

dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas, prof. uczelni

Gdańsk, 23 września 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Świackiej

pt.: Los środowiskowy i ocena toksyczności wybranych farmaceutyków i ich metabolitów z wykorzystaniem *Mytilus trossulus* jako gatunku modelowego

wykonanej pod opieką **dr hab. Katarzyny Smolarz, prof. UG**

w Zakładzie Funkcjonowania Ekosystemów Morskich Uniwersytetu Gdańskiego.

Pracę doktorską oceniłem pod kątem spełnienia kryteriów wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

Ostatnie 20-25 lat to okres ogromnego wzrostu zainteresowania problematyką obecności substancji leczniczych w środowisku. Aktualnie w ciągu roku ukazuje się ponad 1200 publikacji naukowych na ten obecności tych substancji w ściekach, podczas gdy w roku 2000 takich prac było zaledwie 23 (źródło Pubmed). W latach 60. i 70-tych ubiegłego wieku dostrzegano już te zagrożenia, ale na zaawansowane badania trzeba było czekać do przełomu wieków, kiedy poprawiła się znacząco dostępność i jakość aparatury analitycznej umożliwiającej śledzenie losu zanieczyszczeń środowiskowych występujących w bardzo niskich stężeniach. Mimo, że faktycznie większość substancji leczniczych wykrywanych jest w wodach środowiskowych w niskich stężeniach, to należy pamiętać, że wiele z nich charakteryzuje się wysoką aktywnością biologiczną i wobec tego może wywierać efekty biologiczne na organizmy niedocelowe w stężeniach znajdujących w środowisku, a grupami szczególnie niebezpiecznymi są substancje o działaniu hormonalnym i antybiotyki. Po ponad dwudziestu latach badań środowisko naukowe zaczyna dostrzegać kolejny problem, jakim jest oddziaływanie na środowisko produktów środowiskowej degradacji substancji leczniczych a także ich metabolitów oraz łączne oddziaływanie „koktajlu” różnych substancji.

Problematyka obecności substancji leczniczych w środowisku znajduje również coraz ważniejsze miejsce w obszarze regulacyjnym przemysłu farmaceutycznego. Wchodzące w życie nowe zalecenia instytucji odpowiedzialnych za dopuszczenie do obrotu produktów leczniczych (m.in. EMA, FDA), mogą doprowadzić do wstrzymania proces rejestracji produktu, jeśli ocena oddziaływania na środowisko wskaże na istotne ryzyko lub podmiot odpowiedzialny nie wprowadzi adekwatnych środków zaradczych, mających na celu zminimalizowanie ryzyka. Dotychczas nie miało to miejsca w przypadku leków ludzkich, ale wyłączenie weterynaryjnych. Do przeprowadzenia oceny oddziaływania na środowisko potrzebne są dane ekotoksykologiczne, które pozyskuje się coraz częściej metodami obliczeniowymi, natomiast w dalszym ciągu najwyższą wiarygodność mają dane eksperymentalne. Nie zawsze są one dostępne, dlatego tematyka rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Świackiej doskonale odpowiada na to zapotrzebowanie.

Rozprawa jest wydrukiem komputerowym o całkowitej objętości 151 stron, o układzie charakterystycznym dla rozpraw, które stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Kopie publikacji stanowią najbardziej obszerny fragment dysertacji i zajmują strony od 35. do 140. wydruku. Omówienie rozprawy Doktorantka przedstawiła na łącznie 35 stronach, umieszczając w tej części streszczenia w języku polskim i angielskim, spełniając tym samym kryterium ustawowe (konieczność umieszczenia streszczenia w języku angielskim, jeśli rozprawa przygotowana jest w języku polskim). Kolejnymi rozdziałami są: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusja oraz wnioski. Zawarty jest także bogaty zestaw źródeł bibliograficznych w rozdziale „literatura”. Ostatnim rozdziałem tej części rozprawy jest wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie, poprawnie pod względem językowym, co sprawia, że lektura jest przyjemnością. Uwagę, którą pozwolę sobie poczynić w tym miejscu, dotyczy tytułowego słowa „farmaceutyk/i”, które jako kalka językowa od angielskiego wyrażenia „*pharmaceuticals*” funkcjonuje w języku polskim, lecz odnosi się ono do leku a poprawnie do produktu leczniczego. Produkt leczniczy zawiera substancję czynną/leczniczą (ang. active pharmaceutical ingredient, API), odpowiedzialną za działanie farmakologiczne, ale także substancje pomocnicze (wypełniające, poślizgowe, rozsadzające etc.). Tak więc poprawnym określeniem w tym znaczeniu jest „substancja czynna” lub „lecznicza”, co definitywnie wskazuje na przedmiot badań i jest zgodne z polską nomenklaturą. Inne drobne uwagi edytorskie:

Strona 8. Kalka językowa – wyrażenie „nietargetowe” od ang. „non-target” powinno być zastąpione „niedocelowe”.

Strona 13. Powinno być „...rozpuszczonego w buforze Tris...”.

Strona 14. Powinno być „jodku acetylotiocholiny” a nie „jodku acetylocholin”. W kolei w pracy nr 6, ten odczynnik również ma błędną nazwę „acetylthiocholine iodine”, podczas gdy powinno być „acetylthiocholine iodide”.

Uważam, że bardzo cennym jest rozdział 3., w którym Doktorantka omawia warsztat eksperymentalny. Mimo, że każda z publikacji zawiera również paragraf opisujący część metodyczną, to zebranie opisów w jednym miejscu ułatwia czytelnikowi kompleksowe spojrzenie na całość prowadzonych badań od strony warsztatowej w kontekście projektu doktorskiego. Rozdział 4. zawiera wyniki i ich dyskusję. Lektura tych rozdziałów, po wcześniejszym zapoznaniu się z publikacjami, pozwala usystematyzować informacje rozproszone w kilku miejscach.

Najważniejszym, aczkolwiek najkrótszym rozdziałem jest prezentacja wniosków (rozdział 5.), sformułowanych przejrzysto z odnośnikami do publikacji, które były podstawą do ich wysnucia.

Na rozprawę doktorską mgr Klaudii Świackiej składa się zbiór siedmiu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, które ukazały się w latach 2019-2022 (jedna publikacja w roku 2019, jedna w 2020, dwie w 2021 i 3 w roku 2022). We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką, w tym w dwóch również autorką korespondencyjną. W ostatnim rozdziale rozprawy przedstawione są oświadczenia współautorów (spełnione jest kolejne kryterium ustawowe), z których wynika, że Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzała eksperymenty, analizowała i interpretowała dane, tworzyła pierwsze wersje

manuskryptów. Świadczy to jednoznacznie o znaczącym zaangażowaniu i roli w procesie badawczym. Parametry naukometryczne, charakteryzujące dorobek wchodzący w skład rozprawy są imponujące. Łączna wartość współczynnika oddziaływania Impact Factor czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład rozprawy to 69,70 a liczba punktów MEiN to 1000. Czasopisma Environmental Pollution (4 publikacje), Science of the Total Environment (2 publikacje) i Journal of Hazardous Materials (1 publikacja) cieszą się wysoką renomą a przejście procesu recenzji zakończone przyjęciem manuskryptu do publikacji nie należy do najłatwiejszych.

