

Autoreferat
w języku polskim

Autoreferat

dr n. wet. Artur Burmańczuk

*Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Zakład Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin*

Lublin 2018

1. Imię i nazwisko

Artur Burmańczuk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2001** Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademii Rolniczej w Lublinie.
- 2008** Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych specjalność – farmakologia weterynaryjna, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie; tytuł rozprawy doktorskiej: *„Określenie farmakokinetyki cefacetrilu po dowymieniowym stosowaniu w stanach zapalnych i fizjologicznych gruczołu mlekowego u krów”*.
- 2012** Dyplom ukończenia studiów podyplomowych. Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego, uzyskany tytuł: specjalista chorób psów i kotów.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1995 – 2001** Student wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie,
- 2002 – 2009** Asystent, Katedra Farmakologii, (od 2003 Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakład Farmakologii) Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademii Rolniczej, (od 2008 Uniwersytet Przyrodniczy) w Lublinie,
- 2009 – nadal** Adiunkt, Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakład Farmakologii, (od września 2017 Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakład Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska), Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 poz. 1789 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.

„Weryfikacja wybranych elementów metodycznych badań farmakokinetycznych i farmakodynamicznych z wykorzystaniem podania dowymieniowego, u bydła mlecznego ze szczególnym uwzględnieniem stosowania modelu kompartmentowego.”

tworzy jednotematyczny cykl następujących publikacji oryginalnych:

4.1.1. Burmańczuk A., Grabowski T., Osypiuk M., Polska B., Kowalski C. (2017) *Determination of cloxacillin residues in dairy cows after intramammary administration.* J Vet Pharmacol Therap, 40 (5): 552-560.
(MNiSW 2017 25; IF 2017 1,202)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4.1.2. Burmańczuk A., Grabowski T., Gbylik-Sikorska M., Gajda A., Kowalski C. (2017) *Withdrawal of amoxicillin and penicillin G procaine from milk after intramammary administration in dairy cows with mastitis.* J Vet Res, 61: 37-43. (wcześniej Bull Vet Inst Pulawy).
(MNiSW 2015 15; IF 2015 0,462)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4.1.3. Burmańczuk A., Grabowski T., Błądek T., Kowalski C., Dębiak P. (2017) *Withdrawal of cefoperazone with milk after intramammary administration in dairy cows – prospective and retrospective analysis.* Pol J Vet Sci, 20: 261-268.
(MNiSW 2017 20; IF 2017 0,697)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4.1.4. Burmańczuk A., Hola P., Wojciechowska B., Kowalski C., Grabowski T. (2017) *Validation of relationship between milk resistance and daily yield of dairy cows.* Pol J Vet Sci, 20: 737-742.
(MNiSW 2017 20; IF 2017 0,697)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

4.1.5. Burmańczuk A., Hola P., Milczak A., Piech T., Kowalski C., Wojciechowska B., Grabowski T. (2018) *Quercetin decrease somatic cells count in mastitis of dairy cows.* Res Vet Sci, 117: 255-259.
(MNiSW 2016 35; IF 2016 1,298)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

Łączna punktacja 5 prac, wchodzących w skład wymienionego wyżej jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*[®] wynosi **115 punktów** MNiSW. Łączny współczynnik wpływu (**IF**) wynosi **4,356**.

Koszty publikacji prac (4.1.1., 4.1.2., 4.1.3.) sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki, numer projektu badawczego: NN308603438; numer umowy: 6034/B/P01/2010/38. Eksperymenty prowadzone w ramach badań przedstawionych w cyklu publikacji stanowiących moją rozprawę habilitacyjną (4.1.4., 4.1.5.) finansowano z tematu statutowego nr WKD/DS-6.

4.2. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.2.1. Wprowadzenie i cel przeprowadzonych badań

Analiza farmakokinetyki leków podawanych dowymieniowo (IMM) stanowi istotny element badań farmakometrycznych, umożliwiając między innymi prawidłowe zaplanowanie dawkowania leku. Podanie IMM jest niezwykle specyficzną drogą podania leku. Umożliwia podanie go wprost do organu docelowego objętego patologią. W przypadku bydła mlecznego IMM stosowanie leków skraca czas potrzebny na dyspozycję leku w obrębie wymienia oraz osiągnięcia oczekiwanego stężenia terapeutycznego. Najczęściej pozwala również na uzyskanie niskich wartości stężenia leku w krążeniu ogólnym oraz tkankach (poza wymieniem). W efekcie podanie IMM pozwala często, na znaczne ograniczenie dystrybucji leku w skali całego organizmu.

Jednym z podstawowych narzędzi analizy farmakokinetyki leków jest podejście wykorzystujące modele matematyczne ilustrujące rozmieszczenie leków na różnych poziomach: komórka, tkanka, organ, narząd, cały organizm. Jednym z częściej stosowanych modeli jest model kompartmentowy. Bliższa analiza problemu właściwego ilustrowania farmakokinetyki leków podawanych IMM oraz stosowania modeli kompartmentowych rodzi jednak pewne pytania.

Jednym z zasadniczych pytań jest stosowanie metod kompartmentowych oraz określenie liczby kompartmentów w przypadku podania leku drogą dowymieniową (praca 4.1.2 oraz 4.1.3). W przypadku IMM podania leków kompartment obejmuje jednorodną pod względem stężenia rozmieszczonego leku strukturę, obejmującą: kanał strzykowy, cysternę mlekonośną oraz mniejsze kapilary. Podany lek podlega dystrybucji z tej przestrzeni do tkanki gruczołu. W związku z bardzo dużą perfuzją narządu krwią, pewna część leku może dostać się do krążenia ogólnego, gdzie podlega zjawiskom dystrybucji, redystrybucji, metabolizmu oraz eliminacji. Jednak kluczowym mechanizmem warunkującym eliminację leku podanego drogą dowymieniową jest proces zdajania mleka. Proces ten postrzegany jest najczęściej, jako uwarunkowany przez dój przemysłowy (np. w 12 godzinnych interwałach). Jednak może być również warunkowany potrzebami ssącego cielęcia. W takich wypadkach interwały, w których eliminacja leku uwarunkowana ubytkiem zdajanego mleka są znacznie krótsze i obejmują okresy, 2-3 godzinne.

Stosowanie modelu dwukompartmentowego możliwe jest jedynie wtedy, gdy możliwe jest wyznaczenie dwóch różnych stałych szybkości, z których jedna relacjonuje dystrybucję a druga eliminację. W przypadku gruczołu mlekowego modelowanie kompartmentowe jest niezwykle złożone. Wynika to z tego, że stała szybkości ilustrująca transfer leku

z kompartmentu, jakim jest mleko do tkanki gruczołu mlekowego często nie jest jednorodna. W zależności od leku może zawierać pewną komponentę eliminacyjną (transfer leku do krążenia ogólnego). Z kolei proces eliminacji indukowany przez udój (zależnego od interwałów udoju przemysłowego lub ssania przez cielęta) może mieć wielokierunkowy wpływ na dystrybucję leku do tkanki gruczołu mlekowego.

Stosowanie modelu dwukompartamentowego w badaniu kinetyki leków podawanych IMM wydaje się być uzasadnione strukturą samego organu. Łatwo można w nim wyróżnić dwa osobne kompartmenty (mleko/tkanki). Jednak, aby analiza dwukompartamentowa była precyzyjna musi jej towarzyszyć odpowiedni schemat pobierania prób do analiz chemicznych (praca 4.1.2 oraz 4.1.3). W przypadku, w którym szybkość dystrybucji leku z przestrzeni, jaką jest mleko do przestrzeni, jaką są tkanki gruczołu mlekowego jest duża, pobieranie prób, co 12 godzin może w konsekwencji maskować fazę dystrybucji. W efekcie w trakcie analizy krzywych ilustrujących zmiany stężenia w mleku faza dystrybucji może być słabo wyrażona lub niewidoczna.

Mając na uwadze powyższe, kolejne pytanie natury metodycznej, na które poszukiwano odpowiedzi w prezentowanych badaniach, obejmuje kwestię interwałów pobierania prób do analiz po jednorazowym dowymieniowym podaniu leku.

czy pobieranie prób w badaniach naukowych powinno odzwierciedlać wyłącznie udój przemysłowy, jako najczęściej stosowany i typowy w hodowli wielkostatdnej bydła mlecznego?

czy powinno odzwierciedlać również dynamikę karmienia młodego bydła i fizjologiczne zdajanie mleka przez cielę?

Problem wyboru interwałów pobierania prób wymaga również odniesienia się do kwestii standaryzacji metodologii badań farmakokinetycznych leków podawanych IMM (praca 4.1.2 oraz 4.1.3). Liczne polemiki z Recenzentami przedstawionych niżej prac dowodzą, że ten aspekt metodyki analiz farmakokinetycznych nadal stanowi kwestię dyskusyjną. Wyniki przedstawionych prac dowodzą jednak, że aby zastosować model dwukompartamentowy pobieranie prób w pierwszych 24 godzinach od podania leku musi być znacznie częstsze niż wynikałoby to z interwałów stosowanych w trakcie udoju przemysłowego. W innym wypadku badacz może nie uzyskać danych na podstawie, których mógłby rzeczywiście stwierdzić istotne różnice w szybkościach obserwowanych procesów. Częste pobieranie prób jest, zatem warunkiem, który umożliwia weryfikację modelu, który najlepiej będzie odzwierciedlał procesy dystrybucji redystrybucji wchłaniania i eliminacji podanego leku.

Model jednokompartamentowy najczęściej stosowany w analizie farmakokinetycznej leków podawanych IMM pozwala na wyznaczenie podstawowych parametrów

farmakokinetycznych leku. Jego elementy są często wykorzystywane w analizie kinetyki pozostałości leków (praca 4.1.1). Model ten wzbogacony o analizę momentów statystycznych takich jak pole powierzchni pierwszego momentu, czy średni czas przebywania leku (MRT), stanowi uzupełnienie analizy pozostałości leku w mleku przeznaczonym do spożycia. Zwykle kluczowym elementem analizy jednokompartmentowej jest wyznaczenie wartości stężenia początkowego oraz szybkości eliminacji (k_{el}). W przedstawionych niżej pracach dowiedziono, że również w przypadku tego typu modeli można napotkać na istotne problemy wynikające z fluktuacyjnego przebiegu fragmentu krzywej relacjonującej proces eliminacji leku z wymienia (praca 4.1.1). Fluktuacyjny przebieg eliminacji leków referowany jest w odniesieniu do różnych leków i dróg podania (Stockler, 2009; Karaś-Trzeciak, 2015). W przypadku badań farmakokinetycznych kloksacyliny podawanej IMM potwierdzono również w tym wypadku fluktuacyjny charakter eliminacji leku (praca 4.1.1). Wnioskiem stanowiącym kompilację obserwacji z prowadzonych prac jest to, że w przypadku fluktuacyjnego charakteru kinetyki eliminacji, można liczyć się z istotnym błędem wyznaczonej wartości k_{el} . Powstaje, więc pytanie, w jaki sposób wyznaczyć stałą szybkości eliminacji w przypadku fluktuacyjnego przebiegu fazy eliminacji? Zgodnie z poczynionymi obserwacjami rozwiązaniem może okazać się wyznaczanie k_{el} z wartości MRT. MRT tylko w przypadku modelu jednokompartmentowego pozwala wyznaczyć k_{el} , ponieważ $MRT=1/k_{el}$. MRT jest parametrem niezależnym od modelu. Wyznaczany jest na podstawie wartości pól powierzchni. Oznacza to, że w przypadku modelu jednokompartmentowego oraz fluktuacyjnej kinetyki eliminacji leku k_{el} wyznaczone na podstawie MRT będzie charakteryzować się niskim błędem.

Kolejnym sposobem na właściwą charakterystykę fazy eliminacji o fluktuacyjnym przebiegu jest wyróżnienie dwóch różnych stałych szybkości, co ma szczególne uzasadnienie w przypadku krów w okresie zasuszania (praca 4.1.1). W tym przypadku z jednej strony można mówić o dwufazowej kinetyce eliminacji kloksacyliny, z drugiej jednak strony trudno przyporządkować nachylenie w początkowej fazie spadku stężeń do szybkiej dystrybucji gdyż proces ten trwa prawie 3 tygodnie od momentu podania leku. Faza ta ma raczej charakterystykę typową dla depo leku w efekcie, którego można obserwować *plateau* stężeń w okresie około 21 dni. Taka charakterystyka kinetyki leku wymaga uważnej analizy, ponieważ może skłaniać badacza do zastosowania modelu dwukompartmentowego, który w tym wypadku może okazać się nieuzasadniony. Przyczyną takiego kwalifikowania modelu może być niejednorodność rzędowości kinetyki na różnych etapach jej obserwacji oraz przejście z kinetyki zerowego rzędu do kinetyki pierwszego rzędu.

Kompartmentowy model rozmieszczenia leku w gruczole mlekowym, stał się również podstawą do zaproponowania schematu dawkowania kwercetyny, w przypadkach *mastitis*

u krów mlecznych (praca 4.1.5). Farmakodynamika kwercetyny po podaniu dowymieniowym jak dotąd nie była badana. Kwercetyna jest substancją aktywną, której skuteczność w przypadkach *mastitis* u bydła mlecznego jak dotąd nie była weryfikowana. Jest to substancja o działaniu immunotropowym, której mechanizm działania jest niezwykle złożony. Kwercetyna ma istotny wpływ na komunikację pomiędzy komórkami immunokompetentnymi. W związku, z czym podjęto próbę weryfikacji potencjalnego efektu działania kwercetyny po podaniu dowymieniowym u krów z *mastitis septica*. W przypadku kwercetyny nie zaproponowano do tej pory żadnego schematu dawkowania oraz wielkości dawki efektywnej w przypadkach *mastitis*. Efekt działania kwercetyny w tym wypadku nie musi być zależny od utrzymania 'steady state' w organie docelowym. Przyczyną jest specyfika oddziaływania na układ immunologiczny i prawdopodobny 'boosting effect' po kolejnych dawkach. Stąd wyznaczenie dawkowania w oparciu o klirens leku i znajomość profilu farmakokinetycznego na etapie badania pilotowego nie było konieczne. Wiadomo jednak, że profil farmakokinetyczny kwercetyny podawanej drogą doustną może mieć charakter dwukompartmenny (Ferry i wsp., 1996; Shao i wsp., 2005). Podstawą do zaproponowania schematu dawkowania stało się więc założenie szybkiej dystrybucji oraz eliminacji z gruczołu mlekowego podobnie jak w przypadku innych dróg podania oraz gatunków (Ferry i wsp., 1996; Shao i wsp., 2005). Zaproponowano więc schemat w którym podawano lek jednorazowo co 24 godziny. W efekcie takiego podejścia uzyskano obraz istotnego trendu spadkowego w odniesieniu do liczby komórek somatycznych w mleku (SCC). Oraz istotny spadek SCC w badanej grupie po 8 dniach stosowania kwercetyny.

Uzupełnieniem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie są badania polegające na analizie korelacji pomiędzy wydajnością mleczną a liczbą komórek somatycznych w mleku (praca 4.1.4). Jedną z częściej stosowanych metod we wstępnej oceny stanu gruczołu mlekowego w stadzie, jest analiza oporności mleka. W przypadku omawianych badań (praca 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3) analiza oporności mleka stanowiła jedno z kryteriów włączenia do grupy doświadczalnej. Zmiany zapalne w gruczole mlekowym są niezwykle istotne z punktu widzenia procesów dystrybucyjnych, redystrybucyjnych oraz eliminacji leku. W istotny sposób modyfikują farmakokinetykę oraz farmakodynamikę leków podawanych IMM. Do dzisiaj nie dowiedziono istotnej korelacji o charakterze predykcyjnym, pomiędzy liczbą komórek somatycznych w mleku a jego opornością. Wiadomo jednak, że zmiana oporności mleka świadczy o zmianach powiązanych z liczbą komórek somatycznych i najczęściej wskazuje na rozwijający się stan zapalny. W ramach przeprowadzonych prac dowiedziono zależności pomiędzy opornością mleka a dobową wydajnością u bydła mlecznego. Zaproponowany model oceniono i zweryfikowano za pomocą procedury walidacyjnej. Ostatecznie w pośredni sposób potwierdzono przydatność analizy oporności

mleka, jako istotnego kryterium włączenia lub wykluczenia z grupy badanej w badaniach farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych leków podawanych IMM.

