

Wrocław 25. 10. 2016 r.

Prof., dr hab. Marcin Światała
Katedra Biochemii, Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego We Wrocławiu

**Recenzja pracy doktorskiej
mgr inż. Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej**

pt. „Występowanie leków przeciwbakteryjnych w systemach dozowania wody dla drobiu -
analityka i ocena zagrożeń”

wykonanej w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego -
Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab.
Andrzeja Posyniaka i promotora pomocniczego dr Tomasza Śniegockiego

Podstawą formalną podjęcia się niniejszej recenzji jest prośba o jej wykonanie przez Komisję
Doktorską powołaną przez Radę Naukową Państwowego Instytutu Weterynaryjnego -
Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zgodnie z uchwałą z dnia 23. 04. 2014 r. , o
której zostałem powiadomiony przez przewodniczącego tejże Komisji prof. dr hab. Dariusza
Bednarka w piśmie z dnia 20.09. 2016 r.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej ma formę
spójnego tematycznie zbioru 5-ciu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych
określonych przez ministra właściwego do spraw nauki zaopatrzonego w szerokie
opracowanie wprowadzające w formie maszynopisu.

Wg opisu autorki w skład zbioru artykułów wchodzi cztery współautorskie prace oryginalne oraz
jedna praca przeglądowa, których bibliografię wymieniono poniżej wraz z podaniem w na-
wiasie punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz współczynnika wpływu
IF:

praca nr 1. **Gbylik-Sikorska M.**, Posyniak A., Śniegocki T., Zmudzki J.: Liquid
chromatography-tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of
antibiotic residues in water samples from water supply systems in food-producing animal
farms. *Chemosphere* 2015, 119, 8-15. (liczba pkt. MNiSW = 35; IF = 3,340)

praca nr 2. Piątkowska M., **Gbylik-Sikorska M.**, Olszewska M., Gajda A., Posyniak A.:
Stosowanie nielegalnych antybiotyków w wodzie na fermie niosek jaj konsumpcyjnych - opis
przypadku. *Pasze przemysłowe* 2015, 28-32. (liczba pkt. MNiSW = 3)

praca nr 3. **Gbylik-Sikorska M.**, Posyniak A., Śniegocki T., Sell B., Gajda A., Sawicka A.,
Tomczyk G., Zmudzki J.: The effect of doxycycline concentrations increased in chicken
tissues as consequence of permanent exposure to enrofloxacin traces supplied with drinking
water. *Journal of Veterinary Research* 2016, 60, 293-299. (liczba pkt. MNiSW = 15; IF =
0,468)

praca nr 4. **Gbylik-Sikorska M.**, Posyniak A., Śniegocki T., Sell B., Gajda A., Sawicka A.,
Olszewska-Tomczyk M., Bładek T., Tomczyk G., Zmudzki J.: Influence of enrofloxacin
traces in drinking water on doxycycline tissue pharmacokinetics in healthy and infected by
Mycoplasma gallisepticum broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology* 2016, 90, 123-

129. (liczba pkt. MNiSW = 35; IF = 2,895)

praca nr 5 Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., Gajda A., Piątkowska M., Gaweł M.:

Występowanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych w wodzie pochodzącej z systemów pojenia drobiu. *Pasze Przemysłowe* 2014, 48-53. (liczba pkt. MNiSW = 3)

Jak wynika z ww. przeglądu, trzy prace opublikowane zostały w języku angielskim w renomowanych czasopismach z listy Journal Citation Reports: *Chemosphere*, *Food and Chemical Toxicology* i *Journal of Veterinary Research*, a dwie napisane po polsku, zamieszczono w czasopiśmie krajowym *Pasze Przemysłowe* wydawanym przez Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie i Krajowe Laboratorium Pasz w Lublinie.

Wszystkie prace przed publikacją zostały poddane recenzji.

Łącznie za ww. prace autorka uzyskała 91 pkt. MNiSW i IF = 6,703

Trzeba zaznaczyć że we wszystkich pracach opublikowanych w czasopismach z IF **mgr inż. Małgorzata Gbylik-Sikorska jest pierwszym autorem wskazanym do korespondencji**, co świadczy o jej kluczowej roli w opracowaniu naukowym tych prac. Pierwszym autorem jest również w przeglądowej pracy nr 5.

Z dołączonych do dokumentacji oświadczeń współautorów wynika, że we wszystkich przedstawionych pracach udział mgr inż. Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej jest znaczący i wynosi odpowiednio wg kolejności wymienienia : 80%, 50%, 70%, 55% i 80%.

We wszystkich publikacjach autorka brała udział w analizach laboratoryjnych, interpretacji wyników, napisaniu manuskryptów i korekcie po recenzjach.

