Poznań, 09.09.2026

dr hab. Lidia Radko, prof. UPP
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. PAULINY MARKOWSKIEJ-BUŃKA

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Tomasza Maślanki oraz promotora pomocniczego dr n. wet. Huberta Ziółkowskiego.

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest uchwała z dnia 2 lipca 2026 r. Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie oraz pismo nr WMW-DZ.5201.3.2026 Zastępcy Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, prof. dr hab. Krzysztofa Wąsowicza z dnia 09 lipca 2026 r.

1. Charakterystyka ogólna rozprawy i zasadność podjętej tematyki

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki dotyczy farmakokinetyki czterech pochodnych izoksazolin – fluralaneru, sarolaneru, lotilaneru i afoksolaneru – u kur niosek oraz oceny udziału transporterów błonowych P-gp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 w kształtowaniu farmakokinetyki fluralaneru. Integralnym elementem pracy jest również optymalizacja autorskiej, wieloskładnikowej metody UPLC-MS/MS, umożliwiającej jednoczesne oznaczanie tych związków w osoczu ptaków.

Wybór tematu należy ocenić jako w pełni uzasadniony i aktualny. Pochodne izoksazolin stanowią współcześnie jedną z najintensywniej rozwijających się grup leków przeciwpasożytniczych, a inwazje *Dermanyssus gallinae* pozostają jednym z poważniejszych problemów zdrowotnych i ekonomicznych współczesnej hodowli drobiarskiej. Doktorantka trafnie zidentyfikowała istotną lukę poznawczą: mimo że europejski patent EP3878281B1

obejmuje możliwość zastosowania u drobiu wszystkich czterech badanych związków, dane farmakokinetyczne dostępne były dotychczas wyłącznie dla fluralaneru, a mechanizmy determinujące losy tych substancji w organizmie ptaków – w tym ewentualny udział transporterów wypływowych – pozostawały całkowicie nierozpoznane. Podjęcie tej problematyki ma zatem wymiar zarówno poznawczy, jak i praktyczny, istotny z punktu widzenia racjonalnego, przyszłego stosowania tej grupy leków u drobiu.

2. Ocena wstępu, przeglądu piśmiennictwa oraz sformułowania celów i hipotez badawczych

Rozdział wprowadzający opracowano starannie i kompetentnie. Doktorantka w sposób logiczny przedstawia miejsce pochodnych izoksazolin wśród leków przeciwpasożytniczych, ich mechanizm działania oraz stan wiedzy o ich farmakokinetyce u zwierząt towarzyszących i – w bardzo ograniczonym zakresie – u drobiu, a następnie przekonująco uzasadnia potrzebę podjęcia badań nad udziałem transporterów P-gp i BCRP. Na tej podstawie sformułowano trzy cele badawcze oraz odpowiadające im trzy hipotezy, rozwinięte w osiem szczegółowych zadań badawczych. Cele, hipotezy i zadania są spójne logicznie, precyzyjnie sformułowane i w pełni weryfikowalne, co należy ocenić bardzo wysoko, gdyż ułatwia to ocenę stopnia realizacji założeń pracy.

Jedyną uwagą do tej części rozprawy jest to, że zagadnienia fizjologicznych uwarunkowań farmakokinetyki leków u drobiu (specyfika przewodu pokarmowego, metabolizm wątrobowy) mogłyby zostać nieco szerzej rozwinięte już na etapie wstępu, co ułatwiłoby wcześniejszą interpretację prezentowanych dalej wyników. Uwaga ta ma jednak charakter wyłącznie redakcyjny, ponieważ odpowiednie wątki zostały ostatecznie szeroko i trafnie podjęte w dyskusji.

