



prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381

Recenzja pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej

„Występowanie leków przeciwbakteryjnych w systemach dozowania wody dla drobiu — analityka i ocena zagrożeń”

ZANIECZYSZCZENIE środowiska i żywności ksenobiotykami jest jedną z możliwych przyczyn gwałtownego rozwoju nowotworów i innych chorób cywilizacyjnych. Mierzalne stężenia leków notowane są w próbkach środowiskowych pochodzących nawet z obszarów mało zurbanizowanych. W przypadku antybiotyków, ich obecność w środowisku i żywności jest dodatkowo czynnikiem stymulującym wykształcanie się lekooporności drobnoustrojów. O ile nie da się uniknąć wydalania leków i ich metabolitów do środowiska przez leczonych pacjentów, o tyle leki w żywności są najczęściej wynikiem celowego, często nielegalnego działania producenta, a eliminacja i kontrola ich obecności staje się priorytetowym celem w nowoczesnym społeczeństwie.

Do takiego trendu badawczego zalicza się przedłożona do recenzji dysertacja doktorska, wykonana w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem prof. dra hab. ANDRZEJA POSYNIKA i dra TOMASZA ŚNIEGOCKIEGO.

Praca stanowi spójny tematycznie cykl¹ 4 prac oryginalnych oraz 1 pracy przeglądowej o łącznym IF równym 6,703 oraz punktacji MNiSW równej 91, opatrzonej 37-stronicowym omówieniem. Jest wyraźnie wyodrębnioną i samodzielną częścią badań² prowadzonych w zespole Zakładu Farmakologii i Toksykologii w ramach realizacji zadań Instytutu. Do pracy dołączono stosowne oświadczenia współautorów publikacji i samej Doktorantki, z których jednoznacznie wynika dominujący i wyraźnie samodzielny udział Doktorantki (wynoszący 55 — 80%) w prezentowanych badaniach³.

Na początku pracy zamieszczono listę publikacji oraz wykaz stosowanych skrótów. 11-stronicowy wstęp objaśnia czytelnikowi zasadność podjętej tematyki badawczej oraz umiejscawia przeprowadzone badania w aktualnych wymogach prawnych. Cele pracy zostały sprecyzowane zwięźle na dalszych dwóch stronach omówienia, zaś jego dalszą część stanowi opis metodyki badań, streszczenie każdej z publikacji oraz zwięźle i prawidłowe wnioski. Na końcu zamieszczono abstrakt w języku polskim i angielskim oraz bibliografię złożoną z 48 nienumerowanych pozycji, cytowanych w tekście samego omówienia, niezależnie od bibliografii publikacji. Odbitki wszystkich publikacji stanowią dalszą część dysertacji.

¹Art. 13 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. . .

²Art. 13 ust. 4 *ibidem*

³§6 pkt. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim. . .

Cykl badań stanowiący treść rozprawy jest szeroki i rozwiązuje wiele aspektów monitorowania narażenia zwierząt i ludzi na antybiotyki. Do kontroli wody pitnej podawanej zwierzętom Doktorantka opracowała kompleksową metodę analityczną, umożliwiającą jednoczesne oznaczanie 45 antybiotyków i chemioterapeutyków z różnych grup terapeutycznych.

Różnorodność chemiczna jednocześnie oznaczanych substancji rodzi znaczne trudności na etapie opracowania metody. Dzięki zastosowaniu detektora MS (potrójny kwadrupol) oraz zoptymalizowanej elucji gradientowej nie było konieczne całkowite rozdzielenie pików analizowanych substancji, a czas analizy nie przekroczył 10 minut. Użycie sulfafenazolu jako wzorca wewnętrznego pozwoliło na poprawę dokładności i precyzji wyników oznaczeń, zaś metoda spełniła wszystkie wymagane założenia w procesie walidacji. Zagęszczanie próbek na kolumnkach SPE obniżyło limity detekcji i oznaczalności na poziomie 20 ng/l dla większości substancji, tylko dla kilku związków te wartości były większe. Obszerny opis opracowanej metody badawczej zawarty jest w publikacji 1.1 (*Chemosphere 2015, 119, 8-15*).