Opracowanie wprowadzające załączone w formie maszynopisu ma 41 stron, z czego 14 stron zajmuje wstęp i 12 stron omówienie treści a zwłaszcza wyników ww. prac a 5 stron wykaz piśmiennictwa. Za kluczowe części tego opracowania należy uznać opis celów badań , wnioski oraz streszczenie zamieszczone w języku polskim i angielskim. Decydują one bowiem o nadaniu całokształtu pracy doktorskiej. W związku z tym zostaną one omówione w końcowej części recenzji.

Wstęp **opracowania wprowadzającego** przedstawia w zasadzie 2 zagadnienia. Pierwsze dotyczy stosowania chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych w lecznic- twie fermowym kur, a drugie zawiera zarys kontroli pozostałości tych leków w produktach zwierzęcych oraz w wodzie pochodzącej z systemów pojenia wraz z przedstawieniem zagrożeń wynikających z braku kontroli tej wody. Zwłaszcza te dwa ostatnie tematy stanowią właściwe i dobrze opracowane wprowadzenie do podjęcia celów pracy i są ściśle związane z tematem pracy doktorskiej. Niektóre części tego opracowania znaleźć można w pracy przeglądowej nr 5. Na uwagę zasługują zwłaszcza te fragmenty, w których autorka opisuje wdrażanie swych badań do rozszerzenia Planu Urzędowej Kontroli Pasz o pobieranie próbek wody z systemów pojenia w celu wykrywania obecności leków przeciwbakteryjnych. Podkreśla ona rolę wdrożenia do takich badań odpowiednio sprawnej metody, którą wraz z współautorami opracowała i opisała w pracy nr 1. Świadomość wartości aplikacyjnej podjętych badań jest oczywiście godna podkreślenia, tym bardziej, że użyta w programie i dopracowana przez autorkę pod względem analitycznym metoda została uznana przez Polskie Centrum Akredytacyjne, zaś próbki uzyskiwane w ramach wdrożonego programu kontroli stanowią istotny element tych badań. Trzeba jednak zaznaczyć, że sam proces wdrożeniowy, ma raczej charakter urzędowy i nie wchodzi w zakres pracy. Wydaje się zatem , że zaliczenie samego cyt. „wdrożenia opracowanej metody oznaczania i wykrywania substancji przeciwbakteryjnych w wodzie do

Urzędowej Kontroli Pasz do jednego z celów (założeń) pracy nie jest trafne, gdyż nie jest to cel ściśle naukowy.

Muszę jednak podkreślić, że w pracach o charakterze przeglądowym lub kazuistycznym, (za taką można uznać pracę nr 2), przedstawienie w ujęciu wieloaspektowym procesu kontrolowania składu wody z systemu pojenia drobiu jest jak najbardziej prawidłowe, gdyż docelowymi odbiorcami tych prac są najczęściej osoby zainteresowane chowem zwierząt, które powinny znać zagrożenia wynikające z braku takiej kontroli.

Część metodyczną **opracowania wprowadzającego** autorka ograniczyła do opisu materiału biologicznego oraz trybu pracy analitycznej w opracowaniu metod analitycznych.

Tradycyjne przedstawienie wyników pracy zastąpiono krótkimi opisami poszczególnych prac.

Praca nr 1 zawiera opis bardzo czułej metody wykorzystującej technikę LC-MS/MS, która pozwala na jednoczesne ilościowe oznaczenie 45 antybiotyków należących do 9 grup chemicznych. Osiągnięciem badań nad metodą jest zoptymalizowanie warunków pracy chromatografu poprzez dobór kolumny, składu fazy ruchomej i warunków rozdzielania oraz pracy detektora (poprzez dobór energii kolizji, potencjału rozproszenia napięć przy wyjściu z komory kolizyjnej i czasu zbierania danych, w celu osiągnięcia optymalnych parametrów pomiarów dla tak różnorodnych pod względem chemicznym substancji. Istotnym wkładem autorskim jest dopracowanie warunków do izolacji badanych substancji z wody pitnej oraz do należytego ich zatężania w próbce poddawanej ostatecznej analizie. Wiarygodność uzyskanych wyników zapewnia walidacja metody wykonana wg norm międzynarodowych. W oryginalnej pracy opublikowanej w 2015 r. w *Chemosphere* te elementy będące jej osiągnięciami naukowymi są szczegółowo opisane. Sama praca ta jest bardzo dobrze dopracowana pod względem edycyjnym.