Celem prowadzonych prac (praca 4.1.1 do 4.1.5) była weryfikacja wybranych elementów metodycznych badań farmakokinetycznych i farmakodynamicznych z wykorzystaniem podania IMM u bydła mlecznego, ze szczególnym uwzględnieniem modelu kompartmentowego.

4.2.2. Oznaczanie pozostałości kloksacyliny po dowymieniowym podaniu u krów mlecznych

Klasyczna analiza farmakokinetyczna po jednorazowym podaniu leku zgodnie z obecnymi wymogami obejmuje swoim zasięgiem przedział trzech okresów półtrwania leku od momentu jego podania (Grabowski i wsp., 2012). Po tym okresie eliminacja leku określana jest mianem okresu wypłukiwania lub wymywania (Riviere & Papich, 2009). Charakter procesu wycofywania/wymywania (w języku angielskim: 'withdrawal', 'wash-out') w przypadku wielu leków jest często obiektem dyskusji ze względu na jego zróżnicowany przebieg. Wiadomo, że kinetyka eliminacji leków wraz z mlekiem może mieć charakter dwufazowy (Stockler, 2009). Wiadomo również, że dystrybucja leku podanego IMM, do krążenia ogólnego w niektórych wypadkach może być bardziej efektywna niż podanie domięśniowe (Soback, 1995). Fakt ten ilustruje to jak ważne są procesy dystrybucji/redystrybucji zachodzące na poziomie samego wymienia w stosunku do leków podawanych IMM. Wiadomo również, że okresowe zmiany w perfuzji tkanki tłuszczowej krwią również może stanowić przyczynę złożonej kinetyki wycofywania leku (Karaś-Trzeciak, 2015).

Celem prowadzonych badań było opracowanie metody analitycznej, która pozwoliłaby oznaczyć kloksacylinę (CLO) na poziomie $\leq 0.5 \times \text{MRL}$ (najwyższego dopuszczalnego stężenia pozostałości) wyznaczonym dla tego antybiotyku, oraz analiza porównawcza charakterystyki wymywania CLO po jednorazowym podaniu leku w okresie laktacji oraz w okresie zasuszenia.

4.2.2.1. Materiały i metody

Badania przeprowadzono na grupie 10 krów w okresie laktacji (LP) i grupie 10 krów w okresie zasuszania (DP) o średniej wadze około 650 kg, rasy czarno białej w wieku 3–12 lat. Zwierzęta otrzymały: w okresie laktacji – Syntarpen 500 mg zawiesinę dowymieniową zawierającą kloksacylinę benzatynową – 500 mg/10g, a w okresie zasuszania – Syntarpen prolongatum 600 mg zawiesinę dowymieniową zawierającą kloksacylinę benzatynową – 600

mg/10g (Biowet Puławy, Polska). Pojedyncza dawka kloksacyliny była podawana w postaci tubostrzykawki do jednego kanału strzykowego. Próbkę mleka od krów w okresie laktacji pobierano po 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144 oraz 156 godzinach od podania leku. Od zwierząt w okresie zasuszania próbkę mleka były pobierane raz dziennie w dniach: 3, 7, 14, 21, 26, 31, 35 i 42 od podania leku. Próbkę mleka poddane były analizie chromatograficznej w celu opracowania metody analitycznej, która pozwoliłaby oznaczyć kloksacylinę oraz porównać jej wymywanie po jednorazowym podaniu w okresie laktacji oraz w okresie zasuszenia.

Badania analityczne zostały wykonane wysokosprawną chromatografią cieczą (HPLC). Obliczenia farmakokinetyczne wykonano za pomocą oprogramowania Phoenix[®] WinNonlin[®] 6.4 (Certara L.P., US). Analizy statystyczne wykonano w programie GraphPad Prism[®] 6.01 (GraphPad Software Inc., US). Kinetyka zmian stężeń w grupie DP w zakresie pomiędzy 3 a 14 dniem od podania ma charakter fluktuacyjny i nie osiąga nachyleń, które pozwalałyby określić w sposób precyzyjny okresu półtrwania w tej fazie. Stwierdzono, że nachylenie zmian stężeń w okresie pomiędzy 3-14 oraz 14 i 21 dniem miały różną charakterystykę. W związku z tym w grupie DP podjęto próbę wykonania charakterystyki szybkości charakteryzujących fazę od 3-14 dnia oraz osobno fazę od 14 do 21 dnia. Celem obliczeń było wyznaczenie okresu półtrwania CLO w przedziale 3-14 dzień od zakończenia terapii ($t_{1/2\ 3-14}$) oraz 14-21 dzień od zakończenia terapii ($t_{1/2\ 14-21}$). W przypadku obliczeń ($t_{1/2\ 3-14}$) punktem wyjścia było wyznaczenie stałej szybkości dla procesu na podstawie analizy pierwszego i drugiego momentu statystycznego w zakresie od 3 do 14 dnia ($AUMC_{3-14}$) oraz średni czas przebywania leku dla tego samego przedziału czasowego (MRT_{3-14}). Aby wyznaczenie MRT_{3-14} było możliwe wyznaczono również pole powierzchni pod krzywą w zakresie czasowym pomiędzy 3 i 14 dniem (AUC_{3-14}). MRT_{3-14} obliczono na podstawie wzoru $MRT_{3-14} = AUMC_{3-14} / AUC_{3-14}$. W przypadku obliczeń $t_{1/2\ 14-21}$ punktem wyjścia było wyznaczenie stałej szybkości dla procesu na podstawie klasycznego wzoru $k_{14-21} = [Ln(C_{21}) - Ln(C_{14})] / (21 - 14)$, gdzie C_{21} – jest stężeniem oznaczonym w dniu 21 u określonego zwierzęcia, C_{14} – jest stężeniem oznaczonym w dniu 14 u określonego zwierzęcia, natomiast 21 oraz 14 stanowią odpowiednie punkty czasowe. Stąd okres półtrwania kloksacyliny w zakresie pomiędzy 14 a 21 dniem obliczono na podstawie wzoru $t_{1/2\ 14-21} = Ln(2) / k_{14-21}$.

Ponieważ obserwowane zmiany stężeń w przypadku grupy LP miały również charakter dwuetapowy, wyznaczenie okresów półtrwania przeprowadzono również w dwóch przedziałach czasowych. Nachylenia wartości stężeń w zakresie pomiędzy 12-60 oraz 18-132 godziną od podania miały różny przebieg. Granicę między przedziałami wyznacza godzina

72. Był to jedyny punkt czasowy w ciągu oznaczeń pomiędzy 12 a 144 godziną od podania leku, w którym we wszystkich analizowanych próbkach stężenia kloksacyliny <LOD (granica wykrywalności). Analogicznie do grupy DP okres półtrwania w fazie szybkiej eliminacji $t_{1/2}$ 12-60 wyznaczono na podstawie nachylenia wartości 5 kolejnych stężeń w zakresie czasowym pomiędzy 12 a 60 godziną. Okres półtrwania w późnej fazie eliminacji $t_{1/2}$ 84-132 wyznaczono na podstawie nachylenia wartości 3 ostatnich stężeń w zakresie czasowym pomiędzy 84 a 132 godziną. Do potwierdzenia istotności poczynionych obserwacji wykorzystano test t Studenta. Za statystycznie istotne uznano różnice, dla których p-value przyjmowało wartości <0,05.

4.2.2.2. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że wymywanie CLO z wymienia zarówno w grupie DP jak i LP ma charakter dwufazowy. W przypadku DP jak wynika z obserwacji kinetyki formulacji typu - powolne uwalnianie, dopiero 21 dni po podaniu kloksacyliny w 70% analizowanych próbek stężenie antybiotyku jest <LOQ (granica oznaczalności). W grupie LP w 72 godzinie od podania leku w 100% próbek stężenie kloksacyliny <LOQ jednak w kolejnych godzinach obserwowano wyraźną redystrybucję tego antybiotyku. W przypadku grupy LP w przedziale czasowym pomiędzy 72-144 godziną w 66.6% analizowanych próbek stężenie kloksacyliny <LOQ. Całkowite wymycie kloksacyliny w grupie DP nastąpiło po 36 dniach natomiast w grupie LP po 6,5 dniach. Uzyskane wyniki wskazują, że stężenie kloksacyliny w mleku krów sukcesywnie maleje, począwszy od pierwszego dnia, w którym zakończono podawanie leku. Należy jednak zauważyć, że dynamika spadku stężeń w obu grupach wyrażona wartościami odpowiednich okresów półtrwania była istotnie różna ($p < 0,05$).

Wymycie CLO na poziomie 100% ($CLO_{100\%w}$) oznacza, że we wszystkich analizowanych próbkach stężenie tego antybiotyku <LOQ następuje odpowiednio po 35 oraz 6,5 dniach. Oznacza to, że wymywanie kloksacyliny jest 5.4 razy krótszy w fazie normalnej laktacji niż w okresie zasuszania, mimo że produkcja mleka w fazie laktacji jest tysiące razy większa niż w fazie zasuszenia (średnia wydajność w grupie LP to 25 l/24 godziny). Różnica w ilości produkowanego mleka nie przekłada się, więc na różnice w szybkości wycofywania CLO z wymienia w sposób liniowy. Przepływ krwi przez wymię w trakcie laktacji rośnie w stosunku do okresu zasuszania około 3,8 krotnie (Bertulat, 2014). Potwierdzałoby to do pewnego stopnia hipotezę mówiącą o tym, że różnice w wycofywaniu CLO z wymienia krów jest zależna raczej od zmieniającej się perfuzji krwią niż rosnącej produkcji mleka. Tym bardziej, że wykazano, iż beznizylopenicyliny po podaniu dowymieniowym (IMM) trafiają do krążenia ogólnego na drodze transportu aktywnego (Schadewinkel-Scherkl i wsp., 1993). Po

podaniu IMM. wysyceniu lekiem ulegają również tkanki wymienia (Ehinger & Kietzmann, 2000). Hipoteza ta znajduje również wsparcie w strukturze fizykochemicznej tego leku, co oznacza, że niechętnie rozpuszcza się w mleku. Ma jednak zdecydowanie lipofilny charakter (XLogP 2,4) przy zachowaniu niskiej wartości pola polarnego powierzchni cząsteczki równej ok 138 Å² (NCBI, 2016). Oznacza to, że może łatwo penetrować tkanki i chętnie rozmieszczać się w tkance tłuszczowej. To z kolei sprzyja procesom redystrybucyjnym zarówno z leku zdeponowanego w tkankach wymienia jak i z puli, jaka mogła znaleźć się w krążeniu ogólnym. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pierwszej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Burmańczuk A., Grabowski T., Osypiuk M., Polska B., Kowalski C. (2017) *Determination of cloxacillin residues in dairy cows after intramammary administration.* J Vet Pharmacol Therap, 40(5): 552-560.

4.2.3. Pozostałości amoksycyliny i penicyliny G prokainowej w mleku po dowymieniowym podaniu u krów mlecznych z *mastitis*

Stosowanie aminopenicylin i penicylin w leczeniu zwierząt może być przyczyną obecności pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego (Khaskheli i wsp., 2008; Movassagh & Karami, 2011). W związku z powyższym przeprowadzono badania farmakokinetyczne po jednorazowym podaniu aminopenicyliny i penicyliny G prokainowej w celu określenia okresów karencji w mleku.

4.2.3.1. Materiały i metody

Badanie przeprowadzono na 17 krowach rasy polskiej czarno-białej w wieku 4-10 lat w wadze około 650 kg każda, z klinicznymi przypadkami *mastitis* w okresie laktacji. Średnia wydajność mleczna wynosiła ok. 25-30 l/24 godziny. Pierwsza grupa krów (n=8) otrzymała 5 ml roztworu wodnego zawierającego 200 mg AMX (Synulox LC, Pfizer®), podczas gdy druga grupa (n=9) otrzymała 5 ml roztworu wodnego zawierającego 200 000 IU mg PEN (Albadry Plus®, Zoetis) Obie grupy dostały leki tubostrzykawką do jednego kanału strzykowego. Następnie pobrano próbki mleka (10 ml) w następujących punktach czasowych: PEN i AMX po: 2, 4, 6, 8, 10, 24, 36, 48 i 60 godzinach od aplikacji leku. Do pomiaru stężenia AMX i PEN w mleku po podaniu IMM zastosowano metodę tandemowej spektrometrii masowej sprzężonej z wysokosprawnym chromatografem cieczowym (HPHPLC-MS/MS).

Obliczenia farmakokinetyczne wykonano za pomocą oprogramowania Phoenix[®] WinNonlin[®] 6.4 (Certara L.P., US), analizy statystyczne w programie GraphPad Prism[®] 6.01 (GraphPad Software Inc., US). Obliczenia wykonano w oparciu o teorię momentów statystycznych oraz zmodyfikowany model dwukompartментowy rozmieszczania leków. W ramach SHAM obliczono: AUC_{0-t} – pole powierzchni pod krzywą (AUC) obliczone pomiędzy zerem a ostatnim punktem próbkowania; AUC_{0-inf} – AUC obliczone między zero a nieskończonością; $AUMC_{0-t}$ – pole pod pierwszym momentem krzywej obliczony między zerem a ostatnim punktem próbkowania; $AUMC_{0-inf}$ – pole pod pierwszym momentem krzywej obliczony między zero a nieskończonością; MRT_{0-t} – średni czas przebywania obliczony dla ostatniego punktu pobierania próbek; MRT_{0-inf} – średni czas przebywania leku obliczony na podstawie pól zliczanych od zera do nieskończoności; $AUC_{rest\%}$ – procentowa wartość resztkowego pola powierzchni; C_{max} – maksymalne stężenie; t_{max} – czas osiągnięcia maksymalnego stężenia; C_{last} – ostatnie obserwowane stężenie; t_{last} – czas ostatniego obserwowanego stężenia; k_{el} – stała szybkości eliminacji. W ramach badań kompartmentowej strony stałej dalej: k_d – stała szybkości dystrybucji; $t_{1/2kel}$ – okres półtrwania w fazie eliminacji; $t_{1/2kd}$ – okres półtrwania w fazie dystrybucji; B – stężenie ekstrapolowane w fazie eliminacji; A – stężenie ekstrapolowane w fazie dystrybucji; k_{10} – stała szybkości eliminacji z kompartmentu mleka (centralnego); k_{20} – szybkość eliminacji z kompartmentu tkankowego; k_{12} – stała szybkości transferu między mlekiem i tkankami wymienia; k_{21} – stała szybkości transferu między kompartmentem tkanek wymienia, a mlekiem; CL – klirens całkowity; V_1 – objętość dystrybucji – kompartment centralny; V_2 – objętość dystrybucji – kompartment tkankowy. W ramach analizy kompartmentowej wyróżniono dwa kompartmenty. Pierwszy – kompartment centralny, w skład którego zaliczono mleko obecne w kanale strzykowym oraz zatokach strzykowych. Jako kompartment drugi zdefiniowano tkanki wymienia. Stała szybkości k_d ilustruje więc w tym wypadku stałą szybkości eliminacji leku wraz z mlekiem. Stąd równanie pozwalające na obliczenie stężenia AMX oraz PEN w dowolnym momencie czasowym (C_p) po IMM podaniu ma strukturę typową dla modelu dwukompartmentowego:

$$C_p = A \times e^{-k_d \times t} + B \times e^{-k_{el} \times t} .$$

Natomiast stała szybkości eliminacji k_{el} reprezentuje transfer leku z mleka do tkanek. Do potwierdzenia istotności poczynionych obserwacji wykorzystano test t Studenta. Za statystycznie istotne uznano różnice, dla których p-value przyjmowało wartości <0,05.

