

Wrocław, 28.05.2024

dr hab. Błażej Poźniak, prof. uczelni
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana lek. wet. Bartosza Sella
pt. „Zatrucia zwierząt rodentycydami antykoagulacyjnymi
– aspekty analityczne i ocena zagrożeń”**

Wykonanej w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
pod kierunkiem prof. dr. hab. Andrzeja Posyniaka (promotora)
i dr. hab. Tomasza Śniegockiego, prof. instytutu (promotora pomocniczego)

Analityka zatruc u zwierząt stanowi ciągle palący problem zarówno w kontekście klinicznej pracy lekarsko-weterynaryjnej, jak i zagadnień środowiskowych. Mimo ogromnego postępu w spektrometrii mas i metodach pokrewnych jaki miał miejsce w ostatnich kilku dekadach, wysokie koszty takich analiz, a także ciągle mała liczba specjalistów posiadających zarówno kompetencje analityczne jak i wiedzę lekarsko-weterynaryjną sprawiają, że tego typu usługi w warunkach polskich są nadal mało dostępne. Z drugiej strony, na przestrzeni ostatnich dwudziestu, trzydziestu lat, liczba ostrych zatruc u zwierząt wyraźnie spadła. Jest to przynajmniej po części spowodowane wycofaniem z rynku wielu niebezpiecznych pestycydów, a także wzrostem świadomości społeczeństwa i poprawą regulacji prawnych odnoszących się do użytkowania substancji chemicznych. Warto jednak pamiętać, że w miejsce wycofanych starych i toksycznych pestycydów pojawiło się w ostatnich latach wielokrotnie więcej substancji nowych, o niewielkim potencjale do wywołania zatrucia ostrego, ale często niebezpiecznych przy ekspozycji przewlekłej lub skojarzonej. Ta sytuacja stawia przed toksykologami weterynaryjnymi liczne nowe wyzwania i sprawia, że biegłość w najnowszych technikach analitycznych staje się znacznie bardziej potrzebna niż kiedyś.

Rodentycydy antykoagulacyjne od lat stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zatruc u zwierząt towarzyszących. Według ostatniego raportu rocznego brytyjskiego serwisu toksykologicznego (VPIS, 2022), pestycydy te stanowiły trzecią najczęstszą przyczynę wszystkich zgłoszeń. Ze względu na znaczną filogenetyczną bliskość organizmów docelowych (gryzonie) i zwierząt towarzyszących oraz gospodarczych, rodentycydy antykoagulacyjne nie wykazują tak typowej selektywności, jak ma to miejsce w odniesieniu do ogromnej większości współczesnych fungicydów, herbicydów, czy insektycydów. Dlatego zatrucia antykoagulantami, co zresztą Doktorant doskonale wykazał w swojej pracy, stanowią i

zapewne długo jeszcze stanowiąc będą istotny problem w klinice ostrych zatruc u zwierząt. Co więcej, rozpowszechniająca się wśród gryzoni oporność na starsze antykoagulanty przyczyniła się do konieczności stworzenia nowych przedstawicieli tej grupy (tzw. rodentycydy antykoagulacyjne II generacji), które wykazują niestety również większą toksyczność w stosunku do zwierząt niedoświadczonych.

Jednak oprócz wysokiej toksyczności w stosunku do kręgowców, rodentycydy antykoagulacyjne charakteryzują się wysoką trwałością oraz zdolnością do bioakumulacji i tym samym oddziaływania na różnych piętrach łańcuchów troficznych, szczególnie w stosunku do zwierząt drapieżnych i padlinożernych. A zatem oprócz istotnego znaczenia w toksykologii zatruc ostrych u zwierząt domowych, rodentycydy antykoagulacyjne, zwłaszcza te należące do drugiej generacji, stają się poważnym problemem środowiskowym.