Praca nr 5, skategoryzowana przez autorkę jako przeglądowa, pokazuje pierwsze wyniki zastosowania omówionej powyżej metody w programie kontroli składu wody pozyskiwanej z systemów pojenia drobiu w ramach Urzędowej Kontroli Pasz. Na wstępnym etapie wdrażania programu (2013r.) przebadano 350 próbek wody z ferm drobiarskich. Efektem pracy było wykazanie obecności chemioterapeutyków przeciw- bakteryjnych w próbkach pochodzących z 32 % ferm deklarujących aktualnie nieużywanie tych leków. Jak podają autorzy, uświadamianie właścicielom ferm przykrych konsekwencji nieczyszczenia systemów pojenia ptaków po zakończeniu terapii, spowodowało ich reakcję, w wyniku której, przy powtórnych badaniach, nie stwierdzono już leków w wodzie do picia na tych fermach. Z załączonych do **opracowania wprowadzającego** nieopublikowanych danych uzyskanych podczas kontroli składu wody pitnej na fermach drobiu w kolejnych latach wynika (ok. 3,5 tys. próbek/rok), że w roku 2014 pozostałości leków w wodzie stanowiły 4% a w roku 2015 tylko 2,5 %, przy czym zawsze dominowały zanieczyszczenia enrofloksacyną i doksycykliną.

Można przyjąć, że pojawienie się tej pracy w 2014 roku w czasopiśmie dostępnym dla dużej grupy właścicieli ferm drobiu, w której w sposób przystępny opisano większość negatywnych skutków pozostawiania antybiotyków w wodzie do picia przyczyniło się istotnie do uświadomienia znaczenia problemu pozostałości chemioterapeutyków w wodzie pitnej.

Praca nr 2 opublikowana, podobnie jak poprzednio omówiona, w czasopiśmie *Pasze przemysłowe* opisuje przypadek znalezienia pozostałości doksycykliny, enrofloksacyny oraz lazalozylu (lek kokcydiostatyczny) w jajach i mięśniach kur niosek, którego przyczyną było najprawdopodobniej nielegalne zastosowanie tych chemioterapeutyków z wodą podawaną przez system pojenia. Praca ta nie może być traktowana jako eksperymentalna gdyż przedstawia, zgodnie z tytułem, opis przypadku. Zwraca ona jednak uwagę potencjalnemu

odbiorcy, że przebadanie wody pitnej również na fermach kur niosek może łatwo ujawnić prowadzenie nielegalnych i kosztownych w efekcie dla właściciela praktyk

Praca nr 3. Do osiągnięć tej pracy należy zaliczyć :

1. Opracowanie wysoce czułej metody wykorzystującej technikę LC-MS/MS do jednoczesnego oznaczania w tkance mięśni szkieletowych i wątroby doksycykliny oraz enrofloksacyny i jej metabolitu ciprofloksacyny oraz

2. Ujawnienie na młodych kurczętach interakcji pomiędzy tymi lekami w doświadczeniu symulującym podawanie lecznicze doksycykliny (20 mg/kg przez 5 dni) w warunkach przyjmowania wraz z wodą małych stężeń enrofloksacyny (0,5 mg/L). Wynikiem tej interakcji jest pozostawanie doksycykliny w tkankach badanych zwierząt w prawie dwukrotnie wyższych stężeniach w porównaniu z kurczętami, które piły wodę wolną od enrofloksacyny.

Jako najbardziej oryginalne osiągnięcie w opracowanej metodzie autorka wskazuje sposób przeprowadzenia łatwej do zastosowania ekstrakcji typu ciecz/ciecz oraz sposób oczyszczania próbek. Przeprowadzona pełna walidacja wg międzynarodowych norm wskazuje na wysoką jakość i wiarygodność opracowanej metody.

Schemat przeprowadzonego doświadczenia na brojlerach kurzych, a zwłaszcza dobór dawek i stężeń leków oraz czasu pobierania próbek do badań nie budzi zastrzeżeń. Można było jednak opisać bardziej precyzyjnie sposób doustnego podawania doksycykliny, a stężenia tego leku w tkankach zwierząt otrzymujących wodę z enrofloksacyną uznać za wyższe o 100%, a nie jak jest w pracy o 50%. Tłumaczenie mechanizmu tej interakcji jako wynik hamowania metabolizmu doksycykliny nie budzi zastrzeżeń.

Podsumowując, praca nr 3, zawiera bezpośredni dowód na skutki oddziaływań interakcyjnych przez pozostałą w wodzie do picia enrofloksacynę na tkankowe stężenie doksycykliny użytej w celach terapeutycznych. Wyniki te posiadają bardzo ważne znaczenie w dorobku doktorantki.

Praca nr 4.

Badanie przedstawione w tej pracy potwierdza i rozszerza wiedzę o interakcji pomiędzy enrofloksacyną i doksycykliną uzyskaną w pracy nr 3. Schemat doświadczenia jest podobny, z tą różnicą, że badanie stężenia doksycykliny w mięśniach i w wątrobie przeprowadzono w 5-ciu punktach czasowych już w pierwszej dobie po podaniu ostatniej dawki leku oraz po 3 i 6 dniach. Pozwoliło to wykreślić pole pod krzywą i wyznaczyć kilka innych parametrów farmakokinetycznych. Dodatkowo przeprowadzono badanie interakcyjne na zwierzętach zakażonych referencyjnym szczepem *Mycoplasma gallisepticum*. Wyniki potwierdziły pozostawanie w tkankach większych ilości doksycykliny u ptaków przyjmujących wodę pitną zanieczyszczoną enrofloksacyną. U zwierząt zakażonych efekt ten był jeszcze większy. Badania uwiarygodniły zatem istnienie interakcji farmako- kinetycznej enrofloksacyna – doksycyklina, co z naukowego punktu widzenia jest bardzo cenne i nosi znamiona walidacji samych procesów farmakokinetycznych. W pracy nr 4 rozszerzono, w porównaniu z pracą nr 3, dyskusję dotyczącą podłoża zjawisk interakcyjnych, co niewątpliwie wzbogaca naukową wartość tej publikacji. Niestety autorzy nie ustrzegli się ponownie niedokładności w opisanii sposobu dawkowania doksycykliny. (Brak znajomości nazwy produktu zawierającego ten lek uniemożliwia poznanie rekomendowanego przez producenta dawkowania.) Również interpretacja farmakokinetyki doksycykliny u zwierząt zakażonych bez „czystej” dla tego doświadczenia grupy kontrolnej (DC/MC) ogranicza wnioskowanie o zjawiskach zachodzących w kinetyce doksycykliny po samym zakażeniu. Zdziwienie może budzić zaakceptowana przez redakcją *Food and chemical Toxicology* forma wykresów na ryc. 2, z nierealnym sposobem wyrażenia wpływu czasu oraz rezygnacja z zamieszczenia w tab. 1. analizy statystycznej wyników, którą zamieszczono tylko w tekście.

Trzeba jednak zauważyć, że przedstawione uwagi dotyczące pracy 4 nie umniejszają w żaden sposób jej wartości poznawczej.

Ja już wyżej wspomniano za kluczowe dla spójności i nadania całokształtu ocenianej pracy doktorskiej w opracowaniu wprowadzającym uznano opis celów badań, wnioski i streszczenie.

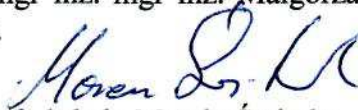
Cel badań nie budzi zastrzeżeń, z wyjątkiem akapitu uznającego jako jedno z założeń pracy wdrożenie metody oznaczania i wykrywania leków przeciwbakteryjnych w wodzie do programu Urzędowej Kontroli Pasz. Stanowisko to uzasadniono powyżej.

Pięć wniosków końcowych można uznać za prawidłowe, choć niewątpliwie „duch wdrożeniowy” pracy występuje we wnioskach nr 1 i 2. Punkt 2. byłby bardziej przekonujący, gdyby został podparty obserwacją zmniejszania się liczby próbek zawierających chemioterapeutyki w wodzie pitnej na fermach po wprowadzeniu urzędowej kontroli jakości wody. Punkt 4 powinien być wyrażony precyzyjniej, bowiem układ doświadczalny pozwala tylko na wyciągnięcie wniosku, w którym czynnik zakażenia występuje na tle interakcji enrofloksacyna – doksycyklina.

Streszczenie pracy nie budzi zastrzeżeń chociaż akapit związany z wdrożeniem kontroli wody pitnej do programu „Urzędowej Kontroli Pasz” można by wzbogacić o informację dotyczącą skutków tego wdrażania (zmniejszenia się liczby próbek pozytywnych) .

W końcowej sentencji stwierdzam, że przesłana mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej pt. „Występowanie leków przeciw- bakteryjnych w systemach dozowania wody dla drobiu - analityka i ocena zagrożeń” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a jej bardzo dobre opracowanie wskazuje na dużą wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie farmakologii weterynaryjnej, a zwłaszcza w dziedzinie analityki leków jako pozostałości, co pozwala sądzić, że posiadała ona także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej .

Są to warunki wymienione w art. 13 ust. 1. ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuk (DZ. U. Nr 65, poz.595 z późn. zm.), które musi spełnić kandydat do stopnia naukowego doktora, aby na podstawie przedłożonej rozprawy przejść do końcowych etapów przewodu. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o jej przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. mgr inż. Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Marcin Świtała