4.2.3.2. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że po podaniu dowymieniowym zarówno AMX jak i PEN możemy zaobserwować natychmiastowe maksymalne stężenie w osoczu. Przeprowadzone

obliczenia wskazują na to, że PEN jest lekiem o dużej zmienności indywidualnej. Zmienność ta w przypadku PEN klasyfikowała się na poziomie $AUC_{0-t} > 30\%$. Ta sama wartość w przypadku AMX wynosiła tylko 18%. W przypadku C_{max} zarówno AMX jak i PEN osiągnęły niskie wartości zmienności międzypersonicznej odpowiednio na poziomie 18 i 17%. Należy zauważyć, że zmienność międzypersoniczna w przypadku pozostałych badanych parametrów była niska (na zbliżonym poziomie AMX i PEN) jednak w niektórych przypadkach stwierdzono znaczące różnice. Zmienność wartości k_{12} (67%) była dwukrotnie a k_{20} (91%) trzykrotnie wyższa w przypadku PEN. Zmienność A (132%) była 3,6 razy wyższa w przypadku PEN. Zaproponowany model dwukompartmenny został zweryfikowany w trakcie obliczeń. Wartość k_d/k_{el} wyniosła w przypadku AMX i PEN odpowiednio 9.1 i 14.1. Oznacza to, że procesy określane mianem dystrybucji osiągnęły w obu przypadkach szybkość dziewięć i czternastokrotnie wyższą od wyznaczonej k_{el} . Wartość $t_{1/2k_{el}}$ obliczona na podstawie MRT_{0-t} była 4,1 oraz 5,5 razy krótsza niż obliczona na podstawie k_{el} . Wyznaczone wartości okresu półtrwania AMX i PEN w gruczole mlekowym sugerują wymywanie AMX i PEN na poziomie 99,90% ($10 \times t_{1/2k_{el}}$) w czasie równym 81 (AMX $\approx 3,5$ dnia) i 116 godzin (PEN ≈ 5 dnia) od momentu podania leku. Kinetyka obu leków szczególnie w zakresie analizy stałych szybkości okazała się bardzo zbliżona. Istotne różnice obejmowały jedynie k_{el} , $t_{1/2k_{el}}$ oraz k_{21} .

Nie ulega wątpliwości, że profil farmakokinetyczny AMX oraz PEN jest niezwykle podobny. Zaobserwowane różnice są zdecydowanie niewielkie i w większości nieistotne statystycznie ($p > 0,05$). Ciekawym elementem kinetyki AMX i PEN jest to, że obydwa leki po podaniu IMM charakteryzuje typowa kinetyka dwukompartmenna. Dystrybucja obu leków do kompartmentu tkankowego jest zdecydowanie wyodrębnioną fazą kinetyczną. Oznacza to, że istotnym elementem eliminacji leku jest transfer z mleka do tkanek oraz transfer z tkanek wymienia do krążenia ogólnego. Jednym z elementów dystrybucji jest wymywanie leku wraz z mlekiem, jednak znaczna dynamika tej fazy zachowana jest w obu przypadkach tylko do ok 12 godzin od podania leków. Oznacza to, że wymywanie AMX oraz PEN nie jest procesem uzależnionym jedynie od produkcji mleka przez gruczoł mlekowy. W kolejnych godzinach od podania leku nachylenie krzywej stężeń jest znacznie bardziej łagodne, a wymywanie jest głównie uzależnione od wzajemnego stosunku trzech stałych szybkości k_{12} , k_{21} oraz k_{10} . k_{20} przyjmuje w przypadku obu leków wartości bardzo duże. Oznacza to, że jeśli lek znajdzie się w kompartmentcie tkankowym usuwany jest z niego z bardzo dużą szybkością. Jeśli przyjąć, że k_{10} to lek usuwany wraz z mlekiem, to szybkość usuwania AMX oraz PEN z tkanek jest odpowiednio aż 31 i 52 razy większa, niż szybkość wymywania leku wraz z mlekiem. W obu przypadkach transfer leku do tkanek jest jednak procesem dość powolnym. Wskazuje na to stosunek k_{21}/k_{12} , z którego wynika, że transfer AMX oraz PEN

z mleka do tkanek jest odpowiednio aż 30 i 33 razy wolniejszy niż z tkanek do mleka. Fakt ten tłumaczy m.in bardzo szybkie oczyszczanie kompartmentu tkankowego (k_{20}) z obu leków.

Przeprowadzone obliczenia wskazują, że po jednorazowym dowymieniowym podaniu AMX jego stężenie w mleku wynosi 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ po 60 godzinach od podania leku. Należy jednak zauważyć, że zmienność międzyosobnicza dla tego punktu czasowego w przypadku AMX wynosi aż 61%. Oznacza to, że po 60 godzinach od podania AMX nadal stężenie leku może być na poziomie nawet 3,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Należy zaznaczyć, że w USA, Francji i Portugalii obowiązuje tylko 24 godzinny okres karencji na mleko dla IMM formulacji zawierającej AMX (EMA, 2013; FDA, 2015). Tym czasem z obecnych obliczeń wynika, że u krów rasy czarno białej z klinicznymi objawami *mastitis* stężenie AMX w mleku po 24 godzinach od podania leku w dawce 200 mg może mieć średnią wartość nawet dwunastokrotnie wyższą (>48 $\mu\text{g}/\text{kg}$) od MRL (4 mg/kg).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że w przypadkach *mastitis* okres karencji równy 72 godziny pozwala na wymycie AMX do poziomu niższego od ustalonych wartości MRL. Jednak w przypadku PEN w 69 godzinie od podania leku nadal stężenie w mleku może być bliskie wartości wyznaczonego MRL. Oznacza to, że zależnie od zmienności międzyosobniczej, różnic rasowych, różnic wynikających z żywienia bądź zmian w przepływie krwi przez wymię, próg ten może zostać przekroczony. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w drugiej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Burmańczuk A., Grabowski T., Gbylik-Sikorska M., Gajda A., Kowalski C. (2017) *Withdrawal of amoxicillin and penicillin G procaine from milk after intramammary administration in dairy cows with mastitis*. J Vet Res, 61: 37-43.

4.2.4. Pozostałości cefoperazonu w mleku po dowymieniowym podaniu u krów mlecznych - analiza retrospektywna i prospektywna.

Antybiotyki powinny być stosowane tylko w uzasadnionych przypadkach (Gruet i wsp., 2001; Guterbock i wsp., 1993). Niekontrolowane stosowanie cefalosporyn w terapii zwierząt może być przyczyną obecności pozostałości tych antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego (Novelli i wsp., 2000).

Celem obecnej pracy było wyznaczenie parametrów kinetyki wmywania cefoperazonu (CEF) z użyciem HPHPLC-MS/MS. Dokonano przy tym retrospektywnej analizy wyników uzyskanych metodą mikrobiologiczną z użyciem obecnie dostępnego oprogramowania (Wilson i wsp., 1986). Uzyskane wyniki porównano również do wyników

badan przeprowadzonych z użyciem detekcji spektrofotometrycznej sprzężonej z wysokosprawnym chromatografem cieczowym (HPLC-UV), (Cagnardi i wsp., 2010). Ponadto celem przeprowadzonych analiz była retrospektywna i prospektywna analiza porównawcza farmakokinetyki CEF po jednorazowym IMM podaniu leku u krów.

4.2.4.1. Materiały i metody

W pracy analizowano dane prospektywne (badanie A) oraz 3 grupy danych retrospektywnych (B, C, D). W badaniu B analizy stężenia CEF dokonano metodą bakteriologiczną (Wilson i wsp., 1986) zaś w badaniu C (początkowa faza laktacji) oraz D (końcowa faza laktacji) zastosowano HPLC-UV (Cagnardi i wsp., 2010).

Badanie A przeprowadzono na 9 krowach rasy polskiej czarno-białej w wieku 4-10 lat z klinicznym zapaleniem wymienia w okresie laktacji. Krowy badano w różnych okresach laktacji tj. od 1,5 miesiąca po wycieleniu do okresu wstępnego zasuszenia. Średnia wydajność mleczna u krów wynosiła 25-30 l/24 godziny. Krowy ważyły ok. 650 kg każda. Zwierzęta otrzymały 5 ml roztworu wodnego zawierającego 250 mg CEF (Pathozone[®] 250 mg/10 ml, Pfizer[®]), do jednego kanału strzykowego. Następnie, po jednorazowym podaniu IMM, próbki mleka (10 ml) zebrano w następujących punktach czasowych: 2, 4, 6, 8, 10, 24, 36, 48, 72 i 84 godziny. Zastosowano metodę analityczną (Błądek i wsp., 2011) do oznaczenia CEF w badaniu A.

Analizę farmakokinetyczną przeprowadzono na podstawie surowych danych przy użyciu oprogramowania Phoenix[®] WinNonlin[®] 6.4 (Certara L.P., US), a analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem programu GraphPad Prism[®] 6.01 (GraphPad Software Inc., US). Obliczenia wykonano w oparciu o teorię momentów statystycznych oraz adaptowany dwukompartментowy model dystrybucji leku po podaniu IMM. Ponadto z racji braku danych wyjściowych w publikacji Cagnardi i wsp., 2010 (badanie C, D), do analizy porównawczej pobrano jedynie kluczowe parametry farmakokinetyczne takie jak AUC_{0-t} , $AUMC_{0-t}$, MRT_{0-t} , $t_{1/2kel}$, C_{max} . W badaniach C i D obliczono dodatkowo wartość klirensu na podstawie wzoru $Cl = D / AUC_{0-t}$ gdzie D oznacza dawkę leku podaną do jednej ćwiartki. Powyższe parametry obliczono również w odniesieniu do badania A i B rozszerzając analizę o AUC_{0-inf} , $AUMC_{0-inf}$, MRT_{0-inf} , $AUC_{rest\%}$, t_{max} , C_{last} , t_{last} , k_{el} , k_d , $t_{1/2kd}$, B , A , k_{10} , k_{20} , k_{12} , k_{21} , V_1 , V_2 .

We wszystkich badaniach (A, B, C, D) $t_{1/2MRT}$ - okres półtrwania w fazie eliminacji w oparciu o MRT_{0-t} obliczono stosując równanie $t_{1/2MRT} = \ln(2) / (1/MRT_{0-t})$. Analiza kompartментowa obejmowała dwa kompartментy. Pierwszym z nich był kompartмент centralny obejmujący mleko obecne w kanale strzykowym i zatoce mlecznej. Tkanki

wymienia zdefiniowano, jako kompartment tkankowy. W badaniach A i B w oparciu o minimalne stężenie hamujące (MIC90) wyznaczono czas (T) w którym minimalne stężenie hamujące obejmowało 90% populacji *S. aureus* ($T > MIC90$) podobnie jak to miało miejsce w badaniach Cagnardi i wsp., (2012). W badaniu Cagnardi $T > MIC90$ wyznaczono w oparciu o krzywą stężeń wyznaczoną na podstawie dawki równej 300 mg/ćwiartkę. W badaniach A i B z kolei zastosowano dawkę 250 mg/ćwiartkę w związku, z czym obliczono również wartość znormalizowaną wielkością dawki $T > MIC90$. Stąd dane surowe wykorzystane do obliczeń farmakokinetycznych w badaniu A i B przemnożono $\times 1.2$. Do potwierdzenia znaczenia tych obserwacji wykorzystano test t Studenta. Różnice o wartości $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

4.2.4.2. Wyniki i dyskusja

W wyniku ponownego obliczenia parametrów PK w badaniu B oraz C, D stwierdzono, że AUC_{0-t} w badaniu A jest ponad 12 krotnie wyższe niż w badaniu B, ponad dwukrotnie wyższe niż w badaniu C oraz o połowę niższe od AUC_{0-t} wyznaczonego w badaniu C. Równocześnie stwierdzono że $AUMC_{0-t}$ w badaniu A jest ponad 4 krotnie wyższe niż w badaniu B, natomiast różnica w stosunku do $AUMC_{0-t}$ wyznaczonego w badaniu C i D nie jest istotna ($p > 0,05$). W odniesieniu do MRT_{0-t} w badaniach A, B oraz C uzyskano trzy istotnie różne wartości ($p < 0,05$). Tylko w przypadku badania A i D różnice w wartości MRT_{0-t} nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$). W przypadku badań A, B oraz D stosunek $t_{1/2kel}$ do $t_{1/2MRT}$ wyniósł odpowiednio 4,07, 1,91 oraz 1,95. Tylko w przypadku badania C, $t_{1/2MRT}$ był dłuższy od $t_{1/2kel}$.

W odniesieniu do C_{max} analizie porównawczej można poddać jedynie badania A, C oraz D z uwagi na zbliżone wartości t_{max} oscylujące w granicach 0,5-2 godzin od podania leku. C_{max} w badaniu D ($t_{max}=1$ godzinę) jest prawie dwukrotnie wyższy od C_{max} w badaniu A ($t_{max}=1$ godzinę) ($p < 0,05$). Jednak C_{max} w badaniu C ($t_{max}=0,6$ godziny) jest 2,7 razy niższy niż w badaniu A ($t_{max}=1$ godzinę) ($p < 0,05$). Z uwagi na brak analizy pola w zakresie 0-12 godzin od podania leku w badaniu B nie poddano analizie porównawczej wartości CL obliczonej w badaniu B która jest silnie uzależniona od AUC_{0-t} . Nie stwierdzono istotnej różnicy między CL obliczonym w badaniu A i D. Stwierdzono natomiast istotną różnicę wartości CL pomiędzy badaniami A, D oraz C ($p < 0,05$). W przypadku badania C wartość CL była 3 krotnie wyższa niż w badaniach A oraz D. Czas całkowitego wymywania CEF wyrażony wartością $10 \times t_{1/2kel}$ w grupach A, B, C oraz D był różny i wyniósł odpowiednio 5,7, 8,0, 2,2 oraz 2,2 dnia od podania leku odpowiednio. Zarówno w badaniu A jak i B,

w których możliwe było wyznaczenie parametrów modelu kompartmentowego $k_{el} \approx k_{21}$ natomiast $k_d \approx k_{10}$.

Analizie poddano homogenność uzyskanych wyników. Dla wybranych parametrów obliczono RSD%. W przypadku AUC_{0-t} RSD% w badaniach A, B, C i D wyniosło odpowiednio 14,7, 14,5, 17,5 oraz 52,5%. W odniesieniu do $AUMC_{0-t}$ zmienność w badaniach A, B, C i D oszacowano na poziomie 37,3, 13,4, 13,8 oraz 14,0 RSD%. W przypadku MRT_{0-t} RSD% w badaniach A, B, C i D wyniosło odpowiednio 20,7, 1,2, 13,5 oraz 43,9%, natomiast $t_{1/2kel}$ 9,5, 24,7, 21,2 oraz 24,9% odpowiednio. W przypadku C_{max} oraz CL RSD% w badaniach A, B, C i D wyniosły odpowiednio 12,0, 16,0, 15,5, 42,5 oraz 13,4, 14,7, 19,6, 59,4.

Średnia zmienność AUC_{0-t} , $AUMC_{0-t}$, MRT_{0-t} , $t_{1/2kel}$, C_{max} oraz CL w badaniach A, B oraz C była na zbliżonym poziomie i wynosiła 16,28% natomiast w przypadku badania D 39,52%. Pod tym względem badanie to odbiegało od wszystkich pozostałych. Zaproponowany model dwukompartментowy został zweryfikowany w trakcie obliczeń. Wartość k_d/k_{el} wyniosła w przypadku badania A i B 9,83 i 4,07 odpowiednio. Oznacza to, że procesy określane mianem dystrybucji osiągnęły w obu przypadkach szybkości dziewięć i czterokrotnie wyższe od wyznaczonej k_{el} .

W przedstawionej pracy wykonano badania z zastosowaniem techniki HPHPLC-MS/MS a wyniki analizy farmakokinetycznej porównano do badań przeprowadzonych z zastosowaniem metody mikrobiologicznej oraz HPLC-UV. Metoda analityczna zastosowana w badaniu A była 5 krotnie czulsza od metod zastosowanych w badaniach B, C oraz D. Do tej pory nie poddawano powtarzanej retrospektywnej analizie farmakokinetycznej danych uzyskanych metodą mikrobiologiczną po IMM podaniu CEF. Jedną z obserwacji wynikających z porównania analizowanych badań jest to, że kinetyka CEF wyznaczona metodą mikrobiologiczną 30 lat temu (badanie B) jest zbieżna z obserwacjami, jakich dokonano z użyciem 5 krotnie czulszej techniki HPHPLC-MS/MS przez autorów manuskryptu (badanie A). Badania A i B dały zbliżone wyniki, jeśli chodzi o poziom kluczowych parametrów farmakokinetycznych relacjonujących poziom dystrybucji leku do tkanek (V_2) a także $t_{1/2kel}$.

W badaniach A, B oraz D, $t_{1/2MRT} < t_{1/2kel}$, co oznacza, że analizowanych procesów nie można zaliczyć do kinetyki jednokompartментowej. Badaniach A, B oraz D relacjonują dwukompartментowy model dyspozycji CEF. W przypadku badania C kinetyka eliminacji leku uzyskała przebieg bliższy modelowi jednokompartментowemu, ponieważ w tym wypadku $t_{1/2MRT} > t_{1/2kel}$. Dystrybucja CEF do kompartментu tkankowego jest zdecydowanie wyodrębniona fazą kinetyczną. Istotnym elementem eliminacji leku jest transfer CEF z tkanek do mleka oraz transfer z tkanek wymienia do krążenia ogólnego.

Zastosowano metody o różnym poziomie czułości (LOQ). Zróznicowanie schematów i założeń analizowanych badań utrudnia analizę porównawczą charakterystyki farmakokinetycznej CEF. W badaniach A, C oraz D wydajność mleczna była na podobnym poziomie. Jednak w badaniu B wydajność mleczna była na poziomie, co najmniej 3 krotnie niższym. Produkcja mleka w przypadku podania IMM jest jednym z ważniejszych elementów modyfikujących kinetykę jego eliminacji. k_{10} jest stałą szybkości, której wartość jest ściśle uzależniona od wydajności mlecznej. W przypadku badania A (wydajność mleczna 25-30 l/24 godziny) i B (wydajność mleczna 10 l/24 godziny) możliwe było wyznaczenie k_{10} , przy czym wartość k_{10} w badaniu B była około $3\times$ niższa niż w A. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w trzeciej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Burmańczuk A., Grabowski T., Błądek T., Kowalski C., Dębiak P. (2017) *Withdrawal of cefoperazone with milk after intramammary administration in dairy cows – prospective and retrospective analysis.* Pol J Vet Sci, 20: 261-268.

4.2.5. Zależność między opornością mleka na dzienną wydajność mleczną u krów.

Utrzymanie produkcji mleka na stabilnym i przewidywalnym poziomie jest jednym z głównych celów hodowców krów mlecznych. Wczesna identyfikacja potencjalnych zagrożeń takich jak stany podkliniczne *mastitis* lub klinicznego *mastitis* umożliwia osiągnięcie tego celu. Jednym z podstawowych narzędzi, jakim posługują się osoby nadzorujące hodowlę w celu szybkiej analizy stanu zdrowotności wymienia jest analiza oporności (R) lub analiza konduktywności (EC) zdawanego mleka (Caria i wsp., 2016; Zaninelli i wsp., 2016; Zecconi i wsp., 2004). Analizy takie, choć nie umożliwiają korelacji z liczbą komórek somatycznych (SCC) pozwalają na łatwe monitorowanie stada w trybie ciągłym (Hamann & Gyodi, 1994; Juozaitiene i wsp., 2010, Norberg i wsp., 2004). Obecnie zależności pomiędzy stanem zaawansowania *mastitis* a EC lub R z uwagi na brak liniowej zależności z liczbą komórek somatycznych (SCC) oceniane są najczęściej w ramach modeli klasyfikacyjnych lub mieszanych modeli liniowych (Wilson i wsp., 2004).

EC mleka w granicach $\approx 4-6$ mS/cm lub R w przedziale $\approx 167-250$ Ω (wskazania DRAMINSKI[®] *Mastitis* Detector $\approx 324-487$) uważana jest za poziom odpowiadający stanom fizjologicznym gruczołu mlekowego (Ferrero i wsp. 2014). Obniżona wartość R mleka (< 167 Ω) lub podwyższona EC (> 6.0 mS/cm) wskazuje na zwiększenie liczby jonów w mleku (Ferrero i wsp., 2014). Zjawisko to kojarzone jest z większą przepuszczalnością przestrzeni międzykomórkowych w gruczole mlekowym towarzyszącym początkowej fazie stanu zapalnego tkanki gruczołowej. To z kolei towarzyszy zwiększonej przepuszczalności jonów

Cl⁻, K⁺, Na⁺ obecnych w płynie międzykomórkowym (Ferrero i wsp., 2014). Dotychczas R lub EC mleka nie była korelowana wprost z średnią dobową wydajnością w stadzie (MDY) (Lukas i wsp., 2009; Vilas Boas i wsp., 2016; Wilson i wsp., 2004). Modelowanie takiej zależności na wysokim poziomie istotności nie zostało do tej pory przedstawione (Vilas Boas i wsp., 2016). Jak dotąd nie przedstawiono łatwego w stosowaniu narzędzia pozwalającego na monitorowanie wydajności stada tylko na podstawie pomiaru R mleka. Wpływ strat MDY wywołanych *mastitis* jest faktem dobrze znanym (Wilson i wsp., 2004). Jednak jak dotąd nie określono w precyzyjny sposób związku między R a MDY w ramach modelu liniowego.

Celem pracy było znalezienie liniowej zweryfikowanej procedurą walidacyjną, zależności pomiędzy R a MDY (R↔MDY), która mogłaby służyć do bieżącego monitorowania i prognozowania wydajności w stadzie krów mlecznych.

4.2.5.1. Materiały i metody

Z grupy ponad 928 krów mlecznych wyodrębniono 118 krów spełniających kryteria włączenia do badania. Kluczowym kryterium był czas ostatniego wycielenia przypadający na przełom grudnia/stycznia 2015/2016 roku. Kolejnym kryterium włączenia był monitoring R prowadzony w czasie 9 miesięcy od ostatniego wycielenia. Do analizy pobierano mleko z początkowej/końcowej fazy doju. Do analiz wykorzystano 913 pomiarów R oraz 929 danych reprezentujących MDY. Dane pozyskano w okresie 9 miesięcy monitorowania stada pomiędzy styczniem a wrześniem 2016 roku. Przeprowadzane badania wykonano na podstawie danych pozyskanych w trakcie prowadzenia rutynowej kontroli R mleka. W tym celu wykorzystano DRAMINSKI[®] Mastitis Detector 4×4Q, (Dramiński[®], Poland), (Ferrero i wsp., 2014; Hamann i wsp., 1995; Iraguha i wsp., 2015).

Analizę danych surowych przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism[®] v. 6.01 (GraphPad Software Inc.). Walidację modelu zależności R↔MDY przeprowadzono metodą 'live-one-out' (LOO) (Grabowski i wsp., 2012; Todeschini i wsp., 2004). Ostateczny model został zweryfikowany przez najwyższą wartość testu Fishera (przedział ufności 95%), a $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne. Dodatkowo dla procedury LOO wyznaczono współczynnik determinacji (R^2) dla wartości obserwowanych w stosunku do przewidywanego MDY (w oparciu o dane równania modelu), współczynnik korelacji zweryfikowano krzyżowo (Q^2) a różnice między Q^2 i R^2 obliczono jako miarę wewnętrznej wydajności i zdolności predykcyjnych modelu. Różnicę pomiędzy dopasowaniem i zdolnością predykcyjną modelu analizowano za pomocą różnicy między współczynnikiem korelacji asymptotycznego współczynnika kwadratów (Q^2_{asym}) i Q^2 . Kryteria akceptacji walidacji, które musiały być spełnione przez zoptymalizowany model, zostały przyjęte

na poziomie: $Q^2 \geq 0,65$, $R^2 \geq 0,85$, $Q^2 - R^2 < 0,3$, $Q^2_{\text{asym}} - Q^2 >$ między -0,005 a 0,005 (Todeschini i wsp., 2004).

4.2.5.2. Wyniki i dyskusja

Monitorowane stado w trakcie miesiący, w których analizowano wydajność oraz R mleka wyprodukowało ponad 1100 ton mleka. Minimalna wartość MDY wyniosła $30,16 \pm 7,74$ l/24 godziny i zaobserwowano ją w 9 miesiącu laktacji. Najwyższa wartość MDY wyniosła $45,24 \pm 9,05$ l/24 godziny i zaobserwowano ją w 2 miesiącu laktacji. Między 2, 3, 4 oraz 5 miesiącem laktacji średnia arytmetyczna MDY nie różniła się w sposób statystycznie istotny $p > 0,05$. Statystycznie istotny wzrost produkcji nastąpił w okresie pomiędzy pierwszym oraz drugim miesiącem laktacji $p < 0,05$. Istotnie wyższa produkcja mleka zarówno w stosunku do miesiąca 7-ego jak i 9-ego miała miejsce w odniesieniu do wyników z wszystkich poprzedzających miesięcy $p < 0,05$. Minimalna średnia geometryczna/arytmetyczna R mleka została zaobserwowana w pierwszym miesiącu laktacji i wyniosła $53,40/254,86$ Ω. Natomiast maksymalna średnia geometryczna/arytmetyczna R mleka została zaobserwowana w 7-mym miesiącu laktacji i wyniosła $189,62/574,51$ Ω. Zarówno w odniesieniu do średniej arytmetycznej jak i średniej geometrycznej były one istotnie różne w zakresie wszystkich analizowanych miesięcy. Przy czym średnie arytmetyczne w każdym przypadku miały wartości znacznie wyższe od średnich geometrycznych.

W trakcie prowadzonych analiz nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy R wyrażoną średnią arytmetyczną bądź geometryczną a średnią arytmetyczną MDY lub średnią geometryczną MDY. Stwierdzono natomiast istotne zależności pomiędzy procentową liczbą krów w stadzie o określonej wartości R mleka a MDY. Najwyższa wartość testu F została osiągnięta dla zależności pomiędzy MDY a procentowym udziałem krów w stadzie, których R wahała się w granicach $49,38-154,32$ Ω. Wartość testu F osiągnięto w tym wypadku na poziomie 59,4 1 przy CI 95% oraz $p < 0,002$. Dla innych badanych przedziałów wartość testu F była niższa. Uzyskana korelacja jest statystycznie istotna i predykcyjna. Opisuje ją równanie krzywej $MDY = -04461 \times R\% + 51.58$, gdzie $R\%$ jest to procentowy udziałem krów w stadzie, których R waha się w granicach $49,38-154,32$ Ω. Pełną predykcyjność modelu w wyżej wymienionych granicach potwierdzają wyniki walidacji, które uzyskano na poziomie: $Q^2 = 0,9286$, $R^2 = 0,9305$, $Q^2 - R^2 = 0,002$, $Q^2_{\text{asym}} - Q^2 = 0,0019$.

W przedstawionej pracy dokonano analizy zależności pomiędzy DMY a R mleka na przestrzeni 9 miesięcy. Potwierdzono, że analizy tego typu pozwalają na kontrolowanie zdrowotności stada oraz prognozowanie MDY w stadzie. W niniejszej pracy zweryfikowano zależność między R a MDY na podstawie analizy kompletnego cyklu produkcyjnego.

Począwszy od rozpoczęcia aż do zakończenia laktacji. Profil zmian MDY w trakcie laktacji miał typowy przebieg. Przeprowadzone w pracy analizy dowodzą, że średnia arytmetyczna R mleka w stadzie nie relacjonuje wystarczająco precyzyjnie ryzyk związanych z potencjalnym wpływem stanów zapalnych na wydajność stada. Dowodzi tego porównanie średnich arytmetycznych oraz geometrycznych wartości R. W analizowanym przypadku średnia arytmetyczna R w poszczególnych miesiącach nie umożliwiła znalezienia istotnej korelacji z MDY ($p > 0,05$). Analizowane dane zarówno po stronie R jak i MDY charakteryzowała duża zmienność międzyosobnicza. W przedstawionych badaniach R mierzona wartością średniej arytmetycznej w całym okresie prowadzonych prac mieści się w zakresach R uważanych za fizjologiczne (167-250 Ω) (Ferrero i wsp., 2014). Jednak te same dane ilustrują zupełnie inny trend jeśli do ich analizy zastosuje się średnią geometryczną. Średnie geometryczne R w odniesieniu do analizowanego stada lokowały się w zakresach R, które kojarzone są z rozwijającym się stanem zapalnym.

Korelacja, którą wyznaczono w niniejszej pracy jest istotna i predykcyjna ($p < 0,002$). Potwierdzono to poprzez weryfikację modelu metodą LOO stosowaną szeroko w walidacji zależności o charakterze liniowym (Grabowski i wsp., 2012; OECD, 2007; Todeschini i wsp., 2004). Wyniki walidacji modelu pozwalają stwierdzić że cechuje go wysoka wydajność wewnętrzna i zdolność predykcyjna modelu (Q^2 , R^2 , Q^2-R^2). Wartość Q^2-R^2 potwierdziła, że aktualny model nie był przeszacowany. Nieznane wartości Q^2 oraz R^2 potwierdzają wysoką wartość dopasowania liniowego. Istotność statystyczna proponowanego modelu regresji została pozytywnie zweryfikowana najwyższą wartością testu F. Niewielką różnicę pomiędzy dopasowaniem i zdolnością predykcyjną potwierdzono akceptowalną niską wartością różnicy $Q^2_{\text{asym}}-Q^2$. Tylko w przypadku jednego miesiąca laktacji (VII) średnia geometryczna R w stadzie była poza „granicą prognostyczną”, w której zwalidowano korelację $R \leftrightarrow \text{MDY}$, czyli w zakresie 43,38-154,32 Ω . Średnie geometryczne wartości R z wszystkich pozostałych miesięcy mieszczą się w zakresie R 43,38-154,32 Ω . Jak dotąd w przypadku badania zależności pomiędzy R a MDY nie zwalidowano żadnego modelu, który kompleksowo oceniałby, jakość modelu i weryfikował jego predykcyjność. Proponowany model potwierdza, że niewielkie przekroczenie fizjologicznych wartości R zdajanego mleka jest istotnym czynnikiem predykcyjnym w odniesieniu do MDY w stadzie. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w czwartej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Burmańczuk A., Hola P., Wojciechowska B., Kowalski C., Grabowski T. (2017) *Validation of relationship between milk resistance and daily yield of dairy cows.* Pol J Vet Sci, 20: 737-742.

4.2.6. Wpływ kwercetyny na spadek liczby komórek somatycznych w mleku u krów z przypadkami *mastitis*

Kwercetyna jest flawonoidem, który ma wpływ na zapalenie, angiogenezę, zapalenie naczyń i odwrotny transport cholesterolu (Bhaskar & Helen 2016). Kwercetyna zmniejsza różnicowanie się limfocytów Th1, obniżając poziomy wielu cytokin i czynników, takich jak IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-25, IL-33, MCP-1, NF- κ B VEGF-A, COX-2, 5-LOX, i NOS, NO, CRP, TNF α , TNF γ , IgE jak również zmniejszanie ekspresji VCAM-1, ICAM-1, MIP-2. Wykazuje aktywność przeciwalergiczną i przeciwzapalną poprzez hamowanie enzymów uczestniczących w produkcji leukotrienów i prostaglandyn. Ma również wpływ na uwalnianie histaminy. Może być też stosowana w celu zmniejszenia aktywności hialuronidazy.

Celem pracy było określenie wpływu jednego z flawonoidów (kwercetyny) na spadek liczby komórek somatycznych w mleku krów ze stanem zapalnym gruczołu mlekowego.

4.2.6.1. Materiały i metody

Na podstawie badania liczby SCC do badań wybrano 9 krów mlecznych z przypadkami *mastitis* (SCC>300 000 komórek/ml). Badanie przeprowadzono na krowach o wadze ≤ 700 kg każdy, rasy czarno-białej, w wieku od 4 do 12 lat. Przed podaniem leku i pobraniem próbek mleka każde wymię było dezynfekowane. Próbki mleka do analizy (0,5 l) zbierano raz dziennie od każdej krowy z zaognionej ćwiartki bezpośrednio przed codziennym porannym udojem. Próbki mleka (15 na każdą krowę) zebrano w punkcie wyjściowym (B₁-B₃), HD (D₁-D₃) LD (D₃-D₈) i po ostatniej dawce (R₁-R₃). Próbki krwi do analizy odpowiedzi immunologicznej (6 próbek na każdą krowę) wykonywano raz dziennie przed porannym udojem na początku doświadczenia (B₁-B₃) i po ostatniej dawce (R₁-R₃). Działania niepożądane, które mogły być związane z podawaną IMM kwercetyną, były monitorowane podczas całego badania. Podczas badania nie podano zwierzętom żadnych leków. Codziennie badany był stan wymienia i ogólny stan zwierząt. Mleko również podlegało codziennemu monitoringowi. Analizę wyjściową (hematologiczną, TNF α , SCC) przeprowadzono 4 godziny u wszystkich krów, trzy dni przed podaniem pierwszej dawki (B₁-B₃). Próbki krwi analizowano pod kątem wybranych parametrów krwi, takich jak: WBC – objętość krwinek białych; RBC – objętość krwinek czerwonych; Hb – hemoglobina; Hct – hematokryt; MCV – średnia objętość komórkowa; MCH – wskaźnik średniej masy hemoglobiny w krwince; MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach; RDW – szerokość rozkładu czerwonych krwinek; Pl – płytki krwi; Fib – fibrynogen. Wszystkie parametry analizowano

przy użyciu wcześniej opisanych metod i sprzętu (Burmańczuk i wsp., 2016). Analizę SCC przeprowadzono przy użyciu analizatora Bentley BactoCount IBCm (Bentley Instruments Inc.). Odpowiedź immunologiczną analizowano również poprzez analizę stężenia TNF α w surowicy krwi, stosując metodę ELISA. Czas osiągnięcia 50% redukcji liczby w mleku SCC ($t_{1/2SCC}$) obliczono w oparciu o równanie procesowe pierwszego rzędu $t_{1/2SCC} = \ln(2)/\text{nachylenie}$. Wartość nachylenia oparta na dopasowaniu liniowym została obliczona za pomocą oprogramowania GraphPad Prism[®] v. 6.01 (GraphPad Software Inc.). Skuteczną dawkę (ED_{50}) opartą na dawce hamującej dla SCC (ID_{50}) za pomocą sigmoidalnej interpolacji 4PL obliczono również stosując GraphPad Prism[®] v. 6.01.

Do porównania danych w kolejnych grupach użyto testu t Studenta, a do analizy trendu SCC zastosowano test χ^2 . Pierwsza grupa stanowiła średnią SCC dla linii podstawowej (B₁-B₃), a drugą stanowiła średnią wartość SCC w danym dniu badania. Różnice pomiędzy grupami na poziomie $p < 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

4.2.6.2. Wyniki i dyskusja

Średnia arytmetyczna SSC w stanie wyjściowym wynosiła 2626741 ± 1718167 komórek/ml. Począwszy od D₁ i kontynuując do D₈, spadek SCC w stosunku do linii bazowej charakteryzował się tendencją malejącą ($p < 0,0001$). Po 3 dniach podawania kwercetyny w dawce 120 mg/wymię (D₁-D₃), SCC zmniejszyło się o 14,12% w odniesieniu do średniej arytmetycznej wartości wyjściowej. Jednak spadek ten nie był statystycznie istotny ($p > 0,05$). Nachylenie mediany dla SCC w fazie D₁-D₃ wykazało, że $t_{1/2SCC}$ w odniesieniu do linii podstawowej przy utrzymaniu stosowanej dawki wyniosłby $\approx 85,45$ godz. Predykcja dokonana na podstawie średniej arytmetycznej wskazywała, że $t_{1/2SCC}$, w odniesieniu do wartości wyjściowej przy utrzymaniu zastosowanej dawki, może osiągnąć $\approx 333,07$ godziny (leczenie 2 tygodniowe). Po kolejnych 5 dniach podawania kwercetyny w mniejszej dawce 40 mg/wymię (D₄-D₈) zaobserwowano znaczny spadek SCC o 114,65% w odniesieniu do średniej arytmetycznej wyjściowej $p < 0,05$. Z drugiej strony nachylenie mediany SCC w fazie D₄-D₈ wskazywało, że $t_{1/2SCC}$ w odniesieniu do linii podstawowej przy utrzymaniu zastosowanej dawki osiągnie $\approx 15,44$ godziny. To samo przewidywanie założone na podstawie średniej arytmetycznej wskazywało, że $t_{1/2SCC}$ w odniesieniu do linii bazowej przy zachowaniu zastosowanej dawki wynosi $\approx 134,05$ godziny ($\approx 5,6$ dnia leczenia). W okresie D₄-D₈ zanotowano medianę fluktuacji, której szczyt ustalono na okres D₆. Nachylenie mediany SCC w fazie D₆-D₈ wskazywało, że $t_{1/2SCC}$ w odniesieniu do linii podstawowej przy utrzymaniu stosowanej dawki może osiągnąć $\approx 38,98$ godzin. W trakcie badania odnotowano dużą zmienność osobniczą SCC wyrażoną, jako RSD%. W fazie B₁-B₃ wartość RSD wynosiła

65,26%. Jednak w kolejnych dniach D₁-D₃ RSD% wynosiło 55,78%, 67,79%, 75,77%, a w kolejnych dniach D₄-D₈ było równe 89,73%, 78,12%, 58,71%, 88,18% i 84,20%. ID₅₀ z sigmoidalnej interpolacji 4PL (kryterium Akaike 277,9) było równe 0,6363. Obliczono również $1/\text{LogED}_{50}=0,6363$, co w efekcie dało wartość $1/\text{LogED}_{50}=37,29$ mg/wymię.

Fluktuacyjny charakter zmian mediany SCC pokazuje, że w zakresie dawek HD→LD można oczekiwać nieliniowej dawki zależnej od SCC. Kilka kluczowych parametrów hematologicznych uległo istotnym zmianom w trakcie badania. Zmiany wartości MCHC, RDW i fibrynogenu w odniesieniu do linii bazowej były znaczące. Jednak wartości te mieściły się w granicach określonych, jako fizjologiczne dla bydła. Przedstawione badania wykazały, że wpływ na poziom TNF α we krwi obwodowej po podaniu dowymieniowym w HD i LD nie jest istotny. W fazie B₁-B₃ średnie stężenie TNF α było równe 104,2 \pm 43,32 pg/ml. W fazie R₁-R₂ poziom TNF α we krwi obwodowej nie zmienił się istotnie i był równy 112,90 \pm 64,44 pg/ml. Synteza TNF α jest indukowana przede wszystkim przez toksyny bakteryjne. W przedstawionych badaniach kwercetynę podawano zwierzętom o wysokiej wartości SCC wskazującej na zapalenie wymienia, ale w hodowli bakteriologicznej nie znaleziono patogenów bakteryjnych.

Ostatnie badania wskazują, że kwercetyna indukuje ekspresję inhibitora proteazy leukocytów, co z kolei zmniejsza wydzielanie TNF α (De Santis i wsp., 2016). TNF α ma kluczowe znaczenie dla podstawowych mechanizmów regulacyjnych w układzie odpornościowym. Dlatego można stwierdzić, że po podaniu dowymieniowym kwercetyny w wyżej wymienionych dawkach, nie należy oczekiwać ogólnego wpływu na układ odpornościowy. Dodatkowo w tym przypadku można również wyciągnąć wniosek, że po podaniu dowymieniowym kwercetyny w HD dawka LD nie ma znaczącego wpływu na obraz krwi w ciągu 8 dni leczenia. Badania *in vitro* potwierdziły farmakologiczne działanie kwercetyny w bardzo szerokim zakresie stężeń 10-200 μ M (Jeong i wsp., 2009). Wiadomo również, że niektóre z nich mają zależny od dawki przebieg dwufazowy (Chirumbolo i wsp., 2010). Poszukiwanie skutecznej dawki wymaga dalszych badań z użyciem jednej dawki. Przedstawione wyniki pozwoliły na potwierdzenie istotnego wpływu kwercetyny na redukcję SCC w *mastitis* u krów mlecznych po 8 dniach terapii. Analiza istotności trendów jest w przypadku badań reakcji na dawkę jednym z kluczowych elementów potwierdzających badany efekt (ICH, 1994). W momencie podawania zarówno HD jak i LD zaobserwowano znaczący trend spadkowy w odniesieniu do SCC. Podawanie kwercetyny w dawce 120 mg/wymię, 4 godziny przez 3 kolejne dni i 40 mg/wymię, co 24 godziny przez następne pięć dni, nie powoduje istotnych zmian we krwi. Obecność znaczącej fluktuacji i powrót do malejącej tendencji SCC wyrażonej medianą jest w tym przypadku obrazem złożonych interakcji między kwercetyną a układem odpornościowym. Wnioski z badania wskazują,

że tendencja spadkowa SCC po podaniu kwercetyny jest widoczna po podaniu zarówno HD, jak i LD. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w piątej pracy oryginalnej, wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego:

Burmańczuk A., Hola P., Milczak A., Piech T., Kowalski C., Wojciechowska B., Grabowski T. (2018) *Quercetin decrease somatic cells count in mastitis of dairy cows*. Res Vet Sci, 117: 255-259.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań:

- Stosowanie modelu dwukompartamentowego w badaniach farmakokinetycznych leków podawanych IMM, szczególnie w pierwszych 24 godzinach po podaniu leku wymaga częstszego pobierania prób do analiz niż wynikałoby to z interwałów doju przemysłowego.
- Rzadkie pobieranie prób w przypadku analiz farmakokinetycznych leków podawanych IMM może maskować fazę dystrybucji, która w efekcie może być niewidoczna i niemożliwa do scharakteryzowania.
- Stosowanie k_{el} do wyznaczania $t_{1/2k_{el}}$ w mleku lub czasu jego wycofywania z organizmu w modelach jedno kompartamentowych przy fluktuacyjnym charakterze fazy eliminacji, może wymagać dwufazowej analizy tej stałej lub jej wyznaczania na podstawie MRT.
- Zakres oporności mleka w granicach 43,38-154,32 Ω jest proporcjonalny do dziennej wydajności bydła mlecznego. W związku z czym, może stanowić dodatkowe kryterium włączenia lub wykluczenia z grupy w badaniach farmakokinetycznych odnoszące się jednocześnie do wydajności, jak i zdrowotności gruczołu mlekowego.
- Dwukompartamentowe rozmieszczenie substancji aktywnej w gruczole mlekowym może stanowić podstawę do optymalizacji dawkowania leków immunotropowych drogą dowymieniową.

4.2.7. Piśmiennictwo:

1. Bertulat S. (2014) Evaluation of stress caused by drying-off dairy cows and its relation to milk yield and udder pressure. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin 1–123.
2. Bhaskar S., Sudhakaran P.R., Helen A. (2016) Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF-kappaB signaling pathway. *Cell Immunol*, 310: 131-140.
3. Błądek T., Posytniak A., Gajda A., Gbylik M., Żmudzki J. (2011) Multi-class procedure for analysis of antibacterial compounds in animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Bull Vet Inst Pulawy*, 55: 741-748.
4. Burmańczuk A., Milczak A., Grabowski T., Osypiuk M., Kowalski C. (2016) The using of a piglets as a model for evaluating the dipyrone hematological effects. *BMC Vet Res*, 12: 263.
5. Cagnardi P., Villa R., Gallo M., Locatelli C., Carli S., Moroni P., Zonca A. (2010) Cefoperazone sodium preparation behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. *J Dairy Sci*, 93: 4105–4110.
6. Caria M., Chessa G., Murgia L, Todde G., Pazzona A. (2016) Development and test of a portable device to monitor the health status of Sarda breed sheep by the measurement of the milk electrical conductivity. *Ital J Anim Sci*, 15: 275-282.
7. Chirumbolo S., Conforti A., Ortolani R., Vella A., Marzotto M., Bellavite P. (2010) Stimulus-specific regulation of CD63 and CD203c membrane expression in human basophils by the flavonoid quercetin. *Int Immunopharmacol*, 10: 183-192.
8. De Santis S., Kunde D., Serino G., Galleggiante V., Caruso M.L., Mastronardi M., Cavalcanti E., Ranson N., Pinto A., Campiglia P., Santino A., Eri R., Chieppa M. (2016) Secretory leukoprotease inhibitor is required for efficient quercetin-mediated suppression of TNF beta secretion. *Oncotarget*, 7: 75800-75809.
9. Ehinger, A.M. & Kietzmann, M. (2000) Tissue distribution of benzylpenicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. *J Vet Pharmacol Ther*, 23: 303-10.
10. EMA (2013) European Medicines Agency/Committee for Medicinal products for Veterinary Use (CVMP) 2013;/EWP/141272/2011, pp 4–5.
11. Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., deTakats P.G., Anderson D., Baker J., Kerr D.J. (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res*, 2(4): 659-68.

12. FDA (2015) Food and Drug Administration. Chapter I food and drug administration department of health and human services subchapter e animal drugs, feeds, and related products, part 526-intramammary dosage form new animal drugs Sec. 526.1696a Penicillin G procaine. Title 21, Volume 6 Revised as of April 1 2015a.
13. FDA (2015) Food and Drug Administration. Chapter I food and drug administration department of health and human services subchapter e animal drugs, feeds, and related products, part 526-intramammary dosage form new animal drugs Sec. 526.1696a Amoxicillin trihydrate. Title 21, Volume 6 Revised as of April 1 2015b.
14. Ferrero F.J., Valledor M., Campo J.C. (2014) Screening method for early detection of *mastitis* in cows. *Measurement*, 47: 855-86
15. Grabowski T., Jaroszewski J.J., Gad S.C., Feder M. (2012) Correlation between in silico physicochemical characteristics of drugs and their mean residence time in human and dog. *Int J Toxicol*, 31: 25-33.
16. Grabowski T., Marczak M., Jaroszewski J.J. & Whitmire M. (2012) Comparison of bioequivalence study regulatory requirements for human and veterinary drugs. *Regul Toxicol and Pharm*, 64: 233-42.
17. Gruet P., Maincent P., Berthelot X., Kaltsatos V. (2001) Bovine *mastitis* and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 50: 245-259.
18. Guterbock W.W., Van Eenennaam A.L., Anderson R.J., Gardner I.A., Cullor J.S., Holmberg C.A. (1993) Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical *mastitis* caused by environmental pathogens. *J Dairy Sci*, 76: 3437-3444.
19. Hamann J., Gyodi P. (1994) Effects on milk yield, somatic cell count and milk conductivity of short-term non-milking of lactating quarters of cows. *J Dairy Res*, 61: 317-322
20. Hamann J., Nipp B., Gyodi P. (1995) Comparison of hand-held instruments for measuring the electrical-conductivity of milk. *Milchwissenschaft*, 50: 543-546.
21. ICH (1994) Dose-Response Information to Support Drug Registration pp. 1-14.
22. Iraguha B., Hamudikuwanda H., Mushonga B. (2015) Bovine *mastitis* prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. *J S Afr Vet Assoc*, 86: 1-6
23. Jeong J.H., An J.Y., Kwon Y.T., Rhee J.G., Lee Y.J. (2009) Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem*, 106: 73-82.

24. Juozaitiene V., Slapkauskaite J., Tusas S., Brazauskas A., Japertiene R. (2010) Electrical conductivity changes of milk during milking phase with cows productivity and somatic cells count. *Vet Med Zoot*, 51: 23-29.
25. Karas-Trzeciak M., Grabowski T., Woloszczuk-Gebicka B., Borucka B. (2015) Fentanyl with ropivacaine infusion for postoperative pain relief in infants and children. Kinetics of epidural fentanyl. *Paediatr Anaesth*, 25: 818-23.
26. Khaskheli M., Malik R.S., Arain M.A., Soomro A.H., Arain H.H. (2008) Detection of beta-lactam antibiotic residues in market milk. *Pak J Nutr*, 7: 682-585.
27. Lukas J.M., Reneau J.K., Wallace R., Hawkins D., Munoz-Zanzi C. (2009) A novel method of analyzing daily milk production and electrical conductivity to predict disease onset. *J Dairy Sci*, 92: 5964-5976.
28. Movassagh M.H., Karami A.R. (2011) Beta-lactam antibiotics residues in pasteurised milk by Beta Star test in the north west region of Iran. *ARPN J Agri Biol Sci*, 6: 7-10
29. NCBI. (2016) Compound Summary for CID 6098, Cloxacillin.
30. Norberg E., Ødegård J., Madsen P. (2004) Comparison of variance components for test-day electrical conductivity of milk and test-day somatic cell score for first lactation cows in an experimental herd. *Acta Agric Scand A Anim Sci*, 54: 181-186.
31. Novelli A., Fallani S., Cassetta M.I., Conti S. (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral cephalosporins as critical factors in choice of antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*, 16: 501-505.
32. OECD (2007) Guidance document on the validation of (quantitative)structure-activity relationships [(Q)SAR] models ENV/JM/MONO(2007)2:1-154. <http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/environment>
33. Riviere J.M. and Papich M.G. (2009) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9th edn, pp. 1-1544. Wiley-Blackwell, Ames, IA.
34. Schadewinkel-Scherkl A.M., Rasmussen F., Merck C.C., Nielsen P., Frey H.H. (1993) Active transport of benzylpenicillin across the blood-milk barrier. *J Pharmacol Toxicol*, 73: 14-9.
35. Shao W., Xu W., Li A., Xi Y., Wang C. (2005) Pharmacokinetic studies of quercetin-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion compound in rats]. *Zhong Yao Cai*, 28(1): 47-50.
36. Stockler R.M., Morin D.E., Lantz R.K., Constable P.D. (2009) Effect of milking frequency and dosing interval on the pharmacokinetics of cephalixin after intramammary infusion in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 92: 4262-4275.

