Dr. hab. n. wet. Beata Łebkowska-Wieruszewska - Profesor Uczelni
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin
tel. +48 814456056, +48 509915541
e-mail: lebkowska.wieruszewska@up.lublin.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki

pt. **„Charakterystyka farmakokinetyczna wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek oraz ocena udziału transporterów wypływowych P-gp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 w farmakokinetyce fluralaneru"**

wykonanej Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem Pana promotora prof. dr. hab. Tomasza Maślanki oraz Pana promotora pomocniczego dr. n. wet. Huberta Ziółkowskiego.

Podstawę formalną wykonania niniejszej recenzji stanowi Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 2 lipca 2026r.

1. Ocena ogólna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 175 stron i została przygotowana w klasycznym układzie rozprawy eksperymentalnej. Jej tematyka obejmuje farmakokinetykę czterech pochodnych izoksazolin: fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru u kur niosek oraz próbę oceny udziału transporterów wypływowych P-gp i BCRP w farmakokinetyce

fluralaneru. Praca obejmuje również optymalizację i rewalidację metody UPLC-MS/MS umożliwiającej jednoczesne oznaczanie badanych związków w osoczu. Cele te zostały jasno określone i logicznie powiązane z zaplanowanymi zadaniami badawczymi.

Temat rozprawy uważam za aktualny i istotny zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia. Farmakokinetyka pochodnych izoksazolin została stosunkowo dobrze poznana u zwierząt towarzyszących, natomiast dane dotyczące drobiu są znacznie bardziej ograniczone. Autorka słusznie zwraca uwagę na ograniczoną możliwość bezpośredniego ekstrapolowania parametrów farmakokinetycznych pomiędzy gatunkami. Jednocześnie zaprojektowanie badań w jednolitych warunkach eksperymentalnych stwarza możliwość rzeczywistego porównania czterech przedstawicieli tej samej grupy chemicznej.

Na podkreślenie zasługuje również połączenie klasycznej charakterystyki farmakokinetycznej z próbą oceny mechanizmów transportowych mogących wpływać na ekspozycję fluralaneru.

2. Ocena części teoretycznej

Układ pracy jest logiczny i przejrzysty. Rozprawa obejmuje Wykaz ważniejszych skrótów, Streszczenie w języku polskim oraz angielskim (Abstrakt), Wstęp (24 strony), Cele i hipotezy badawcze (9 stron), Materiały i metody (14 stron), Wyniki (56 stron), Dyskusję (15 stron), Wnioski, Spis rycin (1-13), Spis tabel (1-63) oraz Piśmiennictwo (132 pozycje).

Wstęp rozprawy jest obszerny i został przygotowany na podstawie bogatego piśmiennictwa. Autorka przedstawiła właściwości fizykochemiczne badanych substancji, ich mechanizm działania, dostępne dane dotyczące farmakokinetyki oraz informacje dotyczące procesów wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji.

Trafnie przedstawiono problematykę farmakokinetyki izoksazolin w kontekście ich wysokiej lipofilności, znacznego stopnia wiązania z białkami oraz szerokiej dystrybucji tkankowej. Autorka prawidłowo wskazuje również na ograniczenia wynikające z porównywania danych uzyskanych w różnych gatunkach i z zastosowaniem różnych postaci farmaceutycznych.

Warto podkreślić umiejętność spojrzenia Doktorantki na podjętą problematykę z różnych stron. Świadczy to o dogłębnym przemyśleniu tematu i bardzo szerokiej wiedzy teoretycznej Doktorantki. W tej części rozprawy Doktorantka potwierdziła również aktualność i znaczenie podjętego tematu badań.

3. Ocena celu i hipotez badawczych

Cele pracy zostały sformułowane poprawnie i odpowiadają zakresowi przeprowadzonych badań.

Szczególnie wartościowy jest pierwszy cel, dotyczący porównania farmakokinetyki czterech pochodnych izoksazolin po podaniu dożylnym i doustnym. Zastosowanie jednakowej dawki oraz wspólnego modelu eksperymentalnego pozwoliło ograniczyć wpływ czynników metodologicznych utrudniających porównywanie danych pochodzących z różnych doświadczeń.