3. Ocena materiału i metod badawczych

Materiał i metody badawcze zaplanowano i opisano na bardzo wysokim poziomie metodologicznym. Badania przeprowadzono na 80 klinicznie zdrowych kurach nioskach linii ISA Brown, za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie (Uchwała nr 26/P1/2023), z zachowaniem właściwych standardów dobrostanu zwierząt. Zastosowano rozbudowany, dziesięciogrupowy schemat doświadczalny, obejmujący podanie każdej z czterech badanych substancji zarówno drogą dożylną, jak i doustną, w tej samej dawce (0,5 mg/kg m.c.), a także dwie dodatkowe grupy oceniające wpływ elakrydaru i oksytetracykliny na farmakokinetykę

fluralaneru. Takie ujednolicenie warunków eksperymentalnych – ten sam gatunek, jednolite dawkowanie, identyczna metoda analityczna – stanowi istotny walor metodologiczny pracy, umożliwiający wiarygodne porównania międzygrupowe. Na szczególne uznanie zasługuje opracowanie – jak podkreśla sama Doktorantka, pierwszej na świecie – stabilnej formulacji do podania dożylnego wszystkich czterech silnie lipofilnych pochodnych izoksazolin (układ DMSO/Tween 80/etanol), co samo w sobie stanowi wartościowe osiągnięcie metodyczne, niezależne od dalszych wyników farmakokinetycznych.

Rozbudowany harmonogram pobierania próbek krwi, obejmujący punkty czasowe od 5 minut do 25 dni po podaniu, pozwolił na rzetelne wyznaczenie parametrów opisujących zarówno wczesną, jak i późną fazę eliminacji badanych związków, co ma istotne znaczenie w przypadku substancji o długim okresie półtrwania. Analizę farmakokinetyczną oparto na metodzie niekompartmentowej, a analizę statystyczną poprzedzono właściwą weryfikacją założeń (test Shapiro-Wilka, test Levene'a) przed zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji z testem post-hoc Tukeya – jest to podejście metodologicznie poprawne i adekwatne do charakteru uzyskanych danych.

Część metodyczna dotycząca optymalizacji i rewalidacji metody UPLC-MS/MS zasługuje na wyróżnienie. Zmiana źródła jonizacji z ESI na APCI, zastosowanie deuterowanego lotilaneru-D4 jako standardu wewnętrznego oraz uproszczenie procedury przygotowania próbek do etapu precypitacji białek, przy jednoczesnym zachowaniu parametrów walidacyjnych zgodnych z wytycznymi EMA i FDA (liniowość, dokładność i precyzja na poziomach LLOQ/LQC/IQC/MQC/HQC, LOD, efekt przenoszenia, odzysk, selektywność, efekt matrycy), świadczy o dojrzałości warsztatu analitycznego Doktorantki. Opracowana metoda stanowi, według dostępnej literatury, pierwsze narzędzie umożliwiające jednoczesne oznaczanie czterech pochodnych izoksazolin w osoczu kur niosek, co ma samodzielną wartość aplikacyjną, wykraczającą poza niniejszą rozprawę.

Pewne zastrzeżenia metodologiczne, które nie podważają jednak wartości uzyskanych wyników, dotyczą: zastosowania wyłącznie jednej dawki (0,5 mg/kg) dla wszystkich związków, co uniemożliwia ocenę proporcjonalności farmakokinetyki do dawki; wykorzystania czystych standardów analitycznych rozpuszczonych w DMSO zamiast docelowych postaci leczniczych, co – jak trafnie zauważa sama Doktorantka w dyskusji – utrudnia bezpośrednie porównanie z danymi literaturowymi uzyskanymi dla preparatów

handlowych; a także braku sparowanych danych indywidualnych PO/IV, co ograniczyło możliwość wyznaczenia odchylenia standardowego dla średniego czasu wchłaniania (MAT).

4. Ocena uzyskanych wyników

Wyniki badań przedstawiono w sposób przejrzysty, wyczerpujący i staranny, z pełną dokumentacją danych indywidualnych oraz zbiorczych zestawień statystycznych dla każdego z badanych związków i układów doświadczalnych. Wykazano, że mimo bliskiego pokrewieństwa strukturalnego badane pochodne izoksazolin nie stanowią jednorodnej grupy farmakokinetycznej u kur niosek. Po podaniu dożylnym najwyższe wartości Cmax oraz najniższe wartości objętości dystrybucji uzyskano dla fluralaneru, natomiast sarolaner charakteryzował się najwyższą ekspozycją ogólnoustrojową (AUC) i najdłuższym czasem przebywania w organizmie (MRT, t1/2kel), a lotilaner – najwyższym klirensem i najszybszą eliminacją, pozostając oznaczalny w osoczu jedynie do 120. godziny wobec 600 godzin obserwacji dla pozostałych związków. Analogiczną hierarchię, z dominującą pozycją sarolaneru pod względem ekspozycji ogólnoustrojowej i czasu przebywania w organizmie, potwierdzono po podaniu doustnym, przy czym wykazano również, że proces wchłaniania badanych związków u kur przebiega istotnie wolniej niż opisywano dotychczas u zwierząt towarzyszących, co Doktorantka trafnie wiąże z odmienną budową i motoryką przewodu pokarmowego ptaków.

Wyniki dotyczące roli transporterów wypływowych stanowią istotny, oryginalny wkład rozprawy do wiedzy farmakologicznej. Zastosowanie elakrydaru, silnego inhibitora P-gp/BCRP, prowadziło do statystycznie istotnego zwiększenia wartości Cmax, AUC0→t, AUC0→∞ oraz dostępności biologicznej (F) fluralaneru, przy jednoczesnym wydłużeniu t1/2kel i obniżeniu kel; podanie oksytetracykliny – substratu tych transporterów – wywoływało zmiany o analogicznym kierunku, choć mniejszym nasileniu. Uzyskany układ wyników jest wewnętrznie spójny i stanowi przekonujący, choć – jak słusznie zaznacza sama Doktorantka – pośredni dowód na udział mechanizmów transportu wypływowego w kształtowaniu ekspozycji ogólnoustrojowej fluralaneru u kur niosek.

Prezentacja wyników, ze względu na bardzo dużą liczbę tabel zawierających dane dla poszczególnych ptaków, jest miejscami mało przystępna i mogłaby zyskać na czytelności poprzez przeniesienie części tabel z danymi jednostkowymi do aneksu, z pozostawieniem w tekście głównym wyłącznie zestawień zbiorczych i wykresów. Uwaga ta ma jednak charakter wyłącznie edytorski i nie umniejsza wartości merytorycznej uzyskanych wyników.

5. Ocena dyskusji i wniosków

Dyskusja jest mocną stroną rozprawy. Doktorantka w sposób krytyczny i wyważony konfrontuje własne wyniki z nielicznymi dostępnymi danymi dotyczącymi fluralaneru u drobiu oraz – z zachowaniem należytej ostrożności interpretacyjnej – z obszerniejszym piśmiennictwem dotyczącym psów, kotów i bydła, trafnie podkreślając ograniczenia prostej ekstrapolacji międzygatunkowej. Dyskusja poprawnie odnosi uzyskane wyniki do sformułowanych na wstępie hipotez badawczych, a wnioski końcowe – trzy główne wnioski merytoryczne wraz z implikacjami klinicznymi i propozycją kierunków dalszych badań – wynikają bezpośrednio z przeprowadzonych badań i są sformułowane w sposób zwięzły oraz adekwatny do uzyskanych danych. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka samodzielnie i uczciwie identyfikuje ograniczenia własnych badań (pośredni charakter dowodu na udział transporterów, różnice formulacji względem preparatów handlowych, brak oceny farmakodynamicznej), co świadczy o dojrzałości naukowej i krytycyzmie badawczym.

Drobną usterką redakcyjną, niewpływającą na wartość merytoryczną pracy, jest dosłowne powtórzenie jednego zdania w akapicie dotyczącym implikacji klinicznych („Obserwowany wpływ substancji modulujących aktywność transporterów wypływowych na farmakokinetykę fluralaneru uzasadnia dalszą ocenę możliwości występowania interakcji farmakokinetycznych…"), które warto usunąć przy przygotowywaniu ostatecznej wersji tekstu.

6. Dorobek naukowy Doktorantki

Dorobek naukowy Doktorantki, związany z rozprawą i wykraczający poza nią, należy ocenić bardzo wysoko. Składa się na niego pięć publikacji w czasopismach indeksowanych w bazie JCR (m.in. Molecules, IF 4,9; Journal of Veterinary Research, IF 1,5; International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, IF 3,4), z których dwie – prezentujące autorską metodę analityczną oraz przegląd farmakologii i toksykologii izoksazolin weterynaryjnych – są bezpośrednio powiązane z tematyką rozprawy, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, a także osiem doniesień konferencyjnych z lat 2015–2026, w tym prezentacja na międzynarodowym kongresie EAVPT (European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology) w Salonikach w 2026 r. Tak udokumentowana aktywność publikacyjna i konferencyjna znacząco przewyższa standardowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie weterynaria i potwierdza samodzielność naukową Doktorantki oraz jej umiejętność prezentowania wyników badań na forum międzynarodowym.

7. Uwagi redakcyjne i formalne

Pod względem redakcyjnym rozprawa została przygotowana starannie. Struktura pracy jest klasyczna i przejrzysta (wstęp z przeglądem piśmiennictwa, cele i hipotezy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, spisy rycin i tabel, obszerny wykaz piśmiennictwa). Bibliografia, licząca 132 pozycji, jest aktualna – obejmuje prace opublikowane jeszcze w 2025 i 2026 r. – i dobrana trafnie pod względem merytorycznym. Streszczenia polskie i angielskie poprawnie oraz zwięźle oddają istotę pracy. Poza wskazaną wyżej pojedynczą powtórzoną frazą oraz miejscową nadmierną szczegółowością tabelaryczną nie stwierdzono istotnych usterek językowych ani edytorskich.

8. Pytania do dyskusji podczas publicznej obrony

1. Jakie są, zdaniem Doktorantki, potencjalne konsekwencje zastosowania jednej dawki (0,5 mg/kg) dla oceny liniowości farmakokinetyki badanych związków, w kontekście dawek stosowanych klinicznie u zwierząt towarzyszących?
2. Czy planowane są badania z wykorzystaniem docelowych, zarejestrowanych postaci leczniczych w celu potwierdzenia uzyskanych wyników w warunkach zbliżonych do praktyki klinicznej?
3. W jaki sposób – w opinii Doktorantki – można by w przyszłości zweryfikować bezpośredni, a nie wyłącznie funkcjonalny/farmakologiczny, udział P-gp i BCRP w transporcie fluralaneru u drobiu, np. z wykorzystaniem modeli komórkowych lub oceny ekspresji transporterów?
4. Czy zaobserwowana interakcja fluralaneru z oksytetracykliną może mieć znaczenie praktyczne w warunkach fermowych, biorąc pod uwagę rzeczywiste schematy stosowania obu substancji u kur niosek?

9. Konkluzja końcowa

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki stanowi oryginalne, metodologicznie rzetelne i starannie udokumentowane rozwiązanie istotnego problemu naukowego z zakresu farmakokinetyki weterynaryjnej. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, obejmującym zarówno planowanie i prowadzenie złożonego eksperymentu *in vivo*, jak i rozwój oraz walidację zaawansowanej metody analitycznej UPLC-MS/MS, a także umiejętnością krytycznej interpretacji uzyskanych

wyników w kontekście aktualnego stanu wiedzy. Praca wnosi nowe, oryginalne dane do wiedzy o farmakokinetyce pochodnych izoksazolin u drobiu oraz o potencjalnej roli transporterów wypływowych w kształtowaniu dostępności biologicznej tych związków. Ze względu na wysoką wartość naukową i praktyczną przeprowadzonych badań, stawiam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie weterynaria oraz dowodzi Jej umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Markowskiej-Buńki spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1–4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm.), wobec czego oceniam ją pozytywnie i wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Poznań, dnia 09.09.2026 r

dr hab. Lidia Radko, prof. UPP

.....Lidia Radko.....

(podpis Recenzenta)