W tym kontekście, podjęte przez Doktoranta badania nad opracowaniem i zastosowaniem nowoczesnej i precyzyjnej metody analitycznej służącej oznaczaniu szerokiego panelu antykoagulantów w materiale biologicznym stanowią istotny wkład w zrozumienie zagrożeń środowiskowych związanych ze stosowaniem rodentycydów antykoagulacyjnych w Polsce. Ponadto, opracowana metoda dostarcza nowoczesne narzędzie diagnostyczne lekarzom praktykom, co stanowi bardzo istotny aspekt aplikacyjny niniejszych badań. Należy zwrócić uwagę, że przedstawiona w dysertacji metoda analityczna jest rozwinięciem wcześniej opracowanej metody przesiewowej obejmującej nie tylko antykoagulanty, ale również wybrane insektycydy, kokcydiostatyki i mikotoksyny. Pierwotna metoda nie pozwalała jednak na precyzyjne oznaczenie rodentycydów w niektórych przypadkach, dlatego pojawiła się konieczność opracowania nowej metody dedykowanej tej grupie związków. W mojej ocenie Doktorant bardzo dobrze wywiązał się ze swojego zadania, a przedstawione w dysertacji wyniki są interesujące i wskazują na Jego dużą biegłość w analizie toksykologicznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma klasyczny układ, ze wstępem, celami i założeniami pracy, opisem materiału i metodyki badań, rozdziałem podsumowującym wyniki, dyskusją i wnioskami. Manuskrypt został napisany rzeczowo i klarownym językiem, zwraca też uwagę dużą dbałością o stronę edycyjną pracy. We wstępie Doktorant wyczerpująco przedstawił zagadnienie rodentycydów antykoagulacyjnych. Opisał historię odkrycia dikumarolu i późniejsze badania, które doprowadziły do rozwoju szerokiej grupy związków pochodnych, scharakteryzował poszczególne grupy chemiczne i ich przedstawicieli, dokładnie opisał ich toksykodynamikę i toksykokinetykę, a także szczegółowo podsumował dostępną wiedzę na temat ich toksyczności u różnych gatunków zwierząt. Następnie Doktorant opisał analitykę antykoagulantów zwracając uwagę na stosowane dotychczas metody, ich zalety i wady. W mojej ocenie wstęp jest merytoryczny i wskazuje na dużą wiedzę Autora zarówno w zakresie rodentycydów antykoagulacyjnych, jak i szeroko pojętej analityki toksykologicznej.

Następnie Doktorant sprecyzował cele i założenia pracy, jakimi było opracowanie i walidacja metody potwierdzającej służącej do oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych w oparciu o chromatografię ciekłą i spektrometrię mas, a także jej zastosowanie w badaniach materiału pobranego zarówno od zwierząt towarzyszących, jak i dzikich w latach 2018-2022.

Następnie Doktorant szczegółowo opisuje materiał badawczy i metody. Dokładnie przedstawia pochodzenie badanych próbek wątrób i surowicy, postępowanie z materiałem próbkowym, przygotowanie szeregów rozcieńczeń wzorców, oraz aparaturę badawczą. Opisuje metodę przesiewową, a następnie szczegółowy tok optymalizacji procesu ekstrakcji próbek, oraz warunków rozdziału chromatograficznego i detekcji w metodzie potwierdzającej. Etapy te są przedstawione bardzo przejrzysto i logicznie. Potem następuje opis procesu walidacji. W mojej ocenie w tym miejscu powinien znaleźć się precyzyjny odnośnik literaturowy do odpowiednich wytycznych. Zdaję sobie sprawę, że taki odnośnik znalazł się w punkcie 4.3 Wstępu, ale uważam, że dla porządku powinien zostać również zamieszczony tutaj, przy opisie procedur walidacyjnych.

W rozdziale „Przebieg i wyniki badań” Autor bardzo klarownie i szczegółowo opisuje wybór optymalnych warunków ekstrakcji rodentycydów z materiału biologicznego, oczyszczania ekstraktów, rozdziału chromatograficznego i parametrów pracy detektora. Następnie podsumowuje proces walidacji, a także ocenę stabilności bromadiolonu w próbkach wątrób. W kolejnej części Doktorant przedstawia w postaci bardzo szczegółowych tabel wyniki analiz toksykologicznych dla wszystkich indywidualnych zgłoszeń z podziałem na poszczególne grupy zwierząt (ptaki drapieżne i zwierzęta towarzyszące) oraz na gatunki. Liczba przeanalizowanych próbek i ich zróżnicowanie są imponujące i, w mojej ocenie, zestawienie to stanowi o wysokiej wartości poznawczej niniejszej pracy. Dzięki zastosowaniu również metody przesiewowej, w wielu przypadkach wykazano nie tylko obecność antykoagulantów, ale też insektycydów karbaminianowych czy fosforoorganicznych. Jest to niezwykle interesujące zestawienie i prowokuje do pytania, co w takich sytuacjach uznaje się za bezpośrednią przyczynę śmierci? W jednym przypadku (pies 132) wykazano obecność aż 5 antykoagulantów oraz karbofuranu. Stężenie kumachloru w tej próbce jest niezwykle wysokie, ale niestety nic nie wiemy o stężeniu karbofuranu. Takie przypadki stanowią zapewne duże wyzwanie interpretacyjne i prosiłbym Doktoranta o przedstawienie jak rozwiązuje się je w praktyce.

