

dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas

Gdańsk, 2020-09-05

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Mileny Wawryniuk

Tytuł: Ocena toksyczności, fototoksyczności i biokumulacji
wybranych leków przeciwdepresyjnych przy użyciu
biotestów wykorzystujących organizmy wodne

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Grzegorz Nałęcz-Jawecki

Promotor pomocniczy: dr Agata Drobniewska

Jednostka: Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział
Farmaceutyczny, Zakład Badania Środowiska

Substancje lecznicze stosowane w farmakoterapii, w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej należą do grupy związków chemicznych, które z natury muszą charakteryzować się wysoką aktywnością biologiczną. Niestety, leki nie kończą swojego „życia” w momencie wydalenia z organizmu, ale w najlepszym przypadku wraz ze ściekami komunalnymi docierają do oczyszczalni ścieków, gdzie podlegają procesom nie zawsze prowadzącym do ich usunięcia czy pozbawienia aktywności biologicznej. O ile los i aktywność biologiczna tej grupy ksenobiotyków w organizmach zwierząt doświadczalnych i człowieka są dość dobrze poznane to oddziaływanie na inne organizmy żywe występujące w środowisku naturalnym, nadal stanowi niedostatecznie scharakteryzowany obszar wiedzy. Środowisko wodne jest ekosystemem, do którego w pierwszej kolejności trafiają wydalone przez człowieka i zwierzęta hodowlane substancje lecznicze i ich metabolity. Z tego właśnie powodu, pierwszym etapem oceny ryzyka dla środowiska jest określenie spodziewanych efektów substancji leczniczych u organizmów żyjących w wodzie.

O rosnącym znaczeniu badań nad wpływem substancji farmaceutycznych na środowisko naturalne już na etapie dopuszczania produktów leczniczych do obrotu, niech świadczy fakt, że Europejska Agencja Leków wydała pierwszą edycję przewodnika do oceny ryzyka dla środowiska produktów leczniczych przeznaczonych do stosowania u

ludzi po raz pierwszy w roku 2006, natomiast aktualnie przygotowywana jest jego nowa, bardziej rozbudowana wersja obejmująca więcej aspektów ekotoksykologicznych. Obecnie istnieje bardzo duże zapotrzebowanie na dostęp do wyników niezależnych badań ekotoksykologicznych farmaceutyków.

Praca doktorska mgr farm. Mileny Wawryniuk zatytułowana: „Ocena toksyczności, fototoksyczności i biokumulacji wybranych leków przeciwdepresyjnych przy użyciu biotestów wykorzystujących organizmy wodne” wpisuje się znakomicie w ten nurt badawczy. Rozprawa przygotowana została w zespole prof. dr. hab. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego w Zakładzie Badania Środowiska, na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jestem przekonany, że powodzenie realizacji założeń pracy doktorskiej w dużej mierze wynika z solidnego wsparcia merytorycznego promotorów: prof. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego i promotora pomocniczego dr Agaty Drobniewskiej. Zarówno promotor jak i członkowie zespołu, dysponują doświadczeniem, udokumentowanym w znaczącym dorobku publikacyjnym.

Całość rozprawy doktorskiej stanowi część opisowa – komentarz w formie wydruku komputerowego na 22 stronach, do której dołączone są przedruki publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów. Doktorantka w części opisowej w syntetyczny sposób przedstawiła uzasadnienie podjęcia tematu, opisała zastosowaną metodologię badawczą oraz omówiła główne wnioski płynące z przeprowadzonych badań. W części tej umieszczone są również streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim oraz wykaz źródeł literaturowych, wykaz konferencji, w których brała udział i wykaz streszczeń opublikowanych w materiałach konferencyjnych.

Cele pracy zostały jasno sformułowane i obejmowały:

- Zbadanie toksyczności wybranych leków przeciwdepresyjnych wobec organizmów wodnych;
- Ocenę fotorozkładu leków pod wpływem promieniowania o różnych długościach fali przy użyciu metod chemicznych oraz ekotoksykologicznych;
- Zbadanie wpływu czynników środowiskowych na toksyczność, fotorozkład i fototoksyczność leków przeciwdepresyjnych;
- Ocenę biokumulacji leków przeciwdepresyjnych u pierwotniaków;
- Poszukiwanie możliwych produktów biotransformacji antydepresantów u pierwotniaków.

Tematyka rozprawy doktorskiej wykracza poza standardowe badania ekotoksyczności substancji leczniczych, gdyż żadne z aktualnych wytycznych nie uwzględniają problemu toksyczności produktów rozkładu leków pod wpływem promieniowania słonecznego, podczas gdy fotodegradacja jest jednym z podstawowych procesów abiotycznych, którym podlegają ksenobiotyki w środowisku. Zasadnicza trudność w badaniach ekotoksykologicznych wynika z ogromnego zróżnicowania organizmów, które mogą być narażone na substancje aktywne w środowisku wodnym. Stąd w badaniach dąży się o stosowania organizmów modelowych, tak jak to jest w przypadku badań toksyczności na ssakach, gdzie wykorzystuje się tylko określone gatunki i szczepy głównie małych ssaków, dzięki czemu możliwe jest porównywanie wyników badań uzyskanych w różnych laboratoriach.

