

Autoreferat

Dr n. wet. Hubert Ziółkowski

**Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie**

1. Imię i nazwisko.

Hubert Ziółkowski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- | | |
|-------------------|--|
| 05/04/2009 | <ul style="list-style-type: none">• Tytuł zawodowy: lekarz weterynarii,• Wydział i Uczelnia: Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, |
| 23/05/2014 | <ul style="list-style-type: none">• Dyplom/świadczenie ukończenia studiów doktoranckich,• Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria,• Promotor: prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski,• Recenzenci pracy doktorskiej: prof. dr hab. Andrzej Koncicki, prof. dr hab. Cezary Kowalski• Tytuł rozprawy doktorskiej: <i>„Wpływ pokarmu i jonów metali na wchłanianie z przewodu pokarmowego i farmakokinetkę oksytetracykliny u kurcząt brojlerów”</i>• Jednostka nadająca stopień naukowy: Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. |

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- | | |
|---|---|
| 01/10/2009 –
30/09/2014 | Stanowisko: doktorant
Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. |
| 01/10/2012 –
30/09/2014 | Stanowisko: asystent
Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. |
| 15/11/2013 –
31/12/2015 | Stanowisko: technolog
Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. |
| 01/09/2014 do
chwili obecnej | Stanowisko: adiunkt
Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. |

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Osiągnięcie, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 lit. b Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.), tj. osiągnięcie stanowiące cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

Znaczenie transporterów wypływowych P-gp/BCRP oraz procesów pierwszego przejścia w farmakokinetyce tetracyklin: od nieselektywnej modulacji do oceny wpływu substancji pomocniczych

4.1.1. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia wraz z informacją o wkładzie wnioskodawcy w prowadzeniu badań naukowych opisanych w poszczególnych publikacjach, jak i w powstaniu tych publikacji.

Cykl publikacji stanowiących zgłaszane osiągnięcie obejmuje 3 oryginalne artykuły naukowe opublikowane w latach 2023-2026 w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports:

[1] Ziółkowski H.* (2023). *Bioavailability of tetracyclines is substantially increased by administration of cyclosporine A, a non-specific efflux-pump blocker. Drug Metabolism and Pharmacokinetics*; 50:100493. DOI: 10.1016/j.dmpk.2023.100493

IF₂₀₂₃: 2,7; punktacja MNiSW: 70 pkt.; liczba cytowań: WoS:9

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie osiągnięć naukowych opisanych w w/w publikacji, jak i w jej powstanie polegał na:

- ❖ opracowaniu koncepcji badań oraz zaplanowaniu doświadczenia,
- ❖ pozyskiwaniu materiału badawczego oraz wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych,
- ❖ przeprowadzeniu analizy farmakokinetycznej, statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników,
- ❖ sformułowaniu wniosków oraz opracowaniu manuskryptu publikacji.

[2] Ziółkowski H.* (2026). *P-gp/BCRP efflux and intestinal metabolism limit tigecycline exposure: effects of elacridar and voriconazole in mice. Drug Metabolism and Disposition*; 54:100213. DOI: 10.1016/j.dmd.2025.100213

IF₂₀₂₄: 4,0; punktacja MNiSW: 100 pkt.; liczba cytowań: WoS:1

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie osiągnięć naukowych opisanych w w/w publikacji, jak i w jej powstanie polegał na:

- ❖ opracowaniu koncepcji badań oraz zaplanowaniu doświadczenia,
- ❖ pozyskiwaniu materiału badawczego oraz wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych,
- ❖ przeprowadzeniu analizy farmakokinetycznej, statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników,
- ❖ sformułowaniu wniosków oraz opracowaniu manuskryptu publikacji.

[3] **Ziółkowski H***, Szteyn K, Jędrzkiewicz D, Rasiński B, Jaroszewski J. (2023). *Tigecycline Absorption Improved by Selected Excipients*. **Pharmaceuticals** (Basel);16(8):1111. DOI: 10.3390/ph16081111

IF₂₀₂₃: 4,3; punktacja MNiSW: 140 pkt. liczba cytowań: WoS:3

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie osiągnięć naukowych opisanych w w/w publikacji, jak i w jej powstanie polegał na:

- ❖ opracowaniu koncepcji badań oraz zaplanowaniu doświadczenia,
- ❖ pozyskiwaniu materiału badawczego oraz wykonywaniu oznaczeń laboratoryjnych,
- ❖ przeprowadzeniu analizy farmakokinetycznej, statystycznej oraz interpretacji uzyskanych wyników,
- ❖ sformułowaniu wniosków oraz opracowaniu manuskryptu publikacji,

***autor korespondencyjny.**

Wartość ważniejszych parametrów bibliometrycznych przedmiotowego cyklu publikacji:

- ❖ Łączna liczba punktów MNiSW (według wykazu listy czasopism punktowanych z dn. **5.01.2024**): **310**
- ❖ Sumaryczny IF na dzień składania wniosku: **11**
- ❖ Sumaryczna liczba cytowań według bazy WoS: **13**

4. 1. 2. Omówienie osiągnięcia

4. 1. 2. 1. Główny przedmiot badań

Przedmiotem niniejszych badań były mechanizmy regulujące farmakokinetykę tetracyklin, w szczególności zachodzące na etapie wchłaniania, dystrybucji i eliminacji, związane z przemieszczaniem się tych związków przez bariery komórkowe oraz potencjalną aktywną kontrolą tego przenikania przez wyspecjalizowane systemy transportowe. W badaniach stanowiących niniejsze osiągnięcie przyjęto założenie, że obserwowana, utrzymująca się pomimo podobieństwa strukturalnego związków, zmienność dostępności biologicznej i dystrybucji tetracyklin nie musi być wyłącznie konsekwencją ich właściwości fizykochemicznych i dyfuzji biernej, lecz może odzwierciedlać działanie wspólnego, regulacyjnego mechanizmu transportowego. Weryfikacja tej hipotezy wymagała jej funkcjonalnej oceny w warunkach *in vivo* oraz rozdzielenia udziału transportu wpływowego i metabolizmu w kształtowaniu ekspozycji ogólnoustrojowej i tkankowej wybranych tetracyklin. W tym celu zastosowano kontrolowaną modulację tych procesów z wykorzystaniem farmakologicznych modulatorów aktywności transporterów i metabolizmu oraz wybranych substancji pomocniczych wpływających na funkcję bariery jelitowej. Takie podejście umożliwiło identyfikację potencjalnego udziału transporterów wpływowych w farmakokinetyce tetracyklin oraz ocenę podatności tych mechanizmów na celową modyfikację, prowadząc do opracowania i eksperymentalnej weryfikacji funkcjonalnego modelu regulacji farmakokinetyki tetracyklin.

4. 1. 2. 2. Wprowadzenie i cele badawcze

Tetracykliny należą obecnie do jednych z najczęściej stosowanych chemioterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych zarówno w medycynie człowieka, jak i weterynaryjnej [Semenovas et al. 2025]. Wynika to z ich szerokiego spektrum działania, wysokiej skuteczności oraz możliwości stosunkowo taniego i wydajnego pozyskiwania tych związków na skalę przemysłową [Chopra and

Roberts 2001]. W ostatnich latach obserwuje się intensywny rozwój metod syntezy zarówno klasycznych tetracyklin, jak i ich nowych analogów, co stanowi istotny postęp w chemii tych substancji. Zainteresowanie to jest w dużej mierze następstwem prac prezentujących innowacyjne strategie syntezy tetracyklin i pochodnych opartych na ich szkielecie [Charest et al., 2005; Brubaker et al., 2007; Sun et al., 2017], ale także z rosnącego problemu lekooporności notowanej w ostatnich latach. Postęp w chemii tetracyklin stworzył tym samym warunki do istotnego poszerzenia ich zastosowań klinicznych, jednocześnie ujawniając potrzebę lepszego zrozumienia mechanizmów determinujących ich los w organizmie.

W ostatnich dekadach wykazano, że tetracykliny charakteryzują się szerokim potencjałem terapeutycznym, obejmującym nie tylko leczenie zakażeń bakteryjnych, lecz także działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i przeciwrzybicze [Breinholt et al. 1997; Henehan et al. 2017; Sun et al. 2019]. Rosnące zainteresowanie tą grupą związków doprowadziło do syntezy wielu nowych pochodnych, spośród których część – m.in. fluorocykliny, pentacykliny, azatetracykliny i aminometylocykliny – osiągnęła etap badań klinicznych, a niektóre zostały wprowadzone do praktyki klinicznej (np. erawacyklina, omadacyklina, sarecyklina).

Równolegle z rozszerzaniem spektrum terapeutycznego tetracyklin coraz wyraźniej ujawniały się jednak ograniczenia wynikające nie z ich aktywności biologicznej, lecz z właściwości farmakokinetycznych, które w wielu przypadkach determinują skuteczność kliniczną i bezpieczeństwo terapii. Pomimo wieloletnich badań farmakokinetyka tetracyklin pozostaje obszarem o wysokiej złożoności, wynikającej między innymi z faktu, że niewielkie różnice strukturalne pomiędzy poszczególnymi tetracyklinami przekładają się na znacząco odmienne właściwości farmakokinetyczne, obejmujące wchłanianie, dystrybucję, metabolizm oraz eliminację [Klein and Cunha 1995; Zhanel et al. 2004; Ziółkowski et al. 2020]. Stopień wchłaniania jest wysoce zróżnicowany i zależy zarówno od rodzaju tetracykliny, jak i gatunku zwierzęcia. Zakres dostępności biologicznej tetracyklin jest wyjątkowo szeroki – od wartości poniżej 1% w przypadku meklocykliny i tygecykliny, poprzez niską i zmienną biodostępność chlorotetracykliny oraz oksytetracykliny, aż do wartości przekraczających 50% dla doksycykliny i niemal całkowitej absorpcji minocykliny u ludzi. Różnice te utrzymują się również pomiędzy gatunkami zwierząt, nawet przy maksymalnym ograniczeniu znanych czynników wpływających na wchłanianie tetracyklin [Gattini i Renzini 1972; Chin and Lach 1975; Klein and Cunha 1995; Riviere and Lees 2003; Zhanel et al. 2004; Jasiocka-Mikołajczyk et al. 2018; Ziółkowski et al. 2020]. Tak znaczna zmienność wskazuje, że właściwości fizykochemiczne cząsteczek nie stanowią jedyne go czynnika determinującego dostępność biologiczną tetracyklin. Cząsteczki tetracyklin charakteryzują się ograniczoną lipofilnością, wysoką polarnością oraz masą cząsteczkową przekraczającą 400 Da. W warunkach fizjologicznych występują głównie w formie jonów obojnych, podczas gdy frakcja niezdysocjowana stanowi niewielki odsetek. W oparciu o te właściwości można byłoby oczekiwać względnie zbliżonego stopnia dyfuzji przez bariery biologiczne, a tym samym podobnych parametrów wchłaniania i dystrybucji.

Po przedostaniu się do krążenia tetracykliny wykazują szeroką dystrybucję tkankową, zróżnicowaną pod względem stopnia wiązania z białkami osocza oraz wartości objętości dystrybucji. Pomimo znacznej ekspozycji ogólnoustrojowej ich penetracja do wyspecjalizowanych kompartmentów chronionych, takich jak ośrodkowy układ nerwowy czy struktury oka, pozostaje ograniczona [Rodvold et al. 2006; Milane et al. 2007; Munyeza et al. 2016; Grada et al. 2022].

Zjawisko to sugeruje, że poza dyfuzją bierną w regulacji rozmieszczenia tetracyklin mogą uczestniczyć aktywne mechanizmy transportowe.

Metabolizm tetracyklin w dostępnych badaniach opisywany jest jako proces o zróżnicowanym i zwykle ograniczonym znaczeniu ilościowym, jednak zarówno wątroba, jak i nabłonek jelitowy stanowią potencjalne miejsca ich biotransformacji oraz regulacji transportu przez błony komórkowe [Kelly and Buyske 1960; Eisner and Wulf 1963; Kelly and Kanegis 1967; Riond et al. 1989; Hoffmann et al. 2007]. Eliminacja zachodzi głównie drogą nerkową oraz poprzez wydzielanie do żółci, z możliwym udziałem krążenia wątrobowo-jelitowego [Kelly and Buyske 1960; Barza et al. 1975; Anadón 1985; Dyer 1988, 1989; Serrano et al. 1999; Hoffmann et al. 2007].

Klasyczne ujęcie transportu tetracyklin zakłada dominującą rolę dyfuzji biernej w przemieszczaniu się tych leków przez błony biologiczne [Hessl and Stamey 1971; Mortimer and Piddock 1993]. Dostępne dane wskazują jednak, że farmakokinetyka tetracyklin wykazuje znaczne zróżnicowanie [Gattini i Renzini 1972; Chin and Lach 1975; Klein and Cunha 1995; Nielsen and Gyrð-Hansen 1996; Ziółkowski et al. 2020], co nie znajduje pełnego wyjaśnienia w klasycznym modelu dyfuzji biernej i sugeruje udział innych mechanizmów. W konsekwencji zasadne było zweryfikowanie, czy w regulacji dostępności biologicznej tetracyklin, ich dystrybucji do kompartmentów chronionych oraz, w określonym zakresie eliminacji, uczestniczą, procesy zależne od białek transportujących, w szczególności systemów transportu wypływowego (np. glikoproteinie P, P-gp; białku oporności raka piersi, BCRP). Takie ujęcie nie zakłada odrzucenia modelu dyfuzji biernej, lecz traktuje go jako element szerszego mechanizmu regulacyjnego, w którym transport czynny może modulować efekty dyfuzji i wpływać na farmakokinetykę tetracyklin na poziomie całego organizmu. Biorąc powyższe pod uwagę zasadniczą luką poznawczą pozostawał brak funkcjonalnego rozdzielenia oraz integracyjnego ujęcia procesów transportowych, metabolicznych i eliminacyjnych, które pozwoliłoby określić, czy obserwowana zmienność farmakokinetyczna tetracyklin odzwierciedla działanie wspólnego mechanizmu regulacyjnego związanego z aktywnym transportem przez bariery biologiczne. Tę logikę badawczą uporządkowano w trzech kolejnych celach, odpowiadających następującym etapom: 1) niselektywnej modulacji transporterów błonowych, metabolizmu i procesów eliminacyjnych w odniesieniu do sześciu tetracyklin; 2) selektywnego rozdzielenia udziału transportu wypływowego, metabolizmu i eliminacji w modelu tetracyklin słabo wchłanianych; 3) oceny możliwości modulacji bariery jelitowej przy użyciu wybranych substancji pomocniczych w tym samym modelu.

Cel nr 1 – Ocena znaczenia niselektywnej modulacji transportu wypływowego, metabolizmu i eliminacji w kształtowaniu farmakokinetyki tetracyklin *in vivo*.

W świetle przedstawionych danych zasadne stało się podjęcie próby ustalenia, w jakim stopniu farmakokinetykę tetracyklin – a zwłaszcza proces ich wchłaniania z przewodu pokarmowego – można modulować poprzez zastosowanie niselektywnego inhibitora transporterów błonowych i metabolizmu pierwszego przejścia, jakim jest cyklosporyna A. Założenie to wynikało z obserwacji, że pomimo podobieństwa strukturalnego tetracykliny wykazują silnie zróżnicowane wartości dostępności biologicznej, których nie można w pełni wyjaśnić znanymi interakcjami zachodzącymi w przewodzie pokarmowym ani prostym modelem dyfuzji biernej [Ziółkowski et al. 2020]. W tym kontekście uzasadnione stało się sprawdzenie, czy zastosowanie związku wpływającego jednocześnie

na aktywność transporterów wypływowych oraz na procesy metaboliczne może w sposób mierzalny zmieniać dostępność biologiczną i ekspozycję ogólnoustrojową tetracyklin po podaniu doustnym.

W toku badań przyjęto, że wchłanianie tetracyklin nie jest zjawiskiem determinowanym wyłącznie przez ich właściwości fizykochemiczne, lecz może podlegać regulacji przez procesy aktywne zachodzące na poziomie bariery jelitowej. W związku z tym zaplanowano nie tylko ocenę efektu cyklosporyny A po podaniu doustnym, lecz również analizę porównawczą jej wpływu po podaniu doustnym i dożylnym na parametry farmakokinetyczne badanych tetracyklin. Takie podejście pozwoliło rozdzielić udział procesów zachodzących na poziomie jelita od procesów eliminacyjnych, obejmujące klirens nerkowy, wydzielanie wątrobowe oraz metabolizm.

W świetle przedstawionych danych literaturowych oraz wyników wcześniejszych badań własnych [Ziółkowski et al. 2020] uzasadnione było przeprowadzenie analizy, która pozwalałaby na całościową ocenę podatności farmakokinetyki tetracyklin na modulację aktywnych procesów regulujących ich losy ustrojowe. Z tego względu w pierwszym etapie badań przyjęto strategię opartą na nieselektywnej modulacji kluczowych procesów aktywnych, obejmujących transport wypływowy, metabolizm oraz funkcję narządów eliminujących, traktując ją jako narzędzie umożliwiające globalną ocenę znaczenia tych mechanizmów dla farmakokinetyki tetracyklin. Takie podejście, choć z założenia nieselektywne, pozwala na uchwycenie skali i kierunku zmian farmakokinetycznych w warunkach jednoczesnej ingerencji w główne szlaki regulacyjne, stanowiąc punkt wyjścia do dalszych, bardziej precyzyjnych analiz realizowanych w kolejnych etapach pracy. Na tej podstawie przyjęto następujące hipotezy badawcze:

- ❖ Wchłanianie tetracyklin z przewodu pokarmowego może ulegać modyfikacji po zastosowaniu nieselektywnego inhibitora transporterów wypływowych i metabolizmu pierwszego przejścia, przy czym zasadniczy komponent tej modyfikacji może ujawniać się na poziomie bariery jelitowej.
- ❖ W kształtowaniu farmakokinetyki tetracyklin procesy eliminacji i metabolizmu mogą mieć charakter wtórny wobec regulacji zachodzącej na etapie ich wchłaniania.

Na podstawie sformułowanego celu oraz przyjętych hipotez badawczych, wyznaczono następujące zadania badawcze:

Zadanie badawcze 1: Ocena wpływu nieselektywnej modulacji transportu wypływowego, metabolizmu i eliminacji, z zastosowaniem cyklosporyny A, na dostępność biologiczną oraz wybrane parametry farmakokinetyczne wybranych tetracyklin po podaniu doustnym.

Zadanie badawcze 2: Ocena wpływu drogi podania cyklosporyny A na farmakokinetykę wybranych tetracyklin w celu rozróżnienia efektów zachodzących na poziomie wchłaniania z jelit oraz na poziomie metabolizmu i eliminacji.

Cel nr 2 – ocena znaczenia transporterów P-gp i BCRP oraz procesów metabolicznych w regulacji farmakokinetyki tygocykliny *in vivo*.

Istotnym argumentem wspierającym przedstawione wcześniej hipotezy dotyczące mechanizmów regulujących wchłanianie tetracyklin jest obecność analogicznych systemów transportowych u bakterii, w których funkcjonują białkowe transportery błonowe zawierające domenę ABC (*ATP binding cassette*), odpowiedzialne za usuwanie leków poza komórkę [Speer et al. 1992; Fath and Kolter 1993; Dawson and Locher 2006]. Mechanizm ten stanowi podstawę jednego z

najważniejszych procesów warunkujących lekooporność drobnoustrojów, będącego obecnie narastającym problemem klinicznym i epidemiologicznym. Dane literaturowe wskazują, że głównym mechanizmem oporności bakterii wobec tetracyklin jest ich czynne wypompowywanie z komórki, realizowane przez systemy pomp wypływowych [Chopra and Roberts 2001; Thaker et al. 2010]. Systemy te należą do konserwatywnej rodziny transporterów ABC, których homologiczne formy występują zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych [Van Bambeke et al. 2003a,b]. Jednocześnie wyniki nielicznych badań sugerują, że tetracykliny mogą wykazywać powinowactwo do transporterów wypływowych w komórkach eukariotycznych, choć zakres i znaczenie tego zjawiska nie zostały dotychczas jednoznacznie określone [Grandi and Giuliani 1988; Kavallaris et al. 1993; Schrickx and Fink-Gremmels 2007].

Systemy transporterów wypływowych tworzą rozbudowaną rodzinę białek błonowych, obejmującą obecnie 49 znanych transporterów ABC [Van Bambeke et al. 2003a], a także ich liczne odpowiedniki w komórkach prokariotycznych [Van Bambeke et al. 2003b]. Ich kluczową funkcją jest czynne usuwanie ksenobiotyków z komórki dzięki obecności zachowanej domeny wiążącej ATP, umożliwiającej transport substancji wbrew gradientowi stężeń [Borst and Elferink 2002; Peña-Solórzano et al. 2017]. Spośród transporterów biorących udział w mechanizmach obronnych komórki szczególne znaczenie przypisuje się P-gp (ABCB1) oraz BCRP (ABCG2). Zlokalizowane w zewnętrznej warstwie błony komórkowej (np. w enterocytach czy hepatocytach), mogą one ograniczać dostępność biologiczną licznych leków po podaniu doustnym, obniżając ich stężenie we krwi i tkankach, co wpływa zarówno na toksyczność ksenobiotyków, jak i skuteczność działania wielu substancji terapeutycznych [Jedlitschky et al. 2006].

Wysoką ekspresję P-gp obserwuje się w komórkach tworzących kluczowe bariery biologiczne, takie jak bariera jelitowa, bariera krew–mózg oraz bariera krew–oko [Borst and Elferink 2002; Shinkel and Jonker 2003; Nau et al. 2010; Peña-Solórzano et al. 2017; Kroll et al. 2020]. W jelicie P-gp zlokalizowana jest w apikalnej części błony enterocytów, gdzie może skutecznie kierować swoje substraty z powrotem do światła przewodu pokarmowego. W wątrobie natomiast białko to występuje w błonach hepatocytów tworzących kanalikuli żółciowe, uczestnicząc w procesach wydzielania do żółci. Drugim istotnym transporterem obecnym w barierach biologicznych jest BCRP – półtransporter zawierający pojedynczą domenę wiążącą nukleotyd oraz pojedynczą domenę transbłonową, którego ekspresję stwierdzono m.in. w łożysku, jelicie, mózgu oraz innych narządach istotnych dla dystrybucji ksenobiotyków [Peña-Solórzano et al. 2017]. Podobnie jak P-gp, BCRP zlokalizowany jest w zewnętrznych domenach komórek barierowych i uczestniczy zarówno w ograniczaniu wchłaniania substancji z jelita, jak i w nasilaniu ich klirensu wątrobowo-żółciowego oraz współtworzeniu barier: łożyskowej, krew–mózg i krew–jądro [Shinkel and Jonker 2003; Nau et al. 2010; Peña-Solórzano et al. 2017; Kroll et al. 2020].

W świetle danych wskazujących na skuteczne usuwanie tetracyklin z komórek bakteryjnych oraz doniesień sugerujących możliwe oddziaływanie wybranych tetracyklin z P-gp w komórkach eukariotycznych [Grandi and Giuliani 1988; Kavallaris et al. 1993; Schrickx and Fink-Gremmels 2007], zasadne stało się postawienie pytania, czy analogiczne mechanizmy transportowe mogą regulować również ich dostępność biologiczną i dystrybucję w organizmie ssaków. Hipoteza ta nabiera szczególnego znaczenia w odniesieniu do tetracyklin o niskiej przyswajalności i ograniczonej penetracji do ośrodkowego układu nerwowego (takich jak chociażby tygecyklina), w przypadku

których udział aktywnego transportu wypływowego mógłby stanowić czynnik ograniczający ekspozycję ogólnoustrojową i tkankową. Weryfikacja tej hipotezy wymagała zastosowania podejścia eksperymentalnego umożliwiającego selektywną modulację aktywności transporterów wypływowych *in vivo*, czego nie można było osiągnąć przy użyciu nieselektywnego inhibitora, jakim jest cyklosporyna A. W związku z tym podjęto próbę oceny udziału transporterów wypływowych w farmakokinetyce tygecykliny poprzez jej podawanie w skojarzeniu z elakridarem – selektywnym inhibitorem P-gp i BCRP [Liu et al. 2014]. Postępowanie to umożliwiło ocenę znaczenia transporterów wypływowych dla parametrów farmakokinetycznych tygecykliny po podaniu dootrzewnowym i doustnym.

Z uwagi na doniesienia wskazujące, że dystrybucja substratów transporterów wypływowych może różnić się pomiędzy liniami genetycznymi zwierząt doświadczalnych, badania przeprowadzono z wykorzystaniem odmiennych wariantów genetycznych myszy, co pozwoliło ocenić, czy obserwowane zjawiska mają charakter uniwersalny i nie są zależne od specyficznych uwarunkowań genetycznych. Dodatkowo przeanalizowano relacje między parametrami osocзовymi i mózgowymi tygecykliny przy zastosowaniu dawek pojedynczych i podwójnych, co umożliwiło ocenę zależności pomiędzy ekspozycją ogólnoustrojową a dystrybucją do ośrodkowego układu nerwowego.

Równolegle, w celu rozdzielenia wpływu transporterów wypływowych od procesów metabolicznych, zastosowano worykonazol, który w przeciwieństwie do cyklosporyny A, jest inhibitorem enzymów metabolicznych niewpływającym na aktywność transporterów wypływowych [Jeong et al. 2009; Lempers et al. 2016]. Podanie worykonazolu zarówno dootrzewnowo, jak i doustnie pozwoliło oszacować względne znaczenie metabolizmu jelitowego i wątrobowego w regulacji farmakokinetyki tygecykliny. Zastosowanie odrębnych, selektywnych modulatorów dla transporterów wypływowych i metabolizmu umożliwiło bardziej jednoznaczne rozdzielenie obu procesów, stanowiąc logiczne rozszerzenie i pogłębienie zagadnień podjętych w ramach pierwszego celu badań. Na tej podstawie przyjęto następujące hipotezy badawcze:

- ❖ Transportery P-gp i BCRP regulują farmakokinetykę tygecykliny poprzez ograniczanie jej dostępności biologicznej oraz modulowanie dystrybucji, w tym dystrybucji do mózgu, a ich selektywne hamowanie prowadzi do mierzalnych zmian ekspozycji ogólnoustrojowej i mózgowej.
- ❖ Metabolizm tygecykliny może stanowić niezależny od transporterów wypływowych czynnik regulujący jej farmakokinetykę.
- ❖ Obserwowane mechanizmy mogą mieć charakter uniwersalny pomiędzy różnymi wariantami genetycznymi modelu zwierzęcego.

Na podstawie sformułowanego celu oraz przyjętych hipotez badawczych, wyznaczono następujące zadania badawcze:

Zadanie badawcze 3: Ocena wpływu selektywnej inhibicji P-gp i BCRP na farmakokinetykę tygecykliny po podaniu doustnym i dootrzewnowym.

Zadanie badawcze 4: Analiza zależności między ekspozycją osocзовą a dystrybucją tygecykliny do mózgu z uwzględnieniem różnic między wariantami genetycznymi zwierząt doświadczalnych.

Zadanie badawcze 5: Ocena udziału metabolizmu jelitowego i wątrobowego w regulacji farmakokinetyki tygecykliny z zastosowaniem selektywnej modulacji enzymów metabolicznych.

Cel nr 3 – Ocena możliwości modulacji dostępności biologicznej tygecykliny za pomocą wybranych substancji pomocniczych oddziałujących na barierę jelitową.

Większość leków przeznaczonych do podawania doustnego zawiera substancje pomocnicze, które zapewniają prawidłowe podanie preparatu, ułatwiają proces technologiczny, zwiększają stabilność formulacji oraz modyfikują jej właściwości fizykochemiczne. Do substancji pomocniczych stosowanych w formulacjach doustnych i/lub iniekcyjnych należą m.in. modyfikatory pH, rozpuszczalne w wodzie rozpuszczalniki organiczne, oleje, surfaktanty, nierozpuszczalne w wodzie rozpuszczalniki organiczne, triglicerydy o średniej i długiej długości łańcucha, cyklodekstryny oraz fosfolipidy [Strickley 2004]. Choć tradycyjnie traktowane są one jako składniki o charakterze technologicznym, coraz liczniejsze doniesienia wskazują, że mogą wchodzić w interakcje z substancją czynną, wpływając na jej wchłanianie i dostępność biologiczną [Jackson et al. 2000; Strickley 2004]. Powyższe właściwości dotyczą m.in. takich związków jak trimetylochitozan, kaprylan sodu, deoksycholan sodu, bursztynian tokoferolu z glikolem polietylenowym (TPGS) oraz pochodne β -cyklodekstryny [Dintaman and Silverman 1999; Lo and Huang 2000; Arima et al. 2001; Zare et al. 2018; Nguyen et al. 2021]. Wykazano ponadto, że niektóre substancje pomocnicze mogą oddziaływać z transporterami białkowymi, w tym z transporterami wypływowymi [Bittner et al. 2002], lub wpływać na integralność połączeń międzykomórkowych, takich jak połączenia ścisłe [Ward et al. 2000]. Mechanizmy tych interakcji nie zostały dotychczas w pełni poznane i mają charakter wielokierunkowy, obejmując zarówno wpływ na elementy bariery jelitowej, jak i interakcje o charakterze chemicznym.

Pomimo stosowania substancji pomocniczych w produktach leczniczych zawierających tetracykliny (np. hydroksypropylocelulozy w preparatach z doksycykliną), w dostępnej literaturze brak jest informacji dotyczących ich wpływu na dostępność biologiczną tetracyklin z przewodu pokarmowego, nawet w przypadku preparatów komercyjnych, w których substancje pomocnicze stanowią integralny składnik formulacji. Luka ta jest szczególnie istotna w odniesieniu do tetracyklin charakteryzujących się bardzo niską dostępnością biologiczną po podaniu doustnym. Jednocześnie wiadomo, że farmakokinetyka tetracyklin wykazuje znaczną zmienność, a ich wchłanianie i dystrybucja nie zawsze korelują z właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak lipofilność. W świetle wcześniejszych badań wskazujących na istotną rolę transporterów wypływowych w regulacji dostępności biologicznej tetracyklin, zwłaszcza na poziomie nabłonka jelitowego, zasadne stało się również rozważenie, czy wybrane substancje pomocnicze takie jak trimetylochitozan, kaprylan sodu, deoksycholan sodu, TPGS oraz pochodne β -cyklodekstryny mogą modulować te same mechanizmy regulacyjne. Otwiera to możliwość traktowania substancji pomocniczych nie tylko jako składników technologicznych, lecz także jako potencjalnych modulatorów bariery jelitowej.

Substancje pomocnicze stosowane w przemyśle farmaceutycznym stanowią w tym kontekście interesujące narzędzie badawcze, ponieważ wiele z nich może modyfikować wchłanianie leków poprzez różne mechanizmy, przy czym wspólną cechą analizowanych w niniejszych badaniach substancji pozostaje ich potencjalny wpływ na aktywność P-gp. Z tego względu bariera jelitowa stanowiła kluczowy obszar przedmiotowych badań niniejszego osiągnięcia, ponieważ to na jej

poziomie dochodzi do pierwszego i często decydującego etapu regulacji dostępności biologicznej leków podawanych doustnie.

W nawiązaniu do założeń dwóch poprzednich celów, tygecyklina została w tym etapie potraktowana jako związek modelowy reprezentujący tetracykliny słabo wchłaniane, umożliwiającą ocenę, czy modulacja bariery jelitowej przez wybrane substancje pomocnicze może stanowić użyteczne podejście do modyfikacji wchłaniania tej grupy leków. Na tej podstawie przyjęto następującą hipotezę badawczą:

- ❖ Dostępność biologiczna tygecykliny po podaniu doustnym może być modulowana przez wybrane substancje pomocnicze, które poprzez oddziaływanie w obrębie bariery jelitowej, w tym wpływ na transportery wypływowe, mogą zwiększać frakcję dawki przenikającą przez nabłonek przewodu pokarmowego, bez istotnej modyfikacji dalszych etapów losów ustrojowych leku.

Na podstawie sformułowanego celu oraz przyjętej hipotezy badawczej, wyznaczono następujące zadanie badawcze:

Zadanie badawcze 6: Ocena wpływu wybranych substancji pomocniczych na dostępność biologiczną oraz wybrane parametry farmakokinetyczne tygecykliny po podaniu doustnym.

4. 1. 2. 3. Materiał i metody

Układ doświadczenia:

Doświadczenie 1

Badania przeprowadzono na 192 zdrowych, czterotygodniowych kurczętach brojlerach (Ross), które po tygodniowym okresie aklimatyzacji losowo przydzielono do grup dożylnych i doustnych ($n=8$ w każdej grupie). Dziesięć grup obejmowało schematy z dożylnym podaniem tetracyklin, a czternaście – z podaniem doustnym. Sześciu grupom podano poszczególne tetracykliny dożylnie bez cyklosporyny A w celu wyznaczenia klirensu całkowitego i objętości dystrybucji, a kolejnym sześciu – doustnie w celu określenia bezwzględnej dostępności biologicznej (figura 1). W następnych sześciu grupach cyklosporynę A (50 mg/kg m.c.) podawano doustnie 45 minut przed doustnym podaniem tetracyklin. Dodatkowo w trzech wariantach krzyżowych (z udziałem tygecykliny i oksytetracykliny) cyklosporynę A podawano dożylnie lub doustnie przed dożylnym albo doustnym podaniem tetracykliny, co pozwoliło rozdzielić wpływ modulacji jelitowej od zmian w eliminacji ogólnoustrojowej (figura 1).

Tetracykliny stosowano w dawce 10 mg/kg m.c., dożylnie do żyły skrzydłowej lub doustnie przez zgłębnik do wola; cyklosporynę A – w dawce 50 mg/kg m.c., 45 minut przed tetracykliną. Paszę wstrzymywano na 6 godzin, a wodę na 1 godzinę przed podaniem; dostęp do nich przywracano odpowiednio po 3 i 1 godzinie.

Próbki krwi (0,4 ml) pobierano z żyły skrzydłowej przed podaniem leku (0 h), następnie w grupach dożylnych w 0,083 i 0,25 h, a w grupach doustnych w 0,16 i 0,32 h po podaniu, a następnie we wszystkich grupach w 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 36; 48; 72; 96 oraz 120 godzinie. Po odwirowaniu osocze przechowywano w temperaturze -70°C do czasu oznaczeń analitycznych.