Metoda otrzymała akredytację Polskiego Centrum Akredytacyjnego i została wdrożona w praktyce do rutynowej analizy próbek wody pobranych na fermach drobiowych. Opis jednego z przypadków wykrycia zabronionych substancji zawiera praca 1.2 dysertacji (*Pasze przemysłowe 2015, 28-32*). Wykrycie obecności lazalocydu, doksycykliny oraz śladów enrofloksacyny w jajach było przyczyną przeprowadzenia postępowania wyjaśniającego, gdzie jako jedno z dodatkowych badań przeprowadzono analizę wody. W wodzie tej oznaczono zarówno enrofloksacynę, jak i doksycyklinę metodą opracowaną wcześniej przez Doktorantkę.

Stała obecność niewielkich stężeń leków w wodzie pitnej może powodować interakcje farmakokinetyczne z innymi lekami. Doktorantka w ramach swojej pracy podjęła również drugi wątek badawczy, mający na celu ustalenie wpływu stałego podawania małych stężeń enrofloksacyny na farmakokinetykę doksycykliny oraz na jej zawartość w tkankach kur. Farmakokinetyka badana była osobno dla kur zdrowych oraz zakażonych *Mycoplasma gallisepticum*. Ta część badań wykonywana była w ramach grantu NCN (DEC-2013/11/N/NZ7/00434), a wybór substancji był słusznie podyktowany najczęstszym ich spotykaniem w kontroli wody podawanej kurom.

Do zbadania interakcji konieczne było opracowanie i zwalidowanie przez Doktorantkę kolejnej metody analitycznej, umożliwiającej ilościowe oznaczenie doksycykliny, enrofloksacyny oraz ciprofloksacyny (jako metabolitu enrofloksacyny), tym razem w tkankach (w mięśniach piersiowych, udowych i wątrobie). Wystarczająca okazała się ekstrakcja ciecz-ciecz, a do samego oznaczania wykorzystano ten sam system HPLC-MS z elucją gradientową. Opis tej metody, wraz ze szczegółową jej walidacją, stanowi część publikacji 1.3 (*Journal of Veterinary Research 2016, 60, 293-299*).

Druga część artykułu 1.3 przedstawia badania zmian stężeń doksycykliny w tkankach kur w przypadku jednoczesnego podawania niewielkich dawek enrofloksacyny (niższych niż przeciętnie wykrywane w wodzie pitnej). Dodatek enrofloksacyny do wody pitnej nasilał kumulację doksycykliny w tkankach, a jej stężenie w badanych próbkach było prawie 50% większe niż w grupie kontrolnej. Świadczy to o istotnej interakcji między tymi lekami, mogącej prowadzić do kumulacji w tkankach mimo odczekania przez producenta drobiu stosownego okresu karencyjnego.

Aby określić czynniki pomocne w wyjaśnieniu tego zjawiska, Doktorantka zbadała wpływ obecności śladów enrofloksacyny na profil stężenia doksycykliny w tkankach (mięśniach i wątrobie) kur, zarówno zdrowych, jak i zainfekowanych *Mycoplasma gallisepticum*. Wyniki tej części zawarte są w publikacji 1.4 (*Food and Chemical Toxicology 2016, 123-129*). Profil farmakokinetyczny doksycykliny nie zmieniał wyraźnie kształtu pomiędzy grupami zwierząt, zatem nie wykazano zmian liczby

kompartamentów ani mechanizmu eliminacji. Okres półtrwania oraz czas do osiągnięcia maksymalnego stężenia nie wykazywały statystycznie istotnych różnic. Jednakże cały profil farmakokinetyczny był istotnie przesunięty w stronę wyższych stężeń dla zwierząt narażonych na enrofloksacynę, a jeszcze bardziej dla narażonych i zakażonych. Istotnie statystycznie różniły się AUC i stężenie maksymalne.