Do właściwych badań, Doktorantka wytypowała substancje lecznicze z grupy przeciwdepresyjnych: selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) – fluoksetynę, fluwoksaminę, paroksetynę i sertralinę oraz mianserynę – przedstawiciela antagonistów receptorów adrenergicznych. Ze względu na powszechność ich stosowania oraz określone właściwości fizykochemiczne dobór

substancji do badań jest w pełni uzasadniony, tym bardziej jeśli uwzględni się fakt, że związki te są też regularnie wykrywane w ściekach oraz wodach powierzchniowych a ich zużycie będzie w przyszłości prawdopodobnie rosło.

Realizacja badań

Proces fotodegradacji przeprowadzano z wykorzystaniem standardowego aparatu – Suntest CPS+, wyposażonego w lampę ksenonową, emitującą promieniowanie zbliżone zakresem do światła słonecznego, a ponadto użyto lampy emitujące różne zakresy promieniowania nadfioletowego (UV-A, UV-B i UV-C). Fotodegradacji poddawano wodne roztwory substancji aktywnych stosując odpowiednie próbki kontrolne, pozwalające wyeliminować lub kontrolować wpływ czynników innych niż określony rodzaj promieniowania. Warto podkreślić, że jest to kompleksowe podejście zastosowane w ocenie toksyczności. Po pierwsze, wykorzystano organizmy, na których standardowo przeprowadza się badania ekotoksyczności na świetle, dzięki czemu wyniki badań są „porównywalne”. Natomiast złożoność naturalnego ekosystemu wodnego znalazła odbicie w doborze gatunków organizmów, które reprezentują różne poziomy troficzne i grupy taksonomiczne, dając pełniejszy obraz oddziaływania na ten skomplikowany system współzależności.

Zastosowane testy toksyczności to Microtox, Spirotox i Thamnotoxkit F, wykorzystujące odpowiednio bakterie *Vibrio fischeri*, pierwotniaki *Spirostomum ambiguum* oraz skorupiaki *Thamnocephalus platyurus*. W części opisowej dotyczącej metodologii, Doktorantka wspomina także o użyciu testu z wykorzystaniem rzęsy drobnej *Lemna minor* (s. 12), jednak nie doszukałam się odniesienia do tych testów w załączonych publikacjach czy dalszej części opisu eksperymentów. Doktorantka przeprowadziła też badania mające na celu jakościową i ilościową ocenę zmian zachodzących podczas naświetlania roztworów substancji badanych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej. Przedstawiony zakres badań uzupełniono o ocenę zdolności do biokumulacji u pierwotniaków oraz podjęto próbę identyfikacji produktów biotransformacji badanych leków u tych samych organizmów. Należy podkreślić, że ten aspekt analityczny jest bardzo istotny, gdyż pozwala na pełniejszą interpretację uzyskanych wyników, poprzez śledzenie przemian i identyfikację produktów odpowiedzialnych za ewentualną toksyczność.

Ciekawym wątkiem rozprawy jest badanie wpływu obecności substancji łatwo ulegających fotodegradacji (kwasów humusowych, triklosanu i diklofenaku) na fotorozkład fluoksetyny i fluwoksaminy. Zarówno triklosan jak i diklofenak, to substancje powszechnie występujące w ściekach komunalnych, w związku z czym, badanie takiej interakcji jest uzasadnione. Doktorantka zaobserwowała, że fluwoksamina łatwiej ulegała fotodegradacji w obecności triklosanu i diklofenaku. Jednak najsilniejszy wpływ wykazywały kwasy humusowe, które są naturalnie obecne w środowisku w wyniku rozkładu martwej materii organicznej. Przy okazji nasuwa się pytanie, czy rozpatrywano zastosowanie innych substancji (naturalnych lub syntetycznych) o właściwościach swoistych „katalizatorów” fotodegradacji, które mogłyby być wykorzystane np. w procesach oczyszczania ścieków? Uzyskane wyniki świadczą o dość znacznej oporności fluoksetyny na działanie światła zarówno bez jak w obecności triklosanu i diklofenaku. W przypadku fluwoksaminy z kolei, głównym procesem zachodzącym pod wpływem światła była izomeryzacja do formy *cis*. Przeprowadzone

badania toksyczności naświetlanych roztworów fluoksetyny i fluwoksaminy bez i w obecności triklosanu, diklofenaku i kwasów humusowych wykazały, że fotodegradacja o ile zachodzi, prowadzi do obniżenia toksyczności proporcjonalnie do spadku stężenia substancji macierzystej.