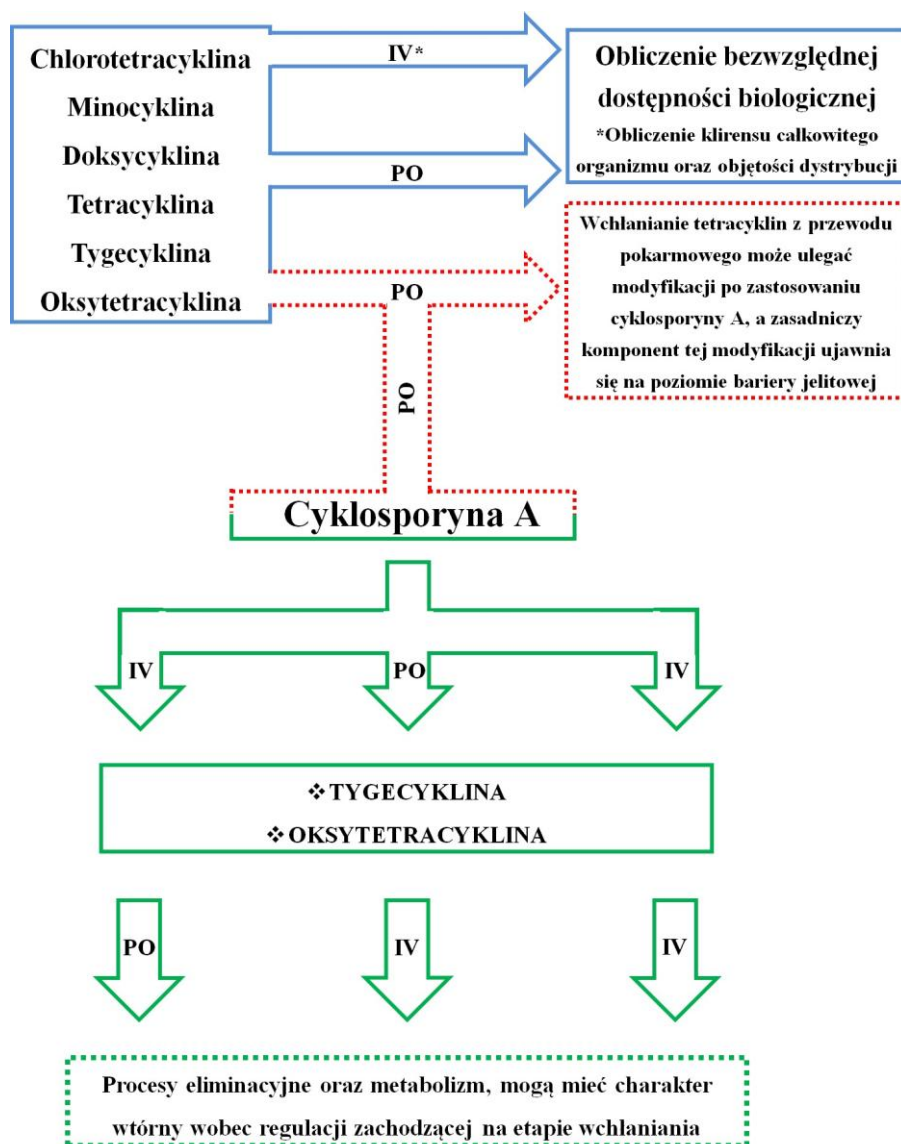


Figura 1. Ocena znaczenia nieselektywnej modulacji transportu wypływowego, metabolizmu i eliminacji w kształtowaniu farmakokinetyki tetracyklin *in vivo*. (PO – podanie doustne, IV – podanie dożylne).

Doświadczenie 2

Badania przeprowadzono na ośmiotygodniowych myszach szczepu BALB/c (n=4) oraz myszach typu dzikiego (n=4). Tygecyklinę podawano w dawce 10 mg/kg masy ciała (w jednej grupie w dawce 20 mg/kg masy ciała), elakridar w dawce 100 mg/kg masy ciała, a worykonazol w dawce 40 mg/kg masy ciała. Leki podawano doustnie przez zgłębnik do żołądka lub dootrzewnowo w zależności od schematu doświadczalnego. Elakridar oraz worykonazol (w odpowiednich wariantach) podawano 30 minut przed tygecykliną. Paszę wstrzymywano na 6 godzin przed podaniem tygecykliny i przywracano po 3 godzinach; dostęp do wody ograniczano od 1 godziny przed do 1 godziny po podaniu leku. W pierwszej serii doświadczeń, przeprowadzonej na myszach szczepu BALB/c, analizowano cztery schematy: dootrzewnowe podanie tygecykliny, dootrzewnowe podanie tygecykliny poprzedzone doustnym podaniem elakridaru, doustne podanie tygecykliny oraz doustne podanie tygecykliny poprzedzone doustnym podaniem elakridaru (figura 2). Próbkę pobierano w

zakresie od 0,25 do 24 godzin po podaniu w grupach dootrzewnowych oraz od 0,25 do 8 godzin w grupach doustnych. W drugiej serii doświadczeń, przeprowadzonej na myszach typu dzikiego, zastosowano rozszerzony układ obejmujący osiem wariantów: dootrzewnowe podanie tygecykliny; dootrzewnowe podanie tygecykliny poprzedzone doustnym podaniem elakridaru; dootrzewnowe podanie podwójnej dawki tygecykliny; doustne podanie tygecykliny; doustne podanie tygecykliny poprzedzone doustnym podaniem elakridaru; doustne podanie tygecykliny poprzedzone dootrzewnowym podaniem worykonazolu; doustne podanie tygecykliny poprzedzone doustnym podaniem worykonazolu; oraz doustne podanie tygecykliny poprzedzone jednoczesnym podaniem elakridaru i worykonazolu (figura 2). Punkty czasowe obejmowały zakres analogiczny do pierwszej serii, z dodatkowym pobraniem w 36 godzinie w grupach dootrzewnowych oraz w 12 godzinie w grupach doustnych.

W wyznaczonych punktach czasowych zwierzęta poddawano eutanazji, a następnie pobierano około 1 ml krwi z żyły głównej dolnej do probówek z heparyną. Po odwirowaniu osocze przechowywano w temperaturze -70°C do czasu oznaczeń. Po pobraniu krwi mózg usuwano w całości, przepłukiwano zimnym roztworem soli fizjologicznej w celu usunięcia pozostałości krwi, osuszano i analizowano bezpośrednio lub przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych oznaczeń.

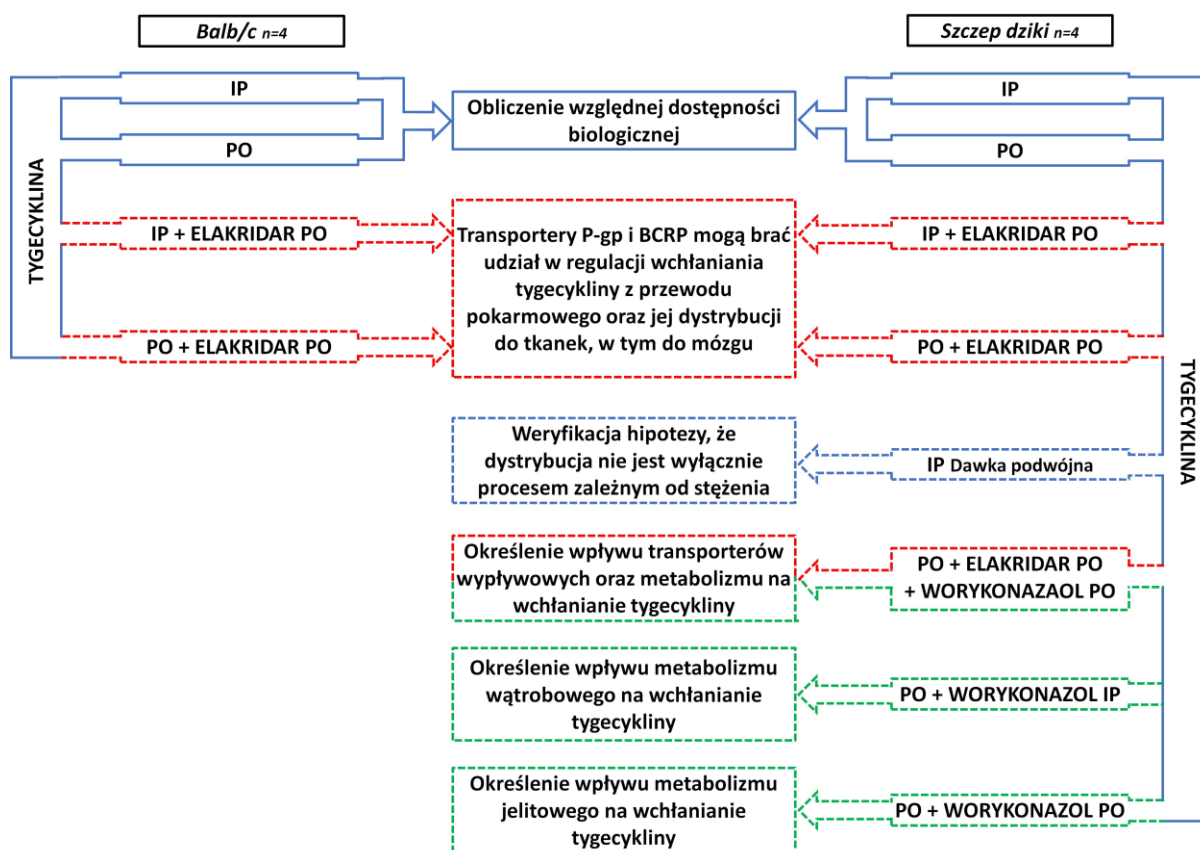


Figura 2. Ocena znaczenia transporterów P-gp i BCRP oraz procesów metabolicznych w regulacji farmakokinetyki tygecykliny *in vivo*. (PO – podanie doustne, IP – podanie dootrzewnowe).

Doświadczenie 3

Badania przeprowadzono na 64 zdrowych, czterotygodniowych kurczętach brojlerach (Ross), które po tygodniowym okresie aklimatyzacji losowo przydzielono do jednej grupy z dożylnym podaniem tygecykliny oraz siedmiu grup z podaniem doustnym ($n=8$ w każdej grupie). Tygecyklinę podawano w dawce 10 mg/kg masy ciała. Podanie dożylne umożliwiło wyznaczenie bezwzględnej dostępności biologicznej, klirensu całkowitego oraz objętości dystrybucji. W grupach doustnych oceniano wpływ wybranych substancji pomocniczych na wchłanianie tygecykliny (figura 3). W sześciu grupach tygecyklinę podawano jednocześnie z jedną z następujących substancji pomocniczych: trimetylochitozanem, dimetylowaną β -cyklodekstryną, hydroksypropyloowaną β -cyklodekstryną, TPGS, deoksycholanem sodu oraz kaprylanem sodu. Dawki substancji pomocniczych dobrano na podstawie danych literaturowych oraz z uwzględnieniem ich profilu bezpieczeństwa i odmienności strukturalnej, tak aby zapewnić możliwość wykrycia potencjalnego efektu modulacyjnego przy zachowaniu bezpieczeństwa modelu doświadczalnego. Substancje pomocnicze rozpuszczano indywidualnie w wodzie w objętości dostosowanej do masy ciała każdego zwierzęcia, a następnie dodawano odpowiednią dawkę tygecykliny, zachowując stałą dawkę przeliczoną na kilogram masy ciała. Paszę wstrzymywano na 6 godzin przed podaniem i przywracano po 3 godzinach; dostęp do wody ograniczano od 1 godziny przed do 1 godziny po podaniu preparatu. Leki podawano doustnie przez zgłębnik do wola lub dożylnie do żyły skrzydłowej.

Próbki krwi pobierano z żyły skrzydłowej przed podaniem leku, następnie w 0,083 i 0,25 godziny w grupie dożylnej oraz w kolejnych punktach czasowych wspólnych dla wszystkich grup: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 24; 36; 48 oraz 72 godziny po podaniu. Po odwirowaniu osocze przechowywano w temperaturze -70°C do czasu oznaczeń analitycznych.

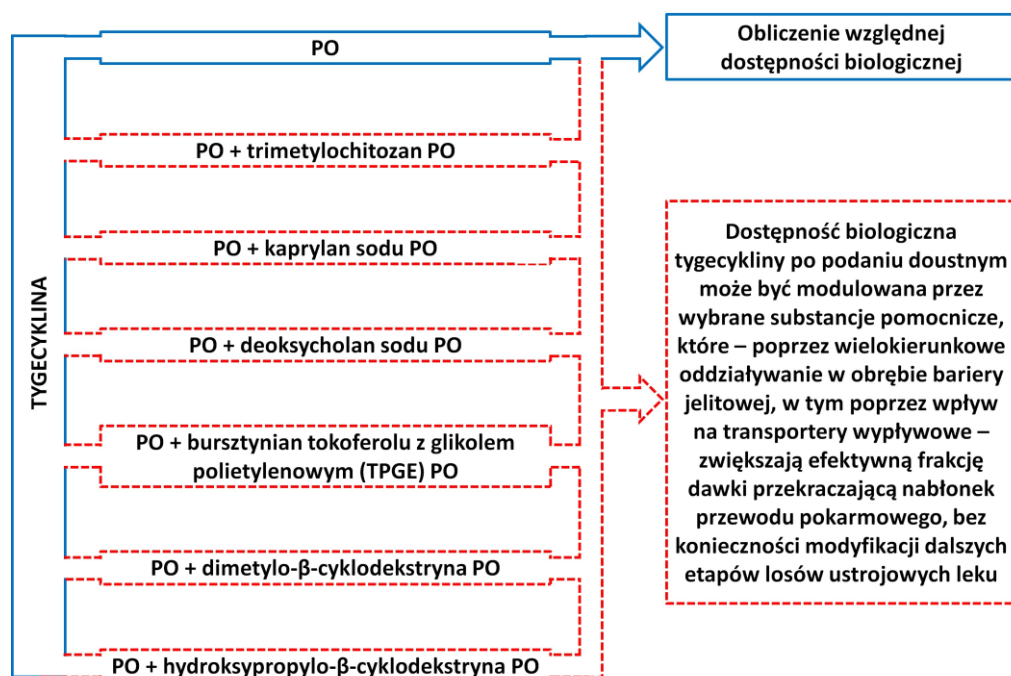


Figura 3. Ocena możliwości modulacji dostępności biologicznej tygecykliny za pomocą wybranych substancji pomocniczych oddziałujących na barierę jelitową. (PO – podanie doustne, IV – podanie dożylne).

Analityka laboratoryjna, farmakokinetyczna i statystyczna w cyklu badań

We wszystkich trzech etapach badań stosowano autorskie metody analityczne z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS oraz UPLC-MS/MS), rozwijane systematycznie w toku wieloletniej pracy z tetracyklinami, co znajduje odzwierciedlenie w cyklu wcześniejszych publikacji [Ziółkowski et al. 2016a,b, 2019, 2020]. Procedury obejmowały standaryzowane przygotowanie próbek (precypitacja białek, ekstrakcja ciecz–ciecz, a w przypadku tkanki mózgowej – homogenizacja i ekstrakcja SPE), a następnie analizę chromatograficzną z detekcją MS/MS. Metody były każdorazowo walidowane zgodnie z obowiązującymi wytycznymi w zakresie liniowości, dokładności, precyzji, selektywności, efektu matrycy oraz stabilności analitów. W przypadku zmiany gatunku lub matrycy biologicznej przeprowadzano re-walidację, zapewniając porównywalność i wiarygodność uzyskiwanych wyników. Szczegółowe parametry walidacyjne oraz dane kalibracyjne przedstawiono w publikacjach źródłowych i materiałach uzupełniających do poszczególnych prac.

Spójność podejścia analitycznego w trzech kolejnych celach badań – przy jednoczesnym dostosowaniu szczegółów procedur do specyfiki modelu eksperymentalnego – stanowi element ciągłości warsztatu badawczego rozwijanego w obszarze analityki tetracyklin. Zapewnienie wysokiej jakości, selektywności i powtarzalności oznaczeń stężeniowych było nie tylko warunkiem poprawnej interpretacji farmakokinetycznej, lecz także czynnikiem integrującym cały cykl badań – umożliwiającym porównywanie uzyskanych wyników pomiędzy modelami eksperymentalnymi oraz stanowiącymi podstawę wiarygodnego modelowania mechanistycznego. W szczególności w zadaniach badawczych realizowanych w ramach Celu 2 precyzja danych analitycznych była kluczowa dla zastosowania modeli bayesowskich, których stabilność i trafność oszacowań zależała bezpośrednio od jakości danych wejściowych.

W niniejszym cyklu badań zastosowano zróżnicowane podejścia analityczne, dostosowane do charakteru projektu, schematu próbkowania oraz celu mechanistycznego poszczególnych etapów. W zadaniach badawczych realizowanych w ramach Celu 1 oraz Celu 3 wykorzystano klasyczne podejście farmakokinetyczne oparte na analizie niekompartimentowej, uzupełnione – w przypadku Celu 1 – analizą kompartmentową. Parametry farmakokinetyczne wyznaczano z wykorzystaniem oprogramowania ThothPro™ (Gdańsk, Polska), współpracowanego w ramach projektu finansowanego z NCBiR (punkt 7.2). Oprogramowanie to umożliwia spójną analizę danych farmakokinetycznych w modelach jedno- i dwukompartimentowych oraz w ujęciu niekompartimentowym, przy zachowaniu przejrzystości procedur obliczeniowych. Takie podejście było możliwe dzięki konstrukcji eksperymentu, w którym dla każdego osobnika uzyskiwano pełny profil stężenie–czas, umożliwiający wyznaczenie kompletu parametrów farmakokinetycznych na poziomie indywidualnym. Uzyskanie pełnych krzywych farmakokinetycznych na poziomie osobniczym umożliwiało zastosowanie klasycznych metod obliczeniowych i bezpośrednie porównanie parametrów pomiędzy grupami. W obu tych etapach projektu parametry farmakokinetyczne obejmowały m.in. pole pod krzywą stężenie–czas, stałą szybkości eliminacji, okres półtrwania, klirens całkowity oraz objętość dystrybucji, a w grupach doustnych dodatkowo stałą szybkości wchłaniania, średni czas wchłaniania oraz okres półtrwania fazy wchłaniania. Różnice dotyczyły natomiast sposobu prezentacji i analizy statystycznej danych. W opracowywaniu wyników w ramach realizacji Celu 1, zgodnie z charakterem danych o rozkładzie log-normalnym typowym dla

parametrów farmakokinetycznych, stosowano transformację logarytmiczną oraz raportowano średnie geometryczne wraz z geometrycznym odchyleniem standardowym. Podejście to jest standardem w analizie parametrów farmakokinetycznych i pozwala na właściwą interpretację danych o asymetrycznym rozkładzie. Z kolei podczas opracowywania wyników w ramach realizacji Celu 3, ze względu na konstrukcję eksperymentu oraz jego porównawczy charakter, uzyskane dane przedstawiano jako średnie arytmetyczne wraz z odchyleniem standardowym. Wybór ten miał również na celu pełniejsze zobrazowanie skali zmienności biologicznej obserwowanej w badanych grupach, która przy prezentacji w postaci średnich geometrycznych może być wizualnie mniej wyraźna, choć pozostaje uwzględniona w analizach opartych na transformacji logarytmicznej. Takie podejście pozwalało lepiej oddać rzeczywistą amplitudę odpowiedzi farmakokinetycznej w warunkach modulacji bariery jelitowej przez substancje pomocnicze.

Odmienne podejście zastosowano dla opracowania wyników w ramach realizacji Celu 2, którego konstrukcja metodologiczna wymagała niestandardowych rozwiązań. W badaniach tych zastosowano schemat próbkowania seryjnego (tzw. *sparse sampling*), w którym pojedyncze zwierzę przypisane było do konkretnego punktu czasowego, co uniemożliwiało klasyczne wyznaczanie parametrów farmakokinetycznych dla każdego osobnika. W konsekwencji zastosowano bayesowskie modele hierarchiczne, implementowane w środowisku R z wykorzystaniem pakietu *rstanarm*. Podejście to umożliwiała:

- pełną propagację niepewności oszacowań,
- częściowe łączenie informacji pomiędzy grupami (*partial pooling*),
- stabilizację estymacji przy ograniczonej liczbie obserwacji,
- wyznaczanie rozkładów a posteriori dla parametrów farmakokinetycznych zamiast punktowych estymatorów.

Parametry farmakokinetyczne obliczano na podstawie losowań z rozkładów a posteriori, a wyniki przedstawiano jako mediany wraz z 95% przedziałami wiarygodności (*credible intervals*). Opracowanie i implementacja modeli statystycznych zostały przygotowane we współpracy ze specjalistą z zakresu statystyki bayesowskiej, natomiast moja rola obejmowała merytoryczną i koncepcyjną interpretację farmakokinetyczną modeli, dobór parametrów podlegających estymacji oraz weryfikację zgodności uzyskanych oszacowań z zasadami farmakokinetyki klasycznej. Takie zróżnicowane podejście metodologiczne pozwoliło dostosować narzędzia analityczne do charakteru każdego z etapów badań: od klasycznej, indywidualnej analizy farmakokinetycznej (Cele 1 i 3), po modelowanie populacyjne oparte na podejściu bayesowskim (Cel 2), co było szczególnie istotne w analizie dystrybucji tkankowej oraz relacji osocze-mózg.

4. 1. 2. 4. Wyniki

1. Wyniki dotyczące farmakokinetyki wybranych tetracyklin po zastosowaniu nieselektywnego modulatora transportu wypływowego, metabolizmu i eliminacji – cyklosporyny A.

A. Wpływ doustnego podania nieselektywnego inhibitora transportu wypływowego i enzymów metabolicznych – cyklosporyny A – na osoczną farmakokinetykę tetracyklin podanych doustnie:

- ❖ Po zastosowaniu cyklosporyny A stężenia osoczowe wszystkich badanych tetracyklin były wyższe niż po podaniu samych tetracyklin, w niemal całym analizowanym zakresie czasowym.
- ❖ Po zastosowaniu cyklosporyny A pole pod krzywą stężenie–czas, maksymalne stężenie osoczowe, bezwzględna dostępność biologiczna wszystkich tetracyklin były wyższe niż w grupie kontrolnej, a względna skala tego wzrostu układała się następująco: tygecyklina (6×) > oksytetracyklina (4×) > chlorotetracyklina (3×) > tetracyklina ≈ minocyklina ≈ doksycyklina (2×).
- ❖ U wszystkich zwierząt otrzymujących cyklosporynę A wartości ekspozycji ogólnoustrojowej wszystkich tetracyklin były wyższe niż w grupach kontrolnych w zdecydowanej większości punktów czasowych.
- ❖ Parametry opisujące fazę wchłaniania tetracyklin nie wykazywały jednolitego, kierunkowego wzorca zmian.

B. Wpływ podania dożylnego lub doustnego cyklosporyny A na farmakokinetykę tygecykliny i oksytetracykliny podanych doustnie:

- ❖ Podanie doustne cyklosporyny A spowodowało co najmniej dwukrotny wzrost pola pod krzywą stężenie–czas, dostępności biologicznej oraz trzy i półkrotny wzrost stężenia maksymalnego tygecykliny w porównaniu z podaniem dożylnym cyklosporyny A.
- ❖ Podanie doustne cyklosporyny A spowodowało co najmniej półtorakrotny wzrost pola pod krzywą stężenie–czas, dostępności biologicznej oraz stężenia maksymalnego oksytetracykliny w porównaniu z podaniem dożylnym cyklosporyny A.

C. Wpływ podania dożylnego lub doustnego cyklosporyny A na farmakokinetykę tygecykliny i oksytetracykliny podanych dożylnie:

- ❖ Podanie dożylnie cyklosporyny A spowodowało około pięciokrotny wzrost pola pod krzywą stężenie–czas oraz trzyipółkrotnie wyższe stężenie maksymalne tygecykliny, w porównaniu z podaniem doustnym cyklosporyny A.
- ❖ Podanie dożylnie cyklosporyny A spowodowało dziesięciokrotny spadek klirensu całkowitego i objętości dystrybucji w stanie stacjonarnym tygecykliny w porównaniu z podaniem doustnym cyklosporyny A.
- ❖ Podanie doustne i dożylnie cyklosporyny A spowodowało około półtorakrotny wzrost pola pod krzywą stężenie–czas oraz stężenia maksymalnego oksytetracykliny.
- ❖ Podanie dożylnie cyklosporyny A spowodowało około półtorakrotne zmniejszenie klirensu całkowitego oksytetracykliny.
- ❖ Podanie doustne i dożylnie cyklosporyny A spowodowało istotne wydłużenie średniego czasu przebywania oksytetracykliny w organizmie.

2. Wyniki dotyczące farmakokinetyki tygecykliny po zastosowaniu elakridaru jako selektywnego inhibitora P-gp i BCRP oraz worykonazolu jako selektywnego inhibitora metabolizmu.

A. Wpływ elakridaru (selektywnego inhibitora P-gp i BCRP) podawanego doustnie na farmakokinetykę osoczną tygecykliny podanej doustnie i dootrzewnowo:

- ❖ Doustne podanie elakridaru spowodowało ponad dwukrotny wzrost pola pod krzywą w pierwszych sześciu godzinach oraz wzrost maksymalnego stężenia osoczowego tygecykliny podanej doustnie u myszy BalB/c i szczepu dzikiego. W całym analizowanym zakresie czasowym stężenia osoczowe tygecykliny (z elakridarem) były co najmniej półtorakrotnie wyższe niż po podaniu samej tygecykliny (bez elakridaru), a efekt ten obejmował wszystkie punkty czasowe.
- ❖ Doustne podanie elakridaru spowodowało ponad półtorakrotny wzrost pola pod krzywą stężenie–czas oraz maksymalnego stężenia osoczowego tygecykliny podanej dootrzewnowo u myszy BalB/c i szczepu dzikiego. W całym analizowanym zakresie czasowym stężenia osoczowe tygecykliny (z elakridarem) były istotnie wyższe niż po podaniu samej tygecykliny (bez elakridaru), a efekt ten miał charakter konsekwentny i obejmował wszystkie punkty czasowe (przy czym skala wzrostu była większa u myszy BALB/c).
- ❖ Podanie podwójnej dawki tygecykliny dootrzewnowo spowodowało dwukrotny wzrost jej pola pod krzywą stężenie–czas w stosunku do dawki pojedynczej oraz niespełna półtorakrotny wzrost tego parametru w porównaniu z tygecykliną podaną dootrzewnowo po uprzednim podaniu elakridaru.
- ❖ Podanie podwójnej dawki tygecykliny dootrzewnowo spowodowało półtorakrotny wzrost stężenia maksymalnego tygecykliny we wczesnej fazie przebiegu krzywej, natomiast w fazie późnej stężenia były zbliżone lub niższe niż u myszy otrzymujących dawkę pojedynczą tygecykliny po uprzednim podaniu elakridaru.
- ❖ Przebieg krzywej (zmian stężenia tygecykliny w czasie) w grupie otrzymującej tygecyklinę dootrzewnowo po uprzednim podaniu elakridaru różnił się od przebiegu krzywej po podaniu podwójnej dawki tygecykliny dootrzewnowo. Przebieg ten charakteryzował się utrzymywaniem podwyższonych stężeń w fazie pośredniej (dystrybucja/metabolizm) i późnej (eliminacja) w grupie otrzymującej elakridar i pojedynczą dawkę tygecykliny, bez wyłącznie proporcjonalnego przesunięcia krzywej stężenie–czas.

B. Wpływ elakridaru (selektywnego inhibitora P-gp i BCRP) podawanego doustnie na dystrybucję do mózgu tygecykliny podanej dootrzewnowo:

- ❖ Profil stężeń mózgowych tygecykliny po zastosowaniu elakridaru miał charakter dwufazowy; w odniesieniu do stężeń tygecykliny nie obserwowano wyraźnej przewagi w najwcześniejszych punktach czasowych, natomiast wtórne zwiększenie jej stężeń występowało w przedziale około 1–4 godzin, z utrzymywaniem istotnie wyższych wartości w fazie pośredniej.
- ❖ Doustne podanie elakridaru spowodowało około dwukrotny wzrost pola pod krzywą stężenie–czas oraz istotny wzrost (niespełna półtorakrotny) maksymalnego stężenia tygecykliny w mózgu u myszy BalB/c i szczepu dzikiego.
- ❖ Podanie podwójnej dawki tygecykliny zwiększało jej stężenia w mózgu w porównaniu z dawką pojedynczą. Przebieg zmian stężenia tygecykliny w czasie pozostawał podobny do obserwowanego w grupie kontrolnej – stężenia tygecykliny w mózgu stopniowo się zmniejszały i nie wykazywały wtórnego wzrostu, który występował po uprzednim podaniu elakridaru. W fazie wczesnej (dystrybucja) stężenia tygecykliny w mózgu po podaniu podwójnej dawki były wyższe niż po podaniu pojedynczej dawki w skojarzeniu z

elakridarem, natomiast w przedziale 2–24 godzin stężenia tygecykliny po zastosowaniu elakridaru były zbliżone lub w niektórych punktach wyższe.

- ❖ Podanie doustne elakridaru poprzedzające podanie tygecykliny prowadziło do zwiększenia stosunku ekspozycji mózgowej do osoczowej tygecykliny (wyrażonej jako stosunek wartości pola stężenie–czas) myszy szczepu BALB/c. U myszy typu dzikiego wpływ elakridaru podanego przed tygecykliną na ten parametr był niejednoznaczny i wykazywał zależność od zmienności indywidualnej.
- ❖ W przeciwieństwie do podwójnej dawki tygecykliny, podanie pojedynczej dawki dootrzewnowo u myszy typu dzikiego skutkowało wyższym stosunkiem pola pod krzywą stężenie–czas w mózgu do pola pod krzywą w osoczu.

C. Wpływ drogi podania worykonazolu (selektywnego inhibitora enzymów metabolicznych) na farmakokinetykę osoczną tygecykliny podanej doustnie:

- ❖ Zarówno po doustnym, jak i dootrzewnowym podaniu worykonazolu stężenia osoczowe tygecykliny podanej doustnie były wyższe we wczesnych punktach czasowych (0,25–0,5 godziny) w porównaniu z podaniem samej tygecykliny.
- ❖ Niezależnie od drogi podania worykonazolu dochodziło do wzrostu pola pod krzywą stężenie–czas oraz maksymalnego stężenia osoczowego tygecykliny w zakresie od nieco poniżej półtorakrotnego do około dwukrotnego.
- ❖ Różnice pomiędzy doustnym a dootrzewnowym podaniem worykonazolu w odniesieniu do pola pod krzywą oraz maksymalnego stężenia osoczowego tygecykliny były niejednoznaczne, z wyjątkiem najwcześniejszego punktu czasowego, w którym wyższe stężenia tygecykliny obserwowano po podaniu dootrzewnowym worykonazolu.
- ❖ Podanie tygecykliny po uprzednim zastosowaniu doustnym worykonazolu i elakridaru nie powodowało dalszego istotnego zwiększenia pola pod krzywą stężenie–czas ani maksymalnego stężenia osoczowego tygecykliny w porównaniu z podaniem tygecykliny po uprzednim zastosowaniu wyłącznie elakridaru.

3. Wyniki dotyczące wpływu substancji pomocniczych na farmakokinetykę tygecykliny podanej doustnie:

- ❖ Podanie wszystkich badanych substancji pomocniczych, z wyjątkiem sodu kaprylanu, prowadziło do zwiększenia pola pod krzywą stężenie–czas oraz bezwzględnej dostępności biologicznej tygecykliny po jej podaniu doustnym, przy czym względna siła efektu oraz przybliżona skala wzrostu układały się następująco: hydroksypropylowana β -cyklodekstryna (około $\times 2$ – 3) $\approx$ TPGS (około $\times 2$ – 3) $>$ sodu deoksycholan (około $\times 2$) $>$ dimetylowana β -cyklodekstryna (około $\times 1,5$) $\approx$ trimetylochitozan (około $\times 1,5$).
- ❖ Maksymalne stężenie osoczowe tygecykliny zwiększało się po zastosowaniu wszystkich substancji pomocniczych, przy czym wyraźny, ponad dwukrotny wzrost obserwowano po podaniu hydroksypropylowanej β -cyklodekstryny oraz TPGS, natomiast w przypadku pozostałych substancji skala wzrostu była mniejsza i obarczona większą zmiennością.
- ❖ Wartości parametrów opisujących fazę wchłaniania tygecykliny nie wykazywały jednolitych zmian po zastosowaniu substancji pomocniczych, natomiast parametry fazy eliminacji oraz średni czas przebywania tygecykliny w organizmie pozostawały zasadniczo niezmienione.

4. 1. 2. 5. Omówienie wyników

Ocena wpływu nieselektywnej modulacji transportu wypływowego, metabolizmu i eliminacji, z zastosowaniem cyklosporyny A, na dostępność biologiczną oraz wybrane parametry farmakokinetyczne wybranych tetracyklin po podaniu doustnym (zadanie badawcze 1)

Pierwsze zadanie badawcze w ramach realizacji Celu nr 1 zostało zaprojektowane jako punkt wyjścia do weryfikacji hipotezy, że farmakokinetyka tetracyklin po podaniu doustnym nie jest determinowana wyłącznie przez dyfuzję bierną i właściwości fizykochemiczne tych leków, lecz podlega także istotnej regulacji przez mechanizmy aktywne na poziomie bariery jelitowej. Założenie to wynikało zarówno z danych literaturowych [Grandi and Giuliani 1988; Kavallaris et al. 1993; Schrickx and Fink-Gremmels 2007], jak i z wcześniejszych badań własnych, wskazujących na skrajnie zróżnicowane wartości biodostępności tetracyklin [Ziółkowski et al. 2020]. Dominujące w literaturze wyjaśnienia tego zjawiska odwoływały się do różnic w lipofilności oraz szybkości dyfuzji przez błony biologiczne [Hessl and Stamey 1971; Chin and Lach 1975; Argast and Beck 1985; Nikaido and Thanassi 1993; Shnappinger and Hillen 1996]. Jednak dane eksperymentalne wskazują, że parametry farmakokinetyczne tetracyklin nie korelują w sposób jednoznaczny z ich parametrami fizykochemicznymi opisującymi lipofilność (np. współczynnik podziału oktanol/woda) ani z wynikami badań prowadzonych w modelach błonowych [Barza et al. 1975; Sigler et al. 2000]. Co więcej, nawet w warunkach doświadczalnych minimalizujących wpływ czynników takich jak skład paszy, jony metali czy formuacja, dostępność biologiczna tetracyklin pozostaje silnie zróżnicowana [Ziółkowski et al. 2016b; 2020]. Obserwacje te sugerowały istnienie dodatkowych, dotychczas niedostatecznie scharakteryzowanych mechanizmów regulacyjnych.

W tym kontekście cyklosporyna A została wykorzystana jako narzędzie farmakologiczne o charakterze nieselektywnym, oddziałujące zarówno na transportery wypływowe z rodziny ABC, w tym P-gp, BCRP, jak i – w pewnym zakresie – na metabolizm oraz eliminację nerkową i wątrobową [Laskow et al. 1990; Hebert 1997; FDA 2020]. Zastosowanie cyklosporyny A umożliwiło zatem jednoczesne zahamowanie głównych procesów aktywnych potencjalnie ograniczających dostępność biologiczną tetracyklin, co pozwalało na globalną ocenę podatności farmakokinetyki tetracyklin na modulację tych mechanizmów. Takie podejście, choć celowo nieselektywne, było adekwatne na etapie wstępnej weryfikacji istnienia aktywnej regulacji farmakokinetyki tetracyklin szczególnie na poziomie wchłaniania. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że cyklosporyna A od wielu lat zajmuje szczególne miejsce w badaniach nad rolą transporterów wypływowych w farmakokinetyce leków. Związek ten był jednym z pierwszych szeroko stosowanych inhibitorów P-gp wykorzystywanych do funkcjonalnego ujawniania udziału transportu wypływowego w regulacji dostępności biologicznej, dystrybucji tkankowej oraz interakcji lek–lek, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* [Demeule et al. 1999; FDA 2020].