37. Soback S., Paape M.J., Filep R., Varma, K.J. (1995) Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. *J Vet Pharmacol Ther*, 18: 413–417.
38. Todeschini R., Consonni V., Mauri A., Pavan M. (2004) Detecting “bad” regression models: multicriteria fitness functions in regression analysis. *Anal Chim Acta*, 515: 199-208.
39. Vilas Boas D.F., Vercesi Filho A.E., Pereira M.A., Roma Junior L.C., El Faro L. (2016) Association between electrical conductivity and milk production traits in Dairy Gyr cows. *J Appl Anim Res*, 45: 227-233.
40. Wilson C.D., Gilbert G.A. (1986) Pharmacokinetics of cefoperazone in the cow by the intramammary route and its effect on *mastitis* pathogens in vitro. *Vet Rec* 118: 607-609.
41. Wilson D.J., Gonzalez R.N., Hertl J., Schulte H.F., Bennett G.J., Schukken Y.H., Grohn Y.T. (2004) Effect of clinical *mastitis* on the lactation curve: a mixed model estimation using daily milk weights. *J Dairy Sci*, 87: 2073-2084.
42. Zaninelli M., Tangorra F.M., Costa A., Rossi L., Dell'Orto V., Savoini G. (2016) Improved Fuzzy Logic System to Evaluate Milk Electrical Conductivity Signals from On-Line Sensors to Monitor Dairy Goat *Mastitis*. *Sensors (Basel)* 16.
43. Zeconi A., Piccinini R., Giovannini G., Casirani G., Panzeri R. (2004) Clinical *mastitis* detection by on-line measurements of milk yield, electrical conductivity and milking duration in commercial dairy farms. *Milchwissenschaft* 59: 240-243.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Po wyłączeniu 5 prac oryginalnych stanowiących podstawę cyklu habilitacyjnego, w których jestem pierwszym autorem, mój dorobek naukowy obejmuje:

- 14 prac oryginalnych w j. angielskim (10) oraz j. polskim (4)
- 13 prac przeglądowych w j. angielskim (1) oraz j. polskim (12)
- 5 monografii w j. polskim
- 45 doniesień konferencyjnych (ustne lub plakatowe)
- 3 wykłady w j. angielskim, wyjazdy zagraniczne Pisa: 2013, 2014, 2018 rok. Erasmus

w tym po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych:

- 10 prac oryginalnych w j. angielskim
- 6 prac przeglądowych w j. angielskim (1) oraz j. polskim (5)
- 3 monografie w j. polskim
- 33 doniesień konferencyjnych (ustne lub plakatowe)
- 3 wykłady w j. angielskim, wyjazdy zagraniczne Pisa: 2013, 2014, 2018 rok. Erasmus

Powyższe prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach, zarówno krajowych jak i zagranicznych (załącznik 3). W 11 publikacjach (nie licząc doniesień konferencyjnych) jestem pierwszym autorem. Łączny IF mojego dorobku naukowego wynosi 14,122, punktacja MNiSW = 439. Indeks h wynosi 3, a liczba cytowań wg Web of Science 35 (na dzień 01.03.2018).

Pozostałe zainteresowania naukowe, które realizowałem, lub realizuję równoległe do badań farmakokinetycznych antybiotyków podawanych IMM u krów, w kontekście stosowania modelu dwukompartmentowego składających się na cykl habilitacyjny, można podzielić na kilka dziedzin, a szczególnie interesujące mnie zagadnienia to:

1. Ocena biorównoważności preparatów weterynaryjnych.
2. Badania nad oznaczeniem tiamuliny w tkankach u trzody chlewnej.
3. Wykorzystania naturalnych zeolitów w produkcji zwierzęcej i ochronie środowiska.
4. Właściwości farmakokinetyczne niesterydowych leków zapalnych (metamizolu) u owiec i trzody chlewnej.
5. Badania mające wpływ na określające stopień ryzyka dla konsumentów po stosowaniu leków dowymieniowych u krów mlecznych z przypadkami *mastitis*.
6. Prace o zróżnicowanej tematyce.

5.1. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Ad 1) Po ukończeniu studiów na wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie ówczesny Kierownik Katedry Farmakologii Profesor dr hab. Cezary Kowalski zaproponował mi zatrudnienie na etacie asystenta. W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora uczestniczyłem w licznych doświadczeniach prowadzonych w Katedrze Farmakologii oraz opanowałem techniki laboratoryjne. Wnikliwie zapoznałem się z piśmiennictwem dotyczącym tematyki prowadzonych badań. Tematyka ta obejmowała farmakokinetykę oraz ocenę biorównoważności linkozamidów oraz sulfonamidów po podaniu doustnym u zwierząt hodowlanych. W pierwszej pracy, której jestem współautorem, scharakteryzowano średnie wartości stężeń linkomycyny w osoczu warchlaków po jednorazowym doustnym podaniu preparatu Lincomycinum 11% i preparatu Lincocin 40% w dawce 10 mg/kg w przeliczeniu na substancję czynną. Dla obu preparatów obliczono parametry farmakokinetyczne takie jak: AUC_{0-t} , C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, MRL, Vd, Cl. Wykazano, że porównywane preparaty można uznać za biorównoważne, ponieważ wyrażone w procentach różnice dla porównywanych wskaźników farmakokinetycznych (AUC , C_{max} , t_{max}) mieszczą się w granicach: $\pm 20\%$. W badaniach nad biorównoważnością sulfonamidów scharakteryzowano średnie wartości stężeń sulfadiazyny i trimetoprimu w osoczu kurcząt rzeźnych po jednorazowym doustnym podaniu preparatu Ditrivet sol. i preparatu Trimetosul 48% w dawce 30 mg/kg w przeliczeniu na substancje czynne. Dla substancji czynnych obu preparatów obliczono wskaźniki farmakokinetyczne: AUC , C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, MRT, Vd, Cl. Uzyskane wyniki z przeprowadzonej analizy wykazały, że preparat Ditrivet sol. można uznać za biorównoważny z preparatem Trimetosul 48%. Wyniki tych badań opublikowano w pracach:

- 5.1.1. Kowalski C., Roliński Z., **Burmańczuk A.**, Zań R., Lodkowski R. (2004) *Farmakokinetyka linkomycyny oraz ocena biorównoważności preparatu Lincomycinum 11% z preparatem Lincocin 40% po stosowaniu doustnym u warchlaków*. Med Weter, 60(3): 307-309.
(MNiSW 10; IF 0,285)
- 5.1.2. Kowalski C., Roliński Z., **Burmańczuk A.**, Krasucka D., Wrona Z., Krakowski L. (2004) *Ustalenie biorównoważności preparatu sulfonamidowego potencjalizowanego trimetoprimem Ditrivet solutio w porównaniu z preparatem referencyjnym u kur brojlerów*. Med Weter, 60(10): 1106-1109.
(MNiSW 10; IF 0,285)

Ad 2) W tym okresie uczestniczyłem również w badaniach obejmujących optymalizację metod analitycznych do oznaczania i określania tempa eliminacji 8- α -hydroksytiamuliny u trzody chlewnej. Tiamulina, półsyntetyczny antybiotyk, jest stosowany wyłącznie w weterynarii, jest szybko dystrybuowany w organizmie i intensywnie metabolizowany w wątrobie. Celem wykonanych badań była walidacja metody oznaczania tiamuliny w tkankach wskaźnikowych świń oraz oszacowanie poziomów pozostałości metabolitu tiamuliny w tkankach, po podaniu doustnym i domięśniowym. Eksperyment przeprowadzono na warchlakach, które podzielono na dwie grupy. Jednej grupie podano doustnie preparat Tiamowet 45% granulat w dawce 24 mg/kg/24godziny, a drugiej grupie podawano domięśniowo preparat Tiamowet 200 w dawce 15 mg/kg/24godziny. Oba leki podawano przez 5 dni. Warchlaki z obu grup poddano ubojowi w dniach: 3, 4, 6, 8, 10, 12 i 15 po zakończeniu podawania leku. Próbkki badanych tkanek mięśni i wątroby zostały wyizolowane w celu oznaczenia poziomu pozostałości markera 8- α -hydroksytiamuliny i oznaczono metodą chromatografii gazowej (GC) wg Marcusa i Sherma w modyfikacji własnej (Marcus & Sherma, 1993). Oceniono podstawowe parametry walidacyjne, w tym dokładność, precyzję, selektywność, czułość, powtarzalność i stabilność. Badania potwierdziły przydatność metody GC do oznaczania pozostałości tiamuliny w tkankach świń. W doświadczeniu wykazano, że stężenie 8- α -hydroksytiamuliny w badanych mięśniach osiąga poziom niższy niż MRL, tj. 100 μ g/kg, w 10-tym dniu po domięśniowym podaniu preparatu Tiamowet 200 i w 12-tym dniu po doustnym podaniu preparatu Tiamowet 45% granulat. Walidacja metod analitycznych jest kluczowym elementem zarówno w opracowywaniu metod referencyjnych, jak i oceny kompetencji laboratorium w zakresie tworzenia wiarygodnych danych analitycznych. Wyniki badań opublikowano w pracach:

- 5.1.3. Zań R., Kowalski C., Roliński Z., **Burmańczuk A.** (2006) *Tempo eliminacji 8- α -hydroksytiamuliny, markera pozostałości tiamuliny, u świń.* Med Weter, 62(4): 448-451
(MNiSW 15; IF 0)
- 5.1.4. Zań R., Kowalski C., **Burmańczuk A.** (2006) *Walidacja metody oznaczania 8- α -hydroksytiamuliny w materiale biologicznym.* Med Weter, 62(7): 797-800.
(MNiSW 15; IF 0)

5.2. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych brałem udział w badaniach związanych z wykorzystaniem naturalnych zeolitów w produkcji zwierzęcej i ochronie środowiska. Czynnie zaangażowałem się w badania *mastitis* u bydła mlecznego. Włączyłem się również w badania z zakresu farmakokinetyki metamizolu u owiec i trzody chlewnej.

Ad 3) Zeolity tuf jest rozdrobnionym minerałem górskim, którego głównym komponentem jest klinoptiolit, posiadający właściwości jonowymienne i adsorpcyjne. W skład tego zeolitu wchodzi potrzebne dla organizmu zwierząt mikro i makroelementy. Celem badań była: wstępna ocena przydatności naturalnych zeolitów w odchowie kurcząt rzeźnych. Ocenę wpływu zeolitu na wykorzystanie składników pokarmowych i poziom upadków w kurniku przeprowadzono na 20 tys. jednodniowych kurcząt rzeźnych odmiany Ross, stanowiących obsadę jednego kurnika. Obsada kurnika była podzielona na dwie części po 10 tys. sztuk. Jedna grupa otrzymywała z karmą przez 6,5 tygodnia 5% dodatek zeolitu, druga grupa otrzymująca same pasze stanowiła odniesienie. Czas obserwacji wynosił 45 dni. Stosowano naturalny zeolit, który pochodził z ukraińskiego złoża Sokirnickiego. Zawierał on (%): tlenek krzemu – 69,43, tlenek aluminium – 13,04, podtlenek żelaza – 0,78, tlenek żelaza – 1,05, tlenek tytanu – 0,18, tlenek manganu – 0,033, tlenek wapnia – 2,10, tlenek potasu – 2,64, tlenek magnezu – 0,87, tlenek sodu – 2,06, tlenek fosforu – 0,033, woda – 3,99. Mączka zeolitowa o takim składzie (średnica drobin 1-3 mm) była dodawana w ilości 5% do paszy w grupie doświadczalnej. W czasie doświadczenia, co tydzień dokonano pomiarów masy ciała, po 100 kurcząt w każdej grupie oraz prowadzono rejestr upadków.

Wyniki obserwacji: W grupie otrzymującej 5% dodatek zeolitu, wykorzystanie paszy na 1 kg przyrostu $1,870 \pm 3,70 \text{ g/kg}^{-1}$; w grupie odniesienia $2,08 \pm 4,19 \text{ g/kg}^{-1}$. Ilość kurcząt padłych: grupa z zeolitem – 46; grupa odniesienia – 63.

Podsumowując naturalne zeolity są krystalicznymi glinokrzemianami o trójwymiarowej strukturze szkieletowej, zabudowanej kontaktującymi się kanałami, wypełnionymi dużymi jonami i cząsteczkami wody. Zainteresowanie biologicznymi efektami zeolitów wynika z ich właściwości fizyko-chemicznych, takich jak duża zdolność do wymiany jonowej, właściwości adsorpcyjne oraz związane ze strukturą cząsteczki właściwości przesiewowe dla związków chemicznych. Zeolity są szczególnie przydatne do usuwania kationów takich jak amon (NH_4) oraz niektórych metali ciężkich z wody (arsenu, ołowiu i rtęci). W trakcie doświadczenia wykazano wzrost wykorzystania paszy i spadek upadków kurcząt w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy:

- 5.2.1. **Burmańczuk A., Roliński Z., Kowalski. C., Burmańczuk N., Markiewicz W.** (2015) *Possible use of natural zeolites in animal production and environment protection.* J Elementol, 20(4): 803-811.
(MNiSW 15; IF 0,719)

Ad 4) Brałem czynny udział w badaniach farmakokinetycznych czynnych metabolitów markera 4-metyloamino-antypiryny i 4-amino-antypiryny prowadzonych wspólnie z pracownikami Katedry Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu w Pizie (Włochy).

Metamizol (MT) jest lekiem przeciwbólowym i przeciwgorączkowym przeznaczonym do stosowania u ludzi, koni, bydła, świń i psów. MT ulega szybkiej hydrolizie do głównego metabolitu 4-metyloamino-manadyny (MAA) i 4-amino-antypiryny (AA). Celem pierwszego etapu badań była ocena profili farmakokinetycznych MAA po podaniu metamizolu zdrowym owcom dożylnie (iv) n=6 i domięśniowo (im) n=6 w dawce 20 mg/kg. Dwanaście owiec podzielono losowo na dwie grupy zgodnie ze schematem 'cross-over' 2×2. Krew pobierano w ustalonym czasie w ciągu 36 godzin, a osocze analizowano za pomocą zwalidowanej metody HPLC-UV. Nie obserwowano zmian zachowania ani parametrów zdrowotnych w grupach zwierząt po iv i im podaniu leku. Stężenia MAA w osoczu po podaniu dożylnym MT było wykrywalne od 5-tej minuty do 8-mej godziny od podania leku u wszystkich zwierząt. Oznaczenie ilościowe MAA w osoczu zwierząt po podaniu im było możliwe od 5-tej minuty do 10 godziny u wszystkich zwierząt. Jedynymi dwoma znacząco różniącymi się parametrami pomiędzy grupami były C_{max} i t_{max} ($p < 0,01$). AUC_{im}/AUC_{iv} wyniosło 1,12. Niniejsze badanie wykazało, że po podaniu iv i im MT nie stwierdzono klinicznie istotnej różnicy w MAA, jednak konieczne są dalsze badania w celu oceny profilu bezpieczeństwa i skuteczności działania MT u owiec.

Celem drugiego etapu naszych badań była ocena farmakokinetyki aktywnych metabolitów (MAA) i (AA) u samców prosiąt po pojedynczym podaniu im MT. Ośmiu zdrowym samcom prosiąt podano domięśniowo MT w dawce 100 mg/kg. Próbkę krwi pobierano w zaplanowanych odstępach czasu, a stężenia leku w osoczu oceniano za pomocą zwalidowanej metody HPLC. Stężenia MAA w osoczu wykrywano od 15 min do 48 godzin od podania leku natomiast AA od 0,5 godziny do 72 godzin od aplikacji metamizolu. Średnie maksymalne stężenia MAA i AA wynosiły odpowiednio 47,59 i 4,94 mg/ml. Średni $t_{1/2kel}$ wynosił 8,57 i 13,3 godzin odpowiednio dla MAA i AA. Wykazano, że pozostałości MAA i AA u prosiąt różnią się od zbadanych u innych gatunków zwierząt. Dlatego konieczne są dalsze badania, aby zrozumieć, czy te różnice w stężeniach w osoczu MAA i AA pomiędzy

gatunkami zwierząt wymagają zróżnicowanego dawkowania leku. Wyniki badań opublikowano w pracach:

5.2.2. Giorgi M., De Vito V., Lee H., Laus F., Kowalsky C., Faillace V., **Burmańczuk A.**, Vullo C. (2015) *Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4-methylamino-antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep*. Small Rumin Res, 132: 143-146.

(MNiSW 30; IF 1,083)

5.2.3. **Burmańczuk A.**, Kowalski C., Giorgi M., Owen H., Grabowski T. (2016) *Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolites 4-methylamino-antipyrine and 4-amino- antipyrine after intramuscular injection of metamizole in health piglets*. J Vet Pharmacol Therap, 39(6): 616-620.

(MNiSW 32; IF 1,202)

W tym samym czasie kierowałem badaniem, którego celem była ocena parametrów hematologicznych metamizolu po podaniu domięśniowym u prosiąt. Badania wykonane zostały na 8 zdrowych samcach prosiąt, o masie od 5,0 do 7,4 kg. Zwierzętom podawano domięśniowo metamizol (Biovetalgin, 500 mg/ml). Krew pobrano 15 min, 30 min 45min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 godz. od podania leku. Stężenie osoczu 4MAA i 4AA analizowano za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej.

Analizie poddano podstawowe wskaźniki morfologiczne krwi (leukocyty – WBC), trzy subpopulacje leukocytów: LYM, MID, GRA, ponadto LYM%, MID%, GRA%, RBC, hematokryt – HCT, średnią objętość krwinki – MCV, wskaźnik anizocytozy erytrocytów – RDW, stężenie hemoglobiny – HGB, średnia masa hemoglobiny w krwince - MCH, średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach – MCHC, trombocyty – PLT, płytkokryt – PCT, średnia objętość krwinki płytkowej – MPV, wskaźnik anizocytozy trombocytów – PDW). Przeprowadzono badanie funkcji trombocytów, oceniano szlak aktywacji płytek zależny od ADP oraz szlak aktywacji zależny od COX-1 Stan osoczowego układu krzepnięcia oceniano na podstawie przeglądowych testów hemostazy: czasu protrombinowego (PT) i czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT). Oznaczono także stężenie fibrynogenu metodą PT zależną z użyciem tromboplastyny.

W pracy poszukiwano również zależności pomiędzy parametrami hematologicznymi a stężeniem metabolitów. Minimalne kryteria walidacyjne, jakie powinien spełnić zoptymalizowany model przyjęto na poziomie zgodnym z wymogami OECD: $Q^2_{\text{asym}}-Q^2 > 0 < 1$, $Q^2 \geq 0,65$, $R^2 \geq 0,85$, $Q^2-R^2 < 0$ (OECD, 2004, 2007). Tylko model spełniający wszystkie kryteria jednocześnie kwalifikowano, jako zweryfikowany pozytywnie i w pełni predykcyjny.

W przypadku trombocytów tuż po podaniu leku odnotowano istotny wzrost PLT a następnie spadek którego szczyt przypadł na 10-tą godzinę po podaniu MET ($p < 0,05$). Wartość PLT po 24 godzinach od podania leku wróciła do poziomu podstawowego. W przypadku fibrynogenu tuż po podaniu leku odnotowano istotny spadek którego szczyt przypadł na 6 godz. po podaniu MET ($p < 0,05$). Poziom fibrynogenu wrócił do poziomu wyjściowego po 24 godz. od podania MET. Potwierdzono również istotną zależność pomiędzy poziomem fibrynogenu a WBC ($R^2 = 0,8355$, $p < 0,05$). W przypadku pozostałych parametrów uzyskanych po podaniu MET nie stwierdzono zmian istotnych statystycznie. Stwierdzono istotną zależność między stężeniem 4MAA a parametrami hematologicznymi przedstawionych w postaci wyrażenia arytmetycznego $PT + [(Hb + Hct)/(RBC^{ATT \text{ Pr atio}})]$. Zależność ta jest statystycznie istotna ($p < 0,001$). Parametry walidacyjne wyznaczone metodą LOO dla zależności $4MAA \leftrightarrow PT + [(Hb + Hct)/(RBC^{ATT \text{ Pr atio}})]$ osiągnęły wartości: $Q^2_{\text{asym}} - Q^2 = 0,063$, $Q^2 = 0,8274$, $R^2 = 0,8905$, $Q^2 - R^2 = 0,0631$, $SS = 1573,36$, $PRESS = 271,57$. Jednocześnie nie potwierdzono istnienia tej samej zależności w odniesieniu do $4AA \leftrightarrow PT + [(Hb + Hct)/(RBC^{ATT \text{ Pr atio}})]$, ($p > 0,05$). Jak wykazano dane dotyczące Ht, Hb oraz RBC są w tym wypadku komplementarne co potwierdza przewidywalność zaproponowanego modelu. Pomiedzy RBC a sumą Ht oraz Hb wykazano silną istotną zależność ($R^2 = 0,9500$, $p < 0,05$). Jak wykazano na modelu świni hodowlanej po sześciu godzinach od podania leku wartość APTT znacznie spada. Krzywa relacjonująca efekt działania leku ma w tym wypadku przebieg fluktuacyjny. Pomiedzy 24 i 72 godziną od podania leku spadek wartości APTT pogłębia się i nie wraca do poziomu wyjściowego.

W trakcie prowadzonych analiz potwierdzono istnienie zależności $4MAA \leftrightarrow PT + [(Hb + Hct)/(RBC^{ATT \text{ Pr atio}})]$. Zależność ta ma wartość predykcyjną w odniesieniu do 4MAA, co potwierdziła przeprowadzona procedura walidacyjna. Oznacza to, że znając wartości parametrów morfologicznych po podaniu MET można wyznaczyć stężenie 4MAA w osoczu świni hodowlanej. Walidacja wymienionej zależności powiodła się tylko w odniesieniu do 4MAA co oznacza że mechanizm wpływu 4MAA na parametry hematologiczne jest różny od 4AA. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- 5.2.4. **Burmańczuk A.**, Milczak A., Grabowski T., Osypiuk M., Kowalski C. (2016) *The using of a piglets as a model for evaluating the dipyrone hematological effects.* BMC Vet Res, 12(1): 263.
(MNIŚW 40; IF 1,750)

Ad 5) Brałem czynny udział w badaniach oznaczania stężeń cefacetrilu w mleku po jednorazowym dowymieniowym podaniu preparatu „Masticef”, metodami chromatografii cienkowarstwowej (TLC-DB) oraz HPLC, a także w analizach porównawczych farmakokinetyki cefacetrilu i określaniu szybkości eliminacji tego antybiotyku u krów zdrowych i chorych. Badania przeprowadzono z preparatem dowymieniowym Masticef w objętości 5 ml (8 g) zawierającym 250 mg substancji czynnej. Doświadczenie wykonano na 18-tu krowach mlecznych, w końcowym stadium laktacji (n=8, grupa A) i grupie krów ze stanem zapalnym gruczołu mlekowego (n=10, grupa B). Cefacetril (CEF) podawano w postaci zawiesiny IMM tubostrzykawką w taki sam sposób w obydwu grupach. Próbkę mleka z antybiotykiem pobierano po 2, 3, 6, 8, 10, 24, 36 i 48 godzinach od podania leku. Od krów ze stanem zapalnym gruczołu mlekowego pobierane były próbki mleka, przed i po zakończeniu terapii, w celu przeprowadzenia badań bakteriologicznych. Odtłuszczone próbki mleka analizowano równolegle za pomocą HPLC i TLC-DB.

We wcześniejszych badaniach wykazano, że liniowa aproksymacja dla wykresu kalibracji w TLC-DB jest możliwa tylko dla wąskiego zakresu stężeń. Dlatego zależności między obszarem stref zahamowania i logarytm stężenia CEF w mleku zostały użyte, jako krzywe kalibracyjne. Ostateczne stężenie dla danej próbki zostało obliczane, jako średnia z trzech wartości uzyskanych na podstawie trzech krzywych kalibracyjnych. Do przeprowadzenia analizy statystycznej wyników użyto programu komputerowego Statistica 6,0. Istotność różnic pomiędzy średnimi w kolejnych godzinach po podaniu leku dla grupy krów zdrowych i dla grupy krów ze stanem zapalnym gruczołu mlekowego zweryfikowano testem t Studenta ($\alpha=0,05$). Podobnie postąpiono w przypadku obliczonych wskaźników farmakokinetycznych. Najwyższe (wartości średnie) stężenie CEF po jednorazowym podaniu preparatu Masticef zarówno u krów w stanie fizjologicznym, jak i u krów ze stanem zapalnym gruczołu mlekowego stwierdzono po 2 godz. od podania. Wynosiły one odpowiednio: 115,30 $\mu\text{g/ml}$ (grupa A) i 237,31 $\mu\text{g/ml}$ (grupa B). Istotne obniżenie stężenia CEF u obu grup zwierząt obserwowano po 6 godzinach od podania. Wartość stężenia u krów z grupy A wynosiła 25,35 $\mu\text{g/ml}$ a u krów z grupy B 28,45 $\mu\text{g/ml}$. W kolejnych godzinach (8, 10) od podania leku wartości stężenia CEF u obu grup krów ulegały dalszemu obniżeniu. Po 24 godzinach wartości stężeń leku obniżyły się u krów w grupie A do 1,57 $\mu\text{g/ml}$ a w grupie B do 2,15 $\mu\text{g/ml}$. Na podstawie uzyskanych stężeń badanego antybiotyku, przy zastosowaniu programu komputerowego PK Solution 2,0 określone zostały podstawowe parametry farmakokinetyczne związane z szybkością eliminacji CEF z mleka.

Z wyliczonych parametrów farmakokinetycznych wynika, że CEF zastosowany u krów z grupy A osiąga niższe stężenia maksymalne w mleku $C_{\text{max}}=140,50 \mu\text{g/ml}$

niż w grupie zwierząt z grupy B - $C_{\max}=174,29 \mu\text{g/ml}$. Istotnie niższe są również wartości AUC ustalone dla zwierząt zdrowych (grupa A) - 619,94 w porównaniu do zwierząt z *mastitis* (grupa B) – 1022,96. Odwrotnie wartość MRT dla CEF zastosowanego u krów z *mastitis* okazała się wyższa - 119,60 godz. w porównaniu z krowami zdrowymi – 22,20 godz. V_d u krów z grupy A wynosiła - 1,19 ml/kg, natomiast u krów z grupy B była stosunkowo wyższa - 2,78 ml/kg. Ocena istotności różnic między wartościami średnimi porównywanych wskaźników farmakokinetycznych u krów z grupy A i B wykazała istotne różnice między parami następujących wskaźników farmakokinetycznych: C_{\max} , AUC, MRT i V_d dla Masticefu stosowanego u krów zdrowych i chorych. Brak istotnych różnic stwierdzono tylko w przypadku - t_{\max} . Uzyskane stężenia CEF w mleku w pierwszych godzinach po podaniu antybiotyku świadczą o jego przydatności w leczeniu zapaleń gruczołu mlekowego. Osiągane stężenia antybiotyku wielokrotnie przekraczają wartości MIC, dla drobnoustrojów chorobotwórczych wywołujących *mastitis* i pozwalają na skuteczną eliminację czynników patogennych jak również uzyskane w niniejszym doświadczeniu wyniki wskazują, że adoptowana i poddana walidacji metoda TLC-DB i HPLC jest w pełni przydatna do oznaczania CEF w mleku. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

5.2.5. Choma I.M., Kowalski C., Lodkowski R., **Burmańczuk A.**, Komaniecka I. (2008) *TLC-DB as an alternative to the HPLC method in the determination of cefacetil residues in cow's milk*. J Liq Chromatogr Relat Technol, 31: 1903-1912.
(MNiSW 15; IF 1,026)

5.2.6. **Burmańczuk A.**, Roliński Z., Kowalski C., Zań R. (2011) *Concentration of cefacetil in milk after its intramammary administration to cows with health and inflamed mammary gland*. Bull Vet Inst Pulawy, 55: 685-688.
(MNiSW 20; IF 0,414)

Celem kolejnych badań było określenie aktualnej aktywności ampicyliny (AMP) w przypadkach *mastitis* przy użyciu modelu PK/PD. W celu ograniczenia przypadków nieskuteczności antybiotykoterapii w wyniku oporności bakterii wprowadzono stosowanie połączonego modelu wskaźników farmakokinetycznych i farmakodynamicznych – PK/PD. Parametry te używane w tym modelu to: AUC/MIC, okres czasu utrzymywania się stężenia antybiotyku powyżej wartości MIC (%T>MIC), C_{\max}/MIC . Doświadczenie wykonano na 9 krowach mlecznych ze stanem zapalnym gruczołu mlekowego, które otrzymały 5ml (75 mg ampicyliny sodowej). Próbki mleka pobierane były w następujących przedziałach czasowych: 2, 4, 6, 8, 10, 24, 36, 48, 60 godzinach i poddawane były procesom oznaczania.

Analizę farmakokinetyczną stężeń AMP w mleku przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego PK Solutions 2.0 a ocenę skuteczności AMP w warunkach *in vitro* przeprowadzono przy użyciu wskaźnika %T (>MIC) w stosunku do uzyskanych z piśmiennictwa wartości MIC dla izolatów z przypadków *mastitis* oraz odpowiednich szczepów referencyjnych. W naszych warunkach wskaźnik %T (>MIC) opiera się na założeniu, że w przedziale czasu T_0 - T_{60} wyrażonym w procentach (z założeniem $\%T_{0-T_{60}} > MIC = 100\%$), stężenia ampicyliny powinny przewyższać wartości MIC.

Po mniej więcej 10-24 godzinach, ostre nachylenie krzywych stężeń badanego antybiotyku zmniejsza się i przypomina krzywe dla leków podawanych pozanaczyniowo. Przy niskim stosunkowo wiązaniu się AMP z białkami, wyraźny spadek stężenia badanej penicyliny w mleku już po 4 godzinach od podania był spowodowany jego absorpcją do pęcherzyków gruczołu mlekowego i w mniejszym stopniu przenikaniem jego do krwi. Po mniej więcej 36 godz. od podania leku, krzywa stężenie-czas opada, aż do 60 godz. W tym okresie stężenie antybiotyku przekracza wartości MRL, jednak po 60 godzinach poziom był niższy od wartości MRL.

Okres półtrwania w fazie wchłaniania, który w decydującym stopniu wpływa na dalsze losy AMP w mleku, wynosił - 1,223 godziny. Wartości okresu półtrwania $t_{1/2-D}$ (h) i eliminacji $t_{1/2-E}$ (h) dla ampicyliny są w przedziale pierwszych 24 godzin od podania odpowiednio: $t_{1/2-D}$ (h) - 4,564 h i $t_{1/2-E}$ (h) - 7,366 godz. Oba wymienione parametry mają znaczenie przy wyznaczaniu okresu karencji w kolejnych przedziałach czasowych 24-60 godzin. Klirens AMP podanej IMM, wskazuje na częściową jej eliminację drogą przez kanaliki nerkowe. W celu sprawdzenia w warunkach *in vitro* skuteczności badanej aminopenicyliny w przypadkach *mastitis* użyto model PK/PD. Model ten wdrożono w oparciu o wykonaną analizę farmakokinetyczną stężeń AMP w mleku krów, a jako wskaźnik farmakodynamiczny użyto: %T (>MIC). Wskaźnik %T (>MIC) najlepiej prognozuje potencjalną skuteczność antybiotyku, której efekt bakteriobójczy zależy od czasu ich działania w miejscu zakażenia (np. beta-laktamazy). Według danych literaturowych wartości MIC dla bakterii izolowanych z przypadków *mastitis* są bardzo zróżnicowane i wahają się w zakresie 0,25-32 $\mu\text{g/ml}$. Na przykład wartości MIC dla szczepów referencyjnych wynoszą: *E. coli* (2-8 $\mu\text{g/ml}$) i *S. aureus* (0,5-2 $\mu\text{g/ml}$). Udało się ustalić, że tylko w przypadku niektórych izolatów od krów z *mastitis*, stężenia AMP w całym przedziale czasu - T_0 - T_{60} , były wyższe od ustalonych dla bakterii wartości MIC. Obliczone parametry farmakokinetyczne pozwalają ustalić różnice, które mogą powstać po podaniu AMP IMM w fazie absorpcji, dystrybucji i eliminacji tego antybiotyku z mleka. Przeprowadzone badania potwierdzają celowość stosowania modelu PK/PD w celu weryfikacji poziomu dawkowania dla innych antybiotyków β -laktamowych i stosowaniu

różnych wskaźników modelu PK/PD: AUC/MIC, C_{max}/MIC , %T >MIC. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- 5.2.7. **Burmańczuk A.**, Roliński Z., Kowalski C., Zań R. (2016) *Pharmacokinetic – pharmacodynamic model and ampicillin residue depletion after intramammary administration in cows*. J Vet Res, 60: 169-176. (Bul Vet Inst Pulawy) (MNiSW 15; IF 0,462)

W kolejnych badaniach, w których brałem udział celem było przeprowadzenie analiz bakteriologicznych próbek mleka pod kątem izolacji drobnoustrojów odpowiadających za zakażenia wymienia oraz określenie ich wrażliwości na wybrane antybiotyki β -laktamowe.

Badania przeprowadzono na grupie krów mlecznych (n=119) z $SCC \leq 400\ 000$ ml. Badania oporności na antybiotyki β -laktamowe wykonano metodą krążkowo-dyfuzyjną na podłożu Mueller-Hinton. Badania bakteriologiczne wykazały, że we wszystkich analizowanych oborach krów mlecznych czynnikami etiologicznymi były zarówno bakterie zaraźliwe jak też środowiskowe. W grupie bakterii zaraźliwych stwierdzono występowanie typowych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia wymienia: *Staph. aureus*, *Str. agalactiae*, *Corynebacterium bovis*. Stosunkowo szeroka grupę izolatów stanowiły odpowiedzialne za stany zapalne gruczołu mlekowego bakterie środowiskowe: *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *Staph. chromogenes*, *Staph. hyicus*, *E. coli*. Średni odsetek krów z przypadkami *mastitis* wywołanymi przez bakterie zaraźliwe wynosił 37,3%, a zapalenia wymienia wywołane przez drobnoustroje środowiskowe stanowiły 62,7% analizowanych przypadków. Wśród drobnoustrojów środowiskowych największy odsetek stanowiły paciorkowce (23%), następnie w kolejności gronkowce (13,2%) i *E. coli* (8,8%). Najliczniejszą grupę patogenów zaraźliwych stanowiły paciorkowce - *Str. agalactiae* (29,6%) i gronkowce - *Staph. aureus* (20,8%). Wyniki oporności badanych izolatów na cefalosporyny kształtowały się na różnym poziomie. Oporność 100% wykazywały izolaty *Corynebacterium bovis* wobec cefalontyny i *E. coli* wobec cefazoliny. Dalej w kolejności 80% badanych szczepów *Corynebacterium bovis* było opornych wobec cefacetrylu i 60% opornych izolatów wobec cefoperazonu. Wrażliwość badanych patogenów na testowane cefalosporyny układała się generalnie na niskim poziomie. Najwyższy odsetek izolatów *Str. dysgalactiae* było wrażliwych na cefazolinę – 80%. Tylko 50% analizowanych szczepów *Str. agalactiae* było wrażliwych na cefazolinę; taki sam poziom wrażliwości wobec cefacetrylu wykazywały szczepy *Staph. haemolyticus*. Poziom wrażliwości wszystkich pozostałych izolatów wobec 4 testowanych cefalosporyn wahał się w granicach 20-35%. Oporność na benzylopenicylinę G kształtowała na poziomie od 80% (szczepy *Staph. aureus*) do 60% (szczepy *Staph. haemolyticus*). Odnotowano stosunkowo wysoką wrażliwość w granicach 80-100% izolatów

Str. agalactiae, *Str. dysgalactiae* oraz *Corynebacterium bovis* na benzylopenicylinę G. Wysoki odsetek badanych izolatów był oporny na kloksacylinę: *Str. agalactiae* 60%, *Staph. haemolyticus* 60%, *Str. dysgalactiae* 80%. Oceniając wyniki stwierdzono, że poziom oporności na AMP w przypadku szczepów *E. coli* i *Staph. haemolyticus* był wyższy w porównaniu do amoksycyliny. Natomiast najwyższy odsetek szczepów wrażliwych na obie te aminopenicyliny stwierdzono w przypadku *Staph. aureus* i *Str. uberis*.

Ocena wrażliwości na antybiotyki izolatów z przypadków zapalenia wymienia pozwala na właściwy dobór aktywnych leków, zmniejsza prawdopodobieństwo braku skuteczności terapii i przyczynia się zmniejszenia skali zużycia antybiotyków. Testy *in vitro* na wrażliwość izolowanych bakterii wobec chemioterapeutyków umożliwiają również wczesną ocenę skali wzrostu szczepów opornych w danym gospodarstwie lub rejonie praktyki lekarskiej. Wyniki przedstawionych w tym doświadczeniu badań bakteriologicznych jeszcze raz potwierdzają konieczność stałego monitorowania poziomu wrażliwości na antybiotyki drobnoustrojów zarówno zaraźliwych jak i środowiskowych. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- 5.2.8. **Burmańczuk A.**, Kowalski C., Roliński Z., Zań R., Krasucka D. (2016) *Activity of β -lactam antibiotics against certain microorganisms which causa mastitis in cows*. J Vet Res, 60: 267-271. (Bull Vet Inst Pulawy)
(MNiSW 15; IF 0,462)

Ad 6) Część prac, zróżnicowanych pod względem tematycznym, jest efektem mojej współpracy między innymi z Zakładem Fizjologii, Zakładem Patofizjologii UP w Lublinie, Państwowym Instytutem Naukowych Badań Weterynaryjnych Produktów Leczniczych i Dodatków Paszowych (SCIVP), Laboratorium Instrumentalnych Metod i Analiz (LIMA) we Lwowie, Katedrą Anatomii Porównawczej i Antropologii UMCS w Lublinie, jak również Katedrą Anatomii, Biochemii i Fizjologii Weterynaryjnej Uniwersytetu w Pizie. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- 5.2.9. Borzym E., Bobowiec R., Kosior-Korzecka U., Martelli F., **Burmańczuk A.** (2008) *Disturbances of cow oocyte maturation by phytoestrogens*. Med Weter, 64(9): 1107-1111.
(MNiSW 10; IF 0)
- 5.2.10. Klebaniuk R., Yanovych D., Zasadna Z., Dobrowolski P., **Burmańczuk A.**, Szymańczyk S., Burmańczuk N., Kwiecień M. (2018) *Chloramphenicol-induced alteration in the liver and small intestine epithelium in pigs*. Ann Anim Sci, doi: 10.2478/aoas-2018-0001.
(MNiSW 20; IF 0,731)

5.3. Publikacje przeglądowe:

- 5.3.1. Kowalski C., Sztanke M., **Burmańczuk A.** (2003) *Makrocykliczne laktony w terapii chorób pasożytniczych.* Med Weter, 59(12): 1069-1072. (MNiSW 10; IF 0,236)
- 5.3.2. Kowalski C., Krasucka D., Pomorska M., **Burmańczuk A.** (2004) *Preparaty zarejestrowane w Rejestrze Produktów Leczniczych Dopuszczonych do Obrotu w Polsce, stosowane w zwalczaniu inwazji pasożytów wewnętrznych u psów i kotów.* Magazyn Wet, 13(91): 72-76. (MNiSW 0; IF 0)
- 5.3.3. Kowalski C., Roliński Z., Krasucka D., **Burmańczuk A.** (2004) *Preparaty stosowane w znieczuleniu miejscowym u zwierząt – środki miejscowo znieczulające.* Magazyn Wet, 13(93): 18-20. (MNiSW 0; IF 0)
- 5.3.4. **Burmańczuk A.**, Burmańczuk Z., Choduń M. (2006) *Praktyczne aspekty leczenia zaburzeń czynności przewodu pokarmowego na tle żywieniowym u dużych zwierząt.* Biuletyn Lubelskiej Izby Lekarsko-Wet, 4: 23-26. (MNiSW 0; IF 0)
- 5.3.5. **Burmańczuk A.**, Kowalski C., Burmańczuk Z. (2007) *Aktywność cefalosporyn I-szej generacji wobec Drobnoustrojów powodujących stan zapalny gruczołu mlekowego.* Biuletyn Lubelskiej Izby Lekarsko-Wet, 4: 28-30. (MNiSW 0; IF 0)
- 5.3.6. Zań R., Roliński Z., Kowalski C., **Burmańczuk A.**, Polska B. (2011) *Właściwości biologiczne melatoniny i jej zastosowania kliniczne u zwierząt.* Życie Wet, 86(3): 225-228. (MNiSW 4; IF 0)
- 5.3.7. Zań R., Roliński Z., Kowalski C., **Burmańczuk A.** (2012) *Melatonina, potencjalnie nowy lek przeciwnowotworowy stosowany u zwierząt.* Med Weter, 68(6): 321-384. (MNiSW 10; IF 0,203)
- 5.3.8. Zań R., Roliński Z., Kowalski C., **Burmańczuk A.** (2013) *Leczenie toksycznych uszkodzeń wątroby u psów i kotów przy użyciu antyoksydantów.* Życie Wet, 88(5): 392-395. (MNiSW 4; IF 0)
- 5.3.9. Zań R., Roliński Z., Kowalski C., **Burmańczuk A.** (2014) *Właściwości przeciwbólowe metatoniny oraz jej możliwości terapeutycznego zastosowania w zespołach bólowych.* Med Weter, 70(6): 336-341. (MNiSW 15; IF 0,218)
- 5.3.10. Markiewicz W., Barski D., **Burmańczuk A.**, Tomaszewska E. (2014) *Toxicity of salinomycin and narasin in turkeys.* J Elementol, 3: 903-914. (MNiSW 15; IF 0,690)
- 5.3.11. Krasucka D., Biernacki B., Szumiło J., **Burmańczuk A.** (2017) *Monitoring zużycia leków przeciwdrobnoustrojowych u bydła, trzody chlewnej i koni w Polsce w latach 2014-2016 na podstawie Programu Wieloletniego.* Życie Wet, 92(8): 578-581. (MNiSW 4; IF 0)

5.4. Monografie

- 5.4.1. Kowalski C., **Burmańczuk A.**, Zań R (2005) *Epidemiologia zagrożeń zdrowotnych preparatów stosowanych w zwalczaniu inwazji pasożytów wewnętrznych u psów i kotów*. Str. 633-640. Wydawca LIBER, Lublin.
- 5.4.2. Kowalski C., Łebkowska B., **Burmańczuk A.**, Pomorska M. (2007) *Odczyny alergiczne po stosowaniu wybranych antybiotyków*. Str. 109-125. Wydawca Studio Przygotowawcze Wydawnictw „Edycja” Olsztyn
- 5.4.3. Kowalski C., **Burmańczuk A** (2011) *Farmakologia zespołu biegunkowego u cieląt*. Lecznica Dużych Zwierząt (Monografia) 2(6): 48-50.
- 5.4.4. Kowalski C., **Burmańczuk A** (2012) *Rozpoznawanie wybranych toksykoz u bydła*. Lecznica Dużych Zwierząt (Monografia) 2(7): 82-85.
- 5.4.5. **Burmańczuk A.**, Zań R., Kowalski C (2016) *Leki stosowane w anestezjologii weterynaryjnej. Innowacje w medycynie i farmakoterapii*. Monografia IV Konferencja Naukowa Zakopane 8-11.03.2016. Str. 1-14. Wydawca PFO Vetos-Farma Sp. z o.o.

Kierowanie oraz udział w projektach badawczych

- **Kierownik projektu:** Badania farmakokinetyczne określające stopień ryzyka dla konsumentów po stosowaniu antybiotyków β -laktamowych u krów mlecznych z przypadkami *mastitis*. NCN, Nr N N308 603438, Czas trwania od 2010.05.17 do 2014.05.15.
- **Główny wykonawca:** Badania nad zachowaniem, się poziomów melatoniny we krwi psów w cyklu całodobowym i zmianami sezonowymi pod kątem zastosowań klinicznych. NCN, Nr N N308 386137, Czas trwania od 2009.10.20. do 2013.10.18.
- **Główny wykonawca:** tematu naukowo-badawczego WKD/U-267/2018. Opracowanie uniwersalnego modelu testowania farmakokinetyki terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych na etapie badań przedklinicznych, z wykorzystaniem modelu zwierzęcego świnii hodowlanej”. Zleconej przez: Zakłady Farmaceutyczne Polpharma SA ul. Pelplińska 19, 83-200 Starogard Gdański.

Nagrody za działalność naukową

- Indywidualna nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie III-go stopnia za pracę doktorską pt „Określenie farmakokinetyki cefacetrilu po dowymieniowym stosowaniu w stanach zapalnych i fizjologicznych gruczołu mlekowego u krów” UP w Lublinie 2009.

- Plakat: **Burmańczyk A.**, Kowalski C. "Activity of beta-lactam antibiotics against of some microbes causing inflammation of lactic gland in cows" otrzymał drugą nagrodę podczas 9th Anti-infectives Partnering and Deal-Making Conference in San Francisco 9-10 July 2012.
- Indywidualna nagroda Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie II-go stopnia za cykl publikacji związanych z badaniami nad farmakokinetyką, mikrobiologią i toksycznością leków stosowanych w medycynie weterynaryjnej oraz możliwościami wykorzystania naturalnych zeolitów w produkcji zwierzęcej, UP w Lublinie 2017.

Odbyte staże, szkolenia i kursy

- Polska, Zastosowanie metod chromatograficznych i elektromigracyjnych w analizie klinicznej, środowiskowej i analizie żywności Uniwersytet Łódzki 2002 (2 dni).
- Polska, Metoda analityczna w ocenie, jakości leków. Uniwersytet Medyczny 2003, Łódź, (2 dni).
- Polska, Wprowadzanie do kontroli, jakości badań laboratoryjnych 16-18.11 2007, Kraków (3 dni).
- Polska, System zarządzania w laboratoriach zgodnie z wymogami normy PN-EN ISO/IEC 17025 Lublin, 23-24.07.2009 (2 dni).
- Polska, Walidacja metod mikrobiologicznych ilościowych, jakościowych i alternatywnych oraz zapewnienie, jakości wyników badań zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO 7218: 2008. Jastrzębia Góra, 06-08.07.2011 (3 dni).
- Włochy, tygodniowy wyjazd z programu Erasmus 11-18.05.2013 Wydział Weterynarii Uniwersytet w Pizie.
- Włochy, tygodniowy wyjazd szkoleniowy z programu Erasmus 10-17.05.2014 Wydział Weterynarii Uniwersytet w Pizie.
- Włochy, tygodniowy wyjazd szkoleniowy z programu Erasmus 15-22.05.2016 Wydział Weterynarii Uniwersytet w Pizie.
- Włochy, tygodniowy wyjazd szkoleniowy z programu Erasmus 17-24.02.2018 Wydział Weterynarii Uniwersytet w Pizie.

Działalność dydaktyczna:

- Od roku 2002 prowadzę ćwiczenia z przedmiotu: „Farmacja”, jak również „Farmakologia weterynaryjna” którego jestem koordynatorem.
- W 2009 brałem udział w opracowaniu, a następnie aż do chwili obecnej prowadzę zajęcia z przedmiotu fakultatywnego: „Farmakologia kliniczna”.

- Od 2011 roku poza zajęciami dla studentów weterynarii uczestniczę w realizacji przedmiotu obowiązkowego „Farmakologia” na kierunku Zielarstwo i Terapie Roślinne, wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, UP w Lublinie.
- W roku akademickim 2015-2016 opracowałem skrypt do ćwiczeń dla studentów III-go roku Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie z przedmiotu „Farmakologia weterynaryjna”.

Działalność w komitetach organizacyjnych i naukowych

- Od roku 2012 do chwili obecnej jestem członkiem Rady Wydziału, Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie.
- Jestem koordynatorem planów zajęć dydaktycznych z przedmiotu Farmakologia weterynaryjna” od roku akademickiego 2008/2009 do chwili obecnej.
- Od 2009 do 2017 przez dwie kadencje byłem członkiem Rady Lubelskiej Izby Lekarsko-Weterynaryjnej (pełniłem funkcje przewodniczącego do spraw farmacji).
- Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych.
- Od 2017, jestem zastępcą Rzecznika Odpowiedzialności Zawodowej Lubelskiej Izby Lekarsko-Weterynaryjnej.

Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych.

- Journal of Veterinary Research (Bull Vet Inst Pulawy), Review June 2016.
(MNiSW 2015 15; IF 2015 0,462)
- Journal of Agricultural and Food Chemistry, Review September 2016.
(MNiSW 2016 40; IF 2016 3,152)
- Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Review January 2018.
(MNiSW 2017 25; IF 2017 1,202)
- Journal of Veterinary Research (Bull Vet Inst Pulawy), Review February 2018.
(MNiSW 2015 15; IF 2015 0,462)

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego. Szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim oraz współpracy naukowej międzynarodowej i krajowej jak również innej działalności (wg DzU. Nr 196, poz 1165) zebrałem i przedstawiłem w załączniku nr 4 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

07.03.2018r
Artur Burmańczyk.