W rozdziale drugim zatytułowanym „cele pracy” Doktorantka określiła szczegółowe cele swoich badań. W pierwszej kolejności przeprowadziła analizę źródeł literaturowych poszukując gatunku modelowego do realizacji założonego celu ogólnego. Drugim celem szczegółowym była ocena toksyczności diklofenaku i jego metabolitu - 4-hydroksy-diklofenaku (4-OH DIC) wobec organizmów niedocelowych z zastosowaniem *Mytilus trossulus*. Realizacja tego zadania została przedstawiona w publikacjach 2 i 6. Publikacja nr 3 przedstawia z kolei przegląd danych literaturowych dotyczących toksyczności niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), w tym diklofenaku, w kontekście ekosystemów wodnych – stanowiąc realizację celu nr 3. W egzemplarzu rozprawy, który otrzymałem do recenzji, zamiast publikacji nr 3 Świacka K, Michnowska A, Maculewicz J, Caban M, Smolarz K. Toxic effects of NSAIDs in non-target species: A review from the perspective of the aquatic environment. Environ Pollut. 2020 Oct 20;273:115891. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115891. umieszczona była kopia publikacji nr 2. Kolejnym celem (4.) była ocena stopnia biokoncentracji i biotransformacji diklofenaku i 4-OH DIC w tkankach bezkręgowców morskich. Cel 5. to zebranie danych literaturowych dotyczących akumulacji substancji leczniczych ich metabolitów u dziko żyjących organizmów wodnych. Ostatnim celem (6.) było określenie stabilności diklofenaku oraz 4-hydroksy-diklofenaku w długoterminowym teście symulującym warunki w strefie przydennej Morza Bałtyckiego. Tak sformułowane cele obejmują kompleksowe spojrzenie na jedną substancję leczniczą – diklofenak oraz jego metabolit(y) w kontekście oddziaływania na organizm bezkręgowca morskiego. Cele są precyzyjnie zdefiniowane i są konsekwentnie realizowane w procesie badawczym.

Krótką charakterystyka publikacji wchodzących w skład rozprawy

Publikacje przeglądowe nr 1, 3 i 5 to bardzo obszerne opracowania, każde oparte na około 200 tekstach źródłowych. Doktorantka przygotowując te publikacje musiała zapoznać się z aktualnym stanem wiedzy w bardzo szerokim zakresie.

Publikacja 1, traktuje o wykorzystaniu organizmów z rodziny *Mytilidae* jako modelu w badaniach ekotoksykologicznych substancji leczniczych. Doktorantka podsumowała dotychczas opublikowane doniesienia naukowe, w których mięczaki z tej rodziny były wykorzystane do badania wpływu substancji leczniczych na organizmy wodne zarówno typowo eksperymentalne z zamierzoną i kontrolowaną ekspozycją jak i te obserwacyjne – biomonitoringowe, dokumentujące obecność substancji leczniczych w organizmach żyjących w naturalnym środowisku. W pracy omówiono badania wykorzystujące tę rodzinę mięczaków do testowania wpływu niesteroidowych leków przeciwzapalnych, substancji zaburzających gospodarkę hormonalną (EDC), inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny, substancji przeciwhistaminowych, β -blokerów i antybiotyków. Doktorantka wraz ze współautorami zwraca też uwagę na aspekt łącznego działania wielu substancji obecnych jednocześnie w środowisku.

Celem pracy nr 3 było omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) na różnorodne organizmy wodne, m.in. pierścienice, skorupiaki, mięczaki i ryby. Zebrano informacje na temat toksycznych efektów powodowanych przez najczęściej wykrywane NLPZ w środowisku wodnym, takie jak diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kwas acetylosalicylowy, indometacynę, naproksen i kwas mefenamowy. W poszczególnych częściach tekstu omówiono wyniki badań eksperymentalnych prowadzonych nad różnymi grupami organizmów, uwzględniając wszystkie główne grupy zwierząt morskich i słodkowodnych, z wyjątkiem organizmów jednokomórkowych. W rezultacie przedstawiono podsumowanie obecnej wiedzy na temat toksyczności NLPZ dla zwierząt morskich, identyfikując także istotne braki i główne kwestie, które wymagają dalszej analizy, np.: ewentualny pozytywny wpływ na organizmy niedocelowe, czy określenie zdolności adaptacyjnej organizmów badanych pod wpływem długotrwałej ekspozycji.

Trzecia praca przeglądowa wchodząca w skład rozprawy (publikacja nr 5) skupia się na obecności substancji leczniczych i ich metabolitów w dziko żyjących organizmach wodnych. Tym razem wyniki pogrupowano pod względem geograficznym, opisując doniesienia naukowe kolejno dla poszczególnych kontynentów.

Wyniki prac eksperymentalnych zawarte są w publikacjach nr 2, 4, 6 i 7.

Celem pierwszej z nich *Effects of environmentally relevant concentrations of diclofenac in Mytilus trossulus* było dostarczenie bardziej szczegółowych informacji na temat wpływu diklofenaku na *M. trossulus* – modelowego bezkręgowca, podczas ekspozycji w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. Po raz pierwszy zastosowano analizę histologiczną w celu określenia toksyczności diklofenaku u małży. Przetestowano także wpływ diklofenaku na ogólny stan małży. W tym samym eksperymencie określono stężenie diklofenaku i jego dwóch metabolitów (4-OH i 5-OH diklofenaku) w tkankach i wodzie podczas ekspozycji na różne stężenia diklofenaku, odpowiadające tym znajdowanym w wodach powierzchniowych. Dodatkowo przeprowadzono badania obecności wybranych NLPZ (ketoprofen, ibuprofen, flurbiprofen i naproksen) w tkankach *M. trossulus* oraz w wodzie pobranej z Zatoki Gdańskiej. Nie stwierdzono obecności wyżej wymienionych substancji w organizmach żyjących na wolności jak również substancje te nie były obecne w pobranych próbkach wody z Zatoki Gdańskiej w stężeniach wyższych niż granica wykrywalności metody analitycznej. Doktorantka udokumentowała, że diklofenak jest wchłaniany przez omułki podczas ekspozycji, ale po jej zakończeniu dochodzi do całkowitej eliminacji z organizmu. Prawdopodobnie ze względu na niskie stężenia diklofenaku, nie były wykrywalne jego metabolity. W badanych stężeniach diklofenak nie wpływał na ogólną kondycję omułek, natomiast obserwowano zmiany histologiczne, które mogą w dłuższej perspektywie prowadzić do zmian funkcjonalnych. Doktoranta zaklasyfikowała obserwowane zmiany do odwracalnych.

Praca nr 4

W tej publikacji opisano badanie losu diklofenaku i jego głównego metabolitu 4-OH DIC (4-hydroksydiklofenaku) w sztucznej słonej wodzie. Analizowano proces pobierania, metabolizmu oraz biokumulacji diklofenaku i 4-OH DIC w tkankach omułek *M. trossulus*. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono analizę bilansu masy, określono współczynnik bioakumulacji (BCF), aby zobrazować potencjał akumulacji diklofenaku i 4-OH DIC w tkankach małża oraz biofilmie. Uwagę recenzenta przyciągnęła znacząca różnica stężeń nominalnych i

zmierzonych diklofenaku i jego metabolitu, 30 minut do dodaniu substancji do naczyń hodowlanych. Czy próbowano wyjaśnić przyczynę tego zjawiska? Czy w taki sam sposób (30 minut po dodaniu roztworu) mierzono stężenie w poprzednich badaniach (Świacka i in. 2019)?

Nie obserwowano istotnych różnic w biokoncentracji DIC i 4-OH DIC w zależności od płci małży. Zaobserwowano, że samice *M. trossulus* są w stanie metabolizować diklofenak, na co wskazuje obecność 5-OH DIC (5-hydroksy-diklofenak) w ich tkankach (stężenia bliskie granicy wykrywalności metody analitycznej). Znaczący spadek stężenia 4-OH DIC w wodzie w trakcie eksperymentu (o ok. 67%) sugeruje zachodzenie dalszych przemian degradacyjnych tej substancji.

Praca nr 6

W niniejszym artykule zaprezentowano wyniki oznaczeń szeregu wskaźników biologicznych, takich jak aktywności: profenylooksydazy, reduktazy glutationowej, transferazy glutationowej, katalazy oraz acetylocholinoesterazy u omułków *M. trossulus* po 7-mio dniowej ekspozycji na diklofenak i 4-OH DIC. Przeprowadzono także badania histologiczne i wyznaczono wskaźnik masy ciała (BMI).

Działanie toksyczne objawiało się obecnością zmian obejmujących liczne deformacje skrzel, martwicę i miejscowe stany zapalne gruczołu trawiennego, a także atrezję gonad i ich zanik. Nie zawsze obserwowane różnice osiągały istotność statystyczną, ale częstość występowania zmian była wyższa u zwierząt eksponowanych. Niektóre zmiany obserwowane były częściej w przypadku ekspozycji na 4-OH DIC, mimo że stężenie tej substancji było niższe niż diklofenaku i szybciej spadało podczas eksperymentu. Markery biochemiczne okazały się natomiast zbyt mało czułe do wykrycia wpływu diklofenaku.

Praca nr 7

Ostatnia z publikacji poświęcona jest badaniom zachowania diklofenaku i jego metabolitu 4-OH DIC w układzie woda morska - osad denny. Doktorantka zastosowała złożony układ eksperymentalny, który miał umożliwić ocenę degradacji biotycznej i abiotycznej obu substancji z wykorzystaniem sterylizowanego i niesterylizowanego osadu dennego oraz wody, pobranych w pobliżu miejsca zrzutu ścieków oczyszczonych oczyszczalni Dębogórze. Zaobserwowano ubytek masy związku macierzystego i 4-OH DIC w zbiornikach z osadem naturalnym i osadem wysterylizowanym, który jednak nie był związany z adsorpcją substancji chemicznych na cząstkach osadu. Ponadto w osadzie z DCF wykryto 5-OH DIC w każdym z trzech powtórzeń, natomiast w osadzie autoklawowanym nie wykryto jakichkolwiek hydroksymetabolitów. Doktorantka dowiodła, że degradacja w osadzie zarówno diklofenaku jak i metabolitów może być mało wydajna i w ten sposób prowadzić do zwiększonego zagrożenia wobec organizmów pelagicznych.

Podsumowanie

Wszystkie badania przedstawione w powyższych publikacjach, Doktorantka podsumowała formułując 6 wniosków (rozdział 5.) podkreślając (1) przydatność *M. trossulus* do badań ekotoksykologicznych substancji leczniczych. Badania dowiodły, że diklofenak w stężeniach spotykanych w środowisku może negatywnie oddziaływać na *M. trossulus* a zmiany mikro- i makroskopowe na poziomie tkankowym są czulszym narzędziem niż wskaźniki biochemiczne. Oszacowany współczynnik biokoncentracji plasuje diklofenak wśród substancji o niskim

potencjale do biokoncentracji środowisku wodnym. Małże mogą metabolizować diklofenak i eliminować go z organizmu. Zarówno diklofenak i 4-OH diklofenak ulegają adsorpcji na osadzie dennym, ale stabilność diklofenaku jest wyższa niż metabolitu.

Są to wnioski podparte solidnymi danymi eksperymentalnymi, ale jednocześnie nie bezkrytyczne.

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska jest rozwiązaniem oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego o dużym znaczeniu praktycznym. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę z pewnością wnoszą istotny wkład w wiedzę w obszarze ekotoksykologii substancji leczniczych.

Realizacja projektu doktorskiego mgr Klaudii Świackiej przypadła na okres pandemii COVID-19, co ma szczególne znaczenie biorąc pod uwagę „laboratoryjny” charakter prowadzonych badań. Nie przeszkodziło to w osiągnięciu założonych celów i utrzymaniu wysokiej „produktywności”.

Mgr Klaudia Świacka odbyła w latach 2018-2023 aż trzy zagraniczne staże naukowe, w Islandii, Niemczech i Australii (najdłuższy, 6-cio miesięczny) oraz uczestniczyła w konferencjach krajowych i zagranicznych, prezentując swoje wyniki w formie posterów, ale także w formie doniesień ustnych na 4 konferencjach międzynarodowych. Zdobyła też nagrodę Rektora pierwszego stopnia w kategorii Nauk ścisłych i przyrodniczych za osiągnięcia naukowe uzyskane w roku akademickim 2020-2021. Te aktywności i osiągnięcia z pewnością wyróżniają ją wśród osób na tym samym etapie kariery akademickiej.

Rozprawa doktorska mgr Klaudii Świackiej spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora i w związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Klaudii Świackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość poznawczą, bardzo rozległy zakres prac eksperymentalnych, mnogość użytych technik badawczych a także imponujący ilościowo i jakościowo dorobek publikacyjny z pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