Uzyskane wyniki dostarczyły silnych przesłanek wskazujących, że doustne podanie cyklosporyny A prowadziło do istotnego wzrostu stężeń osoczowych wszystkich badanych tetracyklin w niemal wszystkich analizowanych punktach czasowych. Efekt ten był obserwowany konsekwentnie, niezależnie od indywidualnych właściwości farmakokinetycznych poszczególnych tetracyklin, co wskazuje na jego uogólniony charakter w badanym modelu. Jednocześnie skala wzrostu maksymalnych stężeń osoczowych była wyraźnie zróżnicowana pomiędzy tetracyklinami – od umiarkowanej w przypadku minocykliny do bardzo nasilonej w przypadku tygecykliny.

Zróznicowanie to zdaje się potwierdzać, że obserwowany efekt wynikał nie tylko z obecności cyklosporyny A w krążeniu, lecz pozostawał zależny od właściwości farmakokinetycznych poszczególnych tetracyklin.

Sz szczególnie istotne zmiany dotyczyły parametrów opisujących całkowitą ekspozycję ogólnoustrojową, tj. pola pod krzywą stężenie-czas i wynikającej z tego bezwzględnej dostępności biologicznej tetracyklin. Po doustnym podaniu cyklosporyny A wartości tych parametrów wzrastały w sposób znaczący i wielokrotny, przy czym największe względne zmiany obserwowano dla tetracyklin charakteryzujących się najniższym „wyjściowym” wchłanianiem z przewodu pokarmowego. W przypadku tygecykliny dostępność biologiczna wzrastała kilkukrotnie, natomiast dla doksycykliny – leku o wysokiej dostępności biologicznej – efekt ten był wyraźnie słabszy. Taki wzorec zmian ma istotne znaczenie interpretacyjne, ponieważ wskazuje, że cyklosporyna A najsilniej znosi ograniczenia farmakokinetyczne tych związków, których losy ustrojowe mogą być w największym stopniu determinowane przez mechanizmy aktywne.

Na uwagę zasługuje również fakt, że wszystkie zwierzęta otrzymujące cyklosporynę A wykazywały wyższe wartości pola pod krzywą stężenie-czas i dostępności biologicznej tetracyklin niż jakikolwiek osobnik w grupach kontrolnych. Taka jednorodność kierunku zmian, przy jednoczesnym zróżnicowaniu ich skali pomiędzy poszczególnymi tetracyklinami, przemawia przeciwko przypadkowemu charakterowi obserwowanego efektu i wskazuje na jego wysoką powtarzalność w warunkach zastosowanego modelu doświadczalnego. Co istotne, brak jednoznacznej korelacji pomiędzy wielkością efektu a lipofilnością cząsteczek dodatkowo podważa model, w którym dyfuzja bierna stanowiłaby dominujący mechanizm regulujący wchłanianie tetracyklin z przewodu pokarmowego.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że farmakokinetyka tetracyklin po podaniu doustnym podlega istotnej regulacji przez procesy aktywne, a ich nieselektywna inhibicja prowadzi do znaczących, ilościowo zróżnicowanych zmian ekspozycji ogólnoustrojowej.

Ograniczenia metodologiczne: Należy podkreślić, że zastosowane narzędzie farmakologiczne (cyklosporyny A) nie pozwalało na jednoznaczne rozdzielenie udziału transportu wypływowego i metabolizmu w regulacji farmakokinetiki tetracyklin, co w sposób naturalny uzasadniało konieczność realizacji kolejnych zadań badawczych, ukierunkowanych na bardziej precyzyjne przypisanie obserwowanych efektów poszczególnym mechanizmom regulacyjnym. Choć nieselektywność cyklosporyny A jest obecnie postrzegana jako ograniczenie metodologiczne, to w początkowym etapie analizy mechanizmów regulacyjnych stanowi ona istotną zaletę, pozwalającą na jednoznaczne wykazanie, że aktywne procesy transportowe uczestniczą w kształtowaniu farmakokinetyki badanych związków.

Ocena wpływu drogi podania cyklosporyny A na farmakokinetykę wybranych tetracyklin w celu rozróżnienia efektów zachodzących na poziomie wchłaniania z jelit oraz na poziomie metabolizmu i eliminacji (zadanie badawcze 2)

Choć nieselektywna inhibicja procesów aktywnych przy użyciu cyklosporyny A jednoznacznie wykazała podatność tetracyklin na modulację ich farmakokinetyki, sama skala wzrostów stężeń osoczowych i dostępności biologicznej nie pozwalała jeszcze na całkowite przypisanie obserwowanych efektów dominującemu mechanizmowi regulacyjnemu. W szczególności

pozostawało otwarte pytanie, w jakim stopniu obserwowane zmiany wynikały z zahamowania transporterów wypływowych w nabłonku jelitowym, a w jakim z ograniczenia klirensu nerkowego i wątrobowego, rozumianego przede wszystkim jako procesy wydzielnicze i transportowe, a nie intensywna biotransformacja enzymatyczna. Rozdzielenie tych efektów wymagało zastosowania strategii eksperymentalnej umożliwiającej funkcjonalne oddzielenie procesów zachodzących na etapie wchłaniania od procesów odpowiedzialnych za eliminację i inne losy ogólnoustrojowe. Z tego względu skoncentrowano się na dwóch tetracyklinach o odmiennych właściwościach farmakokinetycznych – tygecyklinie, charakteryzującej się skrajnie niską dostępnością biologiczną, oraz oksytetracyklinie, wykazującej zdecydowanie wyższe wchłanianie z przewodu pokarmowego (Ziółkowski et al. 2020).

W pierwszym układzie eksperymentalnym tygecyklinę oraz oksytetracyklinę podawano dożylnie kurczętom brojlerom, co poprzedzono doustnym lub dożylnym podaniem cyklosporyny A. Ograniczało to znacząco etap wchłaniania jelitowego (poza cyklem jelitowo-wątrobowym) badanych tetracyklin i pozwalało ocenić wyłącznie wpływ cyklosporyny A na procesy metaboliczne i eliminacyjne. Dożylne podanie cyklosporyny A przed dożylnym podaniem tygecykliny powodowało około 10-krotny wzrost stężeń osoczowych i wartości pola pod krzywą stężenie-czas tygecykliny, czemu towarzyszył proporcjonalny spadek klirensu całkowitego. Doustne podanie cyklosporyny A przed dożylnie podaną tygecykliną spowodowało około 2,5-krotny wzrost stężeń i pola pod krzywą stężenie-czas oraz analogiczny spadek klirensu. W tym układzie zależność pomiędzy wzrostem wartości pola pod krzywą stężenie-czas a zmniejszeniem klirensu była bezpośrednia, co wskazuje, że modulacja eliminacji ogólnoustrojowej może istotnie zwiększać ekspozycję tygecykliny, gdy nie występuje etap wchłaniania. Interpretacja ta pozostaje zgodna z literaturą wskazującą, że w przypadku tygecykliny dominujące znaczenie ma eliminacja wątrobowa z istotnym udziałem wydzielania żółciowego, przy ograniczonym udziale metabolizmu (Hoffmann 2007). Oznacza to, że wpływ cyklosporyny A – jako inhibitora transporterów oraz umiarkowanego inhibitora enzymów cytochromu P450 – może w tym modelu obejmować zarówno komponent transportowy, jak i metaboliczny. W analogicznym schemacie dotyczącym oksytetracykliny dożylne podanie cyklosporyny A przed dożylnie podaną oksytetracykliną powodowało około 1,5-krotny wzrost stężeń osoczowych oraz wartości pola pod krzywą stężenie-czas oksytetracykliny, z towarzyszącym proporcjonalnym spadkiem klirensu całkowitego, natomiast doustne podanie cyklosporyny A przed dożylnie podaną oksytetracykliną prowadziło do około 1,5-krotnego wzrostu wartości pola pod krzywą stężenie-czas przy braku istotnych zmian klirensu całkowitego. Obserwacje te są zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi, że udział eliminacji z żółcią w przypadku oksytetracykliny jest znacznie mniejszy niż w przypadku tygecykliny, a większe znaczenie ma najprawdopodobniej eliminacja nerkowa, co może tłumaczyć mniejszą wrażliwość parametrów farmakokinetycznych oksytetracykliny na modulację transportowo-wątrobową. Klirens wątrobowy, w odróżnieniu od nerkowego, obejmuje zarówno komponent transportowy (wydzielanie żółciowe zależne od transporterów wypływowych) [Kroll et al. 2021], jak i metaboliczny, a ponieważ cyklosporyna A jest umiarkowanym inhibitorem izoenzymów cytochromu P450, nie można jednoznacznie przypisać obserwowanych zmian klirensu wyłącznie mechanizmom transportowym. W analizowanym modelu zmniejszenie klirensu oraz wzrost wartości pola pod krzywą stężenie-czas były istotne w przypadku

tygecykliny i umiarkowane w przypadku oksytetracykliny, co wskazuje, że modulacja eliminacji ogólnoustrojowej może istotnie zwiększać ekspozycję tetracyklin po podaniu dożylnym.

W drugim układzie eksperymentalnym tygecyklinę oraz oksytetracyklinę podawano doustnie, co poprzedzono doustnym lub dożylnym podaniem cyklosporyny A. W tym układzie analizowano wzrost stężeń osoczowych tetracyklin, wartości pola pod krzywą stężenie-czas oraz bezwzględnej dostępności biologicznej w zależności od drogi podania cyklosporyny A. W przypadku doustnego podania tetracyklin wzrost stężeń osoczowych, wartości pola pod krzywą stężenie-czas oraz bezwzględnej dostępności biologicznej był konsekwentnie większy po doustnym podaniu cyklosporyny A niż po jej podaniu dożylnym, mimo że dostępność biologiczna samej cyklosporyny A po podaniu doustnym jest ograniczona [Hebert 1997].

Taki rozkład wyników ma kluczowe znaczenie interpretacyjne. Gdyby dominującym mechanizmem odpowiedzialnym za wzrost ekspozycji po doustnym podaniu tetracyklin było zahamowanie klirensu nerkowego, należałoby oczekiwać silniejszego efektu po dożylnym podaniu cyklosporyny A, które zapewnia wyższe i bardziej powtarzalne stężenia ogólnoustrojowe inhibitora. Analogicznie, gdyby główną rolę odgrywało ograniczenie klirensu wątrobowego o charakterze transportowo-wydzielniczym, przewaga efektu po dożylnym podaniu cyklosporyny A byłaby logiczną konsekwencją farmakokinetyki inhibitora. Takiego układu zależności jednak nie zaobserwowano. Pomimo wyraźnego wpływu cyklosporyny A na klirens w modelu dożylnym cyklosporyny A i badanych tetracyklin (pierwszy układ eksperymentalny), efekt ten nie był dominujący w warunkach doustnego podania tetracyklin. Oznacza to, że mechanizmy wykazane w pierwszym układzie eksperymentalnym – choć ilościowo istotne – nie stanowią czynnika determinującego ekspozycję przy drodze doustnej podawania oksytetracykliny i tygecykliny. Z kolei większa skala wzrostu parametrów farmakokinetycznych po doustnym podaniu cyklosporyny A poprzedzającym doustne podanie tetracyklin wskazuje na istotny udział procesów zachodzących na poziomie nabłonka jelitowego, w tym zahamowania transporterów wpływowych ograniczających wchłanianie. Zależność ta była szczególnie wyraźna w przypadku tygecykliny – związku o bardzo niskiej wyjściowej biodostępności po podaniu doustnym [Ziółkowski et al. 2020] – w przypadku której względna skala wzrostu wartości pola pod krzywą stężenie-czas była największa. To właśnie ta obserwacja uzasadniała wybór tygecykliny jako modelu do dalszych, bardziej szczegółowych badań nad rolą transporterów wpływowych w regulacji farmakokinetyki tetracyklin.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki sugerują, że obserwowany wzrost ekspozycji ogólnoustrojowej tygecykliny i oksytetracykliny był przede wszystkim związany z zahamowaniem aktywności transporterów wpływowych na poziomie nabłonka jelitowego. Wpływ inhibitora na klirens nerkowy i wątrobowy był obecny i możliwy do ilościowego wykazania, miał jednak charakter wtórny i nie tłumaczył ani skali obserwowanych efektów, ani ich zależności od drogi podania. Wyniki te wskazują, że nabłonek jelitowy odgrywa kluczową rolę w ograniczaniu dostępności biologicznej badanych tetracyklin.

~

Przyjęta strategia badawcza, oparta na zastosowaniu nieselektywnego inhibitora, nie pozwalała na jednoznaczne rozdzielenie udziału poszczególnych transporterów wpływowych ani na precyzyjne oddzielenie efektów transportowych od metabolicznych. Ograniczenie to wynikało zarówno z szerokiego spektrum działania cyklosporyny A, jak i z nakładania się jej wpływu na procesy

transportowe oraz metaboliczne, zwłaszcza w obrębie wątroby. W konsekwencji obserwowane zmiany farmakokinetyczne mogły być interpretowane wyłącznie na poziomie globalnym, bez możliwości ich przypisania do konkretnych mechanizmów regulacyjnych.

W tej sytuacji dalsze postępowanie badawcze wymagało przyjęcia odmiennej strategii, ukierunkowanej na funkcjonalne i możliwe selektywne rozdzielenie wpływu transporterów wpływowych oraz procesów metabolicznych na farmakokinetykę tetracyklin. Przyjęte podejście nie miało charakteru eksploracyjnego ani opisowego, lecz stanowiło logiczne następstwo wcześniejszych obserwacji i było podporządkowane pogłębieniu interpretacji mechanistycznej przy jednoczesnym ograniczeniu liczby zmiennych zakłócających analizę.

Pierwszym elementem tej strategii był wybór tygecykliny jako związku modelowego. Jej szczególny profil farmakokinetyczny czyni ją wyjątkowo wrażliwym narzędziem do badania mechanizmów ograniczających ekspozycję ogólnoustrojową oraz dystrybucję tkankową. Tygecyklina charakteryzuje się bardzo niską dostępnością biologiczną po podaniu doustnym oraz ograniczoną penetracją do kompartmentów chronionych, w szczególności do ośrodkowego układu nerwowego [Hoffman et al. 2007; Munyeza et al. 2016; Ziółkowski et al. 2020]. Właściwości te sprawiają, że nawet niewielka modulacja procesów regulujących jej losy ustrojowe prowadzi do mierzalnych zmian parametrów farmakokinetycznych, co istotnie zwiększa czułość zastosowanego modelu badawczego.

Jednocześnie dostępne dane literaturowe wskazują, że eliminacja tygecykliny zachodzi w dużej mierze drogą żółciową oraz nerkową, przy stosunkowo niewielkim udziale procesów metabolicznych [Hoffman et al. 2007]. Taki profil eliminacji implikuje potencjalny udział transporterów wpływowych w regulacji klirensu leku, zarówno na poziomie wątroby, jak i nerek. W konsekwencji tygecyklina stanowiła adekwatny model do testowania hipotezy o istotnej roli P-gp i BCRP w regulacji farmakokinetyki tetracyklin *in vivo*.

Drugim filarem przyjętej strategii był wybór modelu mysiego. W porównaniu z modelem ptasim zastosowanym, model myszy oferuje istotne przewagi metodologiczne, w szczególności w zakresie możliwości analizy dystrybucji tkankowej leku. Zastosowanie myszy umożliwia oznaczanie stężeń tygecykliny w mózgu, co stanowi warunek konieczny do oceny znaczenia transporterów wpływowych zlokalizowanych w obrębie bariery krew–mózg. Dodatkowym uzasadnieniem wyboru modelu mysiego była dostępność dobrze scharakteryzowanych szczepów różniących się tłem genetycznym, co pozwala na ocenę powtarzalności obserwowanych zjawisk oraz ich niezależności od specyficznych uwarunkowań jednego modelu zwierzęcego. Włączenie do badań myszy szczepu BALB/c oraz myszy typu dzikiego umożliwiło analizę potencjalnych różnic ilościowych wynikających z odmiennej ekspresji i aktywności transporterów ABC, co ma istotne znaczenie interpretacyjne w kontekście uogólniania uzyskanych wyników [Barr et al. 2020].

Kolejnym, kluczowym elementem strategii badawczej było zastosowanie selektywnych narzędzi farmakologicznych umożliwiających funkcjonalne rozdzielenie wpływu transporterów wpływowych i metabolizmu. W tym celu wykorzystano elakridar jako inhibitor transporterów P-gp i BCRP oraz worykonazol jako inhibitor metabolizmu tetracyklin niewpływający na aktywność transporterów wpływowych [Jeong et al. 2009; Liu et al. 2014; Lempers et al. 2016]. Elakridar został wybrany ze względu na potencjalnie wysoką selektywność wobec transporterów P-gp i BCRP przy jednocześnie ograniczonym wpływie na metabolizm, co wykazano w badaniach wcześniejszych [Ward and Azzarano 2004; Englund et al. 2014]. W przeciwieństwie do cyklosporyny A, elakridar

umożliwia ocenę wpływu zahamowania transportu wypływowego bez istotnego nakładania się efektów metabolicznych, co stanowiło warunek konieczny do pogłębionej analizy mechanistycznej. Należy jednak podkreślić, że zastosowane podejście miało charakter funkcjonalny i opierało się na farmakologicznej modulacji aktywności transporterów, bez bezpośredniego oznaczania ich ekspresji ani aktywności w badanych tkankach.

Istotnym elementem uzasadniającym wybór elakridaru była również decyzja dotycząca drogi jego podania. Elakridar był podawany doustnie, co wynikało z danych wskazujących na wielokrotnie wyższą dostępność biologiczną tej drogi podania w porównaniu z drogą dootrzewnową [Sane et al. 2012]. Zastosowanie drogi doustnej umożliwiało osiągnięcie stężeń systemowych wystarczających do skutecznej modulacji transporterów P-gp i BCRP, co było istotne dla uchwycenia jego efektu farmakodynamicznego. Jednocześnie bardzo słaba, a w praktyce marginalna rozpuszczalność elakridaru w wodzie stanowiła istotne ograniczenie dla jego podania drogą dożylną, która w warunkach doświadczalnych wymagałaby zastosowania rozpuszczalników o potencjalnie istotnym wpływie na farmakokinetykę badanych związków. W konsekwencji doustna droga podania elakridaru stanowiła najbardziej racjonalny i metodologicznie bezpieczny wybór.

Uzupełnieniem tej strategii było zastosowanie worykonazolu jako selektywnego inhibitora metabolizmu, niewykazującego istotnego wpływu na aktywność transporterów wypływowych [Jeong et al. 2009; Lempers et al. 2016]. Podanie worykonazolu zarówno doustnie, jak i dootrzewnowo umożliwiło dodatkowo rozróżnienie udziału metabolizmu jelitowego i wątrobowego, co nie było możliwe przy zastosowaniu inhibitorów nieselektywnych. Takie podejście pozwoliło na przeprowadzenie analizy porównawczej, w której efekty wynikające z modulacji transportu wypływowego mogły zostać zestawione z efektami wynikającymi z zahamowania metabolizmu, przy zachowaniu spójnych warunków doświadczalnych.

Istotnym elementem przyjętej strategii było również zastosowanie różnych dróg podania tygecykliny oraz modulatorów farmakokinetyki. Podanie dootrzewnowe tygecykliny umożliwiało analizę wpływu elakridaru i worykonazolu na parametry farmakokinetyczne niezależnie od procesów zachodzących w świetle przewodu pokarmowego, natomiast podanie doustne pozwalało na bezpośrednią ocenę mechanizmów regulujących wchłanianie z jelita. Szczególnie istotne było skojarzenie doustnego podania elakridaru z dootrzewnowym podaniem tygecykliny. Takie podejście umożliwiało ocenę wpływu zahamowania transportu wypływowego na eliminację i dystrybucję leku przy założeniu, że wchłanianie z jamy otrzewnej jest procesem efektywnym i mało podatnym na modulację transporterową [Porter et al. 1985; Al. Shoyaib 2019]. Tym samym możliwe było funkcjonalne rozdzielenie wpływu transporterów wypływowych na wchłanianie od ich roli w procesach eliminacyjnych i dystrybucyjnych.

Ocena wpływu selektywnej inhibicji P-gp i BCRP na farmakokinetykę tygecykliny po podaniu doustnym i dootrzewnowym (zadanie badawcze 3)

Pierwszym krokiem w realizacji przyjętej strategii badawczej była charakterystyka farmakokinetyki osoczowej tygecykliny w warunkach niezakłóconego funkcjonowania transporterów wypływowych. Analiza ta stanowiła punkt odniesienia dla dalszych rozważań i obejmowała obserwacje uzyskane po podaniu tygecykliny zarówno drogą dootrzewnową, jak i doustną, przy założeniu braku farmakologicznej modulacji transporterów wypływowych, które – zgodnie z danymi literaturowymi – odgrywają istotną rolę w regulacji dostępności licznych ksenobiotyków w

organizmie ssaków [Borst and Elferink 2002; Shinkel and Jonker 2003; Nau et al. 2010; Peña-Solórzano et al. 2017].

Po dootrzewnowym podaniu tygecykliny myszom obserwowano w osoczu szybkie pojawienie się leku oraz osiąganie maksymalnych stężeń w bardzo wczesnych punktach czasowych. Następnie stężenia tygecykliny ulegały stopniowemu obniżeniu wraz z upływem czasu obserwacji. Profil stężenie–czas miał charakter ciągły, z wyraźnym rozróżnieniem fazy wczesnej (dystrybucyjnej) oraz późniejszej (eliminacyjnej), bez cech sugerujących wtórne narastanie ekspozycji. Taki przebieg pozostaje zgodny z doniesieniami wskazującymi, że pozajelitowe podanie tetracyklin prowadzi do szybkiego uzyskania istotnych stężeń leku przy jednoczesnym braku ograniczeń związanych z barierą jelitową [Porter et al. 1985; Al Shoyaib et al. 2019]. Wartości stężeń oznaczane w kolejnych punktach czasowych mieściły się w zakresie typowym dla tej drogi podania i prowadziły do uzyskania stabilnej, powtarzalnej całkowitej ekspozycji osoczowej, wyrażonej jako wartości pola pod krzywą stężenie–czas. Uzyskane wartości pola pod krzywą stężenie–czas oraz stężenia maksymalne były zgodne zarówno z danymi literaturowymi, jak i z wcześniejszymi obserwacjami własnymi dotyczącymi farmakokinetyki tetracyklin po podaniu pozajelitowym [Anadón 1985; Dyer 1988; Zhanel et al. 2004; Ziółkowski et al. 2016a, 2020], co wskazuje na brak nietypowych zaburzeń w przebiegu losów ustrojowych tygecykliny w tym układzie.

Odmienny obraz uzyskano po doustnym podaniu tygecykliny w warunkach braku modulacji transporterów wpływowych. W tym przypadku stężenia osoczowe były wyraźnie niższe niż po podaniu dootrzewnowym, a wartości maksymalne charakteryzowały się większą zmiennością osobniczą. Profile czasowe miały bardziej spłaszczony charakter, a moment osiągnięcia stężenia maksymalnego był przesunięty w czasie. Całkowita ekspozycja osoczowa, wyrażona jako wartości pola pod krzywą stężenie–czas, pozostawała istotnie niższa, co jest zgodne z dobrze udokumentowaną bardzo ograniczoną doustną dostępnością biologiczną tygecykliny, wynikającą z jej właściwości fizykochemicznych oraz interakcji zachodzących na poziomie bariery jelitowej [Jasiecka-Mikołajczyk et al. 2018; Ziółkowski et al. 2020]. Pomimo istotnych różnic ilościowych pomiędzy drogami podania, jakościowy charakter profili osoczowych tygecykliny pozostawał zasadniczo podobny. Zarówno po podaniu dootrzewnowym, jak i doustnym, krzywe stężenie–czas miały regularny przebieg, bez wtórnych maksimów czy odwrócenia trendu zmian stężeń.

W kolejnym etapie analizy farmakokinetyki osoczowej tygecykliny oceniono przebieg jej stężeń w warunkach farmakologicznej modulacji transporterów wpływowych poprzez zastosowanie elakridaru, przy zachowaniu analogicznego schematu obserwacji jak w warunkach kontrolnych. Analiza obejmowała zarówno podanie tygecykliny drogą dootrzewnową, jak i doustną, przy jednoczesnym doustnym podaniu elakridaru, i miała charakter opisowy, stanowiący bezpośrednie rozszerzenie obserwacji poczynionych w odpowiednich grupach kontrolnych.

Po podaniu tygecykliny w obecności elakridaru – zarówno w schemacie dootrzewnowym, jak i doustnym – obserwowano wyraźne zwiększenie ekspozycji osoczowej w porównaniu z warunkami braku modulacji farmakologicznej. Względna skala wzrostu wartości pola pod krzywą stężenie–czas była jednak większa po doustnym podaniu tygecykliny niż po podaniu dootrzewnowym, co wskazuje, że efekt modulacji nie ograniczał się wyłącznie do etapu eliminacyjnego, lecz obejmował również procesy zachodzące na etapie wchłaniania. W obu przypadkach wzrost dotyczył zarówno stężeń osiąganych we wczesnych punktach czasowych, jak i dalszego przebiegu profilu stężenie–czas.

Stężenia maksymalne były istotnie wyższe, a całkowita ekspozycja osoczowa, wyrażona jako pole pod krzywą stężenie–czas, ulegała znacznemu zwiększeniu. Profile czasowe zachowywały regularny przebieg, jednak w obecności elakridaru cechowały się wolniejszym obniżaniem się stężeń w czasie. W fazie pośredniej i późnej stężenia osoczowe pozostawały konsekwentnie wyższe niż w grupach otrzymujących wyłącznie tygecyklinę, co prowadziło do trwałego „wypiętrzenia” krzywej stężenie–czas w całym okresie obserwacji. Zmiany te są zgodne z modyfikacją równowagi pomiędzy dopływem leku do krążenia ogólnoustrojowego a jego dalszą eliminacją i dystrybucją, przy zachowaniu regularnego przebiegu profili czasowych. Istotne jest przy tym, że taki rozkład zmian w czasie dotyczył zarówno schematu dootrzewnowego, w którym tygecyklina omija barierę jelitową, jak i schematu doustnego, w którym proces wchłaniania z przewodu pokarmowego stanowi potencjalne miejsce oddziaływania wielu mechanizmów regulacyjnych. Utrzymywanie się podwyższonych stężeń osoczowych w całym analizowanym przedziale czasowym, niezależnie od drogi podania tygecykliny, jest trudne do wyjaśnienia wyłącznie wpływem na jeden etap losów leku i sugeruje udział procesów wspólnych dla obu schematów podania. W przypadku podania doustnego należy jednak uwzględnić, że tygecyklina podlega sekwencyjnej regulacji na co najmniej dwóch poziomach farmakokinetycznych. Pierwszym z nich jest nabłonek jelitowy, w którym transportery wypływowe mogą ograniczać przenikanie leku do krążenia wrotnego, drugim natomiast jest etap wątrobowy, obejmujący wydzielanie żółciowe oraz komponent transportowo-metaboliczny. Oznacza to, że obserwowany wzrost stężeń po podaniu doustnym nie musi być wyłącznie konsekwencją modulacji eliminacji ogólnoustrojowej, lecz może odzwierciedlać łączny efekt zahamowania wpływu jelitowego oraz ograniczenia wydzielania żółciowego. W kontekście danych wskazujących na dominującą eliminację tygecykliny drogą przewodu pokarmowego, obserwowany spadek efektywnego klirensu w warunkach selektywnej inhibicji P-gp/BCRP pozostaje spójny z udziałem transporterów wypływowych w procesie wydzielania żółciowego. Choć w ramach niniejszego projektu nie prowadzono bezpośrednich oznaczeń wydzielania żółciowego ani pomiarów aktywności transporterów w wątrobie, zgodność obserwowanego efektu z profilem eliminacyjnym tygecykliny opisanym w literaturze wskazuje, że taka interpretacja pozostaje najbardziej logicznym wyjaśnieniem uzyskanych zmian klirensu [Hoffmann et al. 2007].

W tym ujęciu szczególnego znaczenia nabiera fakt, że zastosowany modulator charakteryzuje się selektywnością wobec transporterów P-gp i BCRP, a obserwowane zmiany farmakokinetyki osoczowej tygecykliny miały charakter trwały i powtarzalny. Choć charakter przeprowadzonych analiz nie pozwala na bezpośrednie przypisanie obserwowanych efektów pojedynczym strukturom molekularnym, zbieżność odpowiedzi po podaniu dootrzewnowym i doustnym, przemawia za udziałem systemów transportu wypływowego w regulacji losów tygecykliny w krążeniu ogólnoustrojowym.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki wskazują, że zahamowanie aktywności P-gp i BCRP wpływa na farmakokinetykę tygecykliny nie tylko na etapie jej wchłaniania, lecz także na dalsze losy leku w organizmie. Oznacza to, że transportery te mogą uczestniczyć zarówno w ograniczaniu dopływu tygecykliny do krążenia, jak i w regulacji jej utrzymywania się w organizmie oraz eliminacji.

**Analiza zależności między ekspozycją osoczną a dystrybucją tygecykliny do mózgu z
uwzględnieniem różnic między wariantami genetycznymi zwierząt doświadczalnych
(zadanie badawcze 4)**

Kolejnym, logicznie wynikającym z wcześniejszych obserwacji, elementem przyjętej strategii badawczej była analiza zależności pomiędzy ekspozycją osoczną tygecykliny a jej dystrybucją do ośrodkowego układu nerwowego, rozumianą jako wynik interakcji pomiędzy stężeniami ogólnoustrojowymi a funkcją wyspecjalizowanych barier biologicznych, w szczególności bariery krew–mózg. W niniejszym zadaniu badawczym uwaga została celowo skupiona nie na syntetycznym ujęciu ilościowym, lecz na jakościowym opisie przebiegów czasowych stężeń tygecykliny w mózgu, z uwzględnieniem różnic pomiędzy schematami podania oraz pomiędzy badanymi szczepami myszy. Takie podejście miało na celu uchwycenie subtelnych, ale powtarzalnych różnic, które w analizie stricte parametrycznej mogłyby ulec spłaszczeniu. Jednocześnie analiza ta pozwoliła ocenić, w jakim stopniu obserwowane zmiany mają charakter powtarzalny w odmiennych wariantach genetycznych modelu doświadczalnego, a więc czy ich kierunek i stabilność pozostają zachowane mimo różnic szczepowych.

W grupach kontrolnych, w których tygecyklina była podawana dootrzewnowo bez jednoczesnej modulacji transporterów wypływowych, obserwowano stosunkowo prosty i jednorodny profil zmian stężenia leku w mózgu. Stężenia tygecykliny w mózgu osiągały wartości najwyższe we wczesnych punktach czasowych po podaniu leku, po czym następował dość szybki spadek w ciągu pierwszych 2–3 godzin, a następnie wolniejsza faza obniżania stężeń aż do ostatniego analizowanego punktu czasowego. Podanie elakridaru doustnie przed dootrzewnowym podaniem tygecykliny prowadziło do istotnej zmiany charakteru profili czasowych stężeń mózgowych. W obu badanych szczepach myszy krzywe stężeń tygecykliny w mózgu przestawały mieć charakter monotonicznie malejący. W pierwszych punktach czasowych (0,25–0,5 h) obserwowano często względnie niskie lub porównywalne stężenia w porównaniu z grupą kontrolną, co może sugerować, że efekt elakridaru nie ujawniał się natychmiast po podaniu tygecykliny. Następnie jednak, w przedziale od około 1 do 4 godzin, stężenia tygecykliny w mózgu ulegały wtórnemu wzrostowi lub utrzymywały się na podwyższonym poziomie, tworząc wyraźnie odmienny kształt krzywej stężenie–czas niż w grupach bez inhibitora. Ten jakościowy (ale także ilościowy) „dwufazowy” charakter profilu mózgowego po zastosowaniu elakridaru był szczególnie wyraźny u myszy BALB/c. U myszy typu dzikiego tendencja ta była również obecna, choć w nieco mniej wyraźnej formie, co znalazło odzwierciedlenie w większej zmienności indywidualnych profili. Zjawisko „dwufazowego” charakteru profilu mózgowego tygecykliny po zastosowaniu elakridaru może pozostawać w związku z farmakokinetyką samego elakridaru. Wykazano bowiem, że maksymalne stężenia elakridaru w mózgu są osiągane z opóźnieniem względem momentu podania doustnego (Sane et al. 2012). W niniejszym modelu tygecyklinę podawano dootrzewnowo 45 minut po doustnym podaniu elakridaru, co oznacza, że w najwcześniejszych punktach czasowych ekspozycja mózgowa inhibitora mogła jeszcze nie osiągać wartości maksymalnych. Taka sekwencja czasowa może częściowo wyjaśniać opóźniony charakter wzrostu stężeń tygecykliny w mózgu po zastosowaniu elakridaru.

Istotnym elementem opisu dystrybucji do mózgu jest porównanie profili uzyskanych po zastosowaniu elakridaru i pojedynczej dawki tygecykliny z profilami obserwowanymi po dootrzewnowym podaniu podwójnej dawki tygecykliny u myszy szczepu dzikiego. Po

dootrzewnowym podaniu podwójnej dawki tygecykliny stężenia w mózgu (oraz w osoczu) były wyższe niż po dawce pojedynczej w niemal wszystkich punktach czasowych, jednak przebieg krzywej stężenie–czas pozostawał zasadniczo taki sam. Oznacza to, że zwiększenie dawki tygecykliny prowadziło więc do ilościowego podwyższenia stężeń, bez zmiany ich przebiegu czasowego. W przeciwieństwie do tego, elakridar nie tylko zwiększał stężenia tygecykliny (w dawce pojedynczej) w mózgu, lecz także modyfikował ich rozkład czasowy. W przedziale 2–24 h stężenia badanego leku w mózgu po elakridarze były porównywalne lub wyższe niż po podwójnej dawce (przy podobnych a nawet niższych stężeniach w osoczu), mimo że w najwcześniejszych punktach czasowych sytuacja była odwrotna. Różnica ta wskazuje, że efekt inhibitora nie sprowadza się do prostego zwiększenia stężeń tygecykliny w mózgu, lecz obejmuje zmianę czasowej relacji między ekspozycją ogólnoustrojową a mózgową.

W tej sytuacji przeprowadzono ostrożne porównanie ekspozycji mózgowej i osoczowej tygecykliny. Analiza ta nie miała charakteru odrębnego punktu końcowego ani bezpośredniego wskaźnika funkcjonalnego, lecz stanowiła narzędzie pomocnicze, pozwalające ocenić profile mózgowe w odniesieniu do zmian ekspozycji ogólnoustrojowej. Takie podejście pozwala na jakościową ocenę, czy zmiany stężeń tygecykliny w mózgu pozostają jedynie wtórnym odzwierciedleniem zmian osoczowych, czy też sugerują modyfikację stosunku pomiędzy tymi dwoma kompartmentami, przy pełnej świadomości ograniczeń interpretacyjnych wynikających z pochodnego charakteru tego typu analiz. Uwzględnienie dwóch odmiennych szczepów umożliwiło dodatkowo ocenę stabilności tej relacji w warunkach zmienności biologicznej wynikającej z różnic genetycznych. U myszy BALB/c analiza wykazała zwiększenie stosunku wartości pola pod krzywą stężenie–czas mózg/osocze po dootrzewnowym podaniu tygecykliny poprzedzonym doustnym podaniem elakridaru w porównaniu z grupą otrzymującą wyłącznie tygecyklinę dootrzewnowo. Wzrost ekspozycji mózgowej tygecykliny był proporcjonalnie większy niż wzrost ekspozycji osoczowej po podaniu elakridaru, co wskazuje na zmianę relacji pomiędzy tymi kompartmentami. Z kolei u myszy typu dzikiego wyniki były mniej jednoznaczne – przedziały ufności obejmowały zarówno brak różnicy, jak i potencjalny wzrost stosunku po zastosowaniu inhibitora. Analiza wykazała ponadto wrażliwość wskaźnika na pojedyncze obserwacje odstające; po wyłączeniu jednego zwierzęcia z wyjątkowo niskim stężeniem mózgowym w późnym punkcie czasowym oszacowany stosunek mózg/osocze w grupie z elakridarem wzrastał, jednak analiza ta miała charakter pomocniczy. Dopiero w dalszej kolejności przeanalizowano wpływ podwojenia dawki tygecykliny w modelu bez inhibitora. W tej grupie zaobserwowano, że stosunek wartości pola pod krzywą stężenie–czas mózg/osocze był niższy niż po podaniu pojedynczej dawki tygecykliny, pomimo istotnie wyższych stężeń osoczowych. Oznacza to, że zwiększenie dawki tygecykliny nie prowadziło do proporcjonalnego zwiększenia jej ekspozycji w mózgu, a wręcz skutkowało względnym „rozcieńczeniem” ekspozycji mózgowej względem osoczowej. Obserwacja ta wskazuje, że relacja mózg/osocze nie ma charakteru stałego i może ulegać modulacji w zależności od schematu podania.

Interpretując znaczenie zarówno stężeń mózgowych, jak również stosunku wartości pola pod krzywą stężenie–czas mózg/osocze tygecykliny, należy również podkreślić, że wskaźniki te nie pozwalają na bezpośrednie wnioskowanie o przepuszczalności bariery krew–mózg. Zwiększenie tych parametrów może wynikać z co najmniej trzech odmiennych zjawisk: (i) rzeczywistego zwiększenia przenikania leku przez barierę krew–mózg, (ii) zmniejszenia klirensu leku z mózgu, lub (iii) zmiany

profilu czasowego stężeń osoczowych, która wtórnie wpływa na pole pod krzywą w mózgu. W przeprowadzonych badaniach nie było możliwości rozdzielenia tych mechanizmów, ponieważ nie oznaczano stężeń w płynie mózgowo-rdzeniowym ani nie oceniano frakcji wolnej leku. Dodatkowym ograniczeniem jest fakt, że stężenia tygecykliny oznaczane w homogenatach mózgowych obejmują zarówno lek zlokalizowany w przestrzeni naczyniowej, jak i pozanaczyniowej. Przy wysokich stężeniach osoczowych część stężenia mózgowego może zatem odzwierciedlać komponent naczyniowy, co dodatkowo komplikuje interpretację stosunku wartości pola pod krzywą stężenie-czas mózg/osocze.

Mimo tych ograniczeń, analiza stężeń jak również stosunku wartości pola pod krzywą stężenie-czas mózg/osocze tygecykliny wnosi istotną wartość do całości rozważań w ramach celu 2. Po pierwsze, pokazuje ona, że relacja pomiędzy ekspozycją osoczną a mózgową tygecykliny nie jest stała i może ulegać zmianom w zależności od schematu leczenia. Po drugie, wskazuje, że modulacja transporterów wypływowych może wpływać nie tylko na bezwzględne stężenia leku w mózgu, ale również na ich relację do ekspozycji ogólnoustrojowej, przynajmniej w niektórych warunkach doświadczalnych i w określonych szczepach myszy. Po trzecie, uwypukla znaczenie czynników osobniczych i zmienności biologicznej, które w analizach opartych na wskaźnikach pochodnych mogą odgrywać rolę decydującą.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki wskazują, że hamowanie aktywności transporterów wypływowych P-gp i BCRP prowadzi nie tylko do zwiększenia stężeń tygecykliny w mózgu, lecz w określonych warunkach także do zmiany relacji między stężeniami tygecykliny w mózgu a jej ekspozycją ogólnoustrojową. Odmienny przebieg zmian stężeń tygecykliny w mózgu, niewyjaśniany wyłącznie wzrostem stężeń osoczowych, sugeruje, że działanie selektywnego inhibitora P-gp i BCRP obejmuje nie tylko wpływ na stężenie leku w krążeniu, lecz także na procesy regulujące jego dystrybucję do ośrodkowego układu nerwowego. Kierunek obserwowanego efektu był podobny w obu analizowanych wariantach genetycznych zwierząt doświadczalnych, choć różnił się jego nasileniem.

Ograniczenia metodologiczne: Zastosowane oznaczenia tkankowe nie pozwalają jednoznacznie rozdzielić wpływu zastosowanego inhibitora transportu wypływowego na przenikanie przez barierę krew-mózg od wpływu na klirens mózgowy lub komponentę naczyniową, dlatego wnioski dotyczące mechanizmu działania transporterów w obrębie bariery powinny pozostać ostrożne i ograniczone do poziomu zależności farmakokinetycznych.

Ocena udziału metabolizmu jelitowego i wątrobowego w regulacji farmakokinetyki tygecykliny z zastosowaniem selektywnej modulacji enzymów metabolicznych (zadanie badawcze 5)

Jednym z kluczowych problemów interpretacyjnych w badaniach farmakokinetycznych ukierunkowanych na identyfikację mechanizmów regulujących losy leków w organizmie jest rozdzielenie efektów wynikających z aktywnego transportu wypływowego od efektów związanych z procesami metabolicznymi, zwłaszcza na etapie wchłaniania. W poprzednich etapach badań wykazano, że inhibicja transporterów wypływowych prowadziła do istotnego zwiększenia ekspozycji ogólnoustrojowej tygecykliny niezależnie od drogi jej podania. Wzrost ekspozycji obserwowano zarówno po podaniu dootrzewnowym, gdzie wykluczony był udział bariery jelitowej, jak i po podaniu doustnym, przy czym efekt był wyraźniejszy w schemacie doustnym. Oznacza to, że transportery wypływowe uczestniczą w regulacji farmakokinetyki tygecykliny na poziomie ogólnoustrojowym, a

w warunkach podania doustnego dodatkowo ograniczają jej dostępność na etapie wchłaniania. Jednocześnie sama obserwacja wzrostu ekspozycji po inhibicji transportu wypływowego nie pozwala jednoznacznie ocenić udziału metabolizmu jelitowego lub wątrobowego w ograniczaniu dostępności biologicznej ani tego, czy jego zahamowanie mogłoby nasilać obserwowane efekty.

W tym kontekście zasadne stało się pytanie, czy – obok transportu wypływowego – istotną rolę w regulacji farmakokinetyki tygecykliny może odgrywać również metabolizm jelitowy lub wątrobowy. Dane literaturowe wskazują, że udział biotransformacji wątrobowej w całkowitym klirensie tygecykliny jest ograniczony, choć mierzalny (rzędu kilkunastu procent) [Hoffman et al. 2007], przy jednoczesnym znaczącym udziale procesów eliminacyjnych o charakterze pozametabolicznym, w tym wydzielania żółciowego. Oznacza to, że zmiany stężeń osoczowych, szczególnie po podaniu doustnym, mogą teoretycznie wynikać zarówno z modulacji transportu, jak i z wpływu na enzymy metaboliczne uczestniczące w efekcie pierwszego przejścia.

W celu oddzielenia udziału procesów metabolicznych od udziału transportu wypływowego w farmakokinetyce tygecykliny zastosowano układ doświadczalny obejmujący selektywną inhibicję metabolizmu przy użyciu worykonazolu oraz – jako punkt odniesienia – selektywną modulację transporterów wypływowych za pomocą elakridaru. Worykonazol jest dobrze scharakteryzowanym inhibitorem enzymów cytochromu P450, opisywanym jako związek niewykazujący istotnego wpływu na aktywność transporterów z rodziny ABC, w tym P-gp i BCRP [Jeong et al. 2008; Lempers et al. 2016]. Taki profil farmakologiczny umożliwia ocenę wpływu zahamowania procesów metabolicznych na stężenia tygecykliny w osoczu przy ograniczeniu ryzyka jednoczesnej modulacji transportu wypływowego, co miało szczególne znaczenie w analizie zmian ekspozycji po podaniu doustnym, gdzie potencjalny udział efektu pierwszego przejścia jest największy.

Analiza profili czasowych stężeń tygecykliny w osoczu podanej doustnie po wcześniejszym podaniu worykonazolu, zarówno doustnie, jak i dootrzewnowo, w odniesieniu do grupy kontrolnej nieotrzymującej inhibitora, wykazała, że zahamowanie metabolizmu prowadziło do wzrostu stężeń tygecykliny w bardzo wczesnych punktach czasowych, szczególnie w 0,25 oraz 0,5 godziny od podania. W późniejszych punktach czasowych różnice pomiędzy grupami otrzymującymi worykonazol a grupą kontrolną stopniowo się zmniejszały, a wartości stężeń w obu grupach stawały się zbliżone. Również analiza parametrów ekspozycji osoczowej, wyrażonych jako wartości pola pod krzywą stężenie–czas, wskazywała na jedynie umiarkowany wzrost tego parametru po zastosowaniu worykonazolu w porównaniu z kontrolą, przy czym w wielu zestawieniach przedziały ufności obejmowały wartości bliskie jedności. Obserwacje te wskazują, że zahamowanie metabolizmu wpływało głównie na początkową fazę wchłaniania tygecykliny względem warunków bez inhibitora, nie prowadząc jednak do wyraźnego zwiększenia jej całkowitej ekspozycji ogólnoustrojowej.

Niezależnie od powyższego porównania z grupą kontrolną, istotnym elementem analizy było zestawienie efektów uzyskanych po podaniu worykonazolu różnymi drogami, tj. doustnie i dootrzewnowo, poprzedzającego podanie tygecykliny. Takie bezpośrednie porównanie obu schematów umożliwiło rozważenie potencjalnych różnic pomiędzy metabolizmem jelitowym a wątrobowym przy zastosowaniu tego samego czynnika hamującego. W analizowanych parametrach farmakokinetycznych, obejmujących stężenia tygecykliny w osoczu oraz wartości pola pod krzywą stężenie–czas, różnice pomiędzy doustnym a dootrzewnowym podaniem worykonazolu były niewielkie, co ograniczało możliwość jednoznacznego rozdzielenia udziału metabolizmu jelitowego i

wątrobowego w regulacji jej farmakokinetyki. Jedynie w bardzo wczesnym punkcie czasowym (0,25 h) stężenia tygecykliny były wyższe po doustnym podaniu worykonazolu niż po jego podaniu dootrzewnowym, co może sugerować udział metabolizmu jelitowego w ograniczaniu dostępności biologicznej leku w początkowej fazie wchłaniania. Brak utrzymania tego efektu w późniejszych punktach czasowych wskazuje jednak na jego ograniczone znaczenie ilościowe. Taki obraz wyników pozostaje spójny z danymi literaturowymi dotyczącymi właściwości metabolicznych tygecykliny, zgodnie z którymi lek ten ulega biotransformacji w ograniczonym stopniu, a zasadnicza część podanej dawki eliminowana jest w postaci niezmienionej [Hoffmann et al. 2007]. W konsekwencji nawet istotne zahamowanie aktywności enzymów metabolizujących nie powinno prowadzić do głębokich i trwałych zmian całkowitej ekspozycji ogólnoustrojowej, szczególnie w warunkach, w których procesy transportowe pozostają głównym czynnikiem ograniczającym dostępność biologiczną leku.

Uzupełnieniem powyższych analiz było zestawienie schematów obejmujących jednoczesne doustne podanie elakridaru oraz worykonazolu poprzedzające doustne podanie tygecykliny z odpowiednimi schematami, w których modulowano wyłącznie transportery wypływowe przy użyciu elakridaru lub wyłącznie procesy metaboliczne przy użyciu worykonazolu. Takie porównanie pozwalało ocenić, czy zahamowanie metabolizmu wnosi dodatkowy, niezależny wkład do zmian ekspozycji ogólnoustrojowej obserwowanych przy inhibicji transporterów, a także czy efekt obu interwencji ma charakter addytywny. W analizowanych parametrach farmakokinetycznych, obejmujących wartości stężenia maksymalnego oraz pola pod krzywą stężenie–czas, nie obserwowano wyraźnych, proporcjonalnych wzrostów ekspozycji tygecykliny po dołączeniu worykonazolu do elakridaru w porównaniu z zastosowaniem samego elakridaru. W wielu zestawieniach przedziały ufności dla różnic pomiędzy tymi schematami obejmowały wartości bliskie jedności. Obserwacja ta wskazuje, że w warunkach skutecznej modulacji transporterów wypływowych dodatkowe zahamowanie metabolizmu nie prowadzi do dalszego istotnego zwiększenia ekspozycji ogólnoustrojowej tygecykliny. W ujęciu funkcjonalnym sugeruje to, że udział metabolizmu w ograniczaniu dostępności biologicznej tygecykliny ma charakter wtórny wobec procesów transportowych i nie stanowi dominującego czynnika regulacyjnego w analizowanych warunkach doświadczalnych.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Zestawienie powyższych obserwacji wskazuje, że metabolizm tygecykliny wpływa na jej farmakokinetykę, jednak jego rola ma charakter wtórny. Wpływ ten ujawnia się głównie w bardzo wczesnej fazie profilu stężenie–czas i nie przekłada się na istotne, trwałe zmiany całkowitej ekspozycji ogólnoustrojowej ani na dalszy przebieg profilu stężeń leku w krążeniu, co pozostaje zgodne z ograniczonym udziałem biotransformacji w jego całkowitym klirensie opisywanym w literaturze.

~

Wyniki uzyskane w dotychczasowych etapach badań wykazały, że farmakokinetyka tetracyklin jako całość podlega istotnej regulacji przez aktywne mechanizmy transportowe i eliminacyjne, przy czym znaczenie tych procesów ujawnia się szczególnie wyraźnie w warunkach podania doustnego. W tym schemacie aktywne mechanizmy działające na poziomie bariery jelitowej odgrywają kluczową rolę, a ich udział różni się pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami tej grupy. Tygecyklina ujawniła się jako szczególnie wrażliwy przedstawiciel tetracyklin, u którego aktywne procesy ograniczające wchłanianie dominują względem dyfuzji biernej i w decydującym stopniu kształtują

dostępność biologiczną po podaniu doustnym. Zastosowane w tych etapach narzędzia farmakologiczne miały charakter funkcjonalny i pozwoliły na funkcjonalne rozdzielenie udziału transportu wpływowego, metabolizmu oraz procesów eliminacyjnych, nie stanowiąc jednak rozwiązań o charakterze technologicznym.

Jednocześnie uzyskane obserwacje skłoniły do postawienia pytania, czy modulacja transporterów wpływowych może zachodzić nie tylko w warunkach celowej inhibicji farmakologicznej, lecz również w obecności substancji współpodawanych z lekiem jako składniki postaci farmaceutycznej. Innymi słowy, należało ustalić, czy wybrane substancje pomocnicze, którym w literaturze przypisuje się zdolność oddziaływania z transporterami wpływowymi, mogą w warunkach *in vivo* w sposób funkcjonalnie mierzalny wpływać na dostępność biologiczną tetracyklin.

Weryfikację tej hipotezy przeprowadzono w modelu kurcząt brojlerów opracowanym na potrzeby realizacji celu pierwszego, pozwalającym na uzyskanie pełnych profili farmakokinetycznych po podaniu doustnym oraz ilościową ocenę zmian ekspozycji ogólnoustrojowej tygecykliny. W tym ujęciu tygecyklina pełniła rolę szczególnie czonego narzędzia, umożliwiającego wykrycie nawet umiarkowanej modulacji procesów ograniczających jej wchłanianie.

Ocena wpływu wybranych substancji pomocniczych na dostępność biologiczną oraz wybrane parametry farmakokinetyczne tygecykliny po podaniu doustnym (zadanie badawcze 6)

Realizacja niniejszego zadania badawczego miała na celu ocenę, czy jednoczesne doustne podanie tygecykliny z wybranymi substancjami pomocniczymi prowadzi do mierzalnych zmian jej dostępności biologicznej oraz parametrów ekspozycji ogólnoustrojowej. Analiza obejmowała całość profili farmakokinetycznych uzyskanych po podaniu doustnym tygecykliny w obecności sześciu substancji pomocniczych: trimetylochitozanu, kaprylanu sodu, deoksycholanu sodu, TPGS oraz dwóch pochodnych β -cyklodekstryny – dimetylowanej i hydroksypropylowanej. Zastosowanie takiego zestawu umożliwiało ocenę efektu modulacji w szerokim spektrum substancji różniących się budową chemiczną, lecz opisywanych w literaturze jako potencjalnie oddziałujące z transporterami wpływowymi [Dintaman and Silverman 1999; Lo and Huang 2000; Arima et al. 2001; Zare et al. 2018; Nguyen et al. 2021].

Uzyskane wyniki wykazały, że większość zastosowanych substancji pomocniczych prowadziła do wzrostu ekspozycji ogólnoustrojowej tygecykliny po jej podaniu doustnym. Zmiany te obejmowały zarówno wartości pola pod krzywą stężenie–czas, jak i bezwzględną dostępność biologiczną, przy czym ich skala była zróżnicowana pomiędzy poszczególnymi substancjami. Najbardziej wyraźne i istotne wzrosty obserwowano po zastosowaniu hydroksypropylowanej β -cyklodekstryny, TPGS oraz deoksycholanu sodu. W przypadku dimetylowanej β -cyklodekstryny oraz trimetylochitozanu obserwowany wzrost dostępności biologicznej miał charakter umiarkowany i obarczony większą niepewnością oszacowania, co znalazło odzwierciedlenie w szerokich przedziałach ufności. Odrębnego komentarza wymaga przypadek kaprylanu sodu, który jako jedyna z badanych substancji pomocniczych nie wykazał istotnego wpływu na dostępność biologiczną tygecykliny. Jednocześnie jednak kierunek obserwowanych zmian wskazywał na tendencję do zwiększenia ekspozycji ogólnoustrojowej, a przedziały ufności obejmowały zarówno wartości wskazujące na brak efektu, jak i na jego potencjalną obecność. Taki obraz wyników nie pozwala na jednoznaczne wnioskowanie o stopniu modulacji procesów wchłaniania przez tę substancję w zastosowanym schemacie doświadczalnym, lecz sugeruje raczej ograniczoną siłę efektu w

porównaniu z pozostałymi substancjami pomocniczymi lub niewystarczającą precyzję oszacowania przy zastosowanej liczebności grup.

Analiza profili stężenie–czas tygecykliny po doustnym podaniu w obecności substancji pomocniczych wykazała, że obserwowane zmiany miały charakter przede wszystkim ilościowy, a nie jakościowy. W porównaniu z grupą kontrolną krzywe stężenie–czas ulegały „wypiętrzeniu”, wyrażonemu wzrostem wartości stężeń osoczowych oraz pola pod krzywą stężenie–czas, przy zachowaniu zasadniczo podobnego przebiegu czasowego wczesnej fazy wchłaniania. Moment osiągnięcia stężenia maksymalnego nie ulegał istotnym przesunięciom, a krzywe nie wykazywały cech sugerujących wyraźną zmianę szybkości procesu absorpcji. Brak istotnych zmian czasu osiągania stężenia maksymalnego nie wyklucza zwiększenia całkowitej frakcji wchłoniętej, lecz wskazuje, że obserwowany wzrost ekspozycji ogólnoustrojowej nie wynikał z przyspieszenia samego procesu wchłaniania. Równocześnie nie obserwowano systematycznych zaburzeń w późniejszych fazach profilu farmakokinetycznego, które mogłyby sugerować dominujący wpływ mechanizmów ogólnoustrojowych. W rezultacie uzyskany wzorzec zmian przemawia za zwiększeniem ilości leku w krążeniu, która przekracza barierę jelitową, przy zachowaniu zasadniczo niezmienionej dynamiki procesu absorpcji.

Z punktu widzenia interpretacji funkcjonalnej obserwacja ta ma istotne znaczenie. Gdyby wzrost ekspozycji ogólnoustrojowej tygecykliny wynikał głównie ze zmian przepuszczalności nabłonka jelitowego niezależnych od aktywności transporterów wypływowych, takich jak przejściowe rozluźnienie połączeń ścisłych, zwiększenie transportu międzykomórkowego, modyfikacja płynności błony komórkowej czy efekt detergentowy prowadzący do nieswoistego zwiększenia przepuszczalności, należałoby oczekiwać wyraźniejszych zmian w dynamice narastania stężeń osoczowych lub modyfikacji kształtu wczesnego fragmentu krzywej stężenie–czas. Takich zależności nie obserwowano w sposób systematyczny. Obraz wyników pozostaje natomiast zgodny z interpretacją, w której zastosowane substancje pomocnicze zwiększały efektywną frakcję dawki pokonującą barierę jelitową, bez zasadniczej ingerencji w szybkość procesu wchłaniania.

Jednocześnie należy podkreślić, że badane substancje pomocnicze mogą oddziaływać na barierę jelitową w sposób wielokierunkowy, obejmujący wpływ na organizację błon komórkowych, interakcje z fazą lipidową, lokalne zmiany środowiska błonowego oraz modulację aktywności białek transportowych. Złożoność tych potencjalnych oddziaływań uniemożliwia przypisanie obserwowanego efektu pojedynczemu, jednoznacznie zdefiniowanemu mechanizmowi molekularnemu. Nie można również wykluczyć, że część zastosowanych substancji pomocniczych ulegała wchłanianiu i w ograniczonym stopniu mogła wpływać na wybrane procesy ogólnoustrojowe; brak jednak systematycznych zmian w późniejszych fazach profilu farmakokinetycznego tygecykliny przemawia przeciwko dominującemu znaczeniu takiego mechanizmu. W niniejszym zadaniu badawczym nie prowadzono bezpośrednich pomiarów aktywności transporterów wypływowych, markerów integralności bariery jelitowej ani oznaczeń ekspresji białek transportowych; interpretacja ma zatem charakter funkcjonalny i opiera się na analizie spójności wzorca zmian farmakokinetycznych.

Pomimo istotnych różnic strukturalnych i fizykochemicznych pomiędzy zastosowanymi substancjami pomocniczymi obserwowany efekt zwiększenia ekspozycji ogólnoustrojowej tygecykliny miał kierunek zgodny tj. zwiększenie stężeń osoczowych i dostępności biologicznej.

Sugeruje to istnienie wspólnego elementu funkcjonalnego ich działania na poziomie bariery jelitowej. Takim wspólnym elementem może być zdolność tych substancji do modulowania aktywności transporterów wypływowych w obrębie nabłonka jelitowego [Dintaman and Silverman 1999; Lo and Huang 2000; Arima et al. 2001; Zare et al. 2018; Nguyen et al. 2021]. W tym ujęciu interpretacją najbardziej spójną z uzyskanym obrazem danych pozostaje funkcjonalne ograniczenie procesów zmniejszających ilość tygecykliny dostępnej do wchłaniania, przy zachowaniu świadomości, że przedstawione wyniki nie stanowią bezpośredniego dowodu molekularnego udziału konkretnych transporterów. Przedstawione obserwacje wskazują zatem, że wpływ substancji pomocniczych ujawniał się przede wszystkim na etapie przechodzenia leku przez barierę jelitową i prowadził do zwiększenia efektywnej frakcji dawki dostępnej do wchłonięcia, bez istotnej modyfikacji dalszych etapów losów ustrojowych tygecykliny.

Zestawienie powyższych obserwacji z wynikami uzyskanymi w ramach realizacji Celu 1 i Celu 2 wskazuje, że choć skala wzrostu dostępności biologicznej tygecykliny po zastosowaniu substancji pomocniczych była wyraźnie mniejsza niż w przypadku nieselektywnej (cyklosporyna A) oraz selektywnej (elakridar) inhibicji transporterów wypływowych to charakter obserwowanych zmian w farmakokinetyce tygecykliny pozostawał zasadniczo odmienny od zmian opisanych w obu wcześniejszych celach. W wynikach uzyskanych w ramach realizacji Celu 1 obserwowano uogólnioną modyfikację wielu etapów losów ustrojowych, obejmującą zarówno wchłanianie, jak i procesy eliminacyjne. Z kolei wyniki uzyskane w ramach realizacji Celu 2 wykazały, że selektywna inhibicja transporterów P-gp i BCRP prowadzi do systemowej modulacji ekspozycji tygecykliny, ujawniającej się niezależnie od drogi podania oraz wpływającej również na dystrybucję tkankową. Na tym tle efekt obserwowany po zastosowaniu substancji pomocniczych ma charakter bardziej ograniczony i lokalny: dotyczy zwiększenia ilości leku dostępnego do wchłonięcia na poziomie bariery jelitowej, bez przesłanek wskazujących na modyfikację dalszych etapów farmakokinetyki po przekroczeniu tej bariery.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki wskazują, że wybrane substancje pomocnicze mogą zwiększać dostępność biologiczną tygecykliny po podaniu doustnym. Brak systematycznych zmian w późniejszych fazach profilu farmakokinetycznego sugeruje, że efekt ten ma charakter lokalny i dotyczy przede wszystkim zwiększenia frakcji dawki pokonującej barierę jelitową, bez istotnej modyfikacji dalszych etapów jej losów ustrojowych.

4. 1. 2. 5. Wnioski końcowe osiągnięcia

Przedstawione badania stanowiły wieloetapową, funkcjonalnie ukierunkowaną analizę czynników regulujących farmakokinetykę tetracyklin *in vivo*, ze szczegółową charakterystyką tygecykliny jako związku modelowego. Plan badawczy obejmował identyfikację udziału transportu wypływowego, jego funkcjonalne rozdzielenie od metabolizmu i procesów eliminacyjnych oraz ocenę wpływu modulacji tych mechanizmów na dostępność biologiczną, ekspozycję ogólnoustrojową i dystrybucję tkankową tetracyklin. Ujęcie to umożliwiło przejście od obserwacji farmakokinetycznych do sformułowania spójnego modelu regulacyjnej roli aktywnych procesów transportowych, a także wykazanie możliwości ich celowej modulacji. Na podstawie uzyskanych wyników można sformułować następujące wnioski końcowe:

1. **Farmakokinetyka tetracyklin *in vivo* podlega aktywnej regulacji transportowej, w której kluczową rolę odgrywają transportery wypływowe P-gp i BCRP.** Nieselektywna modulacja procesów transportowych prowadziła do uogólnionego i powtarzalnego wzrostu ekspozycji ogólnoustrojowej sześciu analizowanych tetracyklin, co wskazuje, że dostępność biologiczna tej grupy leków jest współdeterminowana przez aktywne mechanizmy na poziomie bariery jelitowej. Dalsza, selektywna inhibicja P-gp i BCRP w modelu tygecykliny pozwoliła zawęzić identyfikację mechanizmu do konkretnych transporterów wypływowych. Kierunek obserwowanych efektów był zgodny zarówno w odmiennych wariantach genetycznych modelu myszy, jak i w dwóch gatunkach modeli doświadczalnych (brojler i mysz), co wskazuje na stabilność badanego mechanizmu regulacyjnego.
2. **W analizowanym modelu transport wypływowy pełni rolę dominującą względem metabolizmu w kształtowaniu ekspozycji ogólnoustrojowej oraz relacji pomiędzy kompartmentami tygecykliny.** Selektywna inhibicja P-gp i BCRP prowadziła do trwałej zmiany całego profilu stężenie–czas, obejmującej zarówno ekspozycję ogólnoustrojową, jak i relację między stężeniami osocзовymi a stężeniami w mózgu. Zahamowanie metabolizmu wywoływało natomiast jedynie przejściowe zmiany w bardzo wczesnej fazie dostępności leku, bez istotnego wpływu na całkowitą ekspozycję. Wyniki te wskazują, że metabolizm ma charakter wtórny i modulujący, podczas gdy nadrzędną rolę w regulacji farmakokinetiki odgrywa transport wypływowy.
3. **Zidentyfikowany mechanizm transportowy może być celowo modulowany zarówno farmakologicznie, jak i formulacyjnie.** Selektywna inhibicja P-gp i BCRP prowadziła do systemowej zmiany ekspozycji leku, natomiast wybrane substancje pomocnicze zwiększały frakcję dawki tygecykliny przekraczającą barierę jelitową, bez istotnej ingerencji w jej dalsze losy ustrojowe. Oznacza to, że aktywne procesy regulujące farmakokinetykę tetracyklin stanowią uchwytne i modyfikowalny poziom kontroli ich dostępności biologicznej *in vivo*.

Uzyskane wyniki umożliwiają sformułowanie funkcjonalnego modelu procesów regulujących farmakokinetykę tetracyklin *in vivo*, w którym aktywne zjawiska transportowe pełnią rolę dominującą względem metabolizmu oraz mechanizmów eliminacyjnych. Model ten wyjaśnia zarówno zmienność dostępności biologicznej po podaniu doustnym, jak i różnice w retencji ogólnoustrojowej oraz dystrybucji tkankowej tetracyklin. W kontekście medycyny weterynaryjnej ma to szczególne znaczenie, ponieważ tetracykliny należą do najczęściej stosowanych chemioterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych, a zmienność ich ekspozycji może wpływać na skuteczność terapii, bezpieczeństwo stosowania oraz ryzyko lekooporności. Jednocześnie mechanizmy opisane w niniejszej pracy mają charakter międzygatunkowy, co nadaje uzyskanym wynikom wymiar translacyjny i pozwala osadzić je w szerszym kontekście farmakologii tych chemioterapeutyków. Przedstawiona sekwencja badań umożliwiła funkcjonalne rozdzielenie procesów transportowych, metabolicznych i eliminacyjnych w warunkach *in vivo*, tworząc spójny model ich wzajemnych zależności.

Piśmiennictwo

- Al Shoyaib A, Archie SR, Karamyan VT. (2019). Intraperitoneal route of drug administration: should it be used in experimental animal studies? *Pharm Res.* 37:12.
- Anadón A. (1985). Pharmacokinetics of tetracycline in chickens after intravenous administration. *Poult Sci.* 64:2273–2279.
- Argast M, Beck CF. (1985). Tetracycline uptake by susceptible *Escherichiacoli* cells. *Arch Microbiol.* 141:260–265.
- Arima H, Yunomae K, Hirayama F, Uekama K. (2001). Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:547–555.
- Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C, Weinstein L. (1975). Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 8:713–720.
- Barr JT, Tran TB, Rock BM, Wahlstrom JL, Dahal UP. (2020). Strain-dependent variability of early discovery small molecule pharmacokinetics in mice: Does strain matter? *Drug Metab Dispos.* 48:613–621.
- Bittner B, Guenzi A, Fullhardt P, Zuercher G, González RC, Mountfield RJ. (2002). Improvement of the bioavailability of colchicine in rats by co-administration of D-alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate and a polyethoxylated derivative of 12-hydroxy-stearic acid. *Arzneimittelforschung.* 52:684–688.
- Borst P, Elferink RO. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 71:537–592.
- Breinholt J, Jensen GW, Kjær A, Olsen CE, Rosendahl CN. (1997). Hypomycetin - an antifungal, tetracyclic metabolite from *Hypomyces aurantius*: Production, structure and biosynthesis. *Acta Chemica Scandinavica.* 51:855–860.
- Brubaker JD, Myers AG. (2007). A Practical, Enantioselective Synthetic Route to a Key Precursor to the Tetracycline Antibiotics. *Org Lett.* 9:3523–3525.
- Charest MG, Lerner CD, Brubaker JD, Siegel DR, Myers AG. (2005). A Convergent Enantioselective Route to Structurally Diverse 6-Deoxytetracycline Antibiotics. *Science.* 308:395–398.
- Chin TF, Lach JL. (1975). Drug diffusion and bioavailability: tetracycline metallic chelation. *Am J Hosp Pharm.* 32:625–629.
- Chopra I, Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:232–260.
- Dawson RJ, Locher KP. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature.* 443:180–185.
- Demeule M, Laplante A, Sepehr-Araé A, Beaulieu E, Averill-Bates D, Wenger RM, Béliveau R. (1999). Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites. *Biochem Cell Biol.* 77:47–58.
- Dintaman JM, Silverman JA. (1999). Inhibition of P-glycoprotein by D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). *Pharm Res.* 16:1550–1556.
- Dyer DC. (1988). Pharmacokinetics of chlortetracycline in the turkey: evaluation of biliary secretion. *Am J Vet Res.* 49:36–37.
- Dyer DC. (1989). Pharmacokinetics of oxytetracycline in the turkey: evaluation of biliary and urinary excretion. *Am J Vet Res.* 50:522–524.
- Eisner HJ, Wulf RJ. (1963). The metabolic fate of chlortetracycline and some comparisons with other tetracyclines. *J Pharmacol Exp Ther.* 142:122–131.
- Englund G, Lundquist P, Skogastierna C, Johansson J, Hoogstraate J, Afzelius L, Andersson TB, Projean D. (2014). Cytochrome P450 inhibitory properties of common efflux transporter inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 42:441–447.
- Fath MJ, Kolter R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev.* 57:995–1017.

