

dr hab. *Paweł Struciński*, prof. NIZP-PZH
Zakład Toksykologii i Oceny Ryzyka Zdrowotnego
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego –
Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. *Mileny Wawryniuk*

pt.: „Ocena toksyczności, fototoksyczności i biokumulacji wybranych leków przeciwdepresyjnych przy użyciu biotestów wykorzystujących organizmy wodne”

Obecność leków w środowisku jest faktem dobrze znanym i udokumentowanym. Są one wykrywane na poziomach rzędu ng/L w ściekach, wodach powierzchniowych i gruntowych czy osadach dennych, czego konsekwencją jest ich obecność w organizmach wodnych zajmujących poszczególne poziomy troficzne. Szczególnie niepokojące jest, że są one wykrywane również w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Leki, które wraz ze ściekami trafiają do środowiska mogą ulegać rozkładowi pod wpływem promieniowania słonecznego w zakresie widzialnym oraz ultrafioletu. Jest to korzystne w sytuacji, gdy lek jest oporny na biodegradację, a produkty fotodegradacji są mniej toksyczne. Z drugiej strony, w procesie tym mogą powstawać związki pośrednie, o innym profilu ekotoksykologicznym, np. o większej toksyczności w stosunku do organizmów wodnych niż substancja macierzysta.

W ostatnich dziesięcioleciach leki psychotropowe, zwłaszcza przeciwdepresyjne, są coraz częściej wykrywane w rzekach, wodach powierzchniowych i ściekach ze względu na rosnącą liczbę diagnozowanych zaburzeń psychicznych, w tym depresyjno-lękowych, i związany z tym wzrost liczby wypisywanych recept na tę grupę leków. Wg bazy danych OECD, w 2018 r. w czterech państwach – Islandii, Kanadzie, Australii i Portugalii – współczynnik DDD (*Daily Defined Dose*, tj. przypuszczalna średnia dobową dawką podtrzymująca leku w terapii podstawowego wskazania tego leku podana osobie dorosłej) dla leków przeciwdepresyjnych (kod N06A) przekraczał 100 dawek na 1000 mieszkańców. W 11 państwach europejskich wartości DDD zawierały się w granicach 50-100 dawek/1000 mieszkańców. Wg danych Narodowego Funduszu Zdrowia sprzedaż leków

przeciwdepresyjnych w Polsce w 2016 r. przekroczyła 20 mln opakowań, a leki z tej grupy – refundowane i nierefundowane – wykupuje niemal 4 mln osób. Sytuacja epidemiologiczna związana z pandemią COVID-19 znacząco wpłynęła na wielkość sprzedaży tych leków. Ocenia się, że wzrosła ona w Polsce w pierwszym półroczu 2020 r. o około 25%.

Uwzględniając powyższe, tematykę podjętą przez Doktorankę należy uznać za niezwykle ważną i aktualną. Badanie toksyczności leków dla organizmów wodnych, zjawiska biokoncentracji i biokumulacji w organizmach zajmujących niższe poziomy troficzne, biotransformacji leków przez takie organizmy oraz ocena fototoksyczności, tj. toksyczności produktów fotorozkładu leków należy zaliczyć do kluczowych elementów wciąż zbyt mało docenianej oceny ryzyka środowiskowego związanego z produkcją i stosowaniem farmaceutyków. Uzyskane wyniki mogą być ponadto wykorzystane w praktyce w ocenie skuteczności rozkładu leków przeciwdepresyjnych w oczyszczalniach ścieków.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Badania Środowiska Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana prof. dr hab. *Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego* – promotora oraz Pani dr *Agaty Drobniowskiej* – promotora pomocniczego.