Uzupełnieniem dysertacji jest publikacja przeglądowa 2.1 (*Pasze Przemysłowe 2014, 48-53*), która przedstawia aktualność problematyki pracy doktorskiej, jak również pilotowo informuje o podjętych badaniach i wstępnie przedstawia świeżo opracowaną metodę analityczną.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską przeszły pełny proces edytorski w 4 czasopismach, w tym 3 z listy filadelfijskiej o wysokim współczynniku IF. Warto podkreślić jest uzyskanie przez publikację 1.1 w ciągu zaledwie roku od jej ukazania siedmiu cytowań nie będących autocytowaniami (wg bazy Scopus). Świadczy to o dużym zainteresowaniu analizą antybiotyków w wodzie w skali światowej, a tytuły prac cytujących świadczą, że opracowana metoda stanowi referencję również dla innych, pozaweterynaryjnych zastosowań.

Chociaż w ramach recenzji pracy doktorskiej nie wykonuje się formalnie oceny dorobku Doktorantki, nie można przemilczeć współautorstwa co najmniej sześciu innych artykułów ze współczynnikiem IF, ponad 30 łącznych cytowań oraz indeksu h równego 4 (wg bazy Scopus).

Z obowiązku recenzenta chciałbym podzielić się nielicznymi uwagami i przemyśleniami dotyczącymi dysertacji:

1. Tekst omówienia cyklu publikacji chwilami nie informuje wyraźnie czytelnika, czy opisywane badania są wykonane w ramach pracy doktorskiej, czy też są niedawnymi badaniami innych autorów lub wcześniejszymi okolicznościami inspirującymi do tej pracy. Tak jest np. na stronie 11 („w tym celu opracowano” — nie wiadomo, kto opracował). Jednak takie niejasności pojawiają się tylko przy pierwszym czytaniu tekstu, a po zapoznaniu się z całością pracy ten problem znika.
2. Zdecydowanie lepiej czytałoby się omówienie publikacji, gdyby tekst zawierał wyraźne przyczynowo-skutkowe ciągi chronologiczne. Jest to tym bardziej potrzebne, że data przyjęcia do druku publikacji nie jest skorelowana z kolejnością wykonanych badań, a publikacje ze względu na ich pisanie w krótkim czasie nie mogły cytować się wzajemnie.
3. W publikacji 1.4 interpretację wyników zdecydowanie poszerzyłoby zbadanie czwartej grupy zwierząt zakażonych drobnoustrojem i nie narażonych na enrofloksacynę. Taki projekt eksperymentu umożliwiłby analizę dwuczynnikową ze zbadaniem interakcji pomiędzy zakażeniem i narażeniem.
4. Doświadczenia opisane w publikacjach 1.3 oraz 1.4 nie zakładały oznaczenia enrofloksacyny i doksycykliny we krwi zwierząt. Nie było to wprawdzie konieczne do osiągnięcia celu pracy, jednakże takie dane (np. z dalszych przyszłościowych badań), połączone np. z różnymi ściśle kontrolowanymi dawkami obu leków pozwoliłyby ocenić zmianę profili farmakokinetycznych obu substancji na różnych poziomach i dało cenny wgląd umożliwiający pełniejsze wyjaśnienie zbadanego zjawiska.
5. W literaturze dotyczącej interakcji leków u ludzi nie jest wspomniana żadna istotna interakcja pomiędzy tetracyklinami i chinolonami. Jest to punkt startowy do interesującej dyskusji, czy wykazana przez Doktorantkę interakcja farmakokinetyczna może mieć (poza aspektem analitycznym) znaczenie terapeutyczne u ludzi i u zwierząt.

Powyższe drobne uwagi nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny dysertacji. Jest to przykład kompleksowo przeprowadzonego projektu badawczego, do którego motywacją jest rzeczywisty problem społeczny. Metody opracowane w ramach pracy mogły być od razu wdrożone w praktyce, ocena zagrożenia przy ich użyciu stanowi część pracy, a przeprowadzone badania farmakokinetyczne są dodatkowym uzupełnieniem dającym pełniejsze zrozumienie przyczyn podwyższonego stężenia antybiotyków.

Podsumowując, praca doktorska mgr Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego o istotnej nowości naukowej, jak również wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę aplikacyjność przeprowadzonych badań, wdrożenie ich do rutynowych analiz, jak również wskaźniki bibliometryczne artykułów składających się na dysertację, z przyjemnością wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej do recenzji pracy.

Lublin, 17 października 2016.