oraz parametry bibliometryczne (liczba cytowań i indeks Hirscha), udział w krajowych i zagranicznych projektach naukowych, a także działalność dydaktyczną i organizacyjną stwierdzam, iż dr Anna Roszkowska spełnia wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego określone w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Powyższe argumenty upoważniają mnie do wystąpienia z wnioskiem o dopuszczenie dr Anny Roszkowskiej do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

**KIEROWNIK**  
Laboratorium Metabolomiki  
Centrum Badań Klinicznych  
*Giborowski*  
dr hab. Michał Ciborowski

Białystok, dn. 20.01.2021r.