W kolejnej publikacji opisano badania toksyczności, biokumulacji i biotransformacji fluoksetyny, sertraliny, paroksetyny i mianseryny z wykorzystaniem pierwotniaka *Spirostomum ambiguum*. Zmierzona toksyczność malała w szeregu sertralina>fluoksetyna=paroksetyna>mianseryna. Dowiedziono, że istotnym czynnikiem wpływającym na toksyczność badanych substancji było pH środowiska wpływające prawdopodobnie na biodostępność. W największym stopniu kumulacji ulegały sertralina i mianseryna, które nie ulegały wydaleniowi nawet po zaprzestaniu ekspozycji. Podjęte próby identyfikacji produktów biotransformacji ze względu na niskie stężenia nie zakończyły pełnym sukcesem, mimo zastosowania zaawansowanych technik analitycznych (UHPLC z analizatorem typu Orbitrap).

Cykl prac eksperymentalnych uzupełnia publikacja przeglądowa w Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jest to obszerne opracowanie podsumowujące opublikowane w latach 2007-2017 wyniki badań fototoksyczności leków. Mimo, że w rozprawie publikacja ta umieszczona została na ostatniej pozycji, to od niej powinno się zaczynać lekturę dysertacji, gdyż stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki prac eksperymentalnych.

Opisany zakres badań jest szeroki i przystający do aktualnego stanu wiedzy. Zastosowane techniki badawcze natomiast nie budzą zastrzeżeń i pozwoliły Autorce na znalezienie wiarygodnych odpowiedzi na postawione w celu pracy pytania. Bardzo pozytywnie oceniam wskazanie przez Doktorantkę potencjalnych kierunków dalszych badań i stawianie kolejnych pytań, które pojawiły się w trakcie realizacji projektu doktorskiego.

Podczas lektury części opisowej natknąłem się na nieliczne usterki edytorskie i językowe, które z obowiązku wymieniam:

Strona 9 – poprawna pisownia to „nierzadko”

Strona 15 – „Poziom tego produktu...” – „Stężenie tego produktu...”

Strona 16 – „... na bardzo niskich poziomach” – „...występujących w bardzo niskich stężeniach.”

Są to drobiazgi, które w żaden sposób nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy.

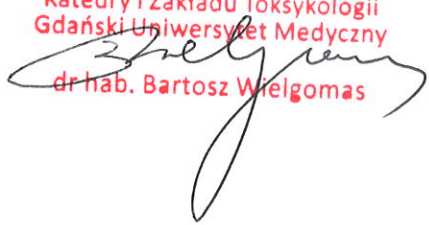
Wyniki przeprowadzonych badań Doktorantka opublikowała w trzech pracach oryginalnych w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania IF 9,104 i punktacji MNiSW 160. Cykl prac uzupełnia praca przeglądowa opublikowana w Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (punktacja MNiSW 5). Z załączonych oświadczeń współautorów wynika, że Doktorantka miała wiodący udział w tworzeniu wszystkich prac, od etapu planowania doświadczeń do przygotowania manuskryptów do publikacji. Deklarowany udział mgr farm. Mileny Wawryniuk mieści się w zakresie 35-80%.

Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki prac eksperymentalnych zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach, a zatem zyskały już aprobatę niezależnych ekspertów, chciałbym jedynie poprosić Doktorantkę o przedyskutowanie poniższych zagadnień:

- Czy sposób pozyskania chlorowodoru mianseryny do badań fotodegradacji poprzez ekstrakcję metanolem produktu leczniczego był optymalny i nie wpływał na przebieg fotodegradacji czy wyniki badań toksyczności?
- Czy na podstawie przeprowadzonych badań, może Pani zaproponować modyfikację technologii oczyszczania ścieków, które przyczyniłyby się do zmniejszenia ekotoksyczności badanych substancji aktywnych?
- Adsorpcja na cząstkach stałych materii organicznej, obok fotodegradacji, jest jednym z procesów odpowiadających na usuwanie substancji aktywnych lub ich metabolitów ze ścieków czy wód powierzchniowych. W jaki sposób te dwa procesy mogą na siebie wzajemnie oddziaływać?
- Dlaczego podjęte próby identyfikacji produktów biotransformacji przeprowadzono wyłącznie po inkubacji badanych substancji w obecności pierwotniaków, a nie np. bakterii?

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr farm. Mileny Wawryniuk spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora zgodnie z artykułem 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami, *O stopniach i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki*. Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr farm. Mileny Wawryniuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, fakt opublikowania wyników rozprawy doktorskiej w bardzo dobrych czasopismach jest w mojej opinii uzasadnieniem do wnioskowania o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowaną nagrodą.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Toksykologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

dr hab. Bartosz Wielgomas