- FDA. (2020). Drug development and drug interactions. 2020. <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactionstable-substrates-inhibitors-and-inducers>. [Accessed 10 March 2020].
- Gattini P, Renzini G. (1972). Hematic levels of meclocycline in adults treated with meclocycline ointment. *Antibiotica*. 10:46–51.
- Grada A, Del Rosso JQ, Moore AY, Stein Gold L, Harper J, Damiani G, Shaw K, Obagi S, Salem RJ, Tanaka SK, Bunick CG. (2022). Reduced blood-brain barrier penetration of acne vulgaris antibiotic sarecycline compared to minocycline corresponds with lower lipophilicity. *Frontiers in medicine*. 9:1033980.
- Grandi M, Giuliani FC. (1988). Reduced cytotoxicity of tetracyclines to a multi-drug resistant human cell line. *Biochem Pharmacol*. 37:3038–3041.
- Hebert MF. (1997). Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 27:201–214.
- Henehan M, Montuno M, De Benedetto A. (2017). Doxycycline as an Anti-Inflammatory Agent: Updates in Dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 31:1800–1808.
- Hessl JM, Stamey TA. (1971). The passage of tetracyclines across epithelial membranes with special reference to prostatic epithelium. *J Urol*. 106:253–256.
- Hoffmann M, DeMaio W, Jordan RA, Talaat R, Harper D, Speth J, Scatina J. (2007). Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of [14C]tigecycline, a first-in-class glycylcycline antibiotic, after intravenous infusion to healthy male subjects. *Drug Metabolism and Disposition*. 35:1543–1553.
- Jackson K, Young D, Pant S. (2000). Drug-excipient interactions and their affect on absorption. *Pharm Sci Technol Today*. 3:336–345.
- Jasiecka-Mikołajczyk A, Ziółkowski H, Jaroszewski JJ. (2018). Pharmacokinetics of tigecycline in turkeys following different routes of administration. *J Vet Pharmacol Ther*. 41:e22–e29.
- Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. (2006). Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2:351–366.
- Jeong S, Nguyen PD, Desta Z. (2009). Comprehensive in vitro analysis of voriconazole inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effect on CYPs 2B6, 2C9, 2C19, and 3A. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:541–551.
- Kavallaris M, Madafiglio J, Norris MD, Haber M. (1993). Resistance to tetracycline, a hydrophilic antibiotic, is mediated by P-glycoprotein in human multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 190:79–85.
- Kelly RG, Buyske DA. (1960). Metabolism of tetracycline in the rat and the dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 130:144–149.
- Kelly RG, Kanegis LA. (1967). Metabolism and tissue distribution of radioisotopically labelled minocycline. *Toxicol Appl Pharmacol*. 11:171–183.
- Klein NC, Cunha BA. (1995). Tetracyclines. *Med Clin North Am*. 79:789–801.
- Kroll T, Prescher M, Smits SHJ, Schmitt L. (2021). Structure and Function of Hepatobiliary ATP Binding Cassette Transporters. *Chemical Reviews*. 121:5240–5288.
- Laskow DA, Curtis JJ, Luke RG, Julian BA, Jones P, Deierhoi MH. (1990). Cyclosporine-induced changes in glomerular filtration rate and urea excretion. *Am J Med*. 88:497–502.
- Lempers VJ, van den Heuvel JJ, Russel FG, Aarnoutse RE, Burger DM, Brüggemann RJ, Koenderink JB. (2016). Inhibitory potential of antifungal drugs on ATP-binding cassette transporters P-glycoprotein, MRP1 to MRP5, BCRP, and BSEP. *Antimicrob Agents Chemother*. 60:3372–3379.
- Liu X, Cheong J, Ding X, Deshmukh G. (2014). Use of cassette dosing approach to examine the effects of P-glycoprotein on the brain and cerebrospinal fluid concentrations in wild-type and P-glycoprotein knockout rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 42:482–491.

- Lo YL, Huang JD. (2000). Effects of sodium deoxycholate and sodium caprate on the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats. *Biochem Pharmacol.* 59:665–672.
- Milane A, Fernandez C, Vautier S, Bensimon G, Meininger V, Farinotti R. (2007). Minocycline and riluzole brain disposition: interactions with p-glycoprotein at the blood-brain barrier. *J Neurochem.* 103:164–173.
- Mortimer PGS, Piddock LJV. (1993). The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 32:195–213.
- Munyeza CF, Shobo A, Baijnath S, Bratkowska D, Naiker S, Bester LA, Singh SD, Maguire GE, Kruger HG, Naicker T, Govender T. (2016). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the quantification of tigecycline in rat brain tissues. *Biomed Chromatogr.* 30:837–845.
- Nau R, Sörgel F, Eiffert H. (2010). Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 23:858–883.
- Nguyen T, Duong V, Maeng H. (2021). Pharmaceutical Formulations with P-Glycoprotein Inhibitory Effect as Promising Approaches for Enhancing Oral Drug Absorption and Bioavailability. *Pharmaceutics.* 13:1103.
- Nielsen P, Gyrd-Hansen N. (1996). Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *J Vet Pharmacol Ther.* 19:305–311.
- Nikaido H, Thanassi DG. (1993). Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1393–1399.
- Peña-Solórzano D, Stark SA, König B, Sierra CA, Ochoa-Puentes C. (2017). ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. *Med Res Rev.* 37:987–1050.
- Porter WP, Bitar YM, Strandberg JD, Charache PC. (1985). A comparison of subcutaneous and intraperitoneal oxytetracycline injection methods for control of infectious disease in the rat. *Lab Anim.* 19:3–6.
- Riond JL, Tyczkowska K, Riviere JE. (1989). Pharmacokinetics and metabolic inertness of doxycycline in calves with mature or immature rumen function. *Am J Vet Res.* 50:1329–1333.
- Riviere J, Lees P. (2003). USP veterinary pharmaceutical information monographs - antibiotics: Tetracyclines. *J Vet Pharmacol Ther.* 26:225–252.
- Rodvold KA, Gotfried MH, Cwik M, Korth-Bradley JM, Dukart G, Ellis-Grosse EJ. (2006). Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J Antimicrob Chemother.* 58:1221–1229.
- Sane R, Agarwal S, Elmquist WF. (2012). Brain distribution and bioavailability of elacridar after different routes of administration in the mouse. *Drug Metabolism and Disposition.* 40:1612–1619.
- Schnappinger D, Hillen W. (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol.* 165:359–369.
- Schinkel AH, Jonker JW. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:3–29.
- Schrickx J, Fink-Gremmels J. (2007). P-glycoprotein-mediated transport of oxytetracycline in the Caco-2 cell model. *J Vet Pharmacol Ther.* 30:25–31.
- Semenova Y, Makalkina L, Glushkova N, Gaipov A. (2025). Tetracyclines in the Modern Era: Global Consumption, Antimicrobial Resistance, Environmental Occurrence, and Degradation Techniques. *Antibiotics (Basel).* 14: 1183.
- Serrano JM, Moreno L, Rosado I, Guimera E, Escudero E. (1999). Biliary elimination kinetics and tissue concentrations of oxytetracycline after intravenous administration in hens. *J Vet Pharmacol Ther.* 22:148–152.
- Sigler A, Schubert P, Hillen W, Niederweis M. (2000). Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 267:527–534.
- Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* 5:387–399.

- Strickley RG. (2004). Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 21:201–230.
- Sun C, Xiao XY. (2017). Fully Synthetic Tetracyclines: Increasing Chemical Diversity to Combat Multidrug-Resistant Bacterial Infections. In: Fisher J, Mobashery S, Miller M (eds) *Antibacterials. Topics in Medicinal Chemistry*, vol 26. Springer, Cham. 55–95.
- Sun C, Zhao P, Hunt D, Kerstein K, Newman J, McKellip S, Bostwick R, Dumas J, Xiao X. (2019). Abstract 3857: Discovery and structure-activity relationship studies of TP-2846: a novel tetracycline antileukemia agent. *Experimental and Molecular Therapeutics.* 79:3857.
- Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. (2010). The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci.* 67:419–431.
- Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plésiat P, Pechère JC, Tulkens PM. (2003a). Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Antimicrob Chemother.* 51:1055–1065.
- Van Bambeke F, Michot JM, Tulkens PM. (2003b). Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. *Antimicrob Chemother.* 51:1067–1077.
- Ward KW, Azzarano LM. (2004). Preclinical pharmacokinetic properties of the P-glycoprotein inhibitor GF120918A (HCl salt of GF120918, 9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-N-[4-[2-(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinoliny)ethyl]phenyl]-4-acridine-carboxamide) in the mouse, rat, dog, and monkey. *J Pharmacol Exp Ther.* 310:703–709.
- Ward PD, Tippin TK, Thakker DR. (2000). Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technol Today.* 3:346–358.
- Zhanell GG, Homenvik K, Nochol K, Noreddin A, Vercaigne L, Embil J, Gin A, Karlowsky JA, Hoban DJ. (2004). The glycyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs.* 64:63–88.
- Ziółkowski H, T. Grabowski, A. Jasiecka, M. Zuśka-Prot, D. Barski and J. J. Jaroszewski. (2016a). Pharmacokinetics of oxytetracycline in broiler chickens following different routes of administration. *Vet J.* 208:96–98.
- Ziółkowski H, Jasiecka A, Zuśka-Prot M, Przybysz J, Grabowski T, Jaroszewski JJ. (2016b). Metal ion-oxytetracycline pharmacokinetic interactions after oral co-administration in broiler chickens. *Poult Sci.* 95:1927–1933.
- Ziółkowski H, Madej-Śmiechowska H, Grabowski T, Jaroszewski JJ, Maślanka T. (2019). Hard water may increase the inhibitory effect of feed on the oral bioavailability of oxytetracycline in broiler chickens. *Pol J Vet Sci.* 22:251–258.
- Ziółkowski H, Jasiecka-Mikołajczyk A, Madej-Śmiechowska H, Janiuk J, Zygmuntowicz A, Dąbrowski M. (2020). Comparative pharmacokinetics of chlortetracycline, tetracycline, minocycline and tigecycline in broiler chickens. *Poultry Science.* 99:4750–4757.

4. 2. Inne osiągnięcie, o którym mowa art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4. 2. 1. Osiągnięcie pt. „Wpływ pokarmu i jonów dwuwartościowych na dostępność biologiczną enrofloksacyny u indyków.”

Publikacja omawiająca osiągnięcie wraz z informacją o wkładzie wnioskodawcy w prowadzeniu badań naukowych opisanych w publikacji, jak i w jej powstanie:

- ❖ Ziółkowski H., Jaroszewski J., Maślanka T., Grabowski T., Katolik K., Pawęska J., Siemianowska M., Markiewicz W., Jasiecka A., Spodniewska A. *Influence of oral co-administration of a preparation containing calcium and magnesium and food on enrofloxacin pharmacokinetics*. Research in Veterinary Science, **2014**, 97: 99–104.

IF=1,409; MNiSW=35

Mój wkład w powstanie osiągnięcia obejmował współtworzenie koncepcji badań, zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczenia, wykonanie analiz laboratoryjnych i farmakokinetycznych, opracowanie i interpretację wyników, sformułowanie wniosków oraz przygotowanie manuskryptu.

4. 2. 1. 1. Wprowadzenie

Enrofloksacyna należy do kluczowych leków przeciwbakteryjnych stosowanych w medycynie weterynaryjnej, szczególnie w terapii zakażeń bakteryjnych u zwierząt gospodarskich. Jako przedstawiciel fluorochinolonów charakteryzuje się szerokim spektrum działania oraz korzystnymi właściwościami farmakokinetycznymi, które w warunkach eksperymentalnych zapewniają wysoką skuteczność kliniczną. Jednocześnie fluorochinolony wykazują zdolność do tworzenia kompleksów z wielowartościowymi kationami metali (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+}), co może prowadzić do ograniczenia ich wchłaniania z przewodu pokarmowego.

Dotychczasowe badania wskazywały, że zarówno obecność jonów, jak i pokarmu może wpływać na farmakokinetkę fluorochinolonów, jednak dane te pochodziły głównie z badań prowadzonych u ludzi lub w modelach innych gatunków zwierząt. Brakowało natomiast jednoznacznych danych odnoszących się do warunków produkcyjnych drobiu, w których zwierzęta mają stały dostęp do paszy oraz są rutynowo ekspozowane na wysokie stężenia jonów mineralnych w wodzie i paszach.

4. 2. 1. 2. Uzasadnienie podjętych badań i ich cele naukowe/podjęte problemy badawcze

W praktyce produkcji drobiarskiej farmakoterapia przeciwbakteryjna prowadzona jest w warunkach znacząco odbiegających od modeli eksperymentalnych, w których zwierzęta pozostają na czczo lub w warunkach kontrolowanych pod względem podaży składników mineralnych. W konsekwencji stosowane schematy dawkowania nie uwzględniają potencjalnych interakcji zachodzących w przewodzie pokarmowym, które mogą istotnie modyfikować biodostępność leków. Podjęte badania miały na celu rozwiązanie istotnego problemu poznawczego i aplikacyjnego: określenie, w jakim stopniu jednoczesna obecność pokarmu oraz jonów dwuwartościowych wpływa na wchłanianie i ekspozycję ogólnoustrojową enrofloksacyny u indyków, a tym samym – na potencjalną skuteczność terapii przeciwbakteryjnej w warunkach produkcyjnych. Na tej podstawie przyjęto następujące hipotezy badawcze:

- ❖ jednoczesna obecność pokarmu oraz jonów dwuwartościowych w przewodzie pokarmowym istotnie ogranicza dostępność biologiczną enrofloksacyny,

- ❖ mechanizmy oddziaływania pokarmu i jonów są odmienne, a ich wpływ na parametry farmakokinetyczne enrofloksacyny różni się pod względem nasilenia,
- ❖ zmiany farmakokinetyczne mogą prowadzić do obniżenia wartości wskaźników farmakokinetyczno-farmakodynamicznych (PK/PD) poniżej poziomów warunkujących skuteczność kliniczną enrofloksacyny wobec części patogenów.

Na podstawie sformułowanego celu oraz przyjętych hipotez badawczych, wyznaczono następujące zadania badawcze:

- ocena wpływu jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} na parametry farmakokinetyczne enrofloksacyny,
- ocena wpływu pokarmu na przebieg wchłaniania leku,
- porównanie siły i charakteru obu typów interakcji,
- analiza konsekwencji obserwowanych zmian w kontekście wskaźników PK/PD obejmujących stosunek najwyższego stężenia leku osiąganego we krwi do najmniejszego stężenia leku hamującego wzrost 90% badanych szczepów drobnoustrojów ($\text{C}_{\text{max}}/\text{MIC}_{90}$).

4. 2. 1. 3. Wyniki

Przeprowadzone badania wykazały jednoznacznie, że jednoczesna obecność jonów dwuwartościowych oraz pokarmu prowadzi do istotnych zmian w farmakokinetyce enrofloksacyny podawanej doustnie u indyków, przy czym charakter i nasilenie tych zmian zależą od rodzaju czynnika towarzyszącego. Najbardziej wyraźnym efektem obserwowanym w obu wariantach doświadczalnych było obniżenie dostępności biologicznej leku. W warunkach eliminujących interakcje na poziomie przewodu pokarmowego dostępność biologiczna enrofloksacyny utrzymywała się na poziomie około 80%, natomiast współpodanie z jonami dwuwartościowymi lub pokarmem prowadziło do spadku tego parametru odpowiednio do około 66% i 48%. Oznacza to, że obecność jonów powodowała istotną redukcję dostępności biologicznej o blisko 20%, podczas gdy obecność pokarmu prowadziła do jej obniżenia o ponad 40% względem warunków kontrolnych. Zmianom tym towarzyszyło istotne obniżenie maksymalnych stężeń enrofloksacyny (C_{max}) w osoczu. W przypadku współpodania enrofloksacyny z jonami wartości C_{max} były istotnie niższe o około 30–40% w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast w obecności pokarmu spadek ten miał charakter znacznie bardziej nasilony i przekraczał 50%, co wskazuje na wyraźne ograniczenie ilości leku wchłanianego do krążenia ogólnego. Jednocześnie wykazano, że obecność pokarmu w istotny sposób modyfikuje kinetykę procesu wchłaniania enrofloksacyny. W tej grupie czas osiągnięcia maksymalnego stężenia w osoczu ulegał wydłużeniu kilkukrotnie – z około 2 godzin w warunkach kontrolnych do ponad 8 godzin w obecności paszy. Zjawisku temu towarzyszyło istotne wydłużenie parametrów opisujących fazę absorpcji, w tym średniego czasu wchłaniania oraz okresu półtrwania wchłaniania. Analogiczne zmiany nie były obserwowane w grupie otrzymującej lek wraz z jonami, gdzie parametry te pozostawały zbliżone do wartości kontrolnych.

Analiza przebiegu krzywych stężenie–czas wskazuje ponadto, że w obecności pokarmu dochodziło do wyraźnego „spłaszczenia” profilu stężeniowego oraz przesunięcia fazy absorpcji w czasie, z utrzymywaniem się niższych stężeń enrofloksacyny w późniejszych punktach czasowych. Towarzyszyły temu istotne zmiany w parametrach eliminacyjnych, w tym wzrost wartości stężenia końcowego oraz wydłużenie czasu obecności leku w organizmie.

Kluczowym elementem analizy było zestawienie uzyskanych danych farmakokinetycznych enrofloksacyny z jej parametrami farmakodynamicznymi. Wykazano, że obniżenie maksymalnych

stężeń leku prowadzi do istotnego zmniejszenia wartości wskaźnika C_{max}/MIC_{90} . W przypadku podania leku wraz z pokarmem spadek ten miał charakter na tyle nasilony, że dla części patogenów wartości wskaźnika obniżały się poniżej poziomu uznawanego za warunek skutecznej terapii. W przypadku współpodania z jonami efekt ten był mniej wyraźny, jednak również prowadził do przekroczenia granicy skuteczności w odniesieniu do wybranych drobnoustrojów.

4. 2. 1. 4. Omówienie wyników

Uzyskane wyniki wskazują, że wpływ pokarmu i jonów dwuwartościowych na farmakokinetykę enrofloksacyny ma charakter jakościowo odmienny, mimo że w obu przypadkach prowadzi do zmniejszenia dostępności biologicznej leku. W przypadku jonów dwuwartościowych podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za obserwowane zmiany jest tworzenie trudno rozpuszczalnych kompleksów chelatowych pomiędzy cząsteczką fluorochinolonu a kationami metali. Kompleksy te nie ulegają efektywnemu wchłanianiu w przewodzie pokarmowym, co prowadzi do zmniejszenia frakcji wolnego leku dostępnego do absorpcji. Mechanizm ten ma charakter głównie chemiczny i nie wpływa istotnie na dynamikę pasaży treści pokarmowej ani na czas osiągnięcia maksymalnych stężeń w osoczu, co znajduje odzwierciedlenie w relatywnie niezmiennych parametrach opisujących szybkość wchłaniania. Odmienny i bardziej złożony charakter ma wpływ pokarmu. Wyniki wskazują, że jego obecność prowadzi nie tylko do zmniejszenia dostępności biologicznej enrofloksacyny, ale również do istotnej zmiany przebiegu procesu absorpcji. Można przypuszczać, że enrofloksacyna ulega wymieszaniu z treścią pokarmową w wolu i dalszych odcinkach przewodu pokarmowego, co prowadzi do jego „rozcieńczenia” oraz ograniczenia bezpośredniego kontaktu z powierzchnią absorpcyjną jelita cienkiego. Jednocześnie obecność pokarmu spowalnia pasaż treści pokarmowej, co skutkuje wydłużeniem czasu wchłaniania oraz przesunięciem momentu osiągnięcia maksymalnego stężenia w osoczu. Dodatkowo można zakładać, że część leku, zamiast ulec wchłonięciu w proksymalnych odcinkach przewodu pokarmowego, jest transportowana do dalszych jego części, gdzie warunki wchłaniania są mniej sprzyjające. Mechanizm ten tłumaczy zarówno obniżenie dostępności biologicznej, jak i obserwowane zmiany w parametrach eliminacyjnych enrofloksacyny, w tym wzrost stężeń końcowych i wydłużenie czasu obecności leku w organizmie.

Istotnym aspektem jest również ograniczona możliwość ekstrapolacji danych uzyskanych u innych gatunków zwierząt na ptaki. W przeciwieństwie do niektórych badań przeprowadzonych u ssaków, w których nie wykazano istotnego wpływu pokarmu na wchłanianie enrofloksacyny, w niniejszym badaniu efekt ten był wyraźny i jednoznaczny. Różnice te mogą wynikać ze specyficznej budowy i fizjologii przewodu pokarmowego ptaków, w szczególności obecności wola oraz odmiennej dynamiki pasaży treści pokarmowej.

Z punktu widzenia farmakodynamiki przeciwbakteryjnej szczególne znaczenie ma wykazanie, że obserwowane zmiany farmakokinetyczne przekładają się na istotne obniżenie wartości wskaźników PK/PD. W przypadku części drobnoustrojów, zwłaszcza o wyższych wartościach MIC, spadek C_{max} prowadził do obniżenia stosunku C_{max}/MIC_{90} poniżej poziomu uznawanego za warunek skutecznego działania fluorochinolonów. Oznacza to, że mimo stosowania standardowych dawek leku, rzeczywista ekspozycja na chemioterapeutyk może być niewystarczająca do eradykacji patogenu. W konsekwencji uzyskane wyniki wskazują, że interakcje zachodzące w przewodzie pokarmowym mogą stanowić istotny, a dotychczas niedostatecznie uwzględniany czynnik

determinujący skuteczność terapii przeciwbakteryjnej u drobiu. Szczególne znaczenie ma fakt, że warunki sprzyjające występowaniu tych interakcji – stały dostęp do paszy oraz obecność jonów mineralnych w wodzie i paszach – są typowe dla intensywnej produkcji zwierzęcej, co nadaje obserwowanym zjawiskom wymiar praktyczny i systemowy, wykraczający poza model eksperymentalny.

4. 2. 1. 5. Wnioski końcowe osiągnięcia

Jednoczesna obecność pokarmu oraz jonów dwuwartościowych w przewodzie pokarmowym istotnie obniża dostępność biologiczną enrofloksacyny podawanej doustnie u indyków, zmniejsza maksymalne stężenia leku w osoczu oraz opóźnia jego wchłanianie, przy czym wpływ pokarmu ma charakter wyraźnie silniejszy niż wpływ jonów. Obserwowane zmiany prowadzą do istotnego obniżenia ekspozycji ogólnoustrojowej leku, a w konsekwencji do spadku wartości wskaźników PK/PD poniżej poziomów warunkujących skuteczność działania fluorochinolonów wobec części patogenów. W warunkach produkcyjnych, w których zwierzęta mają stały dostęp do paszy oraz są narażone na wysokie stężenia jonów mineralnych, standardowe schematy dawkowania enrofloksacyny mogą prowadzić do niewystarczającej ekspozycji na lek i ryzyka nieskuteczności terapii, szczególnie w zakażeniach wywołanych przez drobnoustroje o niższej wrażliwości.

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność uwzględniania interakcji lek–pokarm–środowisko w praktyce klinicznej oraz potencjalnej modyfikacji schematów dawkowania, a także na znaczenie tych interakcji jako czynnika sprzyjającego rozwojowi oporności drobnoustrojów w warunkach niedostatecznej ekspozycji na chemioterapeutyk.

Osiągnięcie to wnosi istotny wkład w rozwój farmakologii weterynaryjnej poprzez wykazanie, że dostępność biologiczna badanych leków przeciwbakteryjnych u zwierząt produkcyjnych jest w sposób zasadniczy determinowana przez warunki środowiskowe ich stosowania, a nie wyłącznie przez właściwości fizykochemiczne substancji czynnej.

Przeprowadzone badania w sposób jednoznaczny wykazały, że standardowe modele farmakokinetyczne, oparte na warunkach eksperymentalnych, nie odzwierciedlają rzeczywistej ekspozycji na lek w warunkach produkcyjnych, co podważa założenie o uniwersalności stosowanych schematów dawkowania. Wykazanie, że interakcje zachodzące w przewodzie pokarmowym mogą prowadzić do klinicznie istotnego obniżenia wskaźników PK/PD, stanowi istotny wkład w rozwój racjonalnej antybiotykoterapii w weterynarii, wskazując na potrzebę integracji farmakokinetyki z warunkami utrzymania zwierząt oraz praktyką produkcyjną. Osiągnięcie to rozszerza rozumienie zmienności odpowiedzi na leczenie przeciwbakteryjne, wskazując, że czynniki środowiskowe mogą w sposób systemowy modulować skuteczność terapii, co ma bezpośrednie znaczenie zarówno dla efektywności produkcji zwierzęcej, jak i dla ograniczania ryzyka rozwoju oporności drobnoustrojów.

4. 2. 2. Osiągnięcie pt. *„Zmienność farmakokinetyczna tetracyklin u kurcząt brojlerów w warunkach maksymalnej standaryzacji eksperymentalnej.”*

Publikacja omawiająca osiągnięcie wraz z informacją o wkładzie wnioskodawcy w prowadzaniu badań naukowych opisanych w publikacji, jak i w jej powstanie:

- ❖ Ziółkowski H., Jasiocka-Mikołajczyk A., Madej-Śmiechowska H., Janiuk J., Zygmuntowicz A., Dąbrowski M. *Comparative pharmacokinetics of chlortetracycline, tetracycline, minocycline and tigecycline in broiler chickens*. Poultry Science, **2020**, 99:4750–4757.

IF=3,352; MNiSW=140

Mój wkład w powstanie osiągnięcia obejmował współtworzenie koncepcji badań, zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczenia, wykonanie analiz laboratoryjnych i farmakokinetycznych, opracowanie i interpretację wyników, sformułowanie wniosków oraz przygotowanie manuskryptu.

4. 2. 2. 1. Wprowadzenie

Tetracykliny należą do najczęściej stosowanych grup leków przeciwbakteryjnych w medycynie weterynaryjnej, przy czym ich zużycie jest w dominującym stopniu determinowane przez skalę i charakter produkcji zwierzęcej, zwłaszcza w intensywniej hodowli drobiu. Ich znaczenie wynika z szerokiego spektrum działania, relatywnie niskiej toksyczności oraz dostępności ekonomicznej. Pomimo długiej historii stosowania tej grupy antybiotyków, wiedza dotycząca ich właściwości farmakokinetycznych, szczególnie w odniesieniu do poszczególnych gatunków zwierząt, pozostaje niepełna i niespójna.

Charakterystyczną cechą tetracyklin jest wysoki stopień podobieństwa strukturalnego, który sugerowałby zbliżone właściwości farmakokinetyczne. Jednocześnie dostępne dane wskazują na bardzo dużą zmienność w zakresie kluczowych parametrów, w szczególności dostępności biologicznej po podaniu doustnym, która może wahać się od wartości marginalnych, rzędu kilku procent, do wartości przekraczających połowę dawki podanej. Zmienność ta obserwowana jest zarówno pomiędzy poszczególnymi substancjami, jak i pomiędzy gatunkami zwierząt.

Dotychczasowe badania farmakokinetyczne tetracyklin u drobiu były prowadzone najczęściej dla pojedynczych substancji, w odmiennych warunkach eksperymentalnych. Różnice w dawkowaniu, wieku i typie zwierząt, warunkach żywienia czy zastosowanych metodach analitycznych powodowały, że uzyskane wyniki nie były w pełni porównywalne. W konsekwencji brakowało spójnego modelu interpretacyjnego, który pozwalałby powiązać właściwości strukturalne tetracyklin z ich zachowaniem w organizmie, a tym samym racjonalnie przewidywać ich skuteczność kliniczną.

4. 2. 2. 2. Uzasadnienie podjętych badań i ich cele naukowe/podjęte problemy badawcze

Kluczowym problemem poznawczym niniejszych badań było ustalenie, czy obserwowana zmienność farmakokinetyki tetracyklin wynika wyłącznie z różnic eksperymentalnych pomiędzy badaniami, czy też stanowi rzeczywistą, wewnętrzną cechę tej grupy leków, ujawniającą się nawet w warunkach pełnej standaryzacji modelu badawczego. Rozstrzygnięcie tego problemu ma fundamentalne znaczenie dla farmakologii weterynaryjnej. Jeżeli bowiem tetracykliny – mimo podobieństwa strukturalnego – wykazują istotnie odmienne właściwości farmakokinetyczne w identycznych warunkach eksperymentalnych, oznacza to, że nie mogą być traktowane jako grupa jednorodna z punktu widzenia dawkowania i skuteczności klinicznej. W konsekwencji stosowanie uogólnionych schematów terapeutycznych może prowadzić do istotnych błędów w ocenie ekspozycji na lek, a tym samym negatywnie rzutować na skuteczność terapii. W związku z powyższym celem badań było jednoznaczne określenie charakteru i skali różnic farmakokinetycznych pomiędzy wybranymi tetracyklinami w warunkach pełnej standaryzacji eksperymentalnej, poprzez ich bezpośrednie porównanie u jednego gatunku zwierząt, przy identycznym schemacie dawkowania, warunkach utrzymania oraz metodologii analitycznej. Na tej podstawie przyjęto następujące hipotezy badawcze:

- ❖ tetracykliny, pomimo wysokiego podobieństwa strukturalnego, wykazują istotne i systematyczne różnice w parametrach farmakokinetycznych w warunkach kontrolowanych,

- ❖ różnice te obejmują zarówno procesy dystrybucji i eliminacji po podaniu dożylnym, jak i wchłaniania oraz dostępności biologicznej po podaniu doustnym,
- ❖ skala obserwowanych różnic przekracza zakres możliwy do wyjaśnienia wyłącznie właściwościami fizykochemicznymi.

Na podstawie sformułowanego celu oraz przyjętych hipotez badawczych, wyznaczono następujące zadania badawcze:

- porównanie parametrów farmakokinetycznych tetracyklin po podaniu dożylnym w identycznych warunkach eksperymentalnych,
- ocena dostępności biologicznej oraz przebiegu wchłaniania po podaniu doustnym,
- analiza zależności pomiędzy ekspozycją ogólnoustrojową a klirensiem całkowitym,
- identyfikacja wzorców farmakokinetycznych mogących wskazywać na udział dodatkowych mechanizmów regulujących wchłanianie i dystrybucję badanych leków.

4. 2. 2. 3. Wyniki

Przeprowadzone badania wykazały jednoznacznie, że badane tetracykliny różnią się istotnie pod względem farmakokinetyki zarówno po podaniu dożylnym, jak i doustnym, pomimo zastosowania identycznych warunków eksperymentalnych, tej samej dawki oraz jednolitego modelu zwierzęcego.

Po podaniu dożylnym stwierdzono wyraźne różnice w ekspozycji ogólnoustrojowej wyrażonej wartościami pola pod krzywą stężenie-czas. Najwyższe wartości tego parametru uzyskano dla chlorotetracykliny i minocykliny, które były ponad dwukrotnie wyższe niż w przypadku tygecykliny i tetracykliny. Różnice te znajdowały bezpośrednie odzwierciedlenie w wartościach klirensu całkowitego, który dla tygecykliny i tetracykliny był około dwukrotnie wyższy niż dla chlorotetracykliny i minocykliny, co wskazuje na szybszą eliminację tych substancji z organizmu. Analiza przebiegu stężeń w osoczu wykazała, że minocyklina osiągała najwyższe stężenia w początkowej fazie obserwacji, przewyższając stężenia pozostałych tetracyklin nawet ponad dwukrotnie w pierwszych godzinach po podaniu. Chlorotetracyklina również charakteryzowała się wyższymi stężeniami niż tygecyklina i tetracyklina, podczas gdy profile stężeń tych dwóch ostatnich leków były zbliżone i utrzymywały się na niższym poziomie.

Znacznie bardziej wyraźne różnice obserwowano po podaniu doustnym, szczególnie w zakresie dostępności biologicznej. Chlorotetracyklina osiągała dostępność biologiczną na poziomie około 30%, natomiast minocyklina i tetracyklina charakteryzowały się wyraźnie wyższą wartością tego parametru, przekraczającą 50%. Najniższą dostępność biologiczną wykazano dla tygecykliny, która wynosiła około 1,5%, co oznaczało, że była ona wchłaniana ponad 20-krotnie słabiej niż chlorotetracyklina, ponad 30-krotnie słabiej niż minocyklina oraz ponad 35-krotnie słabiej niż tetracyklina. Różnice w dostępności biologicznej znajdowały odzwierciedlenie w wartościach maksymalnych stężeń w osoczu oraz ekspozycji ogólnoustrojowej po podaniu doustnym. Stężenia tygecykliny pozostawały wielokrotnie niższe niż pozostałych tetracyklin – nawet ponad 20-krotnie – i były wykrywalne jedynie przez krótki okres czasu. W przeciwieństwie do tego, minocyklina, tetracyklina i chlorotetracyklina utrzymywały się w osoczu przez znacznie dłuższy czas, przy czym minocyklina charakteryzowała się najwyższą ekspozycją ogólnoustrojową.

Pomimo istotnych różnic w stopniu wchłaniania, parametry opisujące szybkość absorpcji, takie jak średni czas wchłaniania oraz okres półtrwania wchłaniania, pozostawały zbliżone dla wszystkich

badanych tetracyklin. Jednocześnie obserwowane różnice w dostępności biologicznej wpływały na przebieg fazy eliminacji, co znalazło odzwierciedlenie w zróżnicowanych wartościach okresu półtrwania w fazie eliminacji, który układał się w kolejności: tygecyklina < chlorotetracyklina < tetracyklina < minocyklina. Ponadto czas obecności poszczególnych tetracyklin w organizmie po podaniu doustnym również różnił się istotnie – tygecyklina była wykrywalna jedynie przez około 13 godzin, podczas gdy pozostałe tetracykliny utrzymywały się w osoczu od kilkudziesięciu do nawet około 100 godzin.

4. 2. 2. 4. Omówienie wyników

Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że badane tetracykliny – pomimo wysokiego podobieństwa strukturalnego – wykazują wyraźnie odmienne profile farmakokinetyczne, obejmujące zarówno procesy dystrybucji i eliminacji po podaniu dożylnym, jak i wchłaniania po podaniu doustnym. Kluczowe znaczenie ma fakt, że różnice te ujawniają się w warunkach pełnej standaryzacji eksperymentalnej, co wyklucza ich przypadkowy charakter oraz ogranicza możliwość ich wyjaśnienia wyłącznie czynnikami zewnętrznymi.

W zakresie farmakokinetyki po podaniu dożylnym istotnym spostrzeżeniem jest odwrotna relacja pomiędzy ekspozycją ogólnoustrojową a klirensiem całkowitym. Wyższe wartości pola pod krzywą stężenie-czas dla minocykliny i chlorotetracykliny odpowiadają niższym wartościom klirensu, co wskazuje na wolniejsze usuwanie tych substancji z organizmu. Z kolei tygecyklina i tetracyklina, charakteryzujące się wyższym klirensiem i osiągają niższą ekspozycję ogólnoustrojową. Różnice te nie mogą być tłumaczone jedynie właściwościami fizykochemicznymi, ponieważ badane substancje należą do jednej grupy chemicznej i wykazują wysokie podobieństwo strukturalne. Wskazuje to na udział dodatkowych czynników regulujących dystrybucję i eliminację leków, potencjalnie związanych z ich transportem przez bariery biologiczne.

Najbardziej wyraźne i jednocześnie kluczowe z punktu widzenia praktyki klinicznej różnice dotyczą procesu wchłaniania. Uzyskane wyniki pokazują, że dostępność biologiczna tetracyklin może różnić się w sposób skrajny, od wartości marginalnych w przypadku tygecykliny do wartości przekraczających połowę dawki w przypadku minocykliny i tetracykliny. Co istotne, przy tak dużych różnicach w stopniu wchłaniania, parametry opisujące szybkość tego procesu pozostają względnie podobne. Oznacza to, że zasadniczym czynnikiem różnicującym farmakokinetykę badanych substancji nie jest tempo absorpcji, lecz zakres, w jakim lek ulega wchłonięciu z przewodu pokarmowego. Taki obraz wskazuje, że proces wchłaniania tetracyklin nie jest determinowany wyłącznie przez bierną dyfuzję przez błony biologiczne. Gdyby dominującym mechanizmem była dyfuzja, należałoby oczekiwać bardziej spójnych wartości dostępności biologicznej pomiędzy substancjami o zbliżonej strukturze i właściwościach fizykochemicznych. Tymczasem obserwowane różnice, sięgające kilkudziesięciokrotności, sugerują istnienie dodatkowych mechanizmów regulacyjnych, które ograniczają lub promują transport leku przez nabłonek jelitowy. W tym kontekście najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem obserwowanych zjawisk jest udział mechanizmów transportu aktywnego, które mogą selektywnie ograniczać wchłanianie niektórych tetracyklin. Mechanizm ten tłumaczyłby zarówno bardzo niską dostępność biologiczną tygecykliny, jak i istotne różnice pomiędzy pozostałymi substancjami, pomimo ich podobieństwa strukturalnego. Jednocześnie obserwowane różnice w parametrach dystrybucji i eliminacji po podaniu dożylnym

mogą wskazywać, że mechanizmy te odgrywają rolę nie tylko na poziomie przewodu pokarmowego, ale również w transporcie leków w ustroju.

Istotnym elementem interpretacyjnym jest również zestawienie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. Dotychczasowe badania, prowadzone dla pojedynczych tetracyklin w różnych modelach eksperymentalnych, wskazywały na dużą zmienność parametrów farmakokinetycznych, jednak nie pozwalały na jednoznaczne określenie charakteru tych różnic. Przeprowadzenie bezpośredniego porównania w identycznych warunkach eksperymentalnych pozwoliło wykazać, że zmienność ta ma charakter systemowy i wynika z właściwości badanych substancji, a nie jedynie z różnic metodologicznych pomiędzy badaniami.

W konsekwencji uzyskane wyniki wskazują, że farmakokinetyka tetracyklin stanowi złożony układ zależności, w którym podobieństwo strukturalne nie przekłada się na podobieństwo zachowania w organizmie. Ma to istotne znaczenie zarówno dla interpretacji danych farmakokinetycznych, jak i dla praktyki klinicznej, ponieważ podkreśla konieczność indywidualnego podejścia do poszczególnych substancji w obrębie tej samej grupy terapeutycznej.

4. 2. 2. 5. Wnioski końcowe osiągnięcia

Przeprowadzone badania wykazały jednoznacznie, że tetracykliny – pomimo wysokiego podobieństwa strukturalnego – nie stanowią farmakokinetycznie jednorodnej grupy leków. Różnice pomiędzy badanymi substancjami mają charakter zasadniczy i obejmują zarówno ekspozycję ogólnoustrojową po podaniu dożylnym, jak i dostępność biologiczną po podaniu doustnym, która w skrajnych przypadkach różni się kilkudziesięciokrotnie.

Najważniejszym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych badań jest stwierdzenie, że stopień wchłaniania tetracyklin z przewodu pokarmowego stanowi główny czynnik determinujący ich farmakokinetkę po podaniu doustnym, a obserwowane różnice nie mogą być wyjaśnione wyłącznie właściwościami fizykochemicznymi tych substancji. Uzyskane wyniki wskazują, że procesy regulujące transport leków przez bariery biologiczne najprawdopodobniej odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu ich dostępności biologicznej oraz ekspozycji ogólnoustrojowej. W konsekwencji uzyskane dane pozwalają wyjaśnić, że traktowanie tetracyklin jako farmakokinetycznie jednorodnej grupy leków może prowadzić do istotnych błędów w ocenie ekspozycji na lek, a tym samym do nieskuteczności terapii lub zwiększonego ryzyka selekcji oporności drobnoustrojów. Wyniki te wskazują na konieczność indywidualizacji podejścia do poszczególnych substancji, nawet w obrębie jednej grupy chemicznej.

Osiągnięcie to wnosi istotny wkład w rozwój farmakologii weterynaryjnej poprzez wykazanie, że podobieństwo strukturalne leków przeciwbakteryjnych nie stanowi wiarygodnej podstawy do przewidywania ich właściwości farmakokinetycznych. Przeprowadzone badania po raz pierwszy w sposób jednoznaczny udokumentowały, że różnice pomiędzy tetracyklinami mają charakter systemowy i ujawniają się w warunkach pełnej standaryzacji eksperymentalnej, co wskazuje, że traktowanie tej grupy leków jako farmakokinetycznie jednorodnej wymaga rewizji.

Wykazanie, że procesy wchłaniania i dystrybucji tetracyklin są regulowane przez mechanizmy wykraczające poza bierną dyfuzję, stanowi istotny wkład poznawczy, który rozszerza rozumienie mechanizmów determinujących losy leków w organizmie zwierząt. Uzyskane wyniki tworzą podstawę do dalszych badań nad rolą transporterów błonowych w farmakokinetyce badanych

chemioterapeutyków oraz wskazują na konieczność integracji danych farmakokinetycznych z mechanizmami molekularnymi transportu leków.

Z punktu widzenia praktyki klinicznej oraz produkcji zwierzęcej uzyskane wyniki wskazują, że różnice w dostępności biologicznej tetracyklin mogą osiągać skalę, która w istotny sposób wpływa na rzeczywistą ekspozycję na lek. W konsekwencji dobór substancji czynnej, nawet w obrębie jednej grupy chemicznej, może mieć kluczowe znaczenie dla skuteczności terapii, co podkreśla znaczenie uwzględniania indywidualnych właściwości farmakokinetycznych poszczególnych tetracyklin.

Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny weterynarii poprzez pogłębienie wiedzy na temat zmienności farmakokinetyki tetracyklin, jednych z najczęściej stosowanych leków przeciwdrobnoustrojowych w weterynarii, oraz wskazanie nowych kierunków badań nad mechanizmami regulującymi ich dostępność biologiczną i skuteczność terapeutyczną.

4. 3. Osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie doktorskiej pt. „*Wpływ pokarmu i jonów metali na wchłanianie z przewodu pokarmowego i farmakokinetykę oksytetracykliny u kurcząt brojlerów*”

Publikacje omawiające osiągnięcie wraz z informacją o wkładzie wnioskodawcy w prowadzeniu badań naukowych opisanych w publikacjach, jak i w ich powstanie:

- ❖ **Ziółkowski H.**, Grabowski T., Jasiecka A., Zuśka-Prot M., Barski D., Jaroszewski J. *Pharmacokinetics of oxytetracycline in broiler chickens following different routes of administration*. The Veterinary Journal, **2016**, 208:96–98.
IF=1,802; MNiSW=40
- ❖ **Ziółkowski H.**, Jasiecka A., Zuśka-Prot, Przybysz J., Grabowski T., Jaroszewski J. *Metal ion-oxytetracycline pharmacokinetic interactions after oral co-administration in broiler chickens*. Poultry Science, **2016**, 95:1927–1933.
IF=1,908; MNiSW=40
- ❖ **Ziółkowski H.**, Madej-Śmiechowska H., Grabowski T., Jaroszewski J.J., Maślanka T. *Hard water may increase the inhibitory effect of feed on the oral bioavailability of oxytetracycline in broiler chickens*. Polish Journal of Veterinary Sciences, **2019**, 22:251–258.
IF=0,516; MNiSW=40

Mój wkład w powstanie osiągnięcia naukowego opisanego w w/w publikacjach, jak i w ich powstanie polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu doświadczenia, zebraniu materiału do badań, przeprowadzeniu analizy instrumentalnej, obliczeń farmakokinetycznych i obliczeń statystycznych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptów. Ponadto, niniejsze osiągnięcie badawcze było podstawą do nadania mi w 2014 roku stopnia doktora nauk weterynaryjnych.

Rozprawa doktorska stanowiła podstawę mojego dalszego rozwoju w obszarze farmakokinetyki eksperymentalnej, koncentrując się na czynnikach regulujących wchłanianie i dostępność biologiczną oksytetracykliny u drobiu.

Oksytetracyklina jest szeroko stosowanym chemioterapeutycznym przeciwbakteryjnym wykorzystywanym zarówno w medycynie człowieka, jak i w medycynie weterynaryjnej. Skuteczność terapeutyczna tego leku zależy w istotnym stopniu od jego wchłaniania z przewodu pokarmowego, które może ulegać modyfikacjom pod wpływem czynników żywieniowych i środowiskowych. Zrozumienie determinant biodostępności oksytetracykliny u zwierząt gospodarskich ma znaczenie dla racjonalizacji terapii przeciwbakteryjnych w warunkach produkcyjnych.

Celem pracy było określenie farmakokinetyki oksytetracykliny u kurcząt brojlerów oraz ocena czynników wpływających na jej wchłanianie z przewodu pokarmowego. W pierwszym etapie ustalono parametry farmakokinetyczne po podaniu dożylnym i doustnym, określając profil absorpcji, dystrybucji i eliminacji leku u badanego gatunku. W kolejnych etapach analizowano interakcje zachodzące na poziomie wchłaniania w obecności pokarmu oraz jonów dwuwartościowych wapnia (Ca^{2+}) i magnezu (Mg^{2+}), a także oceniano ich łączny wpływ na badane parametry.

Realizacja projektu wymagała opracowania i walidacji metody oznaczania oksytetracykliny w osoczu z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS). Metoda została zwalidowana zgodnie z wytycznymi FDA i EMA, co umożliwiło

uzyskanie wiarygodnych danych stężeniowych stanowiących podstawę dalszej analizy i interpretacji farmakokinetycznej.

Uzyskane wyniki pozwoliły na kompleksową charakterystykę farmakokinetyki oksytetracykliny u kurcząt brojlerów. Dostępność biologiczna oksytetracykliny po podaniu doustnym wynosiła około 16%, co wskazuje na ograniczone wchłanianie w warunkach wyjściowych. Wykazano, że obecność pokarmu istotnie obniżała dostępność biologiczną badanego leku – o około 30% – prawdopodobnie w wyniku tworzenia kompleksów oksytetracykliny z jonami wielowartościowymi obecnymi w paszy, zmian w opróżnianiu przewodu pokarmowego, a także fizycznej bariery, jaką stanowi treść pokarmowa w świetle jelita, ograniczającej kontakt leku z powierzchnią wchłaniania. Jony Ca^{2+} i Mg^{2+} obecne w wodzie w stężeniach zgodnych z obowiązującymi normami nie powodowały istotnych zmian parametrów farmakokinetycznych, obniżając dostępność biologiczną o mniej niż 5%. Jednak w połączeniu z pokarmem nasilały hamujący wpływ na wchłanianie, prowadząc do dodatkowego, około 20-procentowego spadku stężeń oksytetracykliny w osoczu. Wyniki te potwierdzają znaczenie interakcji fizykochemicznych tetracyklin z jonami dwuwartościowymi w warunkach obecności składników pokarmowych. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- ❖ Wchłanianie oksytetracykliny z przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów jest ograniczone.
- ❖ Dostęp do pokarmu podczas doustnego podawania oksytetracykliny istotnie obniża ekspozycję ogólnoustrojową leku.
- ❖ Jony Ca^{2+} i Mg^{2+} w dopuszczalnych stężeniach nie wpływają istotnie na farmakokinetykę oksytetracykliny.
- ❖ Jednoczesna obecność pokarmu i jonów dwuwartościowych nasila hamowanie wchłaniania oksytetracykliny.
- ❖ Opracowana metoda HPLC-MS/MS stanowi wiarygodne narzędzie do analiz farmakokinetycznych oksytetracykliny u drobiu.

4. 4. Pozostała aktywność naukowa

Całość mojego dorobku naukowego koncentruje się w trzech obszarach badawczych: farmakokinetyczno-analitycznym, immunofarmakologicznym oraz badaniach nad funkcjonowaniem i zaburzeniami gałki ocznej. Obszary te łączy podejście eksperymentalne oraz koncentracja na zagadnieniach wymagających podejścia ilościowego w analizie zjawisk biologicznych. Niezależnie od tematyki prowadzone przeze mnie badania opierały się na jasno określonych modelach doświadczalnych oraz konsekwentnie rozwijanych kompetencjach metodologicznych. Dorobek ten obejmuje prace realizowane zarówno samodzielnie, jak i we współpracy z zespołami interdyscyplinarnymi oraz partnerami krajowymi i zagranicznymi.

4. 4. 1. Badania z zakresu farmakokinetyki i analityki leków

Pierwszy i dominujący obszar moich badań obejmuje farmakokinetykę leków, ściśle powiązaną z rozwojem i zastosowaniem metod analitycznych opartych na chromatografii cieczowej (HPLC/UPLC-MS/MS) jako narzędzia ilościowej oceny stężeń leków w matrycach biologicznych. Obszar ten towarzyszy mi od początku kariery naukowej – począwszy od pracy przeglądowej dotyczącej farmakokinetyki leków przeciwpadaczkowych drugiej generacji u psów, poprzez rozprawę doktorską, aż po aktualne projekty realizowane we współpracy krajowej i międzynarodowej. Tematyka ta stanowi ponad połowę ($\approx 70\%$) mojego całkowitego dorobku publikacyjnego. Badania z tego obszaru obejmują zarówno klasyczne analizy farmakokinetyczne w weterynarii (drób, konie, psy), jak i projekty realizowane we współpracy z ośrodkami medycznymi, w tym z zakresu farmakokinetyki populacyjnej, terapii nerkozastępczej oraz badań przedklinicznych prowadzonych we współpracy z przemysłem farmaceutycznym. Charakterystyczną cechą tego obszaru jest integracja kompetencji analitycznych i farmakokinetycznych – od opracowania i walidacji metod oznaczeń, poprzez analizę farmakokinetyczną, po interpretację danych w kontekście klinicznym i translacyjnym.

4. 4. 1. 1. Studia literaturowe nad charakterystyką farmakologiczną wybranych leków przeciwpadaczkowych drugiej generacji u psów

Początki mojej działalności naukowej związane były z analizą farmakokinetyki leków przeciwpadaczkowych u psów. Padaczka psów pozostaje istotnym problemem klinicznym, a znaczna część przypadków wykazuje ograniczoną odpowiedź na standardowe leczenie. Jednocześnie dostępność leków przeciwpadaczkowych ulega systematycznemu rozszerzeniu, co stwarza możliwości modyfikacji terapii, w tym leczenia skojarzonego.

W niniejszych studiach nad literaturą przedstawiono analizę farmakodynamiczną i farmakokinetyczną leków przeciwpadaczkowych drugiej generacji dopuszczonych do obrotu po 1990 roku, które nie są powszechnie stosowane w medycynie weterynaryjnej. Do tej grupy należą: felbamat, gabapentyna, lewetyracetam, okskarbazepina, topiramata oraz zonisamid. Charakterystykę opracowano na podstawie danych literaturowych, ze szczególnym uwzględnieniem parametrów farmakokinetycznych określonych u psów. Profile farmakokinetyczne poszczególnych leków zostały zestawione i poddane analizie porównawczej w celu oceny ich potencjalnej użyteczności klinicznej.

Porównanie parametrów farmakokinetycznych wykazało, że część leków drugiej generacji może stanowić wartościowe uzupełnienie terapii padaczki u psów, zwłaszcza w przypadkach opornych na leczenie pierwszej linii. Jednym z czynników ograniczających ich szersze zastosowanie pozostaje koszt terapii w porównaniu z lekami pierwszej generacji, takimi jak fenobarbital czy

karbamazepina. Istotne znaczenie mają również właściwości farmakokinetyczne determinujące schemat dawkowania – krótki okres półtrwania niektórych substancji wymaga częstego podawania, co ogranicza praktyczność terapii. W tym kontekście zonisamid, umożliwiający podawanie raz lub dwa razy na dobę, wyróżnia się korzystniejszym profilem dawkowania.

Ponadto przeprowadzona analiza wykazała, że wśród leków drugiej generacji znajdują się substancje, których farmakokinetyka u psów pozostaje niewystarczająco poznana (lamotrygina, tiagabina, wigabatryna). Równocześnie w medycynie ludzkiej wprowadzane są kolejne leki przeciwpadaczkowe trzeciej generacji, co wskazuje na dynamiczny rozwój tej grupy farmaceutyków i potencjalne kierunki dalszych badań w weterynarii.

Wnioski sformułowane na podstawie analizy literaturowej wskazują, że leki przeciwpadaczkowe drugiej generacji mogą być stosowane zarówno w monoterapii, jak i w leczeniu skojarzonym u psów, zwłaszcza w przypadkach padaczki odpornej. Ich korzystniejszy margines bezpieczeństwa oraz profil farmakokinetyczny mogą umożliwiać optymalizację terapii i redukcję dawek leków pierwszej generacji. Praca ta miała charakter analityczny tj. nie ograniczała się jedynie do syntezy literatury, lecz obejmowała także porównawczą ocenę parametrów farmakokinetycznych w kontekście ich implikacji klinicznych.

Wyniki niniejszej pracy zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ **Ziółkowski H.** Jaroszewski J., Jasiecka A., Ziółkowska N. *Characteristics of selected second-generation antiepileptic drugs used in dogs*. Polish Journal of Veterinary Sciences, **2012**, 15: 571–582.

IF=0,570; MNiSW=20

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji, zebraniu danych, przeprowadzeniu porównań farmakokinetycznych, weryfikacji poprawności przeprowadzenia obliczeń, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

W ostatnim okresie moja aktywność naukowa ponownie objęła zagadnienia farmakokinetyki leków przeciwpadaczkowych. Współuczestniczę w badaniu dotyczącym wpływu terapii nerkozastępczej na eliminację lakozamidu w modelu *in vitro*; manuskrypt znajduje się obecnie na etapie procedury recenzyjnej. Badanie to rozszerza wcześniejsze zainteresowania farmakokinetyką leków przeciwpadaczkowych na obszar medycyny człowieka oraz kontekst kliniczny terapii nerkozastępczej, koncentrując się na ocenie, czy procedury dializacyjne mogą istotnie modyfikować ekspozycję na lakozamid, a tym samym wpływać na skuteczność i bezpieczeństwo terapii u pacjentów z niewydolnością nerek.

4. 4. 1. 2. Badania nad farmakokinetyką *in silico*

Równolegle do badań eksperymentalnych prowadziłem analizy metodologiczne dotyczące interpretacji parametrów farmakokinetycznych w modelach *in silico*. Celem przedstawionych badań była ocena sposobu wyznaczania maksymalnego obserwowanego stężenia ($C_{\max, \text{obs}}$) oraz czasu jego wystąpienia ($t_{\max, \text{obs}}$) przy założeniu stałej szybkości wchłaniania, ze szczególnym uwzględnieniem profili stężenie–czas (C – T) wykazujących więcej niż jedno maksimum. W analizie skoncentrowano się na problemie interpretacji krzywych C – T , w których obecność kilku maksimów stężenia może prowadzić do błędnego przypisania wartości $C_{\max, \text{obs}}$ i $t_{\max, \text{obs}}$ do niewłaściwej fazy absorpcji.

Porównanie danych hipotetycznych z rzeczywistymi profilami *in vivo* wykazało, że nieuwzględnienie złożonego charakteru absorpcji może skutkować nieprecyzyjnym oszacowaniem tych parametrów. Dodatkowo, podjęto próbę zastosowania transformacji danych z wykorzystaniem ciągu Fibonacciego w celu ułatwienia wizualnej analizy dynamiki zmian stężenia. Wykazano, że takie przekształcenie może uwidocznić subtelne różnice w wartościach stężenia w skali półlogarytmicznej, wspierając interpretację złożonych profili farmakokinetycznych.

Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku krzywych C–T z wieloma maksimami weryfikacja wartości C_{max} i t_{max} z uwzględnieniem odrębnych faz absorpcji pozwala na bardziej precyzyjną ocenę tych parametrów oraz ogranicza ryzyko błędnej interpretacji danych farmakokinetycznych.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Grabowski T., Jaroszewski J.J., Borucka B., Ziółkowski H. *C_{max} and t_{max} verification using Fibonacci sequence and absorption rate*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, **2013**, 38: 131–138.

IF=1,312; MNiSW=15

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na weryfikacji poprawności przeprowadzenia obliczeń, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 1. 3. Badania nad farmakokinetyką leków przeciwdrobnoustrojowych

Tygecyklina – farmakokinetyka u indyków

Kolejnym obszarem mojej aktywności naukowej była farmakokinetyka leków przeciwdrobnoustrojowych, zapoczątkowana udziałem w badaniach nad tygecykliną u indyków prowadzonych w ramach współpracy zespołowej. Udział w tym projekcie (punkt 7.1) stanowił dla mnie istotne rozszerzenie doświadczenia w zakresie analityki biofarmaceutycznej oraz interpretacji danych farmakokinetycznych w odniesieniu do skuteczności przeciwdrobnoustrojowej.

Badania wykazały, że tygecyklina podana parenteralnie charakteryzuje się długim okresem półtrwania oraz znaczną objętością dystrybucji, co wskazuje na jej rozległą penetrację tkankową. Parametry uzyskane po podaniu domięśniowym i podskórnym były zbliżone, a dostępność biologiczna w tych drogach wynosiła około 34%. Jednocześnie stwierdzono skrajnie ograniczone wchłanianie po podaniu doustnym – biodostępność wynosiła około 1%. Tak wyraźna dysproporcja pomiędzy drogami podania, przy zachowaniu zgodności parametrów eliminacyjnych z danymi uzyskiwanymi u innych gatunków, wskazywała, że zasadniczym czynnikiem ograniczającym ekspozycję ogólnoustrojową jest etap wchłaniania jelitowego. Obserwacja ta miała dla mnie istotne znaczenie poznawcze, ponieważ sugerowała istnienie mechanizmów regulujących dostępność biologiczną, wykraczających poza klasyczne uwarunkowania fizykochemiczne cząsteczki.

Wyniki tych badań stanowiły bezpośredni impuls do dalszych analiz porównawczych obejmujących inne tetracykliny oraz do podjęcia systematycznych badań nad rolą mechanizmów transportowych w regulacji farmakokinetyki tej grupy leków.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Jasiecka-Mikołajczyk A., Ziółkowski H., Jaroszewski J. *Pharmacokinetics of tigecycline in turkeys following different routes of administration*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, **2018**, 41: 22–29.

IF=1,175; MNiSW=70

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na udziale w pozyskiwaniu próbek oraz w analizie instrumentalnej, weryfikacji poprawności przeprowadzenia obliczeń farmakokinetycznych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Flumechina – wpływ paszy na farmakokinetkę

Kolejnym projektem z zakresu farmakokinetyki leków przeciwdrobnoustrojowych była analiza wpływu sposobu podania leku oraz obecności paszy na parametry farmakokinetyczne flumechiny u kurcząt brojlerów. W badaniu porównano profil farmakokinetyczny flumechiny po podaniu pojedynczej doustnej dawki leku ptakom z ograniczonym i nieograniczonym dostępem do paszy, a także po podaniu leku w sposób ciągły z wodą do picia przez kilka dni, co stanowiło symulację warunków fermowych.

Wyniki wykazały, że obecność paszy istotnie zmniejsza dostępność biologiczną flumechiny po podaniu pojedynczej dawki doustnej. Jednocześnie podawanie leku w sposób ciągły z wodą do picia prowadziło do zwiększenia ekspozycji ogólnoustrojowej, co kompensowało spadek wchłaniania obserwowany w obecności paszy. W konsekwencji uzyskiwano stężenia umożliwiające osiągnięcie efektu terapeutycznego wobec wrażliwych patogenów.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Madej-Śmiechowska H., Orzoł A., Jasiecka-Mikołajczyk A., **Ziółkowski H.**, Jaroszewski J. *Differences in the pharmacokinetics of flumequine after single and continuous oral administration in non-fasted broiler chickens*. Polish Journal of Veterinary Sciences, **2018**, 21: 631–634.

IF=0,839; MNiSW=40

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na udziale w pozyskiwaniu próbek do analizy instrumentalnej, przeprowadzeniu analizy chromatograficznej, weryfikacji poprawności przeprowadzenia obliczeń farmakokinetycznych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Chemioterapeutyki przeciwbakteryjne – farmakokinetyka podczas terapii nerkozastępczej (CRRT)

Kolejnym etapem mojej aktywności naukowej był cykl badań dotyczących farmakokinetyki leków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych u pacjentów poddawanych ciągłej terapii nerkozastępczej (CRRT). Projekty te obejmowały zarówno badania *in vitro* z wykorzystaniem modeli hemofiltracji, jak i analizy kliniczne *in vivo* prowadzone u pacjentów oddziałów intensywnej terapii.

W badaniach *in vitro* oceniano adsorpcję wybranych antybiotyków (wankomycyny, gentamycyny, cyprofloksacyny, tygecykliny oraz linezolidu) w modelu ciągłej żylna-żylna hemofiltracji. Analizy prowadzono z wykorzystaniem różnych typów membran filtracyjnych (poliakrylonitrylowych modyfikowanych polietylenoiminą – PAN PEI, niemodyfikowanych PAN oraz polisulfonowych – PS).

W pierwszym etapie stosowano krystaloidy jako nośnik leków, natomiast w kolejnym – krew pełną jako model naśladujący warunki kliniczne. W przypadku krystaloidów obserwowano istotny spadek stężeń wybranych antybiotyków, szczególnie na filtrach PAN PEI. W modelu z użyciem krwi pełnej potwierdzono istotną adsorpcję wankomycyny, cyprofloksacyny, linezolidu oraz tygecykliny, zwłaszcza w przypadku membran poliakrylonitrylowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że adsorpcja antybiotyków na określonych typach membran może mieć znaczenie kliniczne i wpływać na rzeczywistą ekspozycję na leki pacjentów poddawanych terapii CRRT. W części klinicznej przeprowadzono dwa niezależne projekty. Pierwszy dotyczył oceny farmakokinetyki ciprofloksacyny oraz prawdopodobieństwa osiągnięcia celu PK/PD podczas terapii CRRT z zastosowaniem filtrów o dużej powierzchni i wysokiej intensywności. Pomimo istotnej zmienności międzyosobniczej parametrów farmakokinetycznych, u wszystkich pacjentów osiągnięto docelowe wartości wskaźników PK/PD. Analiza wskazała, że stosowanie dawek 400 mg co 8 godzin dożylnie ciprofloksacyny zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania skutecznej ekspozycji terapeutycznej.

Drugie badanie obejmowało opracowanie modelu farmakokinetyki populacyjnej meropenemu u krytycznie chorych pacjentów poddawanych CRRT. Zastosowano model dwukompartamentowy oraz symulacje Monte Carlo w celu oceny prawdopodobieństwa osiągnięcia celu terapeutycznego. Model pozwolił na opis przebiegu stężeń meropenemu u 90% badanej populacji. W analizie wykazano również związek między poziomem albumin a utrzymywaniem się meropenemu w krążeniu, co ma znaczenie przy interpretacji wyników dotyczących ekspozycji na badany lek w tej grupie chorych.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- ❖ Onichimowski D., **Ziółkowski H**, Nosek K., Jaroszewski J., Rypulak E., Czuczwar M. *Comparison of adsorption of selected antibiotics on the filters in continuous renal replacement therapy circuits: in vitro studies*. Journal of Artificial Organs, **2020**, 23:163–170.
IF=1,731; MNiSW=40
- ❖ Onichimowski D., Będzowska A., **Ziółkowski H**, Jaroszewski J., Borys M., Czuczwar M., Wiczling P. *Population pharmacokinetics of standard dose meropenem in critically ill patients on continuous renal replacement therapy – a prospective observational trial*. Pharmacological Reports, **2020**, 72:719–729.
IF=3,024; MNiSW=70
- ❖ Onichimowski D., Wolska J., **Ziółkowski H.**, Nosek K., Jaroszewski J., Czuczwar M. *Pharmacokinetics of ciprofloxacin during CRRT in intensive care patients – new assessment*. Anaesthesiology Intensive Therapy, **2020**, 52: 267–273.
MNiSW=70
- ❖ Onichimowski D., Nosek K., **Ziółkowski H**, Jaroszewski J., Pawlos A., Czuczwar M. *Adsorption of vancomycin, gentamycin, ciprofloxacin and tygecycline on the filters in continuous renal replacement therapy circuits: in full blood in vitro study*. Journal of Artificial Organs, **2021**, 24:65–73.
IF=1,385; MEiN=40
- ❖ Nosek K, Samiec M, Ziółkowski H, Markowska-Buńka P, Czuczwar M, Borys M, Onichimowski D. *Linezolid adsorption on filters during continuous renal replacement therapy: an in vitro study*. Pharmaceuticals (Basel). **2024**,17:1317.
IF=4,30; MNiSW=100

Mój wkład w powstanie niniejszych publikacji polegał na opracowaniu metod analitycznych oraz przeprowadzeniu oznaczeń instrumentalnych, przeprowadzeniu obliczeń farmakokinetycznych i statystycznych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 1. 4. Badania nad farmakokinetyką leków przeciwpasożytniczych

Albendazol – farmakokinetyka i oznaczanie metabolitów u indyków

Pierwszym doświadczeniem w ramach badań nad farmakokinetyką leków przeciwpasożytniczych było określenie farmakokinetyki albendazolu i jego metabolitów u indyków z wykorzystaniem metody analitycznej umożliwiającej oznaczanie stężeń tych substancji w osoczu. W ramach tego badania opracowano i zwalidowano nową metodę analityczną do oznaczania albendazolu oraz jego dwóch głównych metabolitów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Metoda obejmowała zastosowanie dwóch różnych standardów wewnętrznych, odmiennych programów elucji gradientowej oraz jednoetapowej ekstrakcji ciecz–ciecz.

W dalszym etapie przeprowadzono porównanie kolumn przeznaczonych do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z kolumnami stosowanymi w ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) w celu oceny ich przydatności do oznaczania stężeń albendazolu i jego głównych metabolitów w osoczu indyków. Opracowana metoda analityczna umożliwiała oznaczanie stężeń albendazolu i jego dwóch głównych metabolitów przy limitach oznaczalności wynoszących odpowiednio 10,5, 51,6 oraz 9,99 ng/ml. Uzyskane wyniki potwierdziły możliwość wykorzystania kolumn UPLC do oznaczania albendazolu z zastosowaniem metody HPLC. Analiza farmakokinetyczna wykazała ponadto istotne różnice w metabolizmie albendazolu u indyków w porównaniu z metabolizmem opisanym u różnych gatunków ssaków.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Grabowski T., Jaroszewski J.J., Świerczewska A., Sawicka R., Maślanka T., Markiewicz W., Ziółkowski H. *Application of ultra performance columns in high performance liquid chromatography for albendazole and its metabolites determination in turkeys*. Biomedical Chromatography, **2011**, 25:1159–1167.

IF=1,966; MNiSW=27

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na przeprowadzeniu analizy instrumentalnej, pomocy w przeprowadzeniu obliczeń farmakokinetycznych i statystycznych, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Iwermektyna – farmakokinetyka u koni

Kolejnym zagadnieniem w ramach badań nad farmakokinetyką leków przeciwpasożytniczych był cykl dwóch badań poświęconych farmakokinetyce iwermektyny stosowanej w terapii przeciworobaczej u koni.

W pierwszym doświadczeniu określono charakterystykę farmakokinetyczną iwermektyny podawanej doustnie koniom w trakcie dwóch sezonowych terapii odrobaczających, a także oceniono skuteczność stosowanej terapii wobec pasożytów z podrodziny *Cyathostominae*. Uzyskane wyniki wskazały, że pora roku, w której prowadzono terapię, oraz różnice w żywieniu zwierząt nie wpływały istotnie na większość parametrów farmakokinetycznych iwermektyny.

Drugie badanie dotyczyło oceny możliwych różnic w farmakokinetyce iwermektyny podawanej doustnie koniom rasy huculskiej i toryjskiej, czyli rasom znacząco różniącym się cechami anatomiczno-fizjologicznymi. W przeprowadzonych analizach wykazano ponad dwukrotnie wyższe stężenia iwermektyny w osoczu koni toryjskich w porównaniu ze stężeniami obserwowanymi u koni huculskich, pomimo podania takich samych dawek i zastosowania tej samej drogi podania.

Zaobserwowane różnice wskazują, że rasa może stanowić istotny czynnik wpływający na farmakokinetykę ivermektyny, a tym samym oddziaływać na skuteczność farmakoterapii przeciw Pasożytniczej u koni.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- ❖ Sokół R., Raś-Noryńska M., Michalczyk M., Jasiocka A., **Ziółkowski H.**, Jaroszewski J.J. *A comparison of the efficacy and pharmacokinetics of ivermectin after spring and autumn treatments against Cyathostominae in horses*. Polish Journal of Veterinary Sciences, **2015**, 18(2): 371-377.

IF=0,719; MNiSW=20

- ❖ Vyniarska A., **Ziółkowski H.**, Madej-Śmiechowska H., Jaroszewski J.J. *The pharmacokinetics and antiparasitic activity of ivermectin in Hutsul and Toric horses*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, **2021**, 44: 11–17.

IF=1,567; MEiN=70

Mój wkład w powstanie niniejszych publikacji polegał na opracowaniu metody analitycznej oraz przeprowadzeniu oznaczeń instrumentalnych, przeprowadzeniu obliczeń farmakokinetycznych i statystycznych oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Pochodne izoksazolin – oznaczanie w osoczu metodą UPLC-MS/MS

Jednym z zagadnień podejmowanych w ramach badań nad farmakokinetyką i analityką leków przeciw pasożytniczych było opracowanie i walidacja metody umożliwiającej jednocześnie oznaczanie czterech pochodnych izoksazolin – fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoxolaneru – w osoczu oraz ocena jej przydatności w badaniach przesiewowych. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS). Metodę zwalidowano w osoczu kur niosek, a następnie przeprowadzono jej ponowną walidację w osoczu psa, kota i człowieka w zakresie selektywności, efektu matrycy i odzysku. Ocenie poddano liniowość, precyzję, dokładność, granice wykrywalności i oznaczalności, stabilność analitów oraz przenoszenie sygnału.

Uzyskane wyniki potwierdziły precyzyjność, dokładność oraz liniowość metody w zakresie stężeń 0,001–1,5 µg/mL. Granica oznaczalności wynosiła 1 ng/mL, a odzysk całkowity mieścił się w zakresie 85–99%, w zależności od związku i badanej matrycy. Efekt matrycy nie przekraczał 15%, a stabilność analitów była zachowana w różnych warunkach przechowywania i przygotowania próbek. Opracowaną metodę z powodzeniem zastosowano również w badaniach przesiewowych próbek osocza psów i kotów pochodzących z kliniki weterynaryjnej.

Uzyskane wyniki wskazują, że metoda UPLC-MS/MS umożliwia szybkie i wiarygodne oznaczanie izoksazolin w osoczu i może być stosowana zarówno w badaniach farmakokinetycznych, jak i w rutynowych analizach kontrolnych.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Markowska-Buńka P., Jaroszewski J., Rasiński B., **Ziółkowski H.** *A novel method for the determination of isoxazoline derivatives in plasma by UPLC-MS/MS: validation and applicability to screening tests*. Journal of Veterinary Research. **2025**, 69:405–415.

IF=1,500; MNiSW=140

Mój wkład w powstanie niniejszych publikacji, której byłem autorem korespondencyjnym polegał na znaczącym udziale w opracowaniu koncepcji badania, pomocy w przeprowadzeniu analizy

chromatograficznej, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Dimetoat i pyrantel – wpływ na układ antyoksydacyjny

Uzupełnieniem badań z zakresu leków przeciwpasożytniczych była ocena wpływu jednoczesnej ekspozycji na dwa związki o aktywności przeciwpasożytniczej – embonian pyrantelu oraz dimetoat – na wybrane parametry układu antyoksydacyjnego. Substancje o wysokiej aktywności biologicznej mogą indukować stres oksydacyjny i zaburzać mechanizmy antyoksydacyjne organizmu, zwłaszcza w przypadku jednoczesnego działania kilku ksenobiotyków.