W rozdziale poświęconym dyskusji uzyskanych wyników, Doktorant tłumaczy konieczność opracowania prezentowanej metody jako uzupełnienie wcześniejszej metody przesiewowej. Zasadniczą przyczyną był suboptymalny rozdział pochodnych indandionu w dotychczas stosowanej metodzie. Zważywszy, że ani difacynon, ani chlorofacynon nie zostały stwierdzone w żadnej z niezwykle licznych badanych próbek, wydaje się, że akurat ten cel miał mniejsze znaczenie praktyczne. Być może w tym miejscu należałoby zebrać wszystkie zalety nowo opracowanej metody nad metodą przesiewową, co pozwoliłoby lepiej uwypuklić wartość tego nowego narzędzia.

W kolejnych częściach dyskusji Autor porównuje wypracowany tok analityczny z innymi opublikowanymi metodami służącymi do oznaczania antykoagulantów. Biorąc pod uwagę ogrom i zróżnicowanie czynników, które wymagają dopracowania, uwagę zwraca klarowny język i precyzja Doktoranta z jaką analizuje poszczególne etapy. Ponad wszelką wątpliwość Autor uzyskał znakomity poziom biegłości w analityce chromatograficznej i spektrometrii mas, co wśród lekarzy weterynarii jest niezwykle rzadkie. W dalszych etapach dyskusji Doktorant

analizuje wyniki pomiarów stężeń rodentycydów antykoagulacyjnych w materiale pobranym od ptaków drapieżnych i padlinożernych, i porównuje je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Analizuje możliwe drogi rozprzestrzeniania się tych związków w ekosystemach i związek zmierzonych stężeń z faktycznymi efektami toksycznymi i śmiercią zwierzęcia. Doktorant wykazuje powszechność występowania omawianych pestycydów wśród dzikich zwierząt i identyfikuje również obszary, w których dostępna wiedza jest niewystarczająca, wskazując tym samym kierunki potrzebnych badań. Następnie Autor analizuje wyniki uzyskane w materiale od zwierząt towarzyszących. Porównuje je z wynikami innych ośrodków i, przytaczając liczne dane literaturowe, opisuje trudności interpretacyjne. Jest to niezwykle interesujący fragment dyskusji, który wskazuje na duże doświadczenie Autora jako toksykologa-praktyka. Interesującą obserwacją było to, że u ptaków najczęściej stwierdzano brodifakum, natomiast u zwierząt towarzyszących dominował wyraźnie bromadiolon. Czy Doktorant podejrzewa jakie mogą być przyczyny tej różnicy? Następnie, po podsumowaniu, Autor formułuje sześć jasnych wniosków. Mam pytanie o drugi wniosek. Autor pisze: „*Stwierdzenie odpowiednio wysokich zawartości [rodentycydów antykoagulacyjnych – przyp. rec.] w wątrobie, w połączeniu ze zmianami anatomopatologicznymi, są wskazaniem do stwierdzenia, że substancje te były bezpośrednią przyczyną śmierci zwierzęcia*”. A co jeśli stwierdzono również karbaminian lub związek fosforoorganiczny? Jak się okazuje, to nie są wcale rzadkie przypadki. Czy metoda przesiewowa pozwala na ich oznaczenie ilościowe? Jak wtedy porównywać co było bezpośrednią przyczyną śmierci? Może, przy odpowiednio wysokich stężeniach insektycydu należy stwierdzić, że prawdopodobnie oba czynniki przyczyniły się do śmierci? A może, skoro u psa nr 132 wykazano obecność aż sześciu związków toksycznych, tak naprawdę są tam obecne jeszcze inne trucizny, których nasz panel nie pokrywa? Te pytania recenzenta nie są w żadnej mierze krytyką wniosków Doktoranta. Są raczej zaproszeniem do dyskusji na temat ograniczeń i wyzwań diagnostyki toksykologicznej.

Po wnioskach zamieszczony jest spis piśmiennictwa zawierający 99 pozycji. Około jednej czwartej cytowanych prac to publikacje jeszcze z XX w., ale są tam również prace z ubiegłego roku, co wskazuje na szeroką perspektywę Doktoranta i znajomość literatury naukowej poświęconej zatruciom rodentycydami antykoagulacyjnymi.