Drugi cel, dotyczący transporterów P-gp i BCRP, ma charakter bardziej eksploracyjny. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość udziału mechanizmów transportowych w kształtowaniu ekspozycji fluralaneru. Jednocześnie Autorka słusznie zachowuje ostrożność w formułowaniu ostatecznych wniosków, wskazując, że pełne potwierdzenie udziału konkretnych transporterów wymagałoby zastosowania bardziej swoistych modeli eksperymentalnych.

Natomiast trzeci cel dotyczy optymalizacji i rewalidacji wieloskładnikowej metody UPLC-MS/MS.

4. Ocena materiału i metod

Materiał badawczy jest dobrze scharakteryzowany, a zaplanowane doświadczenia są rozbudowane. Badania obejmowały 80 kur niosek ISA Brown, podzielonych na grupy eksperymentalne (10 grup po 8 zwierząt), w których oceniano farmakokinetykę czterech badanych substancji po podaniu IV (4 grupy) i PO (4 grupy) oraz wpływ elakrydaru i oksytetracykliny (2 grupy) na farmakokinetykę fluralaneru. Warunki utrzymania były kontrolowane, a zwierzęta podlegały codziennej obserwacji klinicznej. Badania uzyskały zgodę właściwej komisji etycznej.

Za mocną stronę pracy uważam bardzo rozbudowany harmonogram pobierania próbek. Pozwoliło to na stosunkowo dokładne scharakteryzowanie zarówno początkowej fazy po podaniu, jak i długotrwałego utrzymywania się badanych substancji w organizmie.

Zastosowanie analizy niekompartmentowej do oceny parametrów farmakokinetycznych jest właściwe. Wyznaczono m.in. AUC, AUMC, MRT, Cmax, tmax, Cl, Vss, kel, $t_{½}$ oraz F.

Badania farmakokinetyczne wymagają precyzji w planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej. Ich prowadzenie wskazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań naukowych, również od strony organizacyjnej.

5. Ocena metody analitycznej

Część dotycząca metody analitycznej została wykonana starannie. Opracowana wcześniej metoda została zoptymalizowana i zrewalidowana w celu jednoczesnego oznaczania czterech pochodnych izoksazolin. Oceniono m.in. liniowość, dokładność, precyzję, LOD, LLOQ, odzysk, selektywność oraz efekt matrycy.

Zastosowanie jednego, odpowiednio dobranego standardu wewnętrznego oraz ujednolicenie warunków analitycznych dla wszystkich badanych substancji zwiększa porównywalność uzyskanych wyników farmakokinetycznych. Zakres kalibracji obejmował 1–2500 ng/mL, a przedstawione wyniki wskazują na spełnienie przyjętych kryteriów akceptacji.

Na podstawie przedstawionych danych można uznać, że zastosowana metoda zapewnia odpowiednią jakość i wiarygodność oznaczeń, stanowiących podstawę dalszej analizy farmakokinetycznej.

6. Ocena wyników farmakokinetycznych

Wyniki zostały przedstawione szczegółowo i w sposób pozwalający na ocenę zarówno średnich wartości parametrów farmakokinetycznych, jak i zmienności obserwowanej pomiędzy poszczególnymi ptakami. Cennym elementem jest przedstawienie danych dla każdego zwierzęcia, co umożliwia ocenę rzeczywistej zmienności osobniczej, widocznej szczególnie w przypadku takich parametrów jak AUC czy MRT.

Istotną wartością przeprowadzonych badań jest możliwość bezpośredniego porównania czterech pochodnych izoksazolin w jednolitych warunkach eksperymentalnych. Wykazano, że mimo bliskiego pokrewieństwa strukturalnego związki te nie tworzą u kur niosek jednorodnej grupy farmakokinetycznej, a różnice dotyczą zarówno dystrybucji, jak i eliminacji oraz ekspozycji ogólnoustrojowej.

Na uwagę zasługują różnice w parametrach dystrybucji po podaniu dożylnym. Fluralaner osiągał najwyższe Cmax oraz najniższe wartości Vss i Varea, podczas gdy pozostałe związki wykazywały większe objętości dystrybucji. Jeszcze wyraźniejsze różnice obserwowano w zakresie eliminacji. Sarolaner charakteryzował się najwyższymi wartościami MRT i $t_{1/2kel}$ oraz najdłuższym czasem utrzymywania się oznaczalnych stężeń, natomiast lotilaner najwyższym klirensem i najszybszą eliminacją.

Również po podaniu doustnym wykazano istotne różnice pomiędzy badanymi substancjami. Sarolaner charakteryzował się największą ekspozycją ogólnoustrojową i najdłuższym średnim czasem przebywania w organizmie, podczas gdy lotilaner wykazywał

odmienny profil związany z szybszą eliminacją. Istotne różnice dotyczyły również dostępności biologicznej, gdzie najwyższą wartość F uzyskano dla sarolaneru, natomiast afoksolaner również wykazywał większą dostępność niż fluralaner.

Autorka prawidłowo zwraca uwagę, że na przebieg wchłaniania i ekspozycję mogą wpływać warunki podania, w tym czynniki żywieniowe.

7. Ocena badań dotyczących transporterów P-gp i BCRP

Ta część rozprawy jest wyjątkowo interesująca i stanowi wartościowe rozszerzenie klasycznej analizy farmakokinetycznej.

Zastosowanie elakrydaru oraz oksytetracykliny pozwoliło na ocenę ich wpływu na profil stężenie–czas fluralaneru oraz poszczególne parametry farmakokinetyczne. Po zastosowaniu elakrydaru obserwowano zwiększenie ekspozycji fluralaneru, szczególnie widoczne w wartościach AUC i F, co wskazuje na możliwość udziału mechanizmów transportowych w kształtowaniu jego farmakokinetyki.

Interpretując te wyniki, należy jednak zachować pewną ostrożność. Zastosowany model nie pozwala na jednoznaczne rozdzielenie udziału P-gp i BCRP ani na określenie, czy obserwowane zmiany wynikają przede wszystkim ze zwiększenia wchłaniania, czy również ze zmian w procesach eliminacji. Autorka jest tego świadoma i sama wskazuje na potrzebę zastosowania w przyszłości bardziej swoistych modeli eksperymentalnych. Jest to zatem raczej mocny, interesujący wynik pilotażowy wskazujący na potencjalny udział transporterów niż ostateczne potwierdzenie ich roli.

8. Ocena dyskusji

Dyskusję oceniam wysoko. Doktorantka sprawnie konfrontuje własne wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi, wskazując zarówno podobieństwa, jak i różnice w profilach farmakokinetycznych badanych związków. Prawidłowo zwraca uwagę na ograniczenia wynikające z różnic gatunkowych, formulacyjnych oraz warunków przeprowadzania poszczególnych badań. Bardzo trafnie przedstawiono również problem porównywania preparatów handlowych z czystymi substancjami stosowanymi w badaniach eksperymentalnych, co ma istotne znaczenie dla właściwej interpretacji uzyskanych wyników.

Pozytywnie oceniam także sposób omawiania wyników dotyczących transporterów. Doktorantka właściwie uwzględnia ograniczenia interpretacyjne zastosowanego modelu i nie traktuje uzyskanych wyników jako ostatecznego dowodu udziału P-gp i BCRP, lecz wskazuje na potrzebę dalszych badań z wykorzystaniem bardziej swoistych modeli eksperymentalnych.

Jednocześnie przedstawia problematykę farmakokinetyczną w szerszym kontekście procesów warunkujących dyspozycję badanych związków, w tym potencjalnego udziału transporterów wypływowych w kształtowaniu ekspozycji ogólnoustrojowej fluralaneru.

Dyskusja jest zatem merytoryczna, logiczna i dobrze powiązana z uzyskanymi wynikami. Świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki w zakresie farmakokinetyki oraz umiejętności krytycznej interpretacji własnych wyników na tle piśmiennictwa.

Przedstawione wnioski zostały sformułowane w sposób prawidłowy i jednoznacznie wskazują, że założone cele pracy zostały osiągnięte. Wnioski znajdują uzasadnienie w zaprezentowanych wynikach i stanowią logiczne podsumowanie przeprowadzonych badań.

