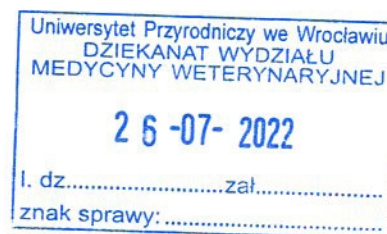


Dr. hab. n. wet. Beata Łebkowska-Wieruszewska - profesor uczelni
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. +48 814456056, +48 509915541
e-mail: lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl



Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers pt.:

**„Wpływ intensywnego wzrostu na eliminację metronidazolu
z tkanek indyków”**

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotor: Prof. dr hab. Marcin Światała

Promotor pomocniczy: dr hab. Błażej Poźniak prof. uczelni

Recenzja została wykonana na zlecenie Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu zgodnie z pismem z dnia 28.06.2022 r. podpisanym przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Weterynaria – Prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego.

1. Ogólna charakterystyka pracy

Prawidłowe stosowanie leków przeciwbakteryjnych oraz przeciw pasożytniczych w dużej mierze wpływa na efektywność terapii oraz bezpieczeństwo konsumentów spożywających produkty pochodzenia zwierzęcego. Obecnie farmakokinetyka stanowi model badawczy służący nie tylko do teoretycznych celów poznawczych nad losami leków w organizmie, ale jest przydatna do precyzyjnego wyznaczania okresu karencji dla leków weterynaryjnych. Prowadzenie badań farmakokinetycznych zgodnie z zasadami GLP stało się możliwe dzięki wprowadzeniu nowoczesnych, czułych i wiarygodnych technik chromatograficznych, które pozwalają wykryć i oznaczyć nawet śladowe stężenia analizowanych leków w badanych tkankach i płynach ustrojowych zwierząt rzeźnych.

Metronidazol (MTZ) to chemioterapeutyk, pochodna 5-nitroimidazolu o właściwościach przeciwprzotniakowych i przeciwbakteryjnych, charakteryzujący się bardzo wysoką skutecznością w stosunku do bakterii beztlenowych Gram-ujemnych i Gram-

dotadnich. W lecznictwie ludzkim stosowany jest od niemalże 70 lat, natomiast w weterynarii ze względu na jego działanie mutagenne jego zastosowanie ograniczono wyłącznie do zwierząt, których tkanki i produkty nie będą przeznaczone do spożycia przez ludzi (psy, koty, konie i gołębie sportowe). Należy podkreślić brak w literaturze szczegółowych danych odnośnie zarówno farmakokinetyki jak i korelacji farmakokinetyczno/farmakodynamicznych MTZ u zwierząt rzeźnych, co po części na pewno jest następstwem w/w obostrzeń jego stosowania. Jednocześnie nie ograniczyło to nielegalnego zastosowania MTZ w produkcji drobiu zarówno w Polsce, jak i krajach Unii Europejskiej. Dlatego tak ważnym z punktu widzenia monitoringu jest pozyskanie danych odnośnie farmakokinetyki i pozostałości w tkankach, które mogą mieć decydujący wpływ na ocenę nielegalnego zastosowania tego leku przez producentów żywności.

W związku z tym, podjęcie badań będących przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej można uznać za celowe, tak ze względów poznawczych, jak i aplikacyjnych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, autorstwa Pani lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers, zatytułowana „Wpływ intensywnego wzrostu na eliminację metronidazolu z tkanek indyków” miała na celu poszerzenie wiedzy odnośnie farmakokinetyki MTZ podanego dożylnie i jego głównego metabolitu w tkankach dwóch grup indyków różniących się istotnie masą (1,5kg i 12kg).

Tematyka jest aktualna i unikalna. Dotychczas w recenzowanych periodykach naukowych spotkać można tylko pojedyncze doniesienia, opisujące farmakokinetykę MTZ u drobiu. Oryginalność podjętej tematyki nie budzi wątpliwości, zwłaszcza w aspekcie oceny wpływu intensywności wzrostu indyków oraz wykorzystania nowatorskich matryc biologicznych do badania pozostałości leków. Co więcej, praca jest kontynuacją wcześniejszych prekursorskich badań własnych, gdzie wykazano, iż z wiekiem ptaków zmniejsza się klirens MTZ, co wpływa na wydłużenie średniego czasu przebywania leku w organizmie oraz generalnie zmniejsza się jego metabolizm. Jest to bardzo ważny aspekt dla konsumenta z punktu widzenia zagrożenia, jako że pośrednio może to być przyczyną narastania oporności bądź pojawienia się efektów toksycznych. Takie podejście do analizy danych bezsprzecznie potwierdza wysoką jakość uzyskanych wyników i stanowi o dobrym metodycznym i merytorycznym przygotowaniu Pani lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers.

Rozprawa ma charakter typowy dla tego typu opracowań i liczy 97 stron w tym 15 rycin oraz 18 tabel. Pragnę podkreślić, że Autorka z wielką dbałością o szczegóły dopracowała stronę

techniczną pracy, która dzięki temu jest przejrzysta i przyjemna w odbiorze. Praca zawiera słowa kluczowe, które będą użyteczne podczas przygotowania publikacji, opartych o dokonane odkrycia.

2. Ocena merytoryczna pracy

We Wstępie liczącym 15 stron, Autorka szczegółowo charakteryzuje MTZ, w tym właściwości fizyko-chemiczne, wykorzystanie w lecznictwie ludzkim i weterynaryjnym, działania niepożądane, farmakodynamikę oraz szczegółowo przytacza nieliczne dane odnośnie profilu farmakokinetycznego oraz pozostałości w tkankach zwierząt laboratoryjnych i zwierząt rzeźnych. Rozdział ten jest dobrze skonstruowaną częścią pracy, dowodzącą znakomitej znajomości badanej tematyki i piśmiennictwa z tego zakresu. Poruszane w tym rozdziale zagadnienia w sposób logiczny korespondują z podjętą przez Doktorantkę tematyką badawczą, a zapoznanie się z nimi ułatwia czytanie kolejnych części rozprawy.

Założenia i cel pracy są sformułowane precyzyjnie, stanowiąc konsekwencję poprzedniego rozdziału i w sposób całościowy ujmują problem, któremu poświęcona jest rozprawa.

Materiał i metody zajmuje 13 stron. Jest to rozdział, który pozwala recenzentowi na szczegółowe poznanie warsztatu badawczego Doktorantki, bazującego na uznanych i powszechnie stosowanych metodach analizy chromatograficznej. Autorka wyczerpująco opisała przebieg doświadczenia, stosowane odczynniki i aparaturę badawczą oraz poszczególne etapy analizy chromatograficznej wraz z jej walidacją umożliwiające oznaczenie MTZ oraz jego głównego metabolitu w 20 matrycach biologicznych pozyskanych od indyków (ciecz wodnista oka, mięśnie, mięsień sercowy, mięśnie Mielca, przełyk, żołądek gruczołowy, dwunastnica, jelito cienkie, jelito ślepe, płuca nerki, trzustka, wątroba, śledziona, grasica, torba Fabrycjusza, mózg, skóra, tłuszcz trzewny, jądra). Liczne ryciny i tabele ułatwiają czytelnikowi zrozumienie kolejnych etapów badania. Sposób prezentacji powyższych danych świadczy o dobrej znajomości przez Panią lek. wet. Karolinę Motykiewicz-Pers opisywanych zagadnień. Z pozycji recenzenta, muszę jednak zwrócić uwagę na zakres walidacji metody chromatograficznej, który można było poszerzyć o dodatkowe wskaźniki walidacyjne pod kątem analizowanych 20 różnych matryc zgodnie z wytycznymi dyrektywy Rady 96/23/WE, dotyczącej wyników metod analitycznych i ich interpretacji (2002/657/WE), jak np. decyzyjna wartość graniczna ($CC\alpha$), zdolność wykrywania ($CC\beta$), efekt matrycy oraz odporność metody,

co podniosłoby jakość przeprowadzonych badań. Możliwość publikacji wyników byłaby jeszcze większe, gdyby Autorka uwzględniła analizę statystyczną oraz analizę parametrów farmakokinetycznych w innym niż Excel (Microsoft Office) programie, rekomendowanym do tego typu badań naukowych (np. Statistica-Statsoft).

Uzyskane rezultaty zostały przedstawione w rozdziale Wyniki, który stanowi najbardziej obszerną część ocenianej rozprawy doktorskiej (27 strony), co jest naturalną konsekwencją mnogości zebranego materiału badawczego. Podział na poszczególne podrozdziały jest utrzymany w jednolitym układzie, a ryciny wykonane według określonego schematu. Wyodrębniono tu porównanie stężenia MTZ a także jego głównego metabolitu w tkankach indyków 1,5kg i 12kg w kontekście ich stężeń w osoczu, przeanalizowano rozmieszczenie głównego metabolitu MTZ w tkankach w obu grupach wiekowych wraz jego procentowym udziałem w puli leku macierzystego wraz z jego metabolitem, ustalono wartość okresu półtrwania MTZ dla fazy eliminacji z poszczególnych tkanek w obu grupach wiekowych. Ponadto przeanalizowano techniką komputerową udział wprowadzonej do organizmu dawki leku w całym doświadczeniu w obu grupach wiekowych ptaków w przestrzeni dystrybucyjnej tworzonej przez mięśnie piersiowe i udowe. Tego typu podejście naukowe pokazuje, jak ważne jest wykorzystywanie innych dostępnych technik, które nie tylko wzbogacają i podnoszą wartość niniejszej dysertacji, ale także pokazują możliwości ich praktycznego zastosowania. Dodatkowo porównano w obu grupach wiekowych indyków wartości sumy molarnych stężeń leku i jego metabolitu w poszczególnych tkankach w punktach wyznaczających średni czas przebywania w organizmie (MRT), który ustalony został we wcześniejszym badaniu własnym. Należy podkreślić fakt, że zagadnienie związane z czasem MRT w literaturze przedstawiane jest od strony matematycznej, jako wyliczenie jednego z parametrów w kinetyce osoczowej, natomiast Autorka podeszła do tematu od strony praktycznej sprawdzając tezę, która zakłada ubytek $2/3$ cząsteczek. Jednocześnie znalazło się tu też odniesienie do odrębnego rozdziału zatytułowanego Dodatek1, który przedstawia stężenia MTZ i jego głównego metabolitu w pozyskanym materiale biologicznym. Logika prezentacji wyników badań jest prawidłowa, mimo, że zawiera bardzo dużą liczbę danych i stanowi idealną podstawę do przygotowania artykułów celem publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Chciałabym podkreślić, że rozdział ten napisany jest na wysokim poziomie, ilość wyników imponująca, opracowanie skrupulatne i ze znajomością zagadnienia.

Autorka wykonała ogrom pracy i dała dowód swojego merytorycznego i metodycznego przygotowania.

Dyskusja, licząca 20 stron pozbawiona jest, tak często spotykanych w rozprawach doktorskich, błędów w postaci niepotrzebnych, powtórnych opisów założeń pracy oraz uzyskanych wyników. Doktorantka skonfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi we wcześniejszych badaniach własnych oraz przez innych autorów i w jasny sposób wyeksponowała oryginalne wyniki własne, co dowodzi dobrego opanowania tematyki badawczej i oczytania oraz umiejętności kierowania logicznym wywodem, w którym ważne miejsce pełni celne dobieranie argumentów z piśmiennictwa naukowego. Poszerzenie i uzupełnienie wiedzy z zakresu kinetyki w osoczu o zbadanie relacji pomiędzy osoczem a tkankami oraz samymi tkankami w wybranych grupach wiekowych stanowi nie tylko uzupełnienie brakującej wiedzy o kinetyce MTZ, ale także daje pogląd na zmiany zachodzące wraz z wiekiem, co może być niezwykle cenną informacją dla stosowania chemioterapeutyków w ogóle.

Wnioski zostały zawarte w 8 punktach, ściśle związanych z celami rozprawy doktorskiej. Z treścią ośmiu wysuniętych wniosków zgadzam się całkowicie.

Bezpośrednio po wnioskach z pracy, Autorka, umieściła Bibliografię, która zawiera listę 69 różnorodnych źródeł bibliograficznych, głównie oryginalnych, tak polskich, jak i międzynarodowych, publikowanych w okresie ostatnich sześćdziesięciu lat. Prace zostały zacytowane w tekście rozprawy według kolejności alfabetycznej. Wszystkie pozycje są ściśle związane z tematem dysertacji, zostały umiejętnie przytoczone i zinterpretowane.

W kolejnym rozdziale Dodatek1, o którym wcześniej wspominałam, przedstawiono w układzie tabelarycznym stężenia MTZ oraz jego metabolitu we wszystkich badanych matrycach biologicznych pozyskanych od indyków.

Następnie opracowano Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim oraz angielskim. Te rozdziały są poprawne i oddają w pełni zawartość pracy, a także są przyjemne w odbiorze.

Rozprawę zamyka tabel oraz spis rycin, które znalazły w tekście odpowiednie odniesienia.

Z pozycji recenzenta mam obowiązek zwrócić uwagę na drobne uchybienia stylistyczne i interpunkcyjne, które pojawiają się w pracy. Nie umniejszają one jednak w żaden sposób wartości pracy. Całość rozprawy oceniam bardzo wysoko. Niniejsze badanie od strony użyteczności klinicznej wskazuje, że stężenia MTZ i jego metabolitu w cieczy wodnistej oka są podobne do tych stwierdzanych w surowicy, co w aspekcie monitoringu jest wysoce użyteczne

w kierunku wykrywania nielegalnego stosowania tego leku u drobiu. Pokazuje to także, jak duży potencjał może mieć wykorzystanie cieczy wodnistej oka. Przyszłościowe opracowanie metod analitycznych dla chemioterapeutyków stosowanych u zwierząt rzeźnych, a także zatwierdzenie ich od strony prawnej, w dużej mierze przyczyniłoby się do poprawy bezpieczeństwa konsumentów. Badania te potwierdziły wcześniejsze ustalenia, że u zwierząt starszych zdolność oczyszczania krwi z leku, głównie przez nerki spada, jednocześnie zmniejsza się objętość dystrybucji a metabolizm ulega spowolnieniu. Ciekawe okazało się przedstawienie kinetyki MTZ i jego głównego metabolitu wyrażonych w formie ich udziału w wielkości wprowadzanej dawki leku w obliczeniach w postaci stężeń molowych poprzez wykorzystanie algorytmu zaczerpniętego z badań innych autorów podobnie jak ocena relacji stężeń leku i jego metabolitu w określonym, dla obu grup wiekowych ptaków, czasie MRT, co potwierdza nowatorskie spojrzenie Autorki na obecnie wykorzystywane modele farmakokinetyczne.

3. Ocena końcowa pracy

Resumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa Pani lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers, zatytułowana „Wpływ intensywnego wzrostu na eliminację metronidazolu z tkanek indyków” stanowi oryginalne, cenne i interesujące opracowanie naukowe, o dużej wartości w obszarze praktycznej medycyny weterynaryjnej. Temat został wybrany właściwie i wpisuje się w najnowsze trendy badawcze.

Rozprawa doktorska Pani lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers spełnia zatem, moim zdaniem, warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki [Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami), w związku z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z dnia 20 lipca 2018 r. z późn. zmianami)] na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz, z uwagi na wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań, proszę o wyróżnienie pracy.

Lublin, dn. 22.07.2022r.


Katedra Farmakologii, Toksykologii
i Ochrony Środowiska UP w Lublinie
Dr hab. Beata Łebkowska-Wieruszewska
profesor uczelni