

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

Olsztyn, 08.09.2022 r.

Katedra Farmakologii i Toksykologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

### Ocena

**rozprawy doktorskiej lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers pt. „Wpływ intensywnego wzrostu na eliminację metronidazolu z tkanek indyków” wykonanej w Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Marcina Świtły i promotora pomocniczego dr hab. Błażeja Poźniaka, prof. uczelni**

Recenzję opracowano w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 28 czerwca 2022 r.

#### 1. Ogólna charakterystyka rozprawy

Recenzowana rozprawa została przygotowana w „formie tradycyjnej” tj. w postaci manuskryptu liczącego 97 stron i posiada typowy układ dla tego typu opracowań. Rozprawa składa się z następujących części a) Spis treści (str. 3-6), b) Wstęp (str. 6-15), c) Geneza i cel pracy (str. 16-17), d) Materiały i metody (str. 18-30), e) Wyniki (str. 31-57), f) Dyskusja (str. 58-77), g) Wnioski (str. 78-79), h) Piśmiennictwo (str. 80-85), i) Dodatek (str. 86-89), j) Streszczenie w języku polskim i angielskim (str. 90-93), k) Spis tabel (str. 94-95), l) Spis rycin (str. 96-97). Tekst manuskryptu został wzbogacony o 18 tabel i 15 rycin. Podjęte przez kandydatkę do stopnia doktora badania dotyczące kinetyki metronidazolu i jego głównego metabolitu hydroksymetronidazolu w osoczu, cieczy wodnistej oka, mięśniu udowym, mięśniu piersiowym, mięśniu sercowym, przełyku, żołądku gruczołowym, żołądku mięśniowym/mielcu, dwunastnicy, jelicie cienkim, jelicie ślepym, wątrobie, nerce, trzustce, śledzionie, grasicy, torbie Fabrycjusza, płucach, mózgu, jądrach, tłuszczu otrzewnowym i skórze indyków o masie ciała ok. 1,5 kg i 12 kg mają walory oryginalności i wnoszą nowy wkład wiedzy z zakresu kinetyki tego leku. Ponadto informacje zaprezentowane w rozprawie wskazują, że lek. wet. Karolina Motykiewicz-Pers posiadała odpowiednie przygotowanie merytoryczne i analityczne do realizacji zaplanowanych badań. Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że pod względem formalnym oceniana rozprawa spełnia kryteria określone 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 sztuki oraz kryteria określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r.

## **2. Ocena merytoryczna pracy**

### **2.1. Sformułowanie problemu naukowego i aktualność tematyki badań**

Metronidazol, należący do grupy 5-nitroimidazoli jest stosowany do leczenia infekcji bakteryjnych wywoływanych przez bakterie beztlenowe (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Helicobacter*) oraz zakażeń pierwotniaczych (*Trichomonas*, *Treponema*, *Histomonas*) występujących u ludzi i zwierząt towarzyszących. Mechanizm działania metronidazolu związany jest z redukcją grupy nitrowej podstawionej w pozycji 5 pierścienia imidazolowego w wyniku czego powstają reaktywne produkty pośrednie uszkodzające DNA, co w konsekwencji prowadzi do śmierci patogenów. Proces ten wymaga niskiego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, który występuje w organizmach z metabolizmem beztlenowym lub ubogim w tlen. Taki mechanizm skutkuje brakiem aktywności wobec bakterii tlenowych, mniejszą wrażliwością komórek zwierzęcych oraz wyjaśnia możliwe działanie mutagenne. Mimo to, że doniesienia na temat działań niepożądanych u ludzi są niejednoznaczne, metronidazol ze względu na potencjalnie działanie genotoksyczne i kancerogenne został wpisany do Tabeli 2 (substancje zakazane) Załącznika do Rozporządzenia Komisji Unii Europejskiej nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. z uwagi na niemożliwość ustalenia maksymalnych limitów pozostałości (maximum residue limit – MRL). Oznacza to, że nie może być on stosowany u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi. Skutkiem tego zakazu jest obowiązek prowadzenia badań kontrolnych pozostałości metronidazolu w żywności pochodzenia zwierzęcego w krajach Unii Europejskiej. Wyniki tych badań wskazują, że mimo zakazu stosowania metronidazolu u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi stwierdzano jego obecność w pobranych próbkach. To nielegalne stosowanie ma miejsce głównie w fermach drobiu z uwagi na niską cenę leku i dużą skuteczność w leczeniu histomonozji oraz zakażeń bakteryjnych wywoływanych przez beztlenowce. Dlatego zaleca się, by nielegalne stosowanie metronidazolu było kontrolowane poprzez analizę zarówno substancji macierzystej jak i głównego metabolitu hydroksymetronidazolu w osoczu lub siatkówce oka, które są łatwe do pobrania, a anality występują w nich w wyższych stężeniach, utrzymują się dłużej i są bardziej stabilne.

Racjonalne dawkowanie oraz czas pozostawiania leku w organizmie określa się w oparciu o badania farmakokinetyczne. Na wyniki tych badań ma wpływ między innymi



gatunek, rasa, płeć oraz wiek zwierząt. Badania farmakokinetyczne w przypadku metronidazolu stosowanego u ptaków, w tym indyków były prowadzone w ograniczonym zakresie. W dużej mierze wynika to z zakazu stosowania metronidazolu u ptaków, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi. Z drugiej strony wiedza w tym zakresie może być podstawą do poszukiwania optymalnych matryc wykorzystywanych w monitoringu oraz interpretacji wyników w przypadku uzyskania wyników dodatnich. Dlatego uważam, że podjęta tematyka jest interesująca i w istotnym stopniu wzbogaca stan wiedzy w zakresie farmakokinetyki metronidazolu u indyków.

## **2.2. Cel rozprawy**

Podstawowym celem pracy było poznanie rzeczywistej dystrybucji metronidazolu i jego głównego metabolitu hydroksymetronidazolu w licznych narządach/tkankach zwierząt o masie ciała 1,5 kg i 12 kg po dożylnym podaniu leku. W przypadku hydroksymetronidazolu odniesiono jego stężenie molowe w każdej matrycy do sumy stężenia molowego leku macierzystego i metabolitu. Dodatkowo w badanych narządach/tkankach obu grup ptaków porównano okres półtrwania leku dla fazy eliminacji. Ponadto ustalono stężenie leku w cieczy wodnistej oka pod kątem ewentualnego wykorzystania tej matrycy w badaniach kontrolnych służących wykrywaniu nielegalnego użycia metronidazolu u drobiu. Przeanalizowano również zmiany udziału metronidazolu i jego metabolitu w mięśniach szkieletowych w odniesieniu do podanej dawki wykorzystując stężenia molowe oraz sprawdzono w jakich relacjach pozostawały stężenia leku i jego metabolitu w przyjętym dla obu porównywanych grup średnim czasie przebywania leku (MRT). W mojej opinii cel badań został wystarczająco jasno zdefiniowany i w pełni zrealizowany.

## **2.3. Poprawność i oryginalność metodyczna**

Metodyka badań wykorzystana do realizacji postawionych celów badawczych została prawidłowo dobrana i nie budzi zastrzeżeń. Sposób przeprowadzenia doświadczeń oraz technika analityczna oparta na wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystana do oznaczenia stężeń metronidazolu i hydroksymetronidazolu w pobranych próbkach są zgodne ze standardami międzynarodowymi stosowanymi w tego typu badaniach.

## **2.4. Znaczenie uzyskanych wyników badań**

Oznaczenie stężeń metronidazolu i hydroksymetronidazolu w osoczu, cieczy wodnistej oka oraz dwudziestu innych tkankach/narządach o odmiennej budowie i funkcji fizjologicznej



pozwoiliło po raz pierwszy na okrelenie rzeczywistej dystrybucji leku i jego metabolitu w organizmie indyków. Wykazano m.in. e stężenia metronidazolu w osoczu, cieczy wodnistej, mięśni piersiowym, mięśni udowym, mięśni sercowym, przełyku, żołądka gruczołowym i mięśniowym, dwunastnicy, wątrobie, trzustce, nerkach, płucach, mózgu, skórze, śledzionie, grasicy i torbie Fabrycjusza były wyższe u ptaków o masie ciała 12 kg w porównaniu z ptakami o masie ciała 1,5 kg. Jednocześnie wykazano, że u ptaków o masie ciała 12 kg w większości badanych tkanek/narządów stwierdzano istotnie niższe stężenia niż w osoczu, co znalazło również odzwierciedlenie w postaci procentowego spadku wartości pola pod krzywą ( $AUC_{me\ 1,25-20h}$ ). U ptaków o masie ciała 1,5 kg nie stwierdzono różnic pomiędzy stężeniem w tkankach/narządach i osoczu lub stężenia te były wyższe (mięsień piersiowy, mięsień udowy, wątroba, trzustka, płuca, mózg, skóra, grasica i torba Fabrycjusza). Z kolei w przypadku mięśnia sercowego, nerek, śledziony, dwunastnicy, jelita cienkiego i ślepego stwierdzono ponad 30% spadek wartości  $AUC_{me\ 1,25-20h}$ . Wykazano również, że wraz z wiekiem metabolizm leku słabnie a wydłuża się czas wystąpienia stężenia maksymalnego metabolitu; w większości tkanek najwyższe stężenia hydroksymetronidazolu stwierdzono u ptaków o masie ciała 1,5 kg po 2,5 godz. a u ptaków o masie ciała 12 kg po 5 godz. Ponadto w większości tkanek obserwowano w 10 godz. odwrócenie proporcji pomiędzy stężeniami metabolitu u ptaków o masie ciała 1,5 kg i 12 kg. Po 15 godz. stężenie metabolitu u ptaków o masie ciała 1,5 kg było istotnie niższe, co wskazuje na szybszy proces metabolizowania leku i szybsze wydalanie w tej grupie ptaków. Potwierdzeniem tego są wyniki wskazujące, że procentowa zawartość udziału metabolitu u ptaków o masie ciała 1,5 kg wynosi ok. 21%, a u ptaków o masie ciała 12 kg 9,2%. Interesujące są wyniki badań stężenia metronidazolu w cieczy wodnistej oka, które wykazały, że u ptaków o masie ciała 1,5 kg stężenia te były istotnie wyższe począwszy od 2,5 do 15 godz. po podaniu leku, natomiast u indyków o masie ciała 12 kg stężenia nie różniły po 1,25 godz. a po 2,5 godz. były istotnie niższe w porównaniu do stężenia stwierdzanego w osoczu. Wyniki te mogą być bardzo przydatne w przypadku wykorzystania cieczy wodnistej oka w badaniach kontrolnych w kierunku wykrywania nielegalnego stosowania metronidazolu u drobiu.

Reasumując, przeprowadzone badania dostarczają szeregu cennych informacji dotyczących kinetyki metronidazolu i hydroksymetronidazolu. Z uwagi za zakres podjętych badań można stwierdzić, że są one wartościowe i mają pionierski charakter z uwagi na brak podobnych badań w dostępnym piśmiennictwie światowym.



## 2.5. Znajomość literatury związanej z tematyką pracy

Analiza dysertacji wskazuje, że lek. wet. Karolina Motykiewicz-Pers dobrze orientuje się w piśmiennictwie powiązonym z podjętą tematyką badań. Ponadto wyniki innych autorów potrafi skonfrontować z wynikami uzyskanymi w ramach badań własnych. Jak już wcześniej wspomniałem wiedza w zakresie farmakokinetyki metronidazolu u drobiu jest ograniczona, co znajduje odzwierciedlenie w niewielkiej liczbie publikacji w dostępnych bazach danych. Szkoda, że kandydatka do stopnia doktora w swojej rozprawie nie uwzględniła dwóch publikacji, które ukazały się ciągu ostatnich pięciu lat:

Tabari MA, Poźniak B, Youssefi MR, Roudaki Sarvandani MR, Giorgi M. Comparative pharmacokinetics of metronidazole in healthy and *Trichomonas gallinae* infected pigeons (*Columba livia*, var. *domestica*). Br Poult Sci. 2021, 62(4):485-491; doi: 10.1080/00071668.2021.1881043).

Pan Y, Yi J, Zhou B, Xie S, Chen D, Tao Y, Qu W, Liu Z, Huang L, Yuan Z. Disposition and Residue Depletion of Metronidazole in Pigs and Broilers. Sci Rep. 2017, 7(1):7203. doi: 10.1038/s41598-017-07443-x.

## 2.6. Uwagi polemiczne

Jak wspomniałem wcześniej recenzowana rozprawa ma typowy układ dla tego typu opracowań jednakże moim zdaniem pewne elementy Dyskusji ze str. 68-70 wraz z Ryc. 4 i 5 powinny być zamieszczone we Wstępie a ze str. 70-71 w Materiałach i metodach oraz Wynikach; w tych ostatnich powinna znaleźć się też Ryc. 6 oraz Tabele 12-13. Takie usytuowanie zwiększyłoby czytelność manuskryptu i ułatwiło jego analizę.

Czytając tekst manuskryptu odnosi się wrażenie, że praca została napisana w pośpiechu, ponieważ ma liczne błędy literowe, interpunkcyjne i stylistyczne, które zaznaczyłem bezpośrednio w tekście. Ponadto chciałbym zwrócić uwagę, że przed ostatecznym przygotowaniem do druku w czasopismach naukowych wyeliminowane winny być nieścisłości, które aktualnie znajdują się w manuskrypcie.

- 1) W odniesieniu do pobranych próbek autorka używa zamiennie słów „próba” i „próbka”; zapis ten należy ujednoczyć do słowa próbka. Podobnie jest w przypadku zapisu jednostki czasu, dla której stosowana jest godzina lub angielski skrót h. Z kolei w przypadku żołądka mięśniowego/mielca stosowane są określenia żołądek mięśniowy, mięsień gładki mielca, mięsień mielca i mielec. Rozbieżności te winny być wyeliminowane.



- 2) Wprowadzone skróty winny być identyczne (obecnie np. dla metronidazolu stosowany jest skrót MTZ lub Mtz) i wprowadzone po raz pierwszy stosowane w dalszej części manuskryptu (obecnie rozwinięcie skrótu AUC i MRT pojawia się wielokrotnie).
- 3) Na str.18 podano, że „Doświadczenie przeprowadzane zostało w dwóch analogicznych rzutach (w 2 kolejnych latach) z zachowaniem tej samej pory roku, aby uniknąć ewentualnej sezonowej zmienności parametrów farmakokinetycznych.” Z przedstawionego opisu nie wynika jasno od ilu ptaków w każdym punkcie czasowym pobierano próbki w poszczególnych latach.
- 4) Na str. 20 jest informacja, że do badań z przewodu pokarmowego pobierano żołądek gruczołowy, żołądek mięśniowy, dwunastnicę, jelito czcze, okrężnicę i jelito ślepe natomiast w wynikach przedstawiono dane dla żołądka gruczołowego, mięśni gładkich mielca, dwunastnicy, jelita cienkiego i jelita ślepego; rozbieżności te winny być wyeliminowane
- 5) Na str. 23 pierwsze odniesie jest do tabeli 3 a dopiero kolejne do tabeli 1; odniesienia do tabel winny mieć charakter chronologiczny. Ponadto w tekście nie ma odniesienia do tabeli 2 a na str. 25 nie podano numeru tabeli w zdaniu „W tabeli przedstawiono dane obrazujące zakres czasów które zajmowały piki uzyskane dla metronidazolu przy stężeniu 50 µg/ml a dla hydroksy-metronidazolu przy stężeniu 25 µg/ml”. W tekście nie ma też odniesienia do tabeli 5 i 6.
- 6) Opis szacowania stopnia skuteczności ekstrakcji tj. odzysku jest mało precyzyjny; nie podano ile powtórzeń wykonano dla każdego badanego stężenia a wyniki zamieszczone w tabelach 5 i 6 sugerują, że wykonano tylko pojedyncze oznaczenia.
- 7) Na str. 31 w zadaniu „1) Porównanie stężenia metronidazolu w tkankach indyków w obu grupach wiekowych (rozdz. 11.1) oraz ich odniesienie do wartości uzyskanych w osoczu (rozdz. 11.2).” jest odwołanie do rozdz. 11.1 i 11.2 a takie nie występują w pracy.
- 8) Na str. 33 znajduje się sformułowanie „Brak istotnej różnicy w mięśni szkieletowym piersiowym pomiędzy poziomem leku w obu grupach po 1,25 godz. od podania metronidazolu można uznać za przypadkowy.” Należy wyjaśnić z czego ta przypadkowość wynikała.
- 9) Na str. 36 podano, że „W nerkach wartość tego ilorazu wynosiła 2,8 zaś...”; w sformułowaniu tym wkraśl się błąd, ponieważ prawidłowa wartość tego ilorazu to 1,6.



- 10) Na str. 43 w zdaniu „W celu precyzyjnego wyrażenia relacji pomiędzy wartością  $t_{1/2}$  w obu porównywanych grupach ptaków w trzeciej kolumnie 3 tabeli 8 ...”; prawidłowe odniesienie dotyczy tabeli 9.
- 11) Na str. 49 zdanie „Wartości AUC<sub>me</sub> 1,25-20h dla ściany jelita ślepego były najniższe w stosunku do innych odcinków przewodu pokarmowego i była wyższa u ptaków 12 kg o 12 % wyższe niż u ptaków 1,5 kg, a w przypadku jelita ślepego wartość AUC<sub>me</sub> 1,25-20h dla ptaków 12 kg była o 36% niższa niż u ptaków 1,5 kg.” winno być przeredagowane, ponieważ aktualnie jest mało precyzyjne.
- 12) Fragment tekstu zawarty w ostatnim akapicie na str. 55 „W grupie ptaków 12 kg wartość obliczanego udziału metabolitu we wszystkich tkankach wahała się ...) jest powtórzony w całości na str.57.
- 13) Tabela 11 jest zbędna ponieważ w dużej mierze jest powtórzeniem tabeli 10.
- 14) Na stronie 67 w zadaniu „Stosunek puli hydroksy-metronidazolu do puli powstałej z sumowania stężeń molowych metronidazolu i tegoż metabolitu jest wyraźnie większy u ptaków młodszych w wątrobie (tab.9).” jest odniesienie do tabeli 9 a powinno być do tabeli 10.
- 15) Różnice statystycznie istotne pomiędzy ptakami o masie ciała 1,5 kg i 12 kg zaznaczone na wykresach oraz w tabelach A1 i A2 winny być zweryfikowane zwłaszcza w odniesieniu do danych, dla których występuje mała różnica pomiędzy wartościami średnimi przy jednocześnie dużym odchyleniu standardowym. Wg moich wrywkowych obliczeń nie wszystkie wskazane na wykresach i w tabelach różnice były statystycznie istotne (np. w przypadku hydroksymetronidazolu po 5 godz. w nerce i torbie Fabrycjusza).
- 16) Ujednolicenia i korekt wymaga sposób cytowania piśmiennictwa w tekście; aktualnie występuje duża dowolność, np. Legator M., S., Connor T., H., Stoeckel M., 1975 (str. 6); F., J., C., Roe 1983 (str. 6); Petrin D i wsp. 1998 (str. 7); Kozinska i wsp. 2017 - praca ta ma tylko dwóch autorów (str. 9); Muler i wsp. 1983 (str. 9) - powinno być Müller i Gorrell 1983; Mair i Yeo, 1987 (str. 10); Hawkins i wsp., 1993 (str. 10); zamiast Patofizjologia 2002 (str. 63 i 65) powinno być Maśliński i Ryżewski 2002 itd. Ponadto nie wszystkie cytowane prace w tekście znajdują się w wykazie [np. Sweeney i wsp., 1991a,b (str. 11) – w wykazie jest tylko 1 praca tych autorów; Grabowski i wsp. 2017 – nie występuje w wykazie) i odwrotnie [np. Cybulski i wsp. 1996 (str. 12) – w wykazie są dwie prace z tego roku; Lamp i wsp. 1999 (str. 81) – pozycja ta jest w



wykazie ale nie ma do niej odwołania w tekście] oraz są rozbieżności w dacie publikacji [np. Sidelmann, U. Gi wsp. 1996 (str. 11) – w wykazie jest rok 1966].

17) W wykazie nie wszystkie prace są zamieszczone w sposób chronologiczny.

18) Streszczenie pracy nie ma podsumowania i kończy się sformułowaniem „Pracę zakończono sformułowaniem 8 wniosków”. Czytając streszczenie niezależnie od całości pracy nie wiemy jakie konkluzje wynikają z przeprowadzonych badań.

19) Wniosek 1 i 3 winien być ograniczony do badań będących przedmiotem rozprawy. Ponadto wniosek 8 jest raczej podsumowaniem i winien być skrócony.

Wszystkie wspomniane powyżej niedociągnięcia mogą być usunięte przy redagowaniu ostatecznej wersji pracy do publikacji w czasopiśmie naukowym i nie rzutują na ostatecznie pozytywną ocenę całości pracy, która wnosi wiele nowych elementów do dotychczasowej wiedzy na temat kinetyki metronidazolu u indyków.

### **3. Wniosek końcowy**

W mojej opinii oceniana rozprawa doktorska lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers pt. „Wpływ intensywnego wzrostu na eliminację metronidazolu z tkanek indyków” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk. Sformułowany cel pracy został w pełni osiągnięty a uzyskane wyniki badań istotnie wzbogacają zakres wiedzy w zakresie kinetyki metronidazolu i hydroksymetronidazolu. Przedstawione w recenzji uwagi polemiczne winny być uwzględnione przy redagowaniu ostatecznej wersji pracy do druku w czasopiśmie naukowym i ostatecznie nie wpływają na pozytywną ocenę całości pracy. Dlatego uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers spełnia wymogi określone 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 sztuki, ponieważ stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w dyscyplinie weterynaria. Biorąc powyższe pod uwagę przedkładam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Karoliny Motykiewicz-Pers do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

