

Prof. dr hab. Irena Choroszy-Król
Zakład Nauk Podstawowych
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Wydział Nauk o Zdrowiu
ul. Chałubińskiego 4
50-368 Wrocław

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**pt. „AKTYWNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA METABOLITÓW AMOKSYCYLINY
WZGLĘDEM PRZEDSTAWICIELI MIKROBIOTY JELITOWEJ I WYBRANYCH
PATOGENÓW”.**

MGR FARM. MAGDALENY OKONIEWSKIEJ

Przygotowana na zlecenie Dziekanatu Wydziału Farmacji z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu nr 112/11/2018 zgodnie z pismem z dnia 27.09.2018 roku podpisanym przez Panią Dziekan prof. dr hab. Halinę Grajetę

Narastanie oporności bakterii na antybiotyki zależy od różnych czynników związanych ze środowiskiem, gospodarzem, zastosowanym leczeniem lub jednostką chorobową. Najczęstszym powodem powstawania opornych mutantów jest niskie subterapeutyczne stężenie związku w środowisku bakterii. W sprzyjających warunkach powstałe mutacje są wzmacniane i powielane, co w konsekwencji prowadzi do niepowodzenia terapii. Wskaźnikiem, który potwierdza oporność danego patogenu na antybiotyk jest MIC. Jest to minimalne stężenie antybiotyku, które hamuje w sposób widoczny wzrost mikroorganizmu po 24 godzinnej inkubacji. Wartość MIC mówi także o aktywności antybiotyku i jest bardzo przydatna podczas ustalania terapii, ponieważ umożliwia wybór najbardziej skutecznego leku.

Amoksycylina jest antybiotykiem powszechnie stosowanym w terapii zakażeń bakteryjnych zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Odnotowuje się wysokie zużycie tego antybiotyku na całym świecie. W naszym kraju do obrotu dopuszczonych jest około 40 produktów leczniczych zawierających w swoim składzie tą substancję.

W weterynarii amoksycylina znalazła zastosowanie głównie do leczenia chorób drobiu i trzody chlewnej. W organizmie antybiotyk ulega transformacji prowadząc do powstania licznych metabolitów. Z uwagi na mniejszą cząsteczkę powstałe związki są wolniej eliminowane z organizmu, pozostając dłuższy czas w tkankach zwierząt a także człowieka. Podczas wyliczania okresów karencji dla tkanek jadalnych zwierząt uwzględnia się jedynie pozostałość w nich amoksycyliny bez uwzględniania powstałych metabolitów. Taki sposób obliczania okresów karencji może doprowadzić do konsumpcji związków obecnych w pożywieniu pochodzenia zwierzęcego. Powstałe metabolity mogą zostać również uwolnione do środowiska wraz z odchodami zwierząt stanowiąc poważne zagrożenie dla organizmów wodnych oraz roślin. Zarówno substancje pozostające w tkankach jadalnych zwierząt jak i te wydalone do środowiska mogą prowadzić do indukcji oporności bakteryjnej.

Tak więc temat pracy doktorskiej mgr Magdaleny Okoniweskiej uważam za jak najbardziej aktualny, godny opracowania. Zadaniem badawczym doktorantki było określenie aktywności trzech metabolitów amoksycyliny: piperazyno-2,5-dionu amoksycyliny, kwasu amoksycylinowego i kwasu amoksylinowego.

Do oceny otrzymałam egzemplarz pracy liczącej 128 stron druku komputerowego łącznie z tabelami, rycinami i piśmiennictwem. Praca ma typowy układ przyjęty w tego typu opracowaniach. W dobrze napisanym i obszernym wstępie (str. 18-51) autorka opisała: zużycie antybiotyków w lecznictwie ludzi i zwierząt hodowlanych oraz oporność bakterii na antybiotyki. W dalszej części wstępu autorka przedstawiła charakterystykę czterech drobnoustrojów, Gram-ujemnych pałeczek *Escherichia coli*, ziarniaków Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, ze szczególnym uwzględnieniem ich chorobotwórczości, czynników chorobotwórczości i mechanizmów oporności oraz Gram-dodatniej beztlenowej bakterii *Bifidobacterium bifidum*. Ponadto we wstępie pracy doktorantka omówiła budowę i właściwości chemiczne amoksycyliny jej farmakokinetykę, metabolizm oraz mechanizm działania i zastosowanie, a następnie przedstawiła wzory strukturalne i charakterystykę trzech badanych metabolitów; kwasu amoksycylinowego, piperazyno-2,5-dionu amoksycyliny i kwasu amoksylinowego. W tej części pracy podobnie jak w spisie treści, wykazie skrótów i spisie rycin nie udało się autorce uniknąć drobnych błędów literowych.

Następnie autorka jasno sformułowała cel pracy (str. 52), który uważam za ambitny, szeroko zakreślony i perspektywiczny. Zamierzenia badawcze doktorantki dotyczyły m.in. badań aktywności metabolitów względem przedstawiciela mikrobioty jelitowej, badań aktywności metabolitów względem patogenów chorobotwórczych, a także ocenę wpływu długotrwałego oddziaływania metabolitów na bakterie pod kątem wytwarzania przez nie mechanizmów oporności na związek macierzysty czy też badanie szybkości indukcji oporności wśród bakterii oportunistycznych.

W rozdziale materiał i metody (str. 53-75) Autorka przedstawiła otrzymywanie, oczyszczanie i identyfikację 3 związków użytych w badaniach tj. metabolitów amoksycyliny. W rozdziale tym przedstawiono szczegółową charakterystykę wszystkich metod badawczych zastosowanych w pracy łącznie ze schematami ilustrującymi te metody, a

także podano metodę statystyczną opracowania wyników. Na uwagę zasługuje przeprowadzenie identyfikacji otrzymanych związków za pomocą nowoczesnych metod badawczych tj. magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR i ^{13}C NMR oraz za pomocą spektrometrii mas. Ponadto Autorka w badaniach własnych dokonała oznaczenia aktywności związków względem bakterii wchodzących w skład mikrobiomu jelitowego. A także m, in. oznaczyła wpływ badanych związków na wzrost form planktonicznych oraz biofilmowych szczepów *E. coli*, *S. aureus* i *S. pneumoniae*. Rozdział ten pod względem merytorycznym został opracowany bez zastrzeżeń, napisany poprawnym naukowym językiem, co uważam za wartościowe także w aspekcie dydaktycznym. Chociaż autorka nie ustrzegła się w nim drobnych nieścisłości i błędów stylistycznych np. str.64 i 65 ; 96” dołkowe płytki polistyrenowe” proponuję zastąpić to słowem wgłębienia lub studzienki . Str. 56 jest sformułowanie” ogrzewanie pod próżnią” - lepiej zastąpić to ogrzewanie w warunkach próżni. Str.58 w spisie odczynników podano potasu diwodorofosforan, ponieważ praca pisana jest w języku polskim poprawnie należałoby użyć dwuwodorofosforan potasu .

Wyniki badań (str. 76-106) mgr Magdalena Okoniewska przedstawiła w 13 tabelach i na 40 rycinach. Rozdział ten został bardzo dobrze opracowany, na podkreślenie zasługuje czytelne przedstawienie wyników w formie tabel oraz doskonale technicznie wykonane ryciny obrazujące widma badanych metabolitów .

W badaniach własnych autorka użyła 4 szczepy wzorcowe wchodzące w skład naturalnej mikrobioty jelitowej oraz bakterii patogennych : *Bifidobacterium bifidum* ATCC35914, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 oraz *Escherichia coli* ATCC25922. Na podkreślenie zasługuje fakt, że metabolity amoksycyliny, których aktywność badała doktorantka, zostały otrzymane samodzielnie w wyniku rozkładu antybiotyku w kontrolowanych warunkach środowiska. Doświadczenia te Autorka wykonała na trzech metabolitach: kwasie amoksycylinowym, piperazyno -2,5- dionie amoksycyliny, i kwasie amoksylinowym za pomocą technik identyfikacyjnych takich jak spektrometria mas ^{13}C NMR oraz ^1H NMR potwierdziła prawidłowość struktur otrzymanych związków. W badaniu wpływu metabolitów na wybrane bakterie udowodniła, że jedynym związkiem, który wykazywał aktywność przeciw *B. bifidum* oraz formom planktonicznym pozostałych patogenów był kwas amoksycylinowy. Żaden z metabolitów nie wpłynął na zahamowanie wzrostu form biofilmowych w warunkach stacjonarnych. Zaobserwowano natomiast istotny statystycznie wpływ kwasu amoksycylinowego na redukcję ilości biofilmu pałeczek *E. coli* tworzonego w warunkach przepływowych.

W kolejnym etapie badań doktorantka wykazała istotny wpływ metabolitów na nabywanie oporności przez *S. aureus* na amoksycylinę. Po 90 pasażach bakterii na podłożu zawierającym kwas amoksycylinowy wartość MIC antybiotyku wzrosła z 0,094 mg/L do 0,5 mg/L. W przypadku pozostałych związków również odnotowano wzrost tego parametru. Ponadto stwierdzono bardzo duży wpływ substancji na aktywność przeciwdrobnoustrojową antybiotyku. Jakkolwiek żaden z metabolitów nie wykazywał własnego działania hamującego wzrost bakterii w użytym stężeniu 0,5 mg/ml to jednak strefy zahamowania wzrostu wokół krążków nasyconych antybiotykiem i metabolitem były znacznie większe od

tych wokół krążków z samą amoksycyliną. Przeprowadzone badanie pozwoliły także na obserwację szybkości procesu nabywania oporności przez bakterie. Otrzymane wyniki potwierdziły, że w ciągu 9? dni pierwotnie wrażliwa na amokksycylinę bakteria potrafi uodpornić się na antybiotyk w takim stopniu by skolonizować podłoże zawierające stężenie leku przewyższające. jego MIC 500-krotnie.

Chociaż aktywność metabolitów amoksycyliny jest zbyt niska , by mogły one funkcjonować jako samodzielne środki przeciwdrobnoustrojowe, to wyniki przedstawione w tej pracy wskazują, że wspomagają one w znacznym stopniu aktywność związku macierzystego. Słusznie zauważono, że zastosowanie metabolitów w dawkach subterapeutycznych przyczynia się do nabywania oporności przez drobnoustroje na amoksycylinę. Warto zastanowić się nad kontynuacją ww badań , które mogłyby się przyczynić do wyjaśnienia mechanizmów wspomagania aktywności amoksycyliny przez jej metabolity.

W rozdziale omówienie wyników i dyskusja (str. 107-116) doktorantka omawia osiągnięte wyniki badań własnych w świetle badań innych autorów. Dyskusja przeprowadzona jest rzeczowo, dane z literatury przytoczone zostały prawidłowo i świadczą one o krytycznym podejściu do interpretacji wyników własnych, a także dowodzą wszechstronności i umiejętności pracy naukowej Kandydatki.

Na zakończenie pracy Autorka przedstawiła 4 wnioski (str. 116), które są bardzo dobrze sformułowane i mają uzasadnienie w wynikach badań.

Na uznanie zasługuje również opracowane streszczenie pracy (str.14), które w zwięzłym nowoczesnym stylu oddaje meritum pracy.

Piśmiennictwo (str. 117-128) zawiera 136 cytowanych prac , głównie anglojęzycznych. Stanowi ono silną pozycję dyzertacji gdyż jest ściśle tematycznie i pochodzi z ostatnich lat. Na podkreślenie zasługuje to, że (.55.) cytowanych prac zostało opublikowanych w latach 2013-2017. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że mgr Magdalena Okoniewska przytacza prace nie tylko autorów zagranicznych ale także 19 pozycji piśmiennictwa polskiego. Zauważyłam jednak, że w poz.103 i 133 nie podano roku publikacji, a w 27 poz. piśmiennictwa nie uwzględniono wszystkich autorów

Czego można dowiedzieć się z tej pracy doktorskiej; Dowiadujemy się że:

- Metabolity amoksycyliny wykazują własną aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do badanych bakterii.
- Bakterie poddane ekspozycji na metabolity amoksycyliny nabywają utrzymującą się oporność na związek macierzysty. Dlatego też, związki obecne w środowisku mogą przyczyniać się do indukcji oporności szczepów wrażliwych na antybiotyk.
- Metabolity amoksycyliny wyraźnie zwiększają aktywność przeciwdrobnoustrojową antybiotyku.

Bardzo cenna jest konkluzja wysunięta przez autorkę, w końcowej części pracy, która wskazuje na potencjalnie szkodliwy wpływ metabolitów amoksycyliny obecnych w jadalnych tkankach zwierząt oraz w środowisku na zdrowie człowieka.

Czytając pracę doktorską Pani mgr Magdaleny Okoniewskiej zapomina się o obowiązku jej recenzowania – tak dalece Autorka potrafiła zafascynować czytelnika omawianymi zagadnieniami.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca ze wszelkich miar odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, stanowi ona cenny wkład w rozwój wiedzy nad aktywnością mikrobiologiczną metabolitów amoksycyliny względem mikroflory jelitowej wybranych patogenów i dowodzi dojrzałości naukowej Kandydatki. Pragnę podkreślić, że pracę doktorską mgr Magdaleny Okoniewskiej cechuje aktualność omawianej problematyki oraz walory poznawcze i praktyczne. Uważam, że problem naukowy ocenianej pracy został postawiony i rozwiązany prawidłowo. Cel pracy został osiągnięty, uzyskane wyniki stanowiły podstawę do wyciągnięcia rzeczowych wniosków.

W związku z powyższym opiniując pozytywnie omawianą pracę doktorską przedstawiam Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Okoniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wcześniej wymienione zalety tej pracy wnoszę wniosek do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej o jej wyróżnienie.

Wrocław, 28 listopada 2018.