

Lublin, 03.06.2024

Prof. dr hab. Jose Luis Valverde Piedra
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej lek. wet. Bartosza Sella pt. „Zatrucia zwierząt rodentycydami antykoagulacyjnymi – aspekty analityczne i ocena zagrożeń”, wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Andrzeja Posyniaka oraz Promotora pomocniczego Dr hab. Tomasza Śniegockiego, profesor instytutu w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Rodentycydy antykoagulacyjne, choć skuteczne w zwalczaniu gryzoni, mogą wpływać na ekosystem w różny sposób. Mają one bezpośredni wpływ na gryzonie, gdyż działając na układ krzepnięcia krwi powodują wewnętrzne krwawienia i śmierć, co bezpośrednio wpływa na ich populację. Jednakże inne zwierzęta, w tym ptaki drapieżne, które żywią się gryzoniami, mogą również spożywać zatrute osobniki, co może prowadzić do zatrucia wtórnego wpływając na populację drapieżników. i może. Ponadto, substancje antykoagulacyjne mogą zaburzać równowagę ekosystemu: przedostać się do gleby, wód gruntowych lub roślin, co może wpływać na inne organizmy, takie jak owady, ryby czy rośliny. Niektóre antykoagulanty są trwałe w środowisku i mogą kumulować się w łańcuchach pokarmowych. Warto podkreślić, że istnieją alternatywne metody kontroli gryzoni, takie jak pułapki na żywo czy naturalni drapieżnicy, które mogą być bardziej przyjazne dla środowiska. W każdym przypadku ważne jest zachowanie ostrożności i dbanie o równowagę w ekosystemie.



W kontekście oceny porównawczej produktów biobójczych działających jako rodentycydy antykoagulacyjne, Komisja Europejska podjęła decyzję wykonawczą w marcu 2024 roku. W dokumencie tym omówiono pytania dotyczące drugiej oceny porównawczej tych produktów, takie jak różnorodność chemiczna substancji czynnych, dostępność alternatywnych produktów biobójczych, skuteczność niechemicznych środków zwalczania, oraz ryzyko dla zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska.

Powyższe informacje pokazują ważność tematu na poziomie Unii Europejskiej a recenzowana praca trafnie wpisuje się w tę problematykę.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet Bartosza Sella została napisana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku komputerowego na 137 stronach formatu A4. Dysertację przedstawiono w układzie zawierającym spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wykaz tabel, wykaz rycin, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, wstęp, cel i założenia pracy, materiał i metodyka badań, przebieg i wyniki badań, dyskusja, wnioski i piśmiennictwo.

Rozprawa zawiera 44 rycin, 11 tabel i 98 pozycji piśmiennictwa w większości anglojęzycznych, z czego mniej niż połowa pochodzi z ostatnich 10 lat. Szata graficzna dysertacji jest bardzo staranna i estetyczna. Praca została napisana poprawnym językiem i w sposób zrozumiały.

Streszczenia w języku polski i angielskim zajmujące po dwie strony każde zawierają zwięzłą informację zawartości rozprawy doktorskiej.

Wstęp zajmuje 24 strony i zawiera przegląd piśmiennictwa wzbogacony o trzy tabele i dwanaście rycin. Rozdział ten przedstawia szczegółowy rys historyczny rodentycydów antykoagulacyjnych (RA), ich syntezę, rozpoznanie mechanizmu biobójczości oraz zastosowanie zarówno w zwalczaniu gryzoni, jak i w medycynie jako leki przeciwzakrzepowe. Autor skupia się na ewolucji RA od pierwszych przypadków związanych z kiszonką z nostryka żółtego, poprzez odkrycie dikumarolu, aż do opracowania warfaryny i późniejszych rodentycydów drugiej generacji. Dokładnie przedstawia historię RA, od pierwszych obserwacji ich działania po rozwój nowych substancji, wskazuje na znaczenie RA w różnych dziedzinach, od rolnictwa po medycynę. Rozdział ten jest dobrze napisany i dostarcza solidne podstawy do zrozumienia tematu pracy. Stanowi dobrze zorganizowany zbiór informacji, który prowadzi czytelnika przez



kolejne etapy odkryć i innowacji. Zawiera bogate informacje historyczne oraz kontekstowe dotyczące rozwoju i zastosowania rodentycydów antykoagulacyjnych. Autor skutecznie łączy historyczne odkrycia z obecnymi zastosowaniami RA, podkreślając ich znaczenie w zwalczaniu gryzoni oraz w medycynie jako leki przeciwzakrzepowe. Zawiera szczegółowe informacje na temat historii RA, ich odkrycia, rozwoju i ewolucji. Autor umiejętnie wiąże historyