

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP

w Lublinie

Ocena

rozprawy doktorskiej Pana Tomasza Bładka p.t. „Wpływ infekcji *Actinobacillus pleuropneumoniae* na farmakokinetykę tkankową tulatromycyny u świń”

Recenzowana rozprawa ma formułę odbiegającą od przyjętego stereotypu, ponieważ Autor wykorzystał w niej, w miejsce tradycyjnego maszynopisu książki, wyniki badań opublikowanych cząstkowo w czasopismach naukowych zagranicznych i krajowych. Taki scenariusz, coraz powszechniej dzisiaj wykorzystywany, dopuszcza ustawa z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2 i 4 (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), zgodnie z którą może on stanowić podstawę ubiegania się kandydata o nadanie stopnia naukowego doktora.

W skład cyklu publikacji wchodzi 5 prac oznaczonych symbolami D1-D5, spośród których jedna jest artykułem przeglądowym (D1) opublikowanym w krajowym czasopiśmie weterynaryjnym, natomiast pozostałe (D2-D5) to prace oryginalne, opublikowane w anglojęzycznych czasopismach krajowych i zagranicznych zamieszczonych w bazie JCR. Łączny współczynnik wpływu (IF) prac wchodzących w skład cyklu wynosi 5,343, natomiast sumaryczna punktacja czasopism zgodnie z wykazami MNiSW wynosi 99. W trzech publikacjach, w tym w artykule przeglądowym Doktorant jest pierwszym autorem, w pozostałych dwóch odpowiednio trzecim i drugim autorem. Biorąc pod uwagę tematykę poszczególnych publikacji, w tym zwłaszcza prac eksperymentalnych można przyjąć, że stanowią one cykl spójny tematycznie, na co zwraca się uwagę w cytowanej Ustawie.

Przedstawione dane bibliometryczne świadczą nie tylko o wysokiej randze czasopism w jakich Doktorant opublikował wyniki swoich badań, ale stanowią także dowód ich wysokiego poziomu naukowego. W tym kontekście dokonywanie odrębnej oceny przedstawionego przez Doktoranta cyklu publikacji wydaje się zbędne. Każda z nich przed opublikowaniem przeszła bowiem szczegółowy proces weryfikacyjny pod kątem wymagań stawianych pracom oryginalnym przez redakcje poszczególnych czasopism. Dodatkowo poddawane były one niezależnej ocenie merytorycznej jednego lub kilku recenzentów będących przeważnie autorytetami w dziedzinie wiedzy, w której mieszczą się publikowane badania. Niezależnie od tych ocen założenia badań będących podstawą cyklu publikacji podlegały weryfikacji przez ekspertów NCN zważywszy, że były one finansowane przez NCN w ramach projektu badawczego. Zadaniem recenzenta w przypadku takiej formuły rozprawy doktorskiej jest natomiast, zgodnie z zapisami odnośnego rozporządzenia, ocena indywidualnego wkładu kandydata do stopnia naukowego w powstanie pracy zbiorowej a także wykazanie, że oceniany cykl publikacji dowodzi kompetencji Doktoranta w zakresie formułowania koncepcji i hipotez badawczych, umiejętności planowania badań naukowych, wykonywania prac eksperymentalnych, analizy wyników badań i wyciągania wniosków. Spełnienie tych kryteriów stanowi dowód dojrzałości pracownika naukowego jako badacza, co jest jednym z warunków ubiegania się o stopień naukowy doktora.

W opisowej części rozprawy Autor w skróconej wersji odtworzył tradycyjny układ pracy doktorskiej bazując na informacjach zawartych w publikacjach wchodzących w skład cyklu. Wyeksponowane zostały zatem rozdziały: wstęp, cel i zakres pracy, metodyka badań, omówienie wyników, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz piśmiennictwa. Rozprawę poprzedza wykaz skrótów użytych w tekście, co ułatwia późniejsze czytanie. Pomimo niewątpliwych korzyści jakie wnosi taki rozdział, z niektórych rozwinięć skrótów można było zrezygnować z uwagi na powszechność ich stosowania, np. rRNA, Ryc., UE.

Wstęp podzielony został na kilka podrozdziałów, w których Doktorant opisuje m.in. możliwości wykorzystywania tulatromycyny w terapii chorób zakaźnych układu oddechowego u różnych gatunków zwierząt, właściwości fizykochemiczne antybiotyku, mechanizm działania przeciwbakteryjnego, biodostępność oraz pozostałości leku w tkankach zwierzęcych. Odrębny podrozdział dotyczy pleuropneumonii świń stanowiącej model zakażenia, w odniesieniu do którego badano farmakokinetykę tulatromycyny. Doktorant odniósł się także do wpływu zakażenia na farmakokinetykę leków, co było także tematem jednej z prac włączonych do cyklu stanowiącego dzieło podlegające ocenie.

Doktorant sprecyzował 4 cele swoich badań. Obejmowały one opracowanie procedur oznaczania tulatromycyny w osoczu świń oraz pozostałości antybiotyku w tkankach i narządach, ustalenie czy zakażenie *App* ma wpływ na farmakokinetykę tulatromycyny i jej dyspozycję w płucach oraz określenie czy zakażenie *App* ma wpływ na farmakokinetykę tkankową tulatromycyny i profil jej zanikania w tkankach jadalnych świń. Realizacji poszczególnych celów odpowiadają wyniki badań zawarte w pracach eksperymentalnych oznaczonych D2-D5.

W badaniach wstępnych Doktorant wykonał serię eksperymentów zmierzających do optymalizacji metod oznaczania tulatromycyny w osoczu i tkankach świń oraz procedur przygotowania próbek do analizy instrumentalnej. Efektem tych badań było opracowanie odrębnych metod analitycznych, z których jedną wykorzystywano do oznaczania zawartości tulatromycyny w osoczu, a drugą do oznaczania pozostałości antybiotyku w tkankach i narządach świń. Wyniki tych badań opisano w publikacjach oznaczonych D2 i D3.

Ważnym elementem recenzowanej rozprawy doktorskiej był wybór modelu zwierzęcego i modelu zakażenia do realizacji badań z użyciem tulatromycyny. Zasadność wyboru dokonanego przez Doktoranta można uzasadnić m.in. powinowactwem antybiotyku do tkanki płucnej, a także faktem kumulowania się tulatromycyny w neutrofilach, makrofagach, komórkach oskrzelowych i komórkach płynu pokrywającego nabłonek dróg oddechowych. Warto także uświadomić sobie fakt narastania oporności na makrolidy, co potwierdzono w krajach Europy, także w Polsce i wynikającą z tego konieczność zwiększenia rozwagi w stosowaniu tej grupy antybiotyków. Odnośnie badań farmakokinetyki tkankowej tulatromycyny na modelu *App* wiadomo, że zdolność i zakres penetracji antybiotyku do miejsca, w którym toczy się proces zapalny jest ważna w kontekście jego przenikania do mięszu płucnego i światła oskrzeli, co jest jednym z wyznaczników skuteczności działania leku. Ponadto, możliwość określania stężenia antybiotyku w materiale z dróg oddechowych jest przydatna w praktyce klinicznej. W tym zakresie wiedza nt. farmakokinetyki leku ma istotne znaczenie.

Interesującą z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia koncepcją badawczą Doktoranta było wprowadzenie do przyjętego modelu doświadczenia trzeciej niewiadomej w postaci zarazka, w tym przypadku *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Nie tak dawno stwierdzono, że z punktu widzenia skuteczności działania antybiotyku, prócz procesów farmakokinetycznych zachodzących na linii lek-makroorganizm istotne są także procesy

zachodzące na linii lek-drobnoustrój, od których zależy m.in. koncentracja antybiotyku w miejscu wiązania w komórce bakteryjnej. Dotyczą one np. zdolności przenikania leku przez błonę zewnętrzną bakterii, szybkości z jaką ten proces przebiega, penetracji leku przez błonę cytoplazmatyczną, charakteru procesów transportu itp. Różnice stwierdzone w tym zakresie pomiędzy antybiotykami należącymi do różnych grup dały podstawę do ich podziału na związki, których skuteczność zależy od maksymalnego stężenia uzyskiwanego w otoczeniu bakterii bez względu na czas utrzymywania się tego stężenia oraz leki, dla których maksymalne stężenie nie jest istotne, a podstawowe znaczenie ma czas utrzymywania się stężenia przekraczającego wartości MIC. Wprawdzie nie wszystkie elementy wspomnianych procesów farmakokinetycznych zostały uwzględnione w recenzowanej rozprawie doktorskiej, tym niemniej analiza wyników badań przedstawionych w załączonych pracach oryginalnych daje przekonujący obraz farmakokinetyki tkankowej tulatromycyny u świń zakażonych *App*.

Badania wykonano na 50 warchlakach w wieku 8 tyg., które podzielono na 2 grupy liczące po 24 zwierzęta, tj. grupę „zdrową” i zakażoną *App*. Dwa warchlaki zdrowe, którym nie podawano antybiotyku służyły jako kontrola próbek materiału wolnego od pozostałości tulatromycyny. Świniom z grupy pierwszej, nie zakażonej, podawano tulatromycynę w postaci preparatu do iniekcji Draxxin w dawce 2,5 mg/kg m.c. natomiast w grupie drugiej antybiotyk podawano po upływie 3-4 godz. po donosowym podaniu zawiesiny *App* zawierającej $3,5 \times 10^7$ CFU/ml.

Parametry farmakokinetyczne, wyznaczone przy użyciu programu Biokinetica 4,0, wraz z ich interpretacją opisano w publikacjach oznaczonych D4 i D5. Uzyskane wyniki poddawano analizie statystycznej testem t-Studenta dla prób niezależnych.

W publikacji oznaczonej D2 Doktorant przedstawił wyniki badań dotyczących opracowania metody oznaczania tulatromycyny w osoczu świń. Dokonano optymalizacji warunków rozdziału chromatograficznego badanych próbek oraz przeprowadzono niezbędne procedury walidacyjne. Uzyskane wyniki dowodzą przydatności opracowanych metod do badania zawartości tulatromycyny w osoczu świń. Krótki czas trwania procedury, łącznie z przygotowaniem próbek zapewnia możliwość wykonywania seryjnych oznaczeń w ciągu jednego dnia roboczego.

Analogiczną metodę z wykorzystaniem techniki LC-MS-MS zaadaptowano do oznaczania tulatromycyny w tkankach i narządach świń. Badania z użyciem tej metody posłużyły do oznaczania pozostałości antybiotyku w materiale biologicznym oraz określenia wpływu zakażenia *App* na parametry farmakokinetyki tkankowej tulatromycyny w odniesieniu do narządów świń. Wyniki uzyskane w tej części badań opublikowano w pracy oznaczonej D3.

W badaniach dotyczących wpływu zakażenia *App* na farmakokinetykę tulatromycyny oraz dyspozycję antybiotyku w płucach świń wykazano, że ulega on szybkiej absorpcji z miejsca iniekcji i już po 6 godz. osiąga maksymalne stężenie w osoczu tak u świń zdrowych jak i zakażonych. Inaczej natomiast przedstawiały się wskaźniki farmakokinetyczne w odniesieniu do płuc, w których maksymalne stężenie tulatromycyny u świń zdrowych pojawiało się po 12 godz. natomiast w grupie świń zakażonych dopiero po 48 godz. Z tej części badań jednoznacznie wynika, że zakażenie *App* istotnie wpływa na farmakokinetykę tulatromycyny u świń. Oddziaływanie to, poza wpływem na czas osiągnięcia maksymalnego stężenia w tkance płucnej, dotyczy m.in. stopnia ekspozycji na lek oraz czasu jego utrzymywania się w osoczu i płucach. W badaniach wykazano wolniejszą eliminację antybiotyku z osocza i tkanki płucnej świń zakażonych *App* w porównaniu do badanych tkanek zwierząt zdrowych. Należy zatem wnioskować, że zakażenie układu oddechowego

świń wywołane przez *App* prowadzi do zmiany profilu farmakokinetyki tulatromycyny, co wyraża się zwiększeniem wskaźnika AUC w osoczu i płucach oraz wydłużeniem procesu eliminacji leku z organizmu.

Ostatnia część badań Doktoranta, odnosząca się do farmakokinetyki tkankowej tulatromycyny oraz profilu zanikania antybiotyku w tkankach jadalnych świń, ma istotne znaczenie z punktu widzenia zdrowia konsumenta i zdrowia publicznego. W badaniach tych wykazano, że zakażenie *App* wpływało na profil farmakokinetyki leku poprzez zwiększenie wskaźnika AUC w mięśniach, nerkach, wątrobie, skórze i tłuszczu oraz w miejscu iniekcji. Największe różnice w wartościach AUC wykazano w odniesieniu do wątroby (wzrost parametru o 118%). Wykazano także, że zakażenie wpływa na czas eliminacji antybiotyku z tkanek jadalnych wydłużając go średnio o 13-21%. Wyniki te dowodzą odmienności profilu zanikania pozostałości tulatromycyny u zakażonych świń w porównaniu do zwierząt zdrowych. Tezę tę potwierdzają porównawcze zestawienia stężeń antybiotyku w wybranych tkankach jadalnych z wyznaczonymi wartościami MRL. Wprawdzie w przypadku nerki i wątroby stężenie tulatromycyny w całym okresie doświadczenia i w obydwu grupach doświadczalnych układało się poniżej wartości MRL, jednak w przypadku innych tkanek jadalnych, takich jak mięśnie oraz skóra z tłuszczem wartości wyższe od MRL utrzymywały się przez 2-5 dni od podania leku. Warto jednak zaznaczyć, że stwierdzone przekroczenia wartości MRL miały miejsce jeszcze przed upływem wyznaczonego okresu karencji, wynoszącego 13 dni, co jest istotne z punktu widzenia zdrowia konsumenta.

Przeprowadzone badania wskazują na długi okres półtrwania w fazie eliminacji antybiotyku z tkanek świń zdrowych i zakażonych *App*. Zakażenie *App* istotnie wpływało na farmakokinetykę tkankową leku także poprzez wydłużenie procesu jego eliminacji z tkanek. Zakażenie przyczynia się także do wydłużenia okresu zanikania pozostałości antybiotyku w tkankach i narządach świń, o czym świadczy wyższe stężenie leku w badanych tkankach w końcowych punktach czasowych doświadczenia, tj. po 360 i 792 godz. od podania antybiotyku.

Z przeprowadzonych badań Doktorant wyciągnął 4 wnioski. Trzy pierwsze wnioski odnoszą się bezpośrednio do wykonanych badań. Spośród nich wniosek 2 i 3 dotyczy istoty badań własnych, tj. oceny wpływu zakażenia *App* na farmakokinetykę tkankową tulatromycyny. Wniosek 1 odnosi się do części metodycznej oznaczania tulatromycyny w osoczu i tkankach świń, w ramach której opracowano i zwalidowano metody oparte na technologii LC-MS-MS, które spełniały międzynarodowe wymagania analityczne. Wniosek 4, w którym Doktorant sugeruje konieczność prowadzenia dalszych badań dotyczących wpływu stanów chorobowych na farmakokinetykę tkankową leków przeciwbakteryjnych stosowanych w medycynie weterynaryjnej ma raczej charakter ogólny i nie wynika wprost z przeprowadzonych badań własnych. Wskazuje on jednak na możliwość wzięcia pod uwagę także innych modeli doświadczalnych, w oparciu o które można będzie badać wpływ różnych drobnoustrojów oraz wywoływanych przez nie zakażeń na losy różnych chemioterapeutyków u zwierząt.

Z uwagi na zbiorowe autorstwo cyklu prac, którego część stanowi podstawę ubiegania się doktoranta o nadanie stopnia naukowego doktora, integralną część rozprawy doktorskiej stanowią oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac eksperymentalnych. Z załączonych oświadczeń wynika, że w przypadku większości publikacji współautorski udział doktoranta był większościowy i wynosił od 55%-95%. W tym zakresie wkładu pracy mieścił się udział w opracowaniu metody analitycznej, walidacji metody, prowadzeniu doświadczeń na zwierzętach, wykonywaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji wyników badań i pisaniu publikacji. Indywidualny udział pozostałych współautorów, w liczbie od 1-3 w zależności od publikacji,

był zróżnicowany i wahał się od 45%-5%. Wkład pracy współautorów polegał na współudziale w wykonywaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji wyników badań oraz korekcie redakcyjnej tekstu. Największy wkład własny współautorów, wynoszący 45% dotyczył publikacji, w której Doktorant jest trzecim współautorem spośród trzech autorów pracy. Analiza dołączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeń współautorów wskazuje na dominujący udział Doktoranta w pracy na każdym z etapów realizacji cyklu publikacji. Warty podkreślenia jest większościowy wkład pracy kandydata do stopnia naukowego w tworzenie koncepcji badań, precyzowanie celu pracy, wykonywanie analiz laboratoryjnych, a także interpretację uzyskiwanych wyników i pisanie prac. Analiza i ocena przytoczonego zestawienia procentowego wkładu pracy współautorów w powstawanie poszczególnych prac eksperymentalnych upoważniają recenzenta do stwierdzenia, że Doktorant jest w pełni uprawniony do uznawania prezentowanego cyklu publikacji jako podstawy ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora na podstawie rozprawy naukowej stanowiącej część pracy zbiorowej.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na drobne i bardzo nieliczne nieścisłości dotyczące nomenklatury wykorzystywanej w opisowej części rozprawy. Przykładowo, określenia „bakterie aerobowe i anaerobowe” można zastąpić bakteriami tlenowymi i beztlenowymi. „Kapsułę” można zastąpić otoczką. Użyty w tytule rzeczownik „infekcja” można zastąpić zakażeniem. Nieścisłość pojawiła się na str. 18, na której widnieje zapis: „osocze od świń z obu grup pobierano z żyły czczej doczaszkowej ...”. Winno być „próbki krwi ... pobierano ...”. Te uwagi mają oczywiście wyłącznie charakter porządkowy.

Podsumowując uważam, że recenzowana praca doktorska dotyczy interesującego, z poznawczego i praktycznego punktu widzenia, problemu wpływu zakażeń bakteryjnych na farmakokinetykę antybiotyków. Analiza i ocena prac eksperymentalnych ujętych w rozprawie dowodzi oryginalności rozwiązań problemu naukowego, a także ugruntowanej wiedzy doktoranta w dziedzinie farmakologii. Świadczy także o doskonałym opanowaniu metodyki badań naukowych, zwłaszcza w odniesieniu do badań farmakokinetycznych, co stanowi jeden z atrybutów umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w dziedzinie wiedzy, którą reprezentuje. Zaprezentowane badania otwierają nowy rozdział w badaniach farmakokinetyki leków przeciwbakteryjnych, dotyczący wpływu zakażeń różnymi drobnoustrojami na dystrybucję i utrzymywanie się leków w tkankach zwierzęcych. Przedstawiony w pracy doktorskiej model eksperymentalny w praktyce można zaadaptować do innych układów doświadczalnych, obejmujących antybiotyki należące do innych grup oraz zakażenia wywoływane przez inne drobnoustroje.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pana Tomasza Bładka p.t. „Wpływ infekcji *Actinobacillus pleuropneumoniae* na farmakokinetykę tkankową tulatromycyny u świń” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Pana Tomasza Bładka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktualność problematyki badawczej ujętej w recenzowanej rozprawie doktorskiej, spójność koncepcji badań oraz rzetelność ich realizacji wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Lublin, 7 lipca 2017 r.


Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki