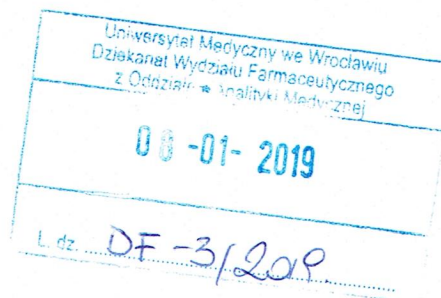




Gdańsk, 02.01.2019 r.

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz  
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Al. Gen. J. Hallera 107  
80-416 Gdańsk



### **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

pt.: *Aktywność mikrobiologiczna metabolitów amoksycyliny względem przedstawicieli  
mikrobioty jelitowej i wybranych patogenów*  
wykonanej przez mgr farm. Magdalenę Okoniewską

Wszechobecna i wciąż narastająca oporność na antybiotyki wśród mikroorganizmów stanowi istotny problem współczesnej medycyny i farmacji o globalnym zasięgu. Kiedyś łatwo uleczalne infekcje bakteryjne czy też grzybicze dziś stanowią poważane zagrożenie dla pacjentów, w szczególności tych, z obniżoną odpornością, po ciężkich zabiegach czy też poddanych immunosupresji. Obecnie, co raz częściej jako przyczynę tej sytuacji wskazuje się nie tylko nieracjonalne zarządzanie antybiotykoterapią w aspekcie klinicznym, lecz również nadmierne stosowanie antybiotyków w różnych gałęziach gospodarczych, m.in. w rolnictwie.

Amoksycylina jest półsyntetycznym antybiotykiem  $\beta$ -laktamowym,  $\alpha$ -aminopochodną penicyliny benzyłowej o szerokim spektrum działania. Jej działanie bakteriobójcze polega przede wszystkim na hamowaniu syntezy ściany komórkowej. Wykazuje ona aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, w związku z tym często stosowana jest w antybiotykoterapii i ujęta jest w wielu schematach postępowania wielolekowego. Ponadto amoksycylina również stosowana jest w rolnictwie – w eradykacji patogenów ludzkich lub też jako promotor wzrostu. W związku z powszechnym i szerokim stosowaniem tego antybiotyku, w środowisku zauważalny jest wzrost jego zawartości jak i jego



metabolitów. Wszeghobecność tych związków, może mieć niebagatelne znaczenie zarówno dla człowieka jak i rozwoju oporności na ten antybiotyk.

Celem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr farm. Magdaleny Okoniewskiej było określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz oddziaływania metabolitów amoksycyliny wobec 4 referencyjnych szczepów bakterii: *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae*. W mojej opinii praca ta i sama jej koncepcja doskonale wpisuje się w nurt aktualnie realizowanych badań naukowych dotyczących tak ważnego zagadnienia jakim jest poszukiwanie nowych dróg walki z antybiotykoodpornością.

Praca posiada typowy układ dla tego typu opracowań. W części teoretycznej, wprowadzeniem do tematyki dział opisujący zużycie antybiotyków w leczeniu ludzi i zwierząt hodowlanych. W opinii Recenzenta sekcji tej poświęcona została zbyt mała uwaga (raptem 1,5 strony). Ponadto, aż prosi się o uzasadnienie wyboru amoksycyliny – stanowiącej podstawę dysertacji oraz uzasadnienia doboru tych konkretnych trzech metabolitów. Następnie dużą uwagę Doktorantka poświęciła zjawisku oporności oraz charakterystyce drobnoustrojów, amoksycyliny oraz metabolitów.

W części *Materiały i Metody* szczegółowo opisane zostały procedury związane z otrzymywaniem metabolitów amoksycyliny, ich identyfikacji oraz przedstawione zostały metody wykorzystane w realizacji badań mikrobiologicznych. Otrzymane przez Doktorantkę związki scharakteryzowane zostały przy użyciu magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektrometrii mas (MS). Wówczas, by móc potwierdzić postawioną hipotezę badawczą wykonano szereg badań mikrobiologicznych obejmujących m.in. wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost, a także określenie wpływu na biofilm tworzony w warunkach przepływowych. Ponadto zbadany został wpływ tych metabolitów na samą aktywność amoksycyliny, a wobec wrażliwych szczepów bakterii wykonane zostało badanie indukcji oporności.

Wyniki prac eksperymentalnych wskazują, iż metabolity amoksycyliny same w sobie wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych szczepów bakterii oraz

są w stanie zaindukować oporność wobec amoksycyliny. W rezultacie, jak prawidłowo zauważyła Doktorantka, metabolity amoksycyliny obecne być w jadalnych tkankach zwierząt oraz środowisku mogą stanowić istotną przyczynę występowania oporności u bakterii na tę grupę antybiotyków. Na uwagę zasługują również liczne ryciny oraz ilustracje przedstawiające rezultaty prac badawczych.

Tym nie mniej, obowiązkiem Recenzenta jest wskazanie uchybień oraz uwag, które w wypadku niniejszej pracy doktorskiej są bardzo liczne. Ponadto należy podkreślić, iż pracę tę czyta się bardzo ciężko oraz brak jest wyraźnego zaznaczenia, które części prac eksperymentalnych wykonywane były przez doktorantkę samodzielnie. Fakt ten bardzo utrudniał rzetelne przygotowanie recenzji. Poniżej opisane zostały ogólnie oraz szczegółowo błędy, na które należy zwrócić szczególną uwagę:

- Bardzo częste błędy edytorskie, począwszy od tytułu pracy, zakończonego kropką, poprzez brak spójności pomiędzy tabelami (te same związki są nazywane w różny sposób), rycinami (m.in. stosowanie różnych czcionek do opisu) czy też m.in. naprzemienne stosowanie pełnych i skróconych łacińskich nazw szczepów drobnoustrojów. Spotykane były również błędy językowe;

- Zauważalne jest również stosowanie dużych i małych liter przy oznaczeniu używanych objętości (raz  $\mu\text{l}$ ,  $\mu\text{L}$ , innym razem ml, mL) oraz naprzemienne stosowanie kropek i przecinków celem rozdzielania wartości dziesiętnych. Co więcej, brak jest spójności pomiędzy skrótami, czy też stosowanie znaku „x” zamiast symbolu iloczynu „×”;

- Brak rozdzielania poszczególnych sekcji (choćby od nowej strony) oraz nagminne stosowanie kolokwializmów (np. „próbkę nastrzyknięto na aparat”, „pałeczka coli”, „uzupełniano danym rozpuszczalnikiem do kreski”), częste powtórzenia dodatkowo wpływają na ogólne wrażenie nieuporządkowania i pośpiechu w realizacji piśmiennej części pracy;

- W części teoretycznej, szczególna uwaga poświęcona została charakterystyce trzech z czterech badanych szczepów (tj. *E. coli*, *S. pneumoniae* i *S. aureus*). Natomiast wręcz marginalnie, w stosunku do pozostałych potraktowany został szczep *Bifidobacterium bifidum*;



- Analiza struktury badanych związków opisana jest w sposób chaotyczny co utrudnia śledzenie tekstu, przykładem może być inna numeracja atomów w cząsteczce piperazyno-2,5-dionu amoksycyliny zaprezentowana na rycinie nr 11 oraz znajdująca się w opisie widma NMR;

- Zastanawiające jest także stwierdzenie w pkt 8.1.1 że mamy do czynienia z mieszaniną izomerów piperazyno-2,5-dionu amoksycyliny, z analiza widm wskazuje, że mamy do czynienia z jednym produktem. Jak jest faktycznie?

- Doktorantka niekonsekwentnie stosuje nomenklaturę badanych związków np. w części doświadczalnej (pkt. 8.1.1) mamy do czynienia z (**5R**)-piperazyn-2,5-dion amoksycyliny lub (**5S**)-piperazyn-2,5-dion amoksycyliny na stronie 79 ten sam związek określany jest jako (**2R**)-amoksycylinopiperazyno-2,5-dion. Zmianie uległa nie tylko nazwa ale także położenie centrum chiralności;

- W przypadku wszystkich 3 produktów konfiguracja centrów asymetrycznych przypisana została na podstawie analizy uzyskanych widm NMR oraz danych literaturowych. Jednakże brak jest do nich odniesienia w tekście co daje wątpliwość poprawnej analizy struktury uzyskanych związków oraz poprawności przypisania konfiguracji

- Często powtarzane jest stwierdzenie dotyczące wymiany protonów grup aminowych, karboksylowych oraz hydroksylowych. To zdanie powtarza się w każdym punkcie dotyczącym analizy związków. Jest to oczywista informacja i wystarczy ją podać raz. Ciekawe jest, że mimo wymiany atomów wodoru na deuter nieobserwowane są na widmach sygnały pochodzące od typowego w tej sytuacji produktu częściowej wymiany w wodzie do HOD o przesunięciu chemicznym 4,7 ppm;

- Opisując widma MS Doktorantka stosuje niepoprawne sformułowania jak na przykład: „pik”, określa jonem molekularnym sygnał, który faktycznie pochodzi od jonu pseudomolekularnego  $[M+H]^+$ . Ponadto stwierdzenie, że analiza MS potwierdza strukturę związków czy też intensywność sygnału  $m/z$  zależy od stężenia jonów jest oczywiście niepoprawne.



Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr farm. Magdaleny Okoniewskiej, pomimo licznych uchybień i ogólnego słabego wrażenia, opisuje interesujące podejście do tematyki występowania oporności na antybiotyki, w tym wypadku na amoksycylinę. Po lekturze dysertacji, można stwierdzić, jak ważna w istocie walki z zakażeniami jest nie tylko kontrola racjonalnego stosowania antybiotyków w aspekcie klinicznym, ale również jak konieczna jest weryfikacja ich stosowania chociażby w rolnictwie czy w hodowli trzody chlewnej. Moim zdaniem, z punktu widzenia naukowca zajmującego się opracowywaniem nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych ważne jest abyśmy w kontekście nowych antybiotyków nie popełniali tych samych błędów.

Uważam, że przedłożona mi do recenzji praca doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu prośbę o przyjęcie wniosku o dopuszczenie Pani mgr. farm. Magdaleny Okoniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej  
*Kamysz*  
prof. dr hab. Wojciech Kamysz