Ocenianą rozprawę doktorską stanowi tematycznie spójny cykl czterech publikacji, na które składają się trzy prace oryginalne, w których zostały przedstawione wyniki prowadzonych przez Doktorankę badań dotyczących oceny toksyczności, fototoksyczności i biokumulacji wybranych leków przeciwdepresyjnych przy użyciu metod biologicznych i chemicznych oraz jedna praca przeglądowa, w której bardzo szczegółowo omówiono różne aspekty niedocenianego w ocenie ryzyka środowiskowego zagadnienia fototoksyczności leków dla organizmów wodnych. Prace oryginalne zostały opublikowane w latach 2015-2020 w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR): *Ecotoxicology and Environmental Safety* (IF₂₀₁₅ = 3,130; 1. Kwartyl w dyscyplinie „Nauki środowiskowe”), *Environmental Science and Pollution Research* (IF₂₀₁₈ = 2,914; 2 kwartyl w dyscyplinie „Nauki środowiskowe”) oraz *Molecules* (IF₂₀₁₉ = 3,267; 2. kwartyl w dyscyplinie „Biochemia i biologia molekularna”). Publikacja przeglądowa ukazała się w 2018 r. w *Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego WUM*. Łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) opublikowanych prac wynosi 9,311, a wartość punktacji MNiSW wynosi 165. W trzech pracach Pani mgr *Milena Wawryniuk* jest pierwszym autorem, w jednej – drugim autorem. Opublikowane prace badawcze zostały już pozytywnie ocenione w procesie redakcyjnym przez niezależnych recenzentów ww. renomowanych czasopism naukowych co potwierdza, że podjęte badania były uzasadnione, właściwie zaplanowane, zrealizowane oraz opisane.

Bardzo starannie przygotowana rozprawa jest poprzedzona syntetycznym opracowaniem, na które składają się *Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Wstęp*, *Cel pracy*, *Metodologia badań* (powinno być raczej „Metodyka badań” gdyż metodologia to nauka o metodach badań naukowych), *Konspekt przeprowadzonych prac badawczych*, *Omówienie wyników badań*, *Wnioski końcowe* oraz *Literatura*. Przedstawione w nim informacje nie budzą zastrzeżeń; wnioski końcowe wskazują, że założone cele zostały przez Doktorantkę w pełni zrealizowane. Opracowanie to wskazuje, że Pani mgr farm. *Milena Wawryniuk* posiadała cenną umiejętność precyzyjnego, zwięzłego i rzeczowego opisywania istotnych dla sprawy informacji. Ponadto zwraca uwagę, że pomimo konieczności posługiwania się specjalistycznym słownictwem, Doktorantka stara się unikać stosowania naukowego żargonu czyniąc tekst opracowania przystępnym i dobrze zrozumiałym. W Rozprawie załączone są wszystkie publikacje będące podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora wraz z odpowiednimi oświadczeniami współautorów z procentowym określeniem udziału w powstaniu tych prac. Z oświadczeń wynika, że wkład Doktorantki w powstanie tych publikacji był znaczący. Został on oszacowany ilościowo na poziomie od 35 do 80%. Była ona współtwórcą koncepcji i planu prac, wykonała znaczną część doświadczeń, opracowywała, interpretowała i dokonywała analizy statystycznej wyników, wreszcie brała udział w przygotowaniu manuskryptów i odnosiła się do uwag recenzentów. Opracowanie informuje również, że wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej były prezentowane na czterech konferencjach o zasięgu międzynarodowym (cztery postery i jedna prezentacja ustna) oraz pięciu krajowych konferencjach naukowych (sześć prezentacji ustnych).

W pracy przeglądowej oznaczonej jako PP.1 „*Fototoksyczność leków dla organizmów wodnych – ważny element w ocenie ryzyka środowiskowego*” szczegółowo omówiono zjawisko fototoksyczności farmaceutyków na podstawie szerokiego przeglądu piśmiennictwa naukowego z lat 2007-2017. Przedstawiono w niej stosowane metodyki badawcze, w tym organizmy testowe, oraz omówiono najważniejsze wyniki. Zwrócono uwagę na rosnące znaczenie zagrożeń dla środowiska związanych z fototoksycznością leków. Całość osadzono w kontekście wytycznych międzynarodowych organizacji sprawujących nadzór nad lekami i środowiskiem. W podsumowaniu zaproponowano najistotniejsze kierunki dalszych badań. Z żalem można skonstatować, że poruszona w tej pracy tematyka, tak bardzo istotna z punktu widzenia ochrony środowiska oraz zdrowia publicznego, nie przebija się do świadomości jednostek administracji rządowej odpowiedzialnych za zarządzanie ryzykiem, ani społeczeństwa.