Na koniec tej części recenzji chciałbym zamieścić jeszcze kilka uwag i pytań szczegółowych:


1. Na rycinie 12. przy przejściu postaci utlenionej (epoksydowej) do postaci chinonowej (opisanej tu jako wit. K) pojawia się opis „oksydacja”, podczas, gdy etap ten ma charakter redukcji. Ponadto, jeżeli przedstawiony schemat został oparty na jakiejś wcześniejszej publikacji, dobrze byłoby podać źródło w opisie tej ryciny.
2. W podrozdziale 2.3 Wstępu Autor pisze: „*Toksykokinetyka zajmuje się badaniem relacji zachodzących pomiędzy substancjami toksycznymi a organizmami żywymi*”. Nie jest to do końca prawda. Toksykokinetyka skupia się na ilościowym opisie zmian stężeń trucizny w ustroju w zależności od czasu. Należy odróżnić ją od nauki badającej efekty takiej ekspozycji (i mechanizmy za nimi stojące), czyli toksykodynamiki.

3. We Wstępie, przy opisie metabolizmu, Autor wspomina o „*wewnątrzwątrobowym krążeniu niezmetabolizowanych RA*”. Nie do końca rozumiem, o jakim krążeniu tu mowa. Czy Autor ma na myśli recyrkulację jelitowo-wątrobową? To zjawisko jest z pewnością ważne w zatruciach tymi związkami, co potwierdza przytoczony przez Autora dwufazowy charakter profili toksykokinetycznych i opis zmian stężeń w ścianie jelita cienkiego.
4. Pojawiły się pewne przypadki lekko niefortunnego doboru słów. Autor wspomina o części „*niezwiązanej i niezaadsorbowanej trucizny*”. Wydaje mi się, że adsorpcja nie jest dobrym określeniem na interakcję z białkami osocza, czy tkanek (w tym białkami docelowymi). Raczej w kinetyce mówi się o „związaniu” leku przez białka. Innym przykładem jest słowo „kurczak” w Tab. 3. Lepszym określeniem byłaby kura domowa.
5. Autor nie wspomina o pozwoleniach lokalnej komisji etycznej. Wydaje mi się, że dla porządku powinny zostać podane ich sygnatury.
6. Chciałbym też zapytać o izomery bromadiolonu. Z własnych doświadczeń wiem, że często związek ten pojawia się w postaci dwóch pików, natomiast na pokazanych chromatogramach pik jest pojedynczy. Chciałbym zapytać Doktoranta, czy w swoich analizach zetknął się z tym zjawiskiem.
7. Czy rozważano badanie próbek od dzikich ssaków drapieżnych, np. lisów? Biorąc pod uwagę zależności troficzne łączące lisy z innymi dzikim gatunkami zwierząt, takie uzupełnienie byłoby bardzo interesujące.
8. Ryc. 22 i 24: czy nie należałoby podać dla jakiego stężenia uzyskano te chromatogramy?
9. Z Ryc. 28 i 29 wynika, że przy oczyszczaniu ekstraktów z zastosowaniem sorbentów to metoda G dawała lepsze rezultaty. Dlaczego zastosowano w takim razie metodę H?
10. Pojawiają się też drobne pomyłki, jak na str. 64, w ostatniej linijce pojawia się bromadiolon zamiast brodifakum.
11. W końcowej części dyskusji zabrakło mi interpretacji wyników dla wątrób myszy. Brak jest informacji o miejscu odłowu tych zwierząt. Czy to tereny bliskie siedzib ludzkich, czy raczej od nich odległe? Fakt, że zaledwie niewielki odsetek wyników był dodatni, w mojej ocenie wymaga komentarza. To też jest ważny i ciekawy wynik, który warto porównać z badaniami innych autorów.

Chciałbym wyraźnie zaznaczyć, że powyższe uwagi i pytania w żadnej mierze nie umniejszają wartości dysertacji przedstawionej przez Doktoranta. Przeprowadzone badania są niezwykle ciekawe, dotyczą istotnych problemów i, co dowodzi ich ważkości, stają się przyczynkiem do formułowania nowych problemów badawczych.

Podsumowując, uważam, że Pan lek. wet. Bartosz Sell bardzo dobrze wywiązał się ze swojego zadania, a przedstawiona do oceny dysertacja doktorska cechuje się wysoką wartością naukową, poznawczą oraz aplikacyjną. Co również jest bardzo istotne, przeprowadzone badania, a także sposób ich komunikowania, świadczą o wysokich kompetencjach jakie Doktorant nabył podczas dotychczasowej pracy.

W mojej ocenie praca doktorska Pana lek. wet. Bartosza Sella p.t. „Zatrucia zwierząt rodentycydami antykoagulacyjnymi – aspekty analityczne i ocena zagrożeń” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zawartym w Ustawie z 14 marca 2003 r. "O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595) oraz Rozp. MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 r. (Dz. U. 2018 r. poz. 261). W związku z powyższym, wnioskuję do wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Błażej Poźniak, prof. uczelni