Celem pracy była ocena wpływu pojedynczego oraz skojarzonego podawania dimetoatu i embonianu pyrantelu na stężenie zredukowanego glutationu (GSH) w wątrobie oraz aktywność enzymów glutationozależnych – peroksydazy glutationowej (GPx) i reduktazy glutationowej (GR) – w erytrocytach szczurów.

Ekspozycja na dimetoat powodowała wyraźne zaburzenia funkcjonowania układu antyoksydacyjnego, objawiające się spadkiem stężenia GSH w wątrobie oraz wzrostem aktywności GPx i GR w erytrocytach. Embonian pyrantelu podawany samodzielnie wywoływał jedynie niewielkie zmiany analizowanych parametrów. W przypadku jednoczesnego podania obu związków obserwowano profil zmian zbliżony do działania dimetoatu, jednak o wyraźnie większym nasileniu, co wskazuje na efekt addytywny lub synergistyczny. Wyniki te sugerują, że skojarzona ekspozycja na oba związki może prowadzić do nasilonych zaburzeń równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Spodniewska A., Barski D., Ziółkowski H. *Glutathione and glutathione-related enzymes in rats exposed to dimethoate and/or pyrantel*. Polish Journal of Veterinary Sciences, **2014**, 17: 105–112.

IF=0,604; MNiSW=20

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na udziale w przeprowadzeniu doświadczenia, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Studia literaturowe nad charakterystyką pochodnych izoksazolin

W ramach pozostałej aktywności naukowej prowadziłem również prace o charakterze przeglądowym, ukierunkowane na kompleksową ocenę nowoczesnych leków przeciwpasożytniczych z grupy izoksazolin, które w ostatnich latach stały się istotnym elementem terapii ektopasożytów w medycynie weterynaryjnej. W analizach tych przedstawiono właściwości chemiczne, farmakologiczne i toksykologiczne głównych przedstawicieli tej grupy (fluralaner, afoxolaner, sarolaner, lotilaner), ze szczególnym uwzględnieniem ich mechanizmu działania polegającego na hamowaniu kanałów chlorkowych zależnych od GABA i glutaminianu u stawonogów. Omówiono również ich charakterystyczne właściwości farmakokinetyczne, takie jak duża objętość dystrybucji, silne wiązanie z białkami osocza oraz długi okres półtrwania, które warunkują wysoką skuteczność kliniczną, ale mogą sprzyjać kumulacji i występowaniu opóźnionych działań niepożądanych.

Zwrócono uwagę, że mimo szerokiego marginesu bezpieczeństwa potwierdzonego w badaniach kontrolowanych, dane z nadzoru porejestacyjnego wskazują na rzadkie przypadki działań niepożądanych o charakterze neurologicznym, zwłaszcza u zwierząt predysponowanych, m.in. z zaburzeniami funkcji transporterów błonowych. W opracowaniu uwzględniono także aspekty

związane z bezpieczeństwem żywności oraz potencjalnym wpływem na środowisko, podkreślając konieczność dalszego monitorowania pozostałości oraz oceny ryzyka ekotoksykologicznego.

Przeprowadzone analizy literaturowe wykazały, że izoksazoliny stanowią skuteczną, lecz złożoną grupę leków, których bezpieczne stosowanie wymaga uwzględnienia zarówno aspektów farmakologicznych, jak i toksykologicznych oraz środowiskowych.

Wyniki niniejszej pracy zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Markowska-Buńka P., Rasiński B., Ziółkowski H. *Pharmacology and toxicology of veterinary isoxazolines: a review*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. **2026**, 31:100645.

IF=3,4; MNiSW=100

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji, której byłem autorem korespondencyjnym polegał na znaczącym udziale w opracowaniu koncepcji pracy, gromadzeniu i opracowaniu danych, pomocy w przeprowadzeniu analizy, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 1. 5. Badania nad farmakokinetyką kandydatów na leki oraz nowych postaci farmaceutycznych leków w testach przedklinicznych

CPL207280 – kandydat na lek przeciwcukrzycowy (agonista GPR40)

W toku mojej działalności naukowej nawiązałem również współpracę z sektorem prywatnym, w ramach której uczestniczyłem w projektach badawczych (punkt 7.1) dotyczących oceny farmakokinetyki oraz bezpieczeństwa potencjalnych kandydatów na leki. Dwa z tych projektów zaowocowały publikacjami naukowymi.

Pierwsze z badań dotyczyło charakterystyki nowego kandydata na lek przeciwko cukrzycy typu II – związku CPL207280, będącego agonistą receptora GPR40 (FFAR1). Receptor ten, należący do receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) dla długo- i średniołańcuchowych wolnych kwasów tłuszczowych, zlokalizowany jest w błonach komórek β wysp Langerhansa trzustki. Jego aktywacja nasila zależne od glukozy wydzielanie insuliny, co może umożliwiać skuteczną kontrolę glikemii przy jednoczesnym ograniczeniu ryzyka epizodów hipoglikemii obserwowanych w przypadku stosowania pochodnych sulfonilomocznika.

CPL207280 wykazywał działanie przeciwcukrzycowe w modelach zwierzęcych cukrzycy, w tym u szczurów Zucker Diabetic Fatty, szczurów Goto Kakizaki oraz myszy db/db. W przeprowadzonych badaniach oceniano potencjalną hepatotoksyczność tego związku, porównując ją z toksycznością TAK-875 – najbardziej zaawansowanego w badaniach agonisty receptora GPR40. Analizy obejmowały badania *in vitro* dotyczące hamowania transporterów kwasów żółciowych, funkcji mitochondriów oraz profilowania metabolicznego w hepatocytach różnych gatunków, a także badania toksyczności przewlekłej prowadzone *in vivo* u szczurów i małp.

Uzyskane wyniki wskazały, że CPL207280 w znacznie mniejszym stopniu niż TAK-875 hamuje transportery kwasów żółciowych oraz nie wykazuje istotnego wpływu na funkcję mitochondriów wątrobowych. W przeciwieństwie do TAK-875, metabolizowanego poprzez potencjalnie toksyczną glukuronidację, CPL207280 ulegał głównie przemianom oksydacyjnym. W badaniach *in vivo* nie stwierdzono również szkodliwego wpływu tego związku na wątrobę u zwierząt poddawanych długotrwałemu leczeniu. Ponadto uzyskane wyniki wskazują, że hepatotoksyczność obserwowana w przypadku niektórych agonistów GPR40 nie stanowi cechy charakterystycznej całej

tej klasy związków, lecz może wynikać z właściwości poszczególnych cząsteczek. W tym kontekście CPL207280 jawi się jako obiecujący kandydat na lek przeciwcukrzycowy o korzystnym profilu bezpieczeństwa w modelach zwierzęcych.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Bazydło-Guzenda K., Buda P., Mach M., Pieczykolan J., Kozłowska I., Janiszewski M., Drzazga E., Dominowski J., **Ziolkowski H.**, Wieczorek M., Gad S.C. *Evaluation of the hepatotoxicity of the novel GPR40 (FFAR1) agonist CPL207280 in the rat and monkey*. PLoS One, **2021**, 16:e0257477.

IF=3,752; MEiN=100

Esketamina – innowacyjna inhalacyjna postać farmaceutyczna

Drugie z badań realizowanych we współpracy z sektorem prywatnym dotyczyło opracowania nowej postaci farmaceutycznej enancjomeru ketaminy – esketaminy – będącej obiecującym kandydatem w terapii depresji odpornej na leczenie. Ketamina oraz jej enancjomer esketamina wzbudziły w ostatnich latach duże zainteresowanie jako szybko działające leki przeciwdepresyjne. Ze względu jednak na intensywny metabolizm w trakcie pierwszego przejścia uzyskanie odpowiedniej ekspozycji ogólnoustrojowej wymaga zastosowania alternatywnych, pozajelitowych dróg podania.

W prezentowanych badaniach zaproponowano nową drogę podania esketaminy w postaci suchego proszku do inhalacji. Przeprowadzono kompleksową ocenę tej postaci leku obejmującą analizę farmakokinetyki, farmakodynamiki, toksykologii oraz bezpieczeństwa stosowania. Badania dotyczyły m.in. porównania farmakokinetyki inhalacyjnej esketaminy z racematem ketaminy, oceny bezwzględnej biodostępności esketaminy po podaniu inhalacyjnym i dotchawiczym, analizy efektów farmakodynamicznych w homogenatach mózgu szczura oraz oceny bezpieczeństwa w badaniach toksykologicznych prowadzonych zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.

Opracowana postać esketaminy wykazywała korzystny profil farmakokinetyczny, charakteryzujący się wysoką biodostępnością (około 62%) oraz stosunkowo niskimi wartościami stężenia maksymalnego. Stwierdzono również efektywną penetrację związku przez barierę krew–mózg. W badaniach farmakodynamicznych nie obserwowano istotnych zmian w fosforylacji ani ekspresji analizowanych białek w homogenatach mózgu szczura.

Przeprowadzone badania toksykologiczne obejmujące 14- i 28-dniowe podawanie inhalacyjne u szczurów i psów pozwoliły określić maksymalne dawki dobowe odpowiednio na poziomie 46,5 mg/kg i 36,5 mg/kg. Wdychana esketamina wykazywała oczekiwany profil bezpieczeństwa zgodny z jej działaniem farmakologicznym, a obserwowane efekty miały charakter przejściowy i nie były istotne toksykologicznie. Uzyskane wyniki wskazują, że inhalacyjna postać esketaminy umożliwia uzyskanie odpowiedniej ekspozycji ogólnoustrojowej przy niższych maksymalnych stężeniach, co może ograniczać działania niepożądane. Rozwijana forma podania może zatem stanowić obiecującą alternatywę dla dotychczas stosowanych sposobów dostarczania tego leku.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Matłoka M., Janowska S., Gajos-Draus A., **Ziolkowski H.**, Janicka M., Perko P., Kisło K., Pankiewicz P., Moszczyński-Pętkowski R., Mach M., Dera P., Abramski K., Teska-Kamińska M., Tratkiewicz E., Wieczorek M., Pieczykolan J. *Esketamine inhaled as dry powder: Pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety assessment in a preclinical study*. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, **2022**, 73–74:102127.

IF=3,282; MEiN=70

Mój wkład w powstanie powyższych publikacji obejmował przeprowadzenie obliczeń farmakokinetycznych, interpretację uzyskanych wyników oraz udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 1. 6. Badania nad farmakokinetyką pozostałych/wybranych leków

Simwastatyna – farmakokinetyka u indyków

Jednym z badań obejmujących farmakokinetykę wybranych leków była ocena farmakokinetyki simwastatyny u indyków. Simwastatyna jest przedstawicielem statyn powszechnie stosowanych w medycynie ludzkiej w leczeniu hipercholesterolemii, gdzie jej działanie polega na hamowaniu reduktazy HMG-CoA – kluczowego enzymu szlaku syntezy cholesterolu. Doniesienia literaturowe wskazują również na możliwość wykorzystania simwastatyny w produkcji drobiarskiej, zwłaszcza w kontekście obniżania zawartości cholesterolu w jajach kurzych, co czyni ją potencjalnym dodatkiem paszowym ukierunkowanym na poprawę jakości żywności pochodzenia zwierzęcego. Pomimo rosnącego zainteresowania tym zagadnieniem, dane dotyczące farmakokinetyki simwastatyny u ptaków pozostawały dotychczas ograniczone.

W przeprowadzonym badaniu oceniono farmakokinetykę simwastatyny po jednorazowym, doustnym podaniu leku indykom w wieku sześciu tygodni w dawce 2 mg/kg masy ciała. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że średnie maksymalne stężenie simwastatyny w osoczu wynosiło 0,49 ng/ml, a czas jego osiągnięcia około 1,6 godziny. Ekspozycja ogólnoustrojowa, wyrażona jako pole pod krzywą stężenie–czas była niska, natomiast biologiczny okres półtrwania w fazie eliminacji oszacowano na około 2 godziny.

Porównanie uzyskanych parametrów farmakokinetycznych z danymi dostępnymi dla ssaków, w tym ludzi i świń, wykazało istotnie niższe wartości u indyków, pomimo zastosowania relatywnie wyższej dawki leku. Wyniki te wskazują na ograniczoną biodostępność simwastatyny u ptaków, która może wynikać z nasilonego efektu pierwszego przejścia w wątrobie lub ograniczonego wchłaniania z przewodu pokarmowego. Uzyskane dane sugerują, że skuteczne obniżenie zawartości cholesterolu w produktach drobiowych z wykorzystaniem simwastatyny mogłoby wymagać stosowania dawek wyższych niż te wykorzystywane w medycynie ludzkiej. Jednocześnie wskazuje to na potrzebę dalszych badań nad bezpieczeństwem, skutecznością oraz farmakokinetyką statyn u ptaków przed ich ewentualnym zastosowaniem w praktyce produkcyjnej.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Jasiecka A., Grabowski T., Maślanka T., **Ziółkowski H.**, Jaroszewski J.J. *Pharmacokinetics of orally administered simvastatin in turkeys*. Polish Journal of Veterinary Sciences, **2013**, 16: 377–379.

IF=0,712; MNiSW=20

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na udziale w przeprowadzeniu obliczeń farmakokinetycznych oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Agomelatyna – farmakokinetyka u psów

Kolejnym badaniem z zakresu farmakokinetyki wybranych leków była ocena farmakokinetyki agomelatyny z uwzględnieniem jej potencjalnego zastosowania u psów. Agomelatyna jest melatonergicznym lekiem przeciwdepresyjnym stosowanym w medycynie ludzkiej, wyróżniającym

się niemonoaminergicznym mechanizmem działania oraz zdolnością do resynchronizacji rytmów dobowych. Pomimo szerokiego zastosowania tego leku w terapii depresji u ludzi, dane dotyczące jego farmakokinetyki u psów pozostają bardzo ograniczone.

Celem badania była ocena profilu stężenia agomelatyny w osoczu psów po podaniu pojedynczej dawki doustnej zarówno na czczo, jak i po posiłku, oraz wstępna analiza wpływu pokarmu na wybrane parametry farmakokinetyczne. Badanie przeprowadzono u zdrowych psów w schemacie krzyżowym, a stężenia agomelatyny w osoczu oznaczano z wykorzystaniem zwalidowanej metody LC-MS/MS.

Uzyskane profile farmakokinetyczne charakteryzowały się bardzo dużą zmiennością międzysobniczą w obu warunkach podania. W przypadku podania na czczo obserwowano wyższe wartości maksymalnego stężenia w osoczu oraz większą ekspozycję ogólnoustrojową w porównaniu z podaniem po posiłku, któremu towarzyszyło także opóźnienie czasu osiągnięcia maksymalnego stężenia. Ze względu na niewielką liczebność badanej grupy oraz znaczną zmienność wyników nie było jednak możliwe przeprowadzenie wiarygodnej analizy statystycznej wpływu pokarmu. Uzyskane wyniki wskazują na istotną zmienność ekspozycji ogólnoustrojowej na agomelatynę u psów, co uniemożliwia jednoznaczną ocenę wpływu pokarmu na jej farmakokinetykę. Pomimo uzyskiwania stężeń wyższych niż osiągane u ludzi przy stosowaniu dawek terapeutycznych, obecnie nie można rekomendować stosowania agomelatyny w terapii off-label u psów. Konieczne są dalsze badania obejmujące większą liczbę zwierząt oraz analizę czynników odpowiedzialnych za obserwowaną zmienność.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Łebkowska-Wieruszewska B., Ziółkowski H., Sartini I., Lisowski A., Kowalski C.J., Poapolathep A., Giorgi M. *Agomelatine: A novel melatonergic antidepressant. Method validation and first exploratory pharmacokinetic study in fasted and fed dogs*. Research in Veterinary Science, **2021**, 139:140–144.

IF=2,554; MEiN=100

Mój wkład w powstanie niniejszych publikacji polegał na opracowaniu metody analitycznej, wykonania oznaczeń instrumentalnych oraz prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

Pranobeks inozyny – farmakokinetyka u świń

Jednym z badań z zakresu farmakokinetyki wybranych leków była analiza farmakokinetyki pranobeksu inozyny u świń, poprzedzona opracowaniem i walidacją metody analitycznej umożliwiającej oznaczanie jego głównego składnika – kwasu 4-acetamidobenzoowego. Opracowana metoda została następnie wykorzystana w pilotażowym badaniu farmakokinetycznym tej substancji po podaniu doustnym.

Analizy prowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS). Przygotowanie próbek biologicznych oparto na jednoetapowej ekstrakcji ciecz–ciecz połączonej z wytrącaniem białek przy użyciu acetonitrylu, a jako wzorzec wewnętrzny zastosowano deuterowany kwas 4-acetamidobenzoowy. Walidacja wykazała, że opracowana metoda jest liniowa w szerokim zakresie stężeń ($r^2 \geq 0,99$), precyzyjna i dokładna oraz charakteryzuje się wysoką selektywnością i czułością. Dzięki prostej procedurze przygotowania próbek metoda może być stosowana w rutynowych analizach farmakokinetycznych.

W badaniu farmakokinetycznym pranobeks inozyny podawano świniom w warunkach fermowych z wodą do picia w kilku dawkach. Uzyskane wyniki wskazały, że kwas 4-acetamidobenzoowy jest szybko wchłaniany i eliminowany z organizmu świń, a okres półtrwania w fazie eliminacji był krótki. Zaobserwowano również wykładniczy wzrost stopnia wchłaniania wraz ze zwiększaniem dawki, co sugeruje nieliniowy charakter absorpcji badanej substancji.

Wyniki tych badań zostały opisane w niniejszej pracy:

- ❖ Markowska P., Procajło Z., Wolska J., Jaroszewski J.J., Ziółkowski H. *Development, Validation, and Application of the LC-MS/MS Method for Determination of 4-Acetamidobenzoic Acid in Pharmacokinetic Pilot Studies in Pigs*. *Molecules*, **2021**, 26:4437.

IF=4,927; MEiN=100

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji, której byłem autorem korespondencyjnym, polegał na istotnym współudziale w opracowaniu projektu badania, opracowaniu metody analitycznej, wykonaniu oznaczeń instrumentalnych oraz analiz farmakokinetycznych jak również wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 2. Badania z zakresu immunologii i immunofarmakologii

Drugim obszarem prowadzonych przeze mnie badań są zagadnienia z zakresu immunofarmakologii, ze szczególnym uwzględnieniem komórek regulatorowych oraz subpopulacji limfocytów w modelach zwierzęcych. Badania te obejmują zarówno mechanizmy modulacji odpowiedzi immunologicznej przez mediatory zapalne (m.in. prostaglandyny), jak i charakterystykę fenotypową oraz funkcjonalną limfocytów T i komórek NK w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Prace z tego zakresu mają charakter eksperymentalny i koncentrują się na analizie mechanizmów regulacyjnych układu odpornościowego w modelach zwierzęcych.

4. 4. 2. 3. Badania nad regulacją funkcji limfocytów T, komórek NK oraz wybranych mechanizmów odporności u bydła

Prace przedstawione w niniejszym podrozdziale koncentrują się na mechanizmach regulacji odpowiedzi immunologicznej u bydła, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji limfocytów T, komórek NK oraz wybranych elementów nieswoistej odporności komórkowej i humoralnej. Badania te obejmowały zarówno charakterystykę fenotypową i funkcjonalną wybranych subpopulacji limfocytów, jak i analizę wpływu czynników farmakologicznych oraz mediatorów zapalnych na aktywność komórek układu odpornościowego. Uzyskane wyniki pozwoliły na lepsze zrozumienie mechanizmów modulujących odpowiedź immunologiczną u bydła w warunkach fizjologicznych oraz w przebiegu reakcji zapalnej.

Limfocyty $T\gamma\delta$ WC1⁺ – charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna

Pierwsze z badań dotyczyło charakterystyki fenotypowej oraz czynnościowej limfocytów T WC1⁺ bydła, należących do populacji limfocytów $T\gamma\delta$, które w układzie odpornościowym przeżywacze mogą pełnić zarówno funkcje efektorowe, jak i regulatorowe. Celem pracy było określenie, czy produkcja cytokin o odmiennym znaczeniu funkcjonalnym – interferonu γ (IFN- γ), związanego z odpowiedzią efektorową, oraz interleukiny 10 (IL-10), kojarzonej z aktywnością regulatorową – zachodzi w obrębie tych samych komórek WC1⁺, czy też jest właściwością odrębnych subpopulacji limfocytów. Dodatkowo analizowano związek pomiędzy ekspresją cząsteczki CD25,

stanowiącej łańcuch α receptora dla interleukiny 2, a zdolnością limfocytów WC1⁺ do produkcji cytokin regulatorowych.

Badania przeprowadzono na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) uzyskanych od jałówek w wieku około 12 miesięcy. Wykazano, że niewielki odsetek limfocytów WC1⁺ wykazuje konstytutywną ekspresję cząsteczki CD25, przy czym w obrębie tej populacji można wyróżnić komórki o wysokiej oraz niskiej ekspresji tego receptora. Analiza produkcji cytokin po stymulacji komórek wykazała, że zarówno w subpopulacji CD25⁻WC1⁺, jak i CD25⁺WC1⁺ komórki produkujące IFN- γ oraz IL-10 stanowiły w dominującej mierze odrębne subpopulacje, a jednoczesna produkcja obu cytokin występowała jedynie w niewielkim odsetku komórek.

W dalszej analizie stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy obecnością cząsteczki CD25 na limfocytach WC1⁺ a zdolnością tych komórek do produkcji cytokin o charakterze regulatorowym, w szczególności IL-10 oraz transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β). Nie obserwowano natomiast zależności pomiędzy ekspresją CD25 a produkcją IFN- γ . Uzyskane wyniki wskazują, że w populacji limfocytów WC1⁺ bydlą można wyróżnić subpopulacje o odmiennym profilu funkcjonalnym, a komórki o fenotypie CD25⁺WC1⁺ wykazują cechy bardziej zbliżone do komórek regulatorowych niż komórki CD25⁻WC1⁺.

Wyniki tych badań zostały opisane w następującej publikacji:

- ❖ Maślanka T., Jaroszewski J., Markiewicz W., Ziółkowski H., Barski D. *The presence of CD25 on bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells is positively correlated with their production of IL-10 and TGF- β , but not IFN- γ .* Polish Journal of Veterinary Sciences, **2012**, 15:11–20.

IF=0,570; MNiSW=20

Deksametazon i meloksykam – wpływ na limfocyty CD8⁺ bydlą

Kolejne badania dotyczyły oceny wpływu wybranych leków przeciwzapalnych na subpopulacje limfocytów T CD8⁺ bydlą oraz na wybrane parametry funkcjonalne tych komórek. Przedmiotem badań był deksametaz – glikokortykosteroid o silnym działaniu przeciwzapalnym i immunosupresyjnym – oraz meloksykam, niesteroidowy lek przeciwzapalny będący preferencyjnym inhibitorem cyklooksygenazy-2.

Badania przeprowadzono w warunkach *in vitro* przy użyciu komórek jednojądrzastych krwi obwodowej bydlą. Wykazano, że deksametazon indukował szybko pojawiający się i utrzymujący się ubytek limfocytów T o fenotypie CD25⁻CD8⁺. Zjawisko to było przede wszystkim wynikiem proapoptotycznego działania deksametazonu wobec tej subpopulacji komórek, a w dalszej fazie także jego działania antyproliferacyjnego. Jednocześnie obserwowano przejściowe zwiększenie względnej oraz bezwzględnej liczby komórek CD25^{high}CD8⁺ oraz CD25^{low}CD8⁺. Analiza mechanizmów odpowiedzialnych za ten efekt wskazała, że nie był on następstwem zwiększonej proliferacji komórek, lecz wynikał przynajmniej częściowo z antyapoptotycznego działania deksametazonu wobec tych subpopulacji limfocytów.

Ponadto stwierdzono, że deksametazon prowadził do upośledzenia produkcji interferonu γ przez limfocyty T CD8⁺. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno indukcja ubytku limfocytów T CD8⁺, jak i zahamowanie produkcji IFN- γ mogą odgrywać istotną rolę w mechanizmie przeciwzapalnego i immunosupresyjnego działania deksametazonu u bydlą. W badaniach tych nie stwierdzono natomiast, aby obserwowane efekty były związane ze zwiększeniem ekspresji czynnika

transkrypcyjnego Foxp3 oraz ze wzrostem produkcji cytokin regulatorowych IL-10 i TGF- β przez limfocyty T CD8⁺.

W przeciwieństwie do deksametazonu, meloksykam nie wykazywał istotnego wpływu na analizowane parametry limfocytów T CD8⁺. Nie obserwowano zmian ani w odsetku, ani w liczbie bezwzględnej, a także w zakresie proliferacji, apoptozy, ekspresji Foxp3 czy produkcji IFN- γ , IL-10 i TGF- β .

Wyniki tych badań zostały opisane w następującej publikacji:

- ❖ Maślanka T., Jaroszewski J., Markiewicz W., Jasińska A., Ziółkowski H., Jędrzkiewicz D. *Effects of dexamethasone and meloxicam on bovine CD25⁺CD8⁺ and CD25⁺CD8⁺ T cells – in vitro study*. Research in Veterinary Science, **2013**, 94: 662–674.

IF=1,511; MNiSW=35

Prostaglandyna E₂ – wpływ na funkcję limfocytów T i komórek NK

Kolejne badania dotyczyły wpływu prostaglandyny E₂ (PGE₂), ważnego mediatora reakcji zapalnej, na funkcję komórek efektorowych układu odpornościowego bydła. PGE₂ wykazuje wielokierunkowe działanie immunomodulujące, a jej efekty biologiczne są zależne od aktywacji specyficznych receptorów z rodziny EP. Celem przeprowadzonych badań było określenie, w jaki sposób PGE₂ wpływa na aktywację i funkcję wybranych populacji limfocytów bydła, w szczególności limfocytów T oraz komórek NK.

W pierwszym etapie badań analizowano wpływ PGE₂ na ekspresję cząsteczki CD25, stanowiącej łańcuch α receptora dla interleukiny 2, na powierzchni limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz WC1⁺. Wykazano, że PGE₂ prowadzi do obniżenia ekspresji CD25 na analizowanych subpopulacjach limfocytów T. Efekt ten był znoszony przez selektywną blokadę receptora EP4, natomiast nie obserwowano jego zahamowania po blokowaniu innych receptorów EP. Wyniki te wskazują, że PGE₂ reguluje w dół ekspresję CD25 na limfocytach T bydła głównie za pośrednictwem receptora EP4.

W kolejnym etapie badań oceniano wpływ PGE₂ na funkcję komórek NK, które odgrywają kluczową rolę w odporności wrodzonej poprzez cytotoksyczność oraz produkcję interferonu γ . Wykazano, że długotrwała ekspozycja komórek na PGE₂ prowadzi do zwiększenia odsetka komórek NK ulegających apoptozie oraz do zmniejszenia ich liczebności. Jednocześnie stwierdzono, że PGE₂ hamuje proliferację komórek NK, a efekt ten jest zależny od aktywacji receptora EP4, ponieważ jego selektywna blokada znosiła obserwowane działanie antyproliferacyjne.

Uzyskane wyniki wskazują, że PGE₂ może odgrywać istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej bydła poprzez modulowanie aktywacji limfocytów T oraz funkcji komórek NK. Mechanizmy te mogą mieć szczególne znaczenie w przebiegu reakcji zapalnych, w których zwiększone stężenie PGE₂ może prowadzić do ograniczenia aktywności komórek efektorowych układu odpornościowego.

Wyniki tych badań zostały opisane w następujących publikacjach:

- ❖ Maślanka T., Spodniewska A., Barski D., Jasińska A., Zuśka-Prot M., Ziółkowski H., Markiewicz W., Jaroszewski J.J. *Prostaglandin E₂ down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor*. Veterinary Immunology and Immunopathology, **2014**, 160: 192–200.

IF=1,535; MNiSW=25

- ❖ Maślanka T., Chrostowska M., Otrocka-Domagała I., Snarska A., Mikiiewicz M., Zuśka-Prot M., Jasiecka A., **Ziółkowski H.**, Markiewicz W., Jaroszewski J. *Prostaglandin E₂ exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells*. Research in Veterinary Science, **2016**, 107: 80–87.
IF=1,298; MNiSW=30
- ❖ Przybysz J., Chrostowska M., **Ziółkowski H.**, Jaroszewski J., Maślanka T. *The influence of prostaglandin E₂ on the production of IFN- γ by bovine CD4⁺, CD8⁺ and WC1⁺ T cells*. Research in Veterinary Science, **2016**, 105: 31–35.
IF=1,298; MNiSW=35

Mój wkład w powstanie powyższych publikacji polegał na udziale w wykonaniu eksperymentów, analizie cytometrycznej oraz w analizie wyników.

Meloksykam – wpływ na nieswoiste mechanizmy odporności u bydła

W kolejnych badaniach oceniano wpływ meloksykamu, niesterydowego leku przeciwzapalnego, na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła. Badania przeprowadzono na dojrzałych jałówkach podzielonych na dwie grupy: doświadczalną, której jednorazowo podano meloksykam dożylnie w dawce 0,5 mg/kg masy ciała, oraz kontrolną, otrzymującą płyn fizjologiczny. Krew pobierano przed podaniem preparatu oraz w 5., 10. i 15. dniu po iniekcji.

W badaniach oceniano wybrane wskaźniki nieswoistej odporności humoralnej, obejmujące aktywność lizozymu oraz poziom białka całkowitego, gammaglobulin i ceruloplazminy, a także parametry nieswoistej odporności komórkowej. W tej części analizowano aktywność metaboliczną fagocytów określaną jako respiratory burst activity (RBA), zdolność wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów przez komórki żerne (PKA) oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów stymulowanych mitogenami.

Uzyskane wyniki wskazały na istotne zmiany w funkcjonowaniu nieswoistych mechanizmów odporności po podaniu meloksykamu. Obserwowano wyraźny spadek poziomu gammaglobulin oraz aktywności lizozymu już od piątego dnia po podaniu leku. Jednocześnie odnotowano przejściowy wzrost poziomu ceruloplazminy, natomiast poziom białka całkowitego nie ulegał istotnym zmianom. W zakresie odporności komórkowej stwierdzono wyraźne obniżenie aktywności metabolicznej fagocytów, zdolności wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów oraz proliferacji limfocytów, utrzymujące się do końca okresu obserwacji.

Wyniki te wskazują, że stosowanie meloksykamu może modulować nieswoiste mechanizmy obronne organizmu, co w określonych warunkach może wpływać na podatność zwierząt na zakażenia oraz kształtowanie się odpowiedzi poszczepiennej.

Wyniki tych badań zostały opisane w następującej publikacji:

- ❖ Markiewicz W., Wójcik R., Małaczewska J., **Ziółkowski H.**, Jaroszewski J., Siwicki A.K. *Influence of meloxicam on cellular and humoral defense mechanisms during the luteal phase of the estrous cycle in cattle*. Medycyna Weterynaryjna, **2011**, 67: 433–504.
MNiSW=10

Mój wkład w powstanie w/w publikacji polegał na zebraniu i przygotowaniu materiału do badania, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 2. 2. Badania nad podwójnie pozytywnymi limfocytami T CD4⁺CD8⁺ w patogenezie astmy

Badania te dotyczyły roli podwójnie pozytywnych limfocytów T CD4⁺CD8⁺ (tzw. komórek DP – double positive cells) w przebiegu alergicznego zapalenia dróg oddechowych. Przeprowadzono je z wykorzystaniem mysiego modelu astmy alergicznej indukowanej ovalbuminą (OVA), w którym analizowano rozmieszczenie oraz bezwzględną liczebność tych komórek w różnych kompartmentach układu odpornościowego.

W badaniu oceniano liczbę limfocytów T CD4⁺CD8⁺ w płucach, węzłach chłonnych śródpiersiowych (MLNs), węzłach chłonnych głowy i szyi (HNLNs) oraz we krwi obwodowej myszy zdrowych i zwierząt z indukowaną astmą. Analizy prowadzono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej po wcześniejszej izolacji komórek z badanych tkanek oraz oznaczeniu ich liczby bezwzględnej.

Uzyskane wyniki wykazały istotny wzrost liczby limfocytów T CD4⁺CD8⁺ w płucach oraz w MLNs myszy z astmą alergiczną w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi. Jednocześnie stwierdzono zmniejszenie liczby tych komórek w HNLNs oraz we krwi obwodowej. Obserwowane zmiany wskazują, że w przebiegu reakcji alergicznej może dochodzić do proliferacji komórek DP w MLNs oraz ich rekrutacji do tkanki płucnej, będącej miejscem toczącego się procesu zapalnego.

Uzyskane wyniki sugerują, że podwójnie pozytywne limfocyty T CD4⁺CD8⁺ mogą uczestniczyć w mechanizmach odpowiedzialnych za patogenezę astmy alergicznej, jednak dokładna rola tych komórek w rozwoju choroby wymaga dalszych badań.

Wyniki tych badań zostały opisane w następującej publikacji:

- ❖ Zuśka-Prot M., Ziółkowski H., Jaroszewski J., Maślanka T. Distribution of CD4⁺CD8⁺ double positive T cells in a mouse model of allergic asthma. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2016, 19: 217–219.

IF=0,697; MNiSW=20

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na udziale w wykonaniu eksperymentów, analizie cytometrycznej oraz analizie wyników.

4. 4. 3. Badania nad funkcjonowaniem i zaburzeniami gałki ocznej

Trzeci obszar obejmuje badania nad funkcjonowaniem i zaburzeniami gałki ocznej. Zakres tych badań obejmuje zarówno analizy immunohistochemiczne, jak i zagadnienia związane z fizjologią narządu wzroku, w tym dobowe zmiany ciśnienia śródgałkowego. Część prowadzonych prac pozostaje powiązana z problematyką immunofarmakologiczną, zwłaszcza w zakresie charakterystyki komórek układu odpornościowego obecnych w strukturach oka oraz ich udziału w procesach zapalnych. Badania te stanowią rozwinięcie wcześniejszych zainteresowań immunologicznych w odniesieniu do narządu o szczególnych właściwościach immunologicznych.

4. 4. 3. 1. Badania nad zasiedlaniem komór oka przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺

Pierwsze badania z tego cyklu były prowadzone na myszach, a ich wyniki sugerują, że u tego gatunku komory oka, jako strefa efektorowa odpowiedzi immunologicznej, stanowią element normalnego szlaku migracyjnego naiwnych limfocytów T CD8⁺, przy czym większość tych komórek, w przeciwieństwie do ich odpowiedników obecnych we krwi, wykazuje niską ekspresję cząsteczki CD8. Przeprowadzone badania ujawniły jedynie śladowy udział limfocytów T CD4⁺ w populacji limfocytarnej komór oka myszy, gdyż ich średni odsetek wynosił zaledwie 0,56. Z badań wynika, że

taki selektywny sposób zasiedlania komór oka przez limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$ może być zaangażowany w utrzymanie statusu immunologicznego uprzywilejowania oka.

Kolejne badania z tego obszaru prowadzono u bydła i świń, u których stwierdzono, że w komorach ich oczu występują limfocyty T o fenotypach $CD4^+CD8^-$, $CD4^+CD8^+$ oraz $CD4^+CD8^+$ (DP), chociaż ich liczebność bezwzględna była bardzo mała. Przeprowadzone badania wykazały, że pod względem udziału odsetkowego limfocytów T $CD4^+$, populacja limfocytna komór oka bydła nie różni się istotnie od tej obserwowanej we krwi obwodowej. Z kolei w przypadku limfocytów T $CD8^+$ udział tych komórek w populacji limfocytniej komór oka był mniejszy w porównaniu z analogiczną populacją we krwi. Komory oka bydła okazały się natomiast szczególne pod względem obecności komórek DP, gdyż ich udział w populacji limfocytniej występującej w tym miejscu był około pięciokrotnie większy niż we krwi, przy czym większość tych komórek wykazywała niską ekspresję zarówno cząsteczki CD4, jak i CD8.

W przypadku świń stwierdzono, że – podobnie jak u myszy – udział odsetkowy limfocytów T $CD4^+$ w populacji limfocytniej komór oka był bardzo mały. Pod względem udziału odsetkowego w populacji limfocytniej limfocyty T $CD8^+$ komór oka świni nie różniły się od adekwatnego parametru obserwowanego we krwi obwodowej. Wiadomo również, że populacja limfocytna świń, w przeciwieństwie do innych gatunków zwierząt oraz człowieka, zawiera bardzo duży udział komórek DP. Na terenie komór oka świni stwierdzono także obecność znaczącej populacji tych komórek, jednak różniły się one istotnie pod względem gęstości cząsteczek CD4 i CD8: we krwi obwodowej dominowały komórki DP z wysoką ekspresją CD4, natomiast w komorach oka przeważały komórki z wysoką ekspresją CD8. Wyniki te wskazują, że komory oka bydła i świni stanowią element w procesie fizjologicznej migracji limfocytów T $CD4^+CD8^-$, $CD4^+CD8^+$ oraz $CD4^+CD8^+$ w organizmie. Wskazuje to również, że udział tych subpopulacji w populacji limfocytniej komór oka może się znacząco różnić pomiędzy różnymi gatunkami zwierząt.

Ostatnie badania z tego obszaru dotyczyły obecności limfocytów T w komorach oka psów zdrowych oraz psów z zaćmą; dodatkową grupę referencyjną stanowiły psy z zapaleniem naczyń. W badaniach tych celem było między innymi ustalenie, czy zaćmie towarzyszą zmiany w zakresie zasiedlania komór oka przez limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$, a więc czy procesowi temu towarzyszy odpowiedź immunologiczna ze strony limfocytów T. Badania prowadzono w oparciu o próbki cieczy wodnistej pobieranej w trakcie operacji wewnątrzgałkowych (głównie podczas operacji zaćmy) lub z oczu psów poddawanych eutanazji z przyczyn innych niż choroby oczu. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują między innymi, że: 1) limfocyty T $CD4^+$ i $CD8^+$ znajdują się w komorze oka zdrowych psów, jednak jedynie w ilościach śladowych; 2) rozwój zaćmy może nie być procesem immunologicznie obojętnym, lecz może być powiązany z rekrutacją limfocytów T $CD8^+$ do komór oka.

Wyniki tych badań zostały opisane w następujących publikacjach:

- ❖ Maślanka T., Ziółkowska N., Ziółkowski H., Małaczewska J. *CD25+CD127+Foxp3- Cells Represent a Major Subpopulation of CD8+ T Cells in the Eye Chambers of Normal Mice.* PLoS One, 2017, 12:e0170021
IF=2,806; MNiSW=100

- ❖ Maślanka T., Socha P., Ziółkowska N., Dąbrowski M., Małaczewska J., **Ziółkowski H.**, *CD4- and CD8-expressing cells found in the bovine and porcine anterior chamber of the eye*. Polish Journal of Veterinary Sciences, **2018**, 21: 293–298.

IF=0,839; MNiSW=40

- ❖ Maślanka T., **Ziółkowski H.**, Garncarz J., Ziółkowska N. *CD4- and CD8-expressing cells in the chambers of normal, cataract and uveitic eyes: A comparative study in dogs*. Research in Veterinary Science, **2020**, 132:393–399.

IF=2,534; MNiSW=100

Mój wkład w powstanie niniejszych publikacji polegał na zebraniu i przygotowaniu materiału do badań, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 3. 2. Badania nad charakterystyką zapalenia struktur oka u kotów z FIP

Zakaźne zapalenie otrzewnej kotów (FIP) jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności młodych kotów, a mimo wieloletnich badań patogeniza tej choroby nie została w pełni wyjaśniona. Celem przeprowadzonych badań była szczegółowa charakterystyka zmian histopatologicznych i immunohistochemicznych w strukturach gałki ocznej kotów z FIP, ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju, nasilenia oraz składu komórkowego odczynu zapalnego.

Do badań wykorzystano gałki oczne pobrane od 15 kotów różnych ras, w wieku od 8 miesięcy do 3 lat, z zaawansowanymi objawami klinicznymi FIP, które z powodu bardzo złego stanu ogólnego zostały poddane eutanazji i badaniu sekcijnemu. Materiał okulistyczny oceniano histologicznie po barwieniu hematoksyliną i eozyną oraz immunohistochemicznie, stosując przeciwciała skierowane przeciwko markerom limfocytów T (CD3), limfocytów B (CD79a), makrofagów (MAC387), komórek glejowych (GFAP), proliferacji komórkowej (PCNA) oraz antygenom koronawirusa kotów (FCoV). Nasilenie zapalenia określano na podstawie liczby komórek zapalnych, stosując pięciostopniowy system oceny.

Przeprowadzone badania wykazały, że niezależnie od postaci klinicznej FIP zapalenie było obecne u wszystkich kotów w wielu strukturach gałki ocznej, w tym w tęczówce, ciele rzęskowym, naczyniówce, siatkówce, twardówce i spojówce, a u części zwierząt także w nerwie wzrokowym oraz rogówce. W dwóch przypadkach stwierdzono zapalenie ziarniniakowe w obrębie ciała rzęskowego. Analiza składu komórkowego nacieku zapalnego wykazała, że w zmianach o największym nasileniu dominowały limfocyty B oraz plazmocyty, co wskazuje na przewlekły charakter procesu zapalnego oraz istotny udział odpowiedzi humoralnej. Liczba makrofagów zwiększała się wyraźnie dopiero w przypadkach znacznego uszkodzenia naczyń krwionośnych. Antygeny FCoV wykryto w makrofagach jedynie u trzech kotów. Ponadto stwierdzono zwiększoną ekspresję GFAP w komórkach Müllera oraz obecność antygeny proliferacyjnego PCNA w siatkówce, co sugeruje aktywację i proliferację tych komórek w odpowiedzi na proces zapalny. Uzyskane wyniki wskazują, że zapalenie oka w przebiegu FIP ma złożony charakter, a jego obraz jest w dużej mierze determinowany przez odpowiedź humoralną oraz wtórne uszkodzenia bariery naczyniowej.

Wyniki tych badań zostały opisane w następującej publikacji:

- ❖ Ziółkowska N., Paździor-Czapula K., Lewczuk B., Mikulska-Skupień E., Przybylska-Gornowicz B., Kwiecińska K., **Ziółkowski H.** *Feline infectious peritonitis:*

immunohistochemical features of ocular inflammation and the distribution of viral antigens in structures of the eye. Veterinary Pathology, 2017; 54:933–944.

IF=1,795; MNiSW=40

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na zebraniu i przygotowaniu materiału do badania, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 3. 3. Badania nad dobową zmiennością ciśnienia wewnątrzgałkowego u kóz

Kolejne badania z tego obszaru dotyczyły analizy dobowej i okołodobowej zmienności ciśnienia wewnątrzgałkowego u kóz oraz oceny wpływu warunków oświetlenia na rytm tych zmian. Celem pracy było określenie, czy wahania ciśnienia wewnątrzgałkowego różnią się pomiędzy zwierzętami utrzymywanymi w warunkach naturalnego cyklu światło–ciemność oraz w warunkach stałego oświetlenia lub stałej ciemności.

Badania przeprowadzono na 50 zdrowych kozach w wieku około 5–6 tygodni, które utrzymywano w trzech różnych warunkach oświetleniowych: w cyklu 12 godzin światła i 12 godzin ciemności, w stałej ciemności oraz w stałym oświetleniu. Po okresie adaptacji zwierząt ciśnienie wewnątrzgałkowe mierzono metodą tonometrii aplanacyjnej w godzinach porannych i wieczornych w kolejnych dniach doświadczenia.

Uzyskane wyniki wykazały wyraźny dobowy rytm zmian ciśnienia wewnątrzgałkowego u kóz utrzymywanych w warunkach naprzemiennego cyklu światła i ciemności. W tych warunkach wartości ciśnienia były wyższe w godzinach porannych niż wieczorem. Natomiast u zwierząt utrzymywanych w stałej ciemności lub stałym oświetleniu obserwowany rytm zmian był znacznie słabiej zaznaczony lub nie wykazywał wyraźnego wzorca. Uzyskane wyniki wskazują, że rytmiczne zmiany ciśnienia wewnątrzgałkowego u kóz pozostają w istotnym stopniu zależne od naprzemiennej ekspozycji na światło i ciemność. Sugeruje to, że cykl świetlny może odgrywać istotną rolę w synchronizacji mechanizmów regulujących ciśnienie wewnątrzgałkowe u tego gatunku.

Wyniki tych badań zostały opisane w następującej publikacji:

- ❖ Ziółkowska N., Ziółkowski H., Jagoda M., Bućko M., Kaczorek-Łukowska E., Lewczuk B. *Diurnal and circadian variations in intraocular pressure in goats exposed to different lighting conditions. Chronobiology International, 2019, 36:1638–1645*

IF=2,486; MNiSW=100

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na udziale w prowadzeniu pomiarów ciśnienia wewnątrzgałkowego, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

4. 4. 3. 4. Studia literaturowe nad dysplazją siatkówki u psów i kotów

Kolejna praca z tego obszaru miała charakter przeglądowy i dotyczyła aktualnego stanu wiedzy na temat dysplazji siatkówki u psów i kotów. Celem opracowania było przedstawienie najważniejszych informacji dotyczących budowy i rozwoju siatkówki, obrazu klinicznego oraz histopatologicznego tej choroby, a także omówienie jej etiopatogenezy, uwarunkowań genetycznych oraz możliwości diagnostyki i profilaktyki.

Dysplazja siatkówki jest zaburzeniem rozwojowym polegającym na nieprawidłowym różnicowaniu i organizacji warstw siatkówki w okresie życia płodowego lub wczesnego okresu postnatalnego. W obrazie histologicznym choroba ta charakteryzuje się obecnością fałdów siatkówki

oraz struktur rozetopodobnych utworzonych przez komórki nerwowe. Zmiany te prowadzą do zaburzenia prawidłowej architektury siatkówki i mogą powodować różnego stopnia upośledzenie funkcji wzrokowych.

W pracy omówiono różne postaci kliniczne dysplazji siatkówki u psów, w tym formę ogniskową, wielogniskową oraz geograficzną, a także postaci choroby przebiegające z odwarstwieniem siatkówki i innymi wadami w obrębie gałki ocznej. Wskazano również, że etiopatogeneza choroby ma charakter wieloczynnikowy i może być związana zarówno z uwarunkowaniami genetycznymi, jak i działaniem czynników środowiskowych, w tym infekcji wirusowych czy czynników fizycznych oddziałujących na rozwijającą się siatkówkę. Szczególną uwagę poświęcono dziedzicznym postaciom dysplazji siatkówki, które opisano u wielu ras psów i które najczęściej dziedziczą się w sposób autosomalny recesywny. Wskazano również na związek niektórych form choroby z mutacjami w genach kodujących składniki kolagenu typu IX, a także na znaczenie badań genetycznych w identyfikacji zwierząt będących nosicielami tej wady.

Podsumowując, przedstawione w pracy dane wskazują, że dysplazja siatkówki stanowi złożone zaburzenie rozwojowe o zróżnicowanej etiologii i obrazie klinicznym, a dalsze badania – szczególnie w zakresie genetyki molekularnej – są niezbędne do pełniejszego poznania mechanizmów jej powstawania oraz opracowania skutecznych metod wczesnej diagnostyki i zapobiegania tej chorobie.

Wyniki niniejszej pracy zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Ziółkowska N., Prusik M., **Ziółkowski H.** *Dysplazja siatkówki u psów i kotów – aktualny stan wiedzy*. Medycyna Weterynaryjna, **2012**, 68: 15–21.

MEiN =15

Mój wkład w powstanie niniejszej publikacji polegał na zebraniu danych i piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

5.1. Badania prowadzone w *The Department of Veterinary Medicine, College of Natural Science & Mathematics, University of Alaska Fairbanks, USA*

Celem stażu było nawiązanie bliższej współpracy z Department of Veterinary Medicine, College of Natural Science & Mathematics, University of Alaska Fairbanks, jak również współprowadzenie badań nad szlakami transportowymi glukozy oraz ścieżkami sygnalizacji wewnątrzkomórkowej towarzyszącymi stanom zapalnym. W trakcie pobytu zostałem przydzielony do badań realizowanych w ramach projektu „*The effect of glucose on macrophage metabolism and inflammatory regulation and the role of hydrogen sulfide on inflammasome regulation in microglia.*”, którego kierownikiem był mój opiekun stażu Dr Alireza Bidiei. W badaniach, w których brałem czynny udział podjęto próbę określenia krytycznej roli metabolizmu glukozy zależnego od transportera Glut1 w odpowiedzi zapalnej makrofagów, które należą do komórek o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym w obrębie wrodzonego układu odpornościowego. Zapalenie prowadzi do zwiększonej ekspresji Glut1, zapewniając tym samym wystarczający wychwyt glukozy w celu wsparcia funkcji makrofagów. W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że użycie siRNA do wyłączenia Glut1 zmniejsza ekspresję różnych cytokin i markerów prozapalnych, takich jak IL-6, iNOS, MHC II/CD40, reaktywne formy tlenu i γ -liaza cystationinowa (CSE) – enzym wytwarzający siarkowodór (H₂S). Najprawdopodobniej Glut1 aktywuje szlak prozapalny poprzez czynnik jądrowy (NF)- κ B, w związku z czym wyciszenie Glut1 zapobiega degradacji I κ B indukowanej przez lipopolisacharyd (LPS), blokując tym samym aktywację NF- κ B. Ponadto określiliśmy także rolę Glut1 w zjawiskach autofagii, niezbędnych dla funkcji makrofagów, takich jak prezentacja antygeny, fagocytoza i wydzielanie cytokin. Wyniki naszych badań pokazały, że stymulacja LPS zmniejszała powstawanie autofagosomów, natomiast wyciszenie Glut1 odwracało ten efekt, zwiększając autofagię poza poziomy kontrolne.

Przeprowadzone badania przedstawiają znaczenie Glut1 w odpowiedziach immunologicznych makrofagów oraz jego rolę w regulacji apoptozy podczas stymulacji LPS. Wyciszenie Glut1 negatywnie wpływa na żywotność komórek i sygnalizację wewnętrzną ścieżki mitochondrialnej. Uzyskane wyniki sugerują, że ukierunkowanie metabolizmu glukozy makrofagów poprzez Glut1 może potencjalnie służyć jako cel kontroli stanu zapalnego.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Cornwell A., Ziółkowski H., Bidiei A. *Glucose Transporter Glut1-Dependent Metabolic Reprogramming Regulates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW264.7 Macrophages*. *Biomolecules*, **2023**, 13, 770.

IF=4,80; MEiN=140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zakładaniu hodowli komórkowej makrofagów, ekstrakcji mRNA i białek, przygotowaniu próbek do analiz qPCR i analiz Western Blott oraz udział w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

5.2. Badania prowadzone w *Faculty of Veterinary Medicine, The Justus-Liebig-University Gießen, Niemcy.*

Krótki staż naukowy realizowany w Instytucie Farmakologii i Toksykologii Weterynaryjnej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Justus Liebig University Gießen, miał na celu nawiązanie współpracy naukowej oraz poszerzenie kompetencji badawczych w zakresie nowoczesnych metod analizy transportu molekularnego leków w organizmie. Tematyka ta była bezpośrednio związana z prowadzonymi równolegle badaniami w Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie, dotyczącymi farmakokinetyki i farmakodynamiki leków, w szczególności z grupy tetracyklin.

W trakcie pobytu zapoznałem się z podstawami hodowli komórkowych oraz technikami badawczymi stosowanymi w analizie transportu przez błony biologiczne, co stanowiło istotne rozszerzenie mojego warsztatu badawczego. Zdobyta wiedza dotyczyła w szczególności oceny roli transporterów błonowych oraz mechanizmów związanych z dystrybucją i metabolizmem leków.

Bezpośrednim efektem stażu było nawiązanie trwałej współpracy naukowej, która po jego zakończeniu została rozwinięta w formie wspólnych badań pilotażowych. Początkowo koncentrowały się one na molekularnych mechanizmach transportu tetracyklin, jednak w krótkim czasie zostały rozszerzone o badania nad pochodnymi izoksazolin – nowoczesną grupę leków przeciwpasożytniczych. Współpraca ta przełożyła się na rozwój badań nad farmakokinetyką i transportem tych związków, które są kontynuowane do chwili obecnej i zaowocowały publikacjami naukowymi w tym obszarze.

W ramach współpracy prowadzono również oznaczenia analityczne próbek przygotowanych w Gießen, w tym z wykorzystaniem opracowywanych metod ilościowego oznaczania wybranych substancji czynnych, takich jak fluralaner i sarolaner, a także makrocyclicznych laktonów. Ze względu na charakter współpracy z partnerami gospodarczymi oraz ograniczenia dotyczące poufności danych, wyniki tych analiz nie mogą być obecnie upublicznione.

Całość stażu stanowiła istotny etap w rozwoju kompetencji badawczych, umożliwiając wdrożenie nowych metod eksperymentalnych oraz zainicjowanie długofalowej współpracy międzynarodowej, której efekty są rozwijane w kolejnych projektach badawczych.

Wyniki badań uzyskanych na podstawie nawiązanej współpracy zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Markowska-Buńka P., Jaroszewski J., Rasiński B., **Ziółkowski H.** *A novel method for the determination of isoxazoline derivatives in plasma by UPLC-MS/MS: validation and applicability to screening tests.* Journal of Veterinary Research. **2025**, 69:405–415.

IF=1,500; MNiSW=140

Mój wkład w powstanie niniejszych publikacji, której byłem autorem korespondencyjnym polegał na znaczącym udziale w opracowaniu koncepcji badania, pomocy w przeprowadzeniu analizy chromatograficznej, zebraniu piśmiennictwa oraz wykonaniu prac związanych z przygotowaniem ostatecznej wersji manuskryptu.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

- ❖ Pełniłem funkcję zastępcy opiekuna roku dla studentów kierunku „Weterynaria” rocznik 2016-2022.
- ❖ W ramach corocznego plebiscytu na najlepszego nauczyciela akademickiego UWM **zająłem II miejsce** w plebiscycie "Belfer roku 2023". Ponadto, w badaniu ankietowym prowadzonym wśród absolwentów kierunku "Weterynaria" na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie zająłem odpowiednio:
 - rocznik 2012-2018 **7 miejsce** w kategorii „najlepszy prowadzący ćwiczenia”,
 - rocznik 2014-2020 **4 miejsce** w kategorii „najlepszy prowadzący ćwiczenia”,
 - rocznik 2015-2021 **3 miejsce** w kategorii „najlepszy prowadzący ćwiczenia” oraz **6 miejsce** „najlepszy prowadzący fakultet”,
 - rocznik 2016-2022 **3 miejsce** w kategorii „najlepszy prowadzący ćwiczenia” oraz **7 miejsce** „najlepszy prowadzący fakultet”,
 - rocznik 2017-2023 **4 miejsce** w kategorii „najlepszy prowadzący ćwiczenia” oraz **5 miejsce** „najlepszy prowadzący fakultet”,
 - rocznik 2018-2024 oraz 2019-2025 **4 miejsce** w kategorii „najlepszy prowadzący ćwiczenia”.
- ❖ **Nagrody & Wyróżnienia**
 - 2023.12.01 – Nagroda Rektora, Nagroda Zespołowa I Stopnia za osiągnięcia dydaktyczne.
 - 2024.01.17 – Nagroda Rektora, za zajęcie II miejsca w Plebiscycie Belfer UWM 2023.
 - 2024.12.01 – Nagroda Rektora, Nagroda indywidualna II stopnia za osiągnięcia dydaktyczne.
- ❖ **Zajęcia dydaktyczne prowadzone na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie dla kierunków Weterynaria oraz Biotechnologia:**
 - Na kierunku weterynaria:**
 - Od 2009 r. prowadzę ćwiczenia z przedmiotu „*Farmakologia weterynaryjna*”.
 - Od 2012 r. współprowadzę wykłady oraz ćwiczenia z przedmiotu fakultatywnego „*Farmakologia kliniczna*”.
 - Od 2021 r. prowadzę ćwiczenia z przedmiotu „*Toksykologia weterynaryjna*” dla studentów programu ERASMUS.
 - Od 2022 r. kieruję oraz jestem autorem programu nauczania przedmiotu fakultatywnego „*Podstawy farmakokinetyki klinicznej*”.
 - Na kierunku biotechnologia:**
 - Od 2015 r. prowadzę wykłady oraz ćwiczenia z przedmiotu „*Farmakologia*” na kierunku biotechnologia (specjalność: „Biotechnologia farmaceutyczna”).

- Od 2021 r. kieruję oraz jestem autorem programu nauczania przedmiotu „*Farmakokinetyka leków*” na kierunku biotechnologia (specjalność: „Biotechnologia farmaceutyczna”).

6. 2. Osiągnięcia organizacyjne

❖ Działalność organizacyjna na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie:

- W latach 2009-2014 oraz w 2016 byłem członkiem Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie – początkowo jako przedstawiciel doktorantów, następnie adiunktów.
- W latach 2013-2014 byłem członkiem zespołu ds. zapewniania jakości.
- W 2019 r. pełniłem funkcję kierownika projektu „*Utworzenie zintegrowanej pracowni badań podstawowo-klinicznych z wykorzystaniem królików jako modelu doświadczalnego*”, finansowanego przez Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” w ramach programu rozwoju warsztatu badawczego młodego pracownika nauki.
- Od 2024 jestem członkiem Zespołu ds. przeglądu warunków pracy na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej oraz członkiem Zespołu ds. pozyskiwania funduszy na badania naukowe i rozwój Wydziału Medycyny Weterynaryjnej.

❖ Działalność organizacyjna na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie:

- 09.06.2024 r. byłem współorganizatorem stanowiska Wydziału Medycyny Weterynaryjnej podczas Pikniku Nauki i Sztuki w ramach obchodów 25-lecia UWM w Olsztynie.
- W 2024 r. otrzymałem Nagrodę Rektora za działalność organizacyjną (udział w organizacji XVII Kongresu Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, 19–21.09.2024).

❖ Jestem aktywnym członkiem kilku towarzystw naukowych:

- Od 2013 r. członek Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych.
- Od 2014 r. członek Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego; od 2025 **przewodniczący Oddziału Warmińsko-Mazurskiego oraz członek Zarządu Głównego.**
- Od 2014 r. członek *Federation of European Toxicologists and European Societies of Toxicology* EUROTOX.
- Od 2023 r. członek *The International Society of Veterinary Ophthalmology* ISVO.

❖ Członkiem komitetów organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych:

- Konferencja naukowo-szkoleniowa „*Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty działania ksenobiotyków*”, Olsztyn 24-25 czerwca **2010. Członek komitetu organizacyjnego.**
- Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, „*Człowiek, żywność, środowisko – problemy współczesnej toksykologii*”, Olsztyn 16-19 września **2014. Członek komitetu organizacyjnego.**

- Konferencja szkoleniowo-naukowa, „*Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty stosowania substancji antropogennych*”, Gdańsk-Sobieszewo 14-16 czerwca **2015**. **Członek komitetu organizacyjnego.**
- Konferencja naukowo-szkoleniowa „*Nowe trendy w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej*”, Warchały 27-29 czerwca **2017**. **Członek komitetu organizacyjnego.**
- Konferencja naukowo-szkoleniowa „*Współczesne kierunki badań w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej*”, Łańsk 25-28 czerwca **2019**. **Członek komitetu organizacyjnego.**
- Konferencja naukowo-szkoleniowa „*Nowe koncepcje leczenia chorób ludzi i zwierząt z zastosowaniem leków konwencjonalnych, biologicznych i preparatów probiotycznych*”. Barczewo 12-15 czerwca **2023**. **Członek komitetu naukowego.**
- Konferencja naukowo-szkoleniowa „*Innowacyjne terapie w leczeniu chorób ludzi i zwierząt*”, Łańsk 23-26 czerwca **2026**. **Członek komitetu naukowego.**

6. 3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

❖ Przeprowadzone wykłady

- W 2023 oraz 2024 przeprowadziłem wykład na zaproszenie studentów Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pt. *Chromatografia cieczowa w weterynarii* w ramach fakultetu „Diagnostyka Weterynaryjna”.
- W 2023 przeprowadziłem wykład na zaproszenie Studenckiego Koła Naukowego Immunologii Chorób Zakaźnych i Nowotworowych Uniwersytetu Szczecińskiego pt. *Toksyczność narządowa wybranych leków przeciwbakteryjnych u ludzi i zwierząt*.
- W 2024 przeprowadziłem wykład na zaproszenie członków olsztyńskiego oddziału *International Veterinary Students Association (IVSA)* pt. „*Prawo farmaceutyczne dla lekarzy weterynarii.*”

❖ Publikacje popularno-naukowe

- H. Ziółkowski. *Okulistyka (nie)ludzka – garść informacji o okulistyce weterynaryjnej*. CX News 2016; 55:6.

❖ Wykonane ekspertyzy lub inne opracowania wykonane na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

- **06.04.2022 – 06.02.2023** – Ekspertyza dla Svine Vet Consulting Sp.z o.o. Sp. K. obejmująca weryfikację zgodności stężeń amoksycyliny trójwodnej w produktach leczniczych weterynaryjnych z wykorzystaniem ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją ultrafioletową.
- **03.09.2024 – 10.11.2024** – „*Opracowanie schematów dawkowania prazykwantelu i pyrantelu u psów i kotów*” dla JDG Robert Janeczek w celu dopuszczenia produktu leczniczego weterynaryjnego do obrotu na terenie Polski na zasadzie importu równoległego.

7. Inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

7.1. Odbyte staże zagraniczne i krajowe

- ❖ Staż naukowy w Centrum Badań Farmakokinetycznych FILAB, Ravimed Spółka z o.o. Polna 54, 05-119 Łajski, Polska. **2010.06.28 – 2010.10.29.**
- ❖ Staż naukowy w Centrum Badań Farmakokinetycznych FILAB, Ravimed Spółka z o.o. Polna 54, 05-119 Łajski, Polska. **2011.06.20 – 2011.09.30.**
- ❖ Staż naukowy w Centrum Badań Farmakokinetycznych FILAB, Ravimed Spółka z o.o. Polna 54, 05-119 Łajski, Polska. **2012.06.04 – 2012.09.01.**
- ❖ Staż naukowy w The Department of Veterinary Medicine, College of Natural Science & Mathematics, University of Alaska Fairbanks, USA. **2022.08.11 – 2022.10.27.**

7.2. Zrealizowane projekty badawcze

- ❖ **Wykonawca** w projekcie badawczym pt. *„Badania nad innowacyjnym lekiem o działaniu immunostymulującym u zwierząt”*. Projekt współfinansowany przez NCBiR nr UDA-POIG.01.03.01-28-108/12-01, okres realizacji 03.12.2012 – 15.06.2015, kwota dofinansowania – 11 757 550,00 PLN.
- ❖ **Wykonawca** w projekcie badawczym pt. *„Opracowanie i walidacja metody oznaczania tigecekliny oraz farmakokinetyka tego leku u indyków”*. Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu „PRELUDIUM 5” nr 2013/09/N/NZ7/03545, okres realizacji 12.03.2014 – 11.03.2016, kwota dofinansowania – 99 320 PLN.
- ❖ **Kierownik** projektu badawczego pt. *„Badania nad mechanizmami ograniczania dostępności biologicznej wybranych tetracyklin z przewodu pokarmowego”*. Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 1, nr DEC-2017/01/X/NZ7/00931, okres realizacji 28.10.2017 – 27.10.2018, kwota dofinansowania – 49 995,00 PLN.
- ❖ **Kierownik** projektu badawczego pt. *„Wpływ p-glikoproteiny na dostępność biologiczną tigecekliny z przewodu pokarmowego”*. Projekt finansowany ze środków Konsorcjum Naukowego KNOW (Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego) „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” nr UMO-KNOW2018/UWM/ESR4/01/1, okres realizacji 22.01.2018 – 21.01.2019, kwota dofinansowania – 50 000,00 PLN.
- ❖ **Wykonawca (na podstawie umowy zlecenia w ramach przeprowadzonego konkursu) – specjalista ds. farmakokinetyki** – w projekcie badawczym pt. *„Badania przedkliniczne i kliniczne kandydata na innowacyjny lek w terapii inwazyjnych grzybic układowych”*. Projekt współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr POIR.01.01.01-00-1990/15-00, okres realizacji 01.01.2016 – 31.12.2018, kwota dofinansowania – 10 301 172,96 PLN.
- ❖ **Wykonawca (18/100 oraz 36/100 etatu) – wewnętrzny tester funkcjonalności oprogramowania farmakokinetycznego ThothPro®** – w projekcie badawczym pt. *„Opracowanie „best in class” kompleksowego, szybkiego i intuicyjnego w użyciu bioinformatycznego narzędzia do obliczeń i modelowania populacyjnych danych farmakometrycznych o szerokim zastosowaniu w procesach opracowywania i rozwoju nowych*

leków". Projekt współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr POIR.01.01.01-00-0649/16-00, okres realizacji 01.01.2017 – 01.01.2019, kwota dofinansowania – 3 976 172,02 PLN.

- ❖ **Wykonawca (na podstawie umowy zlecenia w ramach przeprowadzonego konkursu) – specjalista ds. farmakokinetyki*** – w projekcie badawczym pt. „*Rozwój przedkliniczny i kliniczny inhibitora ścieżki ubikwityna-proteasom jako innowacyjnego leku stosowanego w terapii nowotworów*”. Projekt współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr POIR.01.02.00-00-0009/17, okres realizacji 08.04.2017 – 31.12.2020, wartość projektu – 37 472 533,50 PLN; kwota dofinansowania NCBiR – 25 646 443,69 PLN.

*wykonywanie prac w projekcie obejmujących: analizy i konsultacji strategii badań projektu oraz uzyskiwanych wyników badawczych farmakologii (badania z zakresu PK; PK/PD; modelowanie i analiza PK;PK/PD; wstępna analiza toksykologiczna).

- ❖ **Wykonawca (na podstawie umowy zlecenia w ramach przeprowadzonego konkursu) – specjalista ds. farmakokinetyki*** – w projekcie badawczym pt. „*Rozwój przedkliniczny i kliniczny innowacyjnego agonisty receptora GPR40 w terapii cukrzycy typu II*”. Projekt współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr POIR.01.01.01-00-0334/17, okres realizacji 01.07.2017 – 21.01.2022, wartość projektu – 39 436 596,20 PLN; dofinansowanie NCBiR – 24 818 953,75 PLN.

*wykonywanie prac w projekcie obejmujących: analizy i konsultacji strategii badań projektu oraz uzyskiwanych wyników badawczych farmakologii (badania z zakresu PK; PK/PD; modelowanie i analiza PK;PK/PD).

- ❖ **Wykonawca (na podstawie umowy zlecenia w ramach przeprowadzonego konkursu) – specjalista ds. farmakokinetyki *** – w projekcie badawczym pt. „*Opracowanie innowacyjnego, pierwszego w klasie, małowcząsteczkowego, podwójnie ukierunkowanego terapeutyku o działaniu immunomodulującym i cytotoksycznym, jako kandydata na lek w terapii białaczek i nowotworów litych*”. Projekt współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr POIR.01.01.01-00-0472/19, okres realizacji 1.08.2019 – 07.05.2024, wartość projektu – 45 757 190,00 PLN; kwota dofinansowania NCBiR – 27 936 255,00 PLN.

*obliczanie parametrów farmakokinetycznych z przeprowadzonych badań na różnych gatunkach zwierząt; modelowanie, analiza i interpretacja uzyskanych parametrów farmakokinetycznych (PK) oraz farmakodynamicznych (PD), konsultacja strategii badań PK/PD, wstępna analiza danych toksykologicznych.

7.3. Nagrody & Wyróżnienia za osiągnięcia naukowe:

- Nagroda Zespołowa III Stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowej w 2014 oraz 2016 roku.
- Nagroda Zespołowa II Stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowej w 2018 roku.
- Nagroda Rektora za wyróżniającą się publikację naukową wydaną w roku 2021, 2023, 2024.

7.4. Pozostałe informacje:

- **Stypendysta** w projekcie „Dr INNO 3. Stypendia doktoranckie” realizowanego w ramach Priorytetu VIII Regionalne Kadry Gospodarki, Działania 8.2. Transfer wiedzy, Poddziałania 8.2.1. Wsparcie dla współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Umowa DrINNO 3 nr 89/2013.
- **Kierownik** w złożonym wniosku o finansowanie badań podstawowych w ramach programu SONATA 15 pt. „*Badania nad regulacją dostępności biologicznej tygecykliny z przewodu pokarmowego z wykorzystaniem specyficznych i niespecyficznych modulatorów transportu*”

jelitowego”, nr 2019/35/D/NZ7/01212; wniosek niezakwalifikowany do finansowania (panel 1, ocena 11/24).

- **Kierownik** w złożonym wniosku w ramach programu „SPUB Aparatura badawcza i specjalne urządzenie badawcze” na rok 2024 pt. „*Cytometryczno-chromatograficzne stanowisko badawcze Wydziału Medycyny Weterynaryjnej*”, nr SPUB/SP/596057/2024; wniosek niezakwalifikowany do finansowania.
- **Opiekun** w złożonym projekcie badawczym w ramach programu PRELUDIUM 23 pt. „*Farmakokinetyka pochodnych izoksazolin u kur niosek*”, nr 2024/53/N/NZ7/02145; wniosek niezakwalifikowany do finansowania (panel 1, ocena 11/15).
- **Kierownik** w złożonym wniosku o przyznanie środków finansowych na utrzymanie aparatury naukowo-badawczej lub stanowiska badawczego (SPUB) oraz utrzymanie specjalnej infrastruktury informatycznej (SPUB-I) na rok 2025 pt. „*Cytometryczno-chromatograficzne stanowisko badawcze Wydziału Medycyny Weterynaryjnej*”, nr SPUB/SP/0122/2026; status wniosku: rozpatrywany.



(podpis wnioskodawcy)