W pierwszej pracy badawczej PB.1 „*Evaluation of direct and indirect photodegradation of mianserin with high-performance liquid chromatography and short-term bioassays*” wykorzystano metody biologiczne (biotesty Microtox®, Spirotox® oraz Thamnotoxkit F™) oraz

chemiczne (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem z matrycą diodową oraz z tandemową spektrometrią mas). Badanym lekiem była mianseryna, której fotodegradacja nie została wcześniej opisana w piśmiennictwie naukowym. Pod wpływem naświetlania w pełnym zakresie światła UV-VIS oraz w zakresie światła VIS badana substancja ulegała degradacji z wytworzeniem trzech produktów. Proces ten przebiegał z większą wydajnością pod wpływem pełnego zakresu światła. Interesującą obserwacją było przyspieszenie fotorozkładu mianseryny po dodatku do roztworu kwasów humusowych, z których pod wpływem światła generowały się wolne rodniki. Wykazano, że spadek toksyczności mianseryny dla organizmów wodnych był proporcjonalny do zmniejszenia się jej stężenia wskutek rozkładu, co wskazuje, że produkty fotolizy nie są bardziej toksyczne dla wybranych organizmów testowych niż substancja macierzysta. Należy podkreślić, że wg Web of Science publikacja ta została zacytowana 10 razy.

Druga praca badawcza PB.2 „*Influence of photolabile pharmaceuticals on the photodegradation and toxicity of fluoxetine and fluvoxamine*” miała na celu sprawdzenie wpływu obecności leków łatwo ulegających fotodegradacji – triklosanu i diklofenaku – na fotorozkład i fototoksyczność dwóch leków przeciwdepresyjnych: fluoksetyny i fluwoksaminy. Przyjęte w badaniu założenie odzwierciedla łączne występowanie różnych leków w ściekach czy wodach powierzchniowych tj. sytuację występującą w rzeczywistości. Również w tym badaniu posłużono się technikami biologicznymi (biotest Spirotox®) i chemicznymi (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem z matrycą diodową oraz z tandemową spektrometrią mas). W przypadku fluoksetyny nie zaobserwowano znaczącego rozkładu substancji pod wpływem światła. W przypadku fluwoksaminy stwierdzono tworzenie się jednego produktu fotorozkładu, najprawdopodobniej był nim izomer – *cis*-fluwoksamina. Naświetlanie fluwoksaminy powodowało spadek toksyczności proporcjonalny do spadku stężenia substancji w roztworze. Dodatek kwasów humusowych przyspieszał ten proces znacznie bardziej niż triklosanu i diklofenaku. Choć nie można określić mechanizmu przyspieszania rozkładu fluwoksaminy przez triklosan i diklofenak, to jednak obserwacja ta wskazuje na konieczność uwzględnienia współwystępowania innych leków w badaniach mających na celu określenie losów farmaceutyków w środowisku. Obecność kwasów humusowych zmniejszała toksyczność fluoksetyny wskutek zmniejszenia biodostępności leku. Toksyczność mieszaniny triklosanu oraz każdego z obu leków przeciwdepresyjnych była większa niż toksyczność pozostałych kombinacji badanych związków. Wg Web of Science, praca ta została zacytowana 3 razy.

