



Prof. dr hab. n. farm. Grzegorz Nałęcz-Jawecki
Zakład Badania Środowiska
Warszawski Uniwersytet Medyczny

OCENA

Pracy doktorskiej mgr Alana Puckowskiego

pt. "Analytics, sorption and ecotoxicological evaluation of mixtures of selected veterinary pharmaceuticals in the aquatic environment"

Substancje czynne leków stosowanych w medycynie i weterynarii stanowią szeroką grupę zanieczyszczeń środowiska wodnego, której badania naukowe rozpoczęły się dopiero na przełomie XX i XXI wieku. Badania naukowe prowadzone są w dwóch kierunkach: analizie występowania i losów tych substancji w różnych elementach środowiska: ściekach, wodzie, osadach i organizmach żywych oraz analizie ich oddziaływania na organizmy żywe. Wagę problemu doceniły organizacje międzynarodowe. Europejska Agencja ds. Leków (EMA) w 2006 roku opublikowała wytyczne do oceny ryzyka środowiskowego leków stosowanych w medycynie, w których zaleciła prowadzenie badań ekotoksykologicznych dla wszystkich noworejestrowanych substancji o przewidywanym stężeniu w środowisku powyżej 10 ng/l. Niedługo później EMA opublikowała zalecenia dotyczące oceny wpływu leków weterynaryjnych na środowisko. Komisja Europejska w 2015 roku (nowelizacja w 2018) wprowadziła wybrane farmaceutyki na listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania obejmującego całą Unię Europejską. **Badania Pana Magistra Alana Puckowskiego przedstawione w rozprawie doktorskiej wpisują się w oba kierunki, zarówno analizy losów substancji czynnych leków w środowisku, jak i ich oddziaływania na organizmy żywe.**

Przygotowana rozprawa stanowi klasycznie napisaną dysertację liczącą 116 stron, podzieloną na wstęp, cel, materiały i metody, wyniki i dyskusję. Na podkreślenie zasługuje bardzo obszerna bibliografia obejmująca 216 pozycji, w większości oryginalnych, aktualnych publikacji naukowych.

Celem ocenianej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wybranych substancji czynnych leków na różne gatunki organizmów wodnych, a także ocena losów tych substancji, a zwłaszcza ich sorpcji na powierzchni mikroplastików.

We wstępie/części teoretycznej pracy Doktorant przedstawił problem zanieczyszczenia środowiska wodnego substancjami czynnymi leków, ze szczególnym uwzględnieniem leków wykorzystanych w części doświadczalnej: antybiotyków z grupy fluorochinolonów oraz środków przeciw pasożytniczych pochodnych benzimidazolu. Leki te określane przez Autora pracy jako weterynaryjne, są wykorzystywane także w medycynie. Cyprofloksacyna w Polsce jest jednym z częściej sprzedawanych antybiotyków, stosowanych u ludzi w chorobach układu moczowo-płciowego, zakażeniach kości, tkanek miękkich, w okulistyce, a także zapaleniu otrzewnej i posocznicy. Stąd, moim zdaniem, tytuł rozprawy oraz wstęp poświęcony zanieczyszczeniu środowiska głównie poprzez hodowlę zwierząt nie oddają pełnego obrazu sytuacji. Antybiotyki weterynaryjne w wielu krajach wykorzystywane są nie tylko w leczeniu chorób, ale także jako promotory wzrostu. Jednakże, w większości krajów europejskich takie stosowanie leków przeciwbakteryjnych zastało zakazane na początku XXI wieku.

Autor przedstawił dotychczasowe badania losów fluorochinolonów i benzimidazoli w środowisku, w tym sorpcję w glebie, osadach oraz degradację. Szczególną uwagę poświęcił omówieniu biodostępności substancji chemicznych, która warunkuje ich działanie biologiczne. Słusznie wskazał na konieczność wykonywania analizy stężeń substancji podczas prowadzenia testów oceny ekotoksyczności, a nie posługiwania się jedynie wartościami nominalnymi stężeń. Postulat ten jest zgodny z wytycznymi wielu organizacji międzynarodowych. Wprowadzając zagadnienie oceny ekotoksyczności Doktorant nie uniknął uproszczeń. Na stronie 24 dokonał podziału na testy oceny toksyczności ostrej (narażenie do 96 godzin) i chronicznej (ekspozycja od zygoty do drugiego pokolenia), który odnosi się tylko do organizmów rozmnażających płciowo. Powinien uwzględnić bardziej ogólny podział, w którym test chroniczny jest testem trwającym przez kilka pokoleń. Wówczas nie popełniłby błędu określając wykorzystywany w pracy 7-dniowy test Lemna – testem ostrym (strona 51), a test 14-dniowy – testem pseudo-chronicznym (strona 52).

W części doświadczalnej pracy Doktorant dokonał oceny działania wybranych pięciu substancji czynnych leków na bakterie, glony, skorupiaki i rośliny wodne. Jest to standardowy, podstawowy zestaw testów ekotoksykologicznych obejmujący wszystkie poziomy troficzne. Autor nie odniósł się do współczesnych postulatów dostosowania zestawu biotestów do przewidywanego mechanizmu działania badanych substancji toksycznych. Przebadanie tysięcy potencjalnie toksycznych związków chemicznych wymaga przeprowadzenia wstępnej selekcji zarówno związków, jak i biotestów. W przypadku substancji czynnych leków istnieją wystarczające przesłanki odnośnie ich działania biologicznego na organizmy żywe. Oczywiście w stosunku do organizmów niższych (jednokomórkowych oraz bezkręgowców) mechanizm ten może być inny niż dla kręgowców. Jednakże, na przykład przeprowadzenie 30 minutowego testu toksyczności ostrej

zamiast testu toksyczności chronicznej na bakteriach w przypadku oceny związków bakteriostatycznych, działających poprzez hamowanie rozmnażania mikroorganizmów, należy uznać za niewłaściwe. Prezentując we wstępie dane z piśmiennictwa dotyczące toksyczności fluorochinolonów Autor niestety nie wskazał, które wyniki zostały uzyskane w testach krótko-, a które w długoterminowych. Omawiając swoje wyniki, na stronie 77 przyznaje, że 24 godzinny test na bakteriach luminescencyjnych byłby zdecydowanie bardziej wskazany. Podobnie, zastosowanie skróconego, 24-godzinnego testu na glonach obejmującego tylko jedno pokolenie organizmów przyniosło zdecydowanie niższą toksyczność fluorochinolonów w porównaniu do danych uzyskiwanych w 72- lub 96-godzinnym teście (Environmental Toxicology and Chemistry 27 (2008):1201-1208). **Na podkreślenie zasługuje natomiast przedłużenie oceny badanych substancji w teście z użyciem rzęsy drobnej *Lemna minor*.** Autor zaobserwował nie tylko dwukrotny wzrost toksyczności norfloksacyny, ale także zmiany kształtu i wielkości frondów, które nie występowały w teście standardowym. Takie obserwacje potwierdzają konieczność stosowania testów długoterminowych do oceny realnego ryzyka środowiskowego.

Oprócz analizy pojedynczych substancji Doktorant podjął próbę oceny działania biologicznego ich mieszanin. Organizmy żywe w środowisku wodnym narażone są na liczne związki toksyczne, których sumaryczne działanie może różnić się znacznie od działania poszczególnych składników mieszaniny. **Badanie mieszanin jest ważnym elementem tej rozprawy doktorskiej i stanowi istotny wkład do ekotoksykologii.** Można mieć jednak zastrzeżenia do opisu wyników. Przedstawione w tabelach w rozdziale 5.2 wyniki EC50 wyrażone są w mg/l, ale nie jest jasne do czego odnosi się to stężenie. Wartości te podane są wraz z przedziałem ufności. Natomiast przewidywana wartość EC50 obliczana była bez podania przedziału ufności. W takim przypadku wnioskowanie czy różnica jest, czy nie jest istotna statystycznie, nie jest możliwe do przeprowadzenia.

Jak słusznie wskazał Autor pracy sorpcja leków, zwłaszcza o charakterze amfoterycznym zależy od wielu czynników, co implikuje konieczność wykonania analiz laboratoryjnych przy ocenie oddziaływania badanych substancji z mikroplastikiem. Rosnące w ostatnich latach zainteresowanie obecnością w środowisku mikrocząstek tworzyw sztucznych spowodowane jest nie tylko ich toksycznością, ale też, jak słusznie zauważył Doktorant, możliwością oddziaływania mikroplastiku z istniejącymi zanieczyszczeniami środowiska wodnego. **Podjęcie tego tematu w ocenianej rozprawie doktorskiej uważam za ważne i nowatorskie.** Doktorant ocenił możliwości sorpcji badanych substancji leków na powierzchni czterech rodzajów tworzyw sztucznych. Zjawisko to analizował w różnych wariantach medium zależnych od pH oraz zasolenia środowiska. Założył, że sorpcja zależy od hydrofobowości związku, czyli wartości współczynnika


podziału oktanol/woda (log Kow). Jednakże, w przypadku związków dysocjujących w wodzie współczynnik ten w znacznym stopniu zależy od pH środowiska i powinien być zastąpiony współczynnikiem zależnym od pH, określanym jako log D. Istnieje szereg programów komputerowych umożliwiających wykonanie niezbędnych obliczeń. Dodatkowo, zastosowane tworzywa sztuczne różnią się hydrofobowością, co także jest ważnym czynnikiem, który powinien zostać uwzględniony. Wartość badań znacznie by wzrosła, gdyby ich Autor, zamiast prostego przedstawienia wyników, przeprowadził głębszą analizę danych uwzględniając oba te parametry.

Patrząc całościowo na przedstawioną do oceny rozprawę należy uznać, że Doktorant w logiczny sposób zaplanował analizy oraz starannie je wykonał. Wyniki omówił i przedyskutował korzystając z najnowszego, światowego piśmiennictwa. Nie ustrzegł się jednak przed popełnieniem kilku błędów: w wykazie skrótów symbolem EE2 określony powinien być nie estradiol, lecz etynyloestradiol; aktualna nazwa bakterii luminescencyjnych to *Allivibrio fischeri*; informacja na stronie 15 dotycząca obecności antybiotyków w stężeniach rzędu mg/l w wodach powierzchniowych, a zwłaszcza morskich, jest zdecydowanie przesadzona.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej. Zaproponowane kompleksowe podejście do analizy ekotoksyczności substancji czynnych leków jest ważnym wkładem do ekotoksykologii.

Podsumowując, wyrażam przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Alana Puckowskiego pt.: "Analytics, sorption and ecotoxicological evaluation of mixtures of selected veterinary pharmaceuticals in the aquatic environment" spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim.

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Alana Puckowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakład Badania Środowiska
Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Brzegoła Nałęcz-Jawecki

Warszawa, 11.03.2019