9. Uwagi do rozprawy i pytania do Doktorantki

- W tekście występują pojedyncze uchybienia interpunkcyjne, np. na str. 35 „…zarówno u kur niosek jak i ptaków…"

- W bibliografii są trzy różne publikacje Walther z 2014 r.: Walther et al. 2014a, Walther et al. 2014b i Walther et al. 2014c. Tymczasem w tekście kilka razy pojawia się: „Walther i wsp., 2014" bez litery. To jest niejednoznaczne.

- W tekście występuje: „Zhou i wsp., 2022" ale w bibliografii: „Zhou, X., Hohman, A. E., & Hsu, W. H. (2021). Current review…" I co ważniejsze, dane bibliograficzne w rozprawie są nieprawidłowe: 2021; 44(3), 329–348.

Publikacja jest faktycznie: Zhou X, Hohman AE, Hsu WH. 2022. Current review of isoxazoline ectoparasiticides used in veterinary medicine. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 45(1), 1–15.

Czyli tutaj trzeba poprawić zarówno rok, jak i tom, numer i strony. Co więcej, w różnych miejscach rozprawy cytowane jest Zhou 2021, a w innych Zhou 2022. Należy ujednolicić wszystkie na Zhou i wsp., 2022.

- EMA 2022b – brak pozycji w bibliografii. W tekście:„…preparat Exzolt … zawierający m.in. glikol dietylenowo monoetylowy oraz polisorbat 80 (EMA, 2022b)…"

Natomiast w bibliografii nie ma żadnej pozycji European Medicines Agency z 2022 r. Wykaz zawiera 2014a, 2014b, 2015, 2017a–c, 2019, 2024 i 2025. Nie ma 2022a ani 2022b.

- Trzy pozycje w bibliografii wyglądają na niecytowane

  - Chen C.H. (2012) i Wick et al. (2010) – nie znalazłam cytowania w tekście.
  - Kuchler K. (1999) – pozycja występuje w bibliografii, ale nie jest przywołana w tekście.

- Ujednoliciłabym „i wsp." / „i in." W pracy występują równolegle:

  - „Enomoto i wsp." i„Enomoto i in."

- „Markowska-Buńka i wsp." i„Markowska-Buńka i in."

- Jak Doktorantka interpretuje uzyskanie wartości dostępności biologicznej fluralaneru przekraczającej 100% po zastosowaniu elakrydaru? (106,85%) i jakie mogą być przyczyny?

10. Ocena końcowa

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe, wnoszące nowe informacje dotyczące farmakokinetyki pochodnych izoksazolin u kur niosek.

Na szczególne podkreślenie zasługują:

- aktualność podjętej problematyki;
- oryginalny charakter badań;
- bardzo duży zakres materiału eksperymentalnego;
- przeprowadzenie porównawczej charakterystyki farmakokinetycznej czterech pochodnych izoksazolin w ujednoliconych warunkach eksperymentalnych, obejmującej określenie i porównanie parametrów farmakokinetycznych po podaniu IV i PO oraz wskazanie istotnych różnic pomiędzy badanymi związkami
- podjęcie próby wyjaśnienia mechanizmów transportowych mogących wpływać na farmakokinetykę fluralaneru;
- opracowanie i rewalidację wieloskładnikowej metody UPLC-MS/MS umożliwiającej jednoczesne oznaczanie badanych substancji.

Pomimo przedstawionych uwag, które mają przede wszystkim charakter redakcyjny i ewentualnie dyskusyjny, nie podważają one wartości naukowej przeprowadzonych badań ani zasadniczych wniosków rozprawy.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki pt. „Charakterystyka farmakokinetyczna wybranych pochodnych izoksazolin u kur niosek oraz ocena udziału transporterów wypływowych P-gp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 w farmakokinetyce fluralaneru" zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dokumentuje umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań oraz świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki w zakresie farmakologii, farmakokinetyki i metod analitycznych oraz o szerokiej wiedzy teoretycznej w dyscyplinie weterynaria. Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (t.j. Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria UWM w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki do dalszych etapów

postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ze względu na zakres, oryginalność i wartość naukową przeprowadzonych badań uważam również, że rozprawa zasługuje na wyróżnienie.

Lublin, dn. 01.09.2026r.

Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska UP w Lublinie
dr hab. Beata Łebkowska- Wieruszewska
profesor uczelni