Trzecia praca badawcza PB.3 „*Influence of selected antidepressants on the ciliated protozoa Spirostomum ambiguum: toxicity, bioaccumulation and biotransformation products*” obejmuje trzy cele badawcze: ocenę toksyczności ostrej wybranych czterech leków

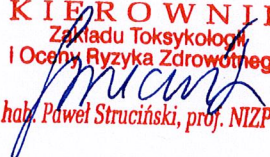
przeciwdepresyjnych: fluoksetyny, sertraliny, paroksetyny oraz mianseryny dla pierwotniaka *Spirostomum ambiguum*, ocenę biokumulacji tych substancji w badanym organizmie oraz ocenę zdolności pierwotniaka do biotransformacji leków z próbą ustalenia struktury powstających metabolitów. Dwa ostatnie wymienione cele badawcze były szczególnie istotne ponieważ w piśmiennictwie nie ma doniesień naukowych na temat kumulowania się leków u jednokomórkowych organizmów stanowiących pierwszy poziom piramidy troficznej jakim jest *Spirostomum ambiguum*. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach posłużono się metodami biologicznymi oraz chemicznymi. Wszystkie badane leki były toksyczne dla badanego organizmu testowego, przy czym toksyczność substancji malała wraz ze wzrostem pH roztworu. Sertralina okazała się związkiem najbardziej toksycznym (wartość EC_{50} po 7-dniowej inkubacji wynosiła ok. 0,2 mg/l). Dowiedziono, że sertralina i mianseryna mają zdolność do biokumulacji w organizmach pierwotniaków. Po 6-dniowym oczyszczeniu się w pożywce nie zawierającej leku, poziom obu związków spadł jedynie o około 30-40%. W zależności od stężenia leku w pożywce, wartości współczynnika biokumulacji (BCF) w 6 dniu narażenia sięgały niemal 5000 l/kg dla mianseryny i ponad 34000 l/kg dla sertraliny. Klasyfikuje to oba leki jako związki o dużej zdolności do biokumulacji. W przypadku fluoksetyny i paroksetyny wartości BCF nie przekraczały wartości granicznej 1000 i wynosiły nie więcej niż, odpowiednio: 600 i 524). W badaniu biotransformacji analizowano homogenat komórek oraz medium, w którym zawieszono pierwotniaki. W pierwszej matrycy wykryto metabolity fluoksetyny i paroksetyny, a w drugim po kilka produktów biotransformacji każdego z leków. Zidentyfikowano produkty N-demetylacji i utleniania mianseryny i sertraliny. Wg Web of Science praca ta, opublikowana w kwietniu tego roku, została zacytowana 1 raz. Jestem przekonany, że ze względu na innowacyjność badania znajdzie ona wysokie uznanie środowiska naukowego wyrażające się m.in. dużą liczbą cytowań.

Praca doktorska pt.: „Ocena toksyczności, fototoksyczności i biokumulacji wybranych leków przeciwdepresyjnych przy użyciu biotestów wykorzystujących organizmy wodne” jest oryginalnym i samodzielnym dorobkiem naukowym Doktorantki. Wysoka jakość prac, doskonały sposób przedstawienia i analizy uzyskanych wyników oraz ich dyskusji wspartej odpowiednim piśmiennictwem zostały docenione przez redakcje trzech czasopism z listy JCR. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę w dziedzinie oceny ryzyka środowiskowego stwarzanego przez leki i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Należy szczególnie podkreślić, że każde z badań opisanych w oryginalnych publikacjach zawiera elementy nowatorskie. Stwierdzam więc z pełnym przekonaniem, że przedłożona mi do recenzji dysertacja w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia wszystkie warunki *ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych*

i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity w Dz.U. z 27 września 2017 r., poz. 1789). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr farm. *Mileny Wawryniuk* do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając istotne elementy nowości naukowej zawarte w recenzowanej dysertacji, wykorzystanie w badaniach wszechstronnego warsztatu metodycznego, a także potencjał dla wykorzystania uzyskanych wyników w praktyce, wnoszę o stosowne wyróżnienie Rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. *Mileny Wawryniuk*.

Warszawa, 19 sierpnia 2020 r.

K I E R O W N I K
Zakładu Toksykologii
i Oceny Ryzyka Zdrowotnego

dr hab. Paweł Struciński, prof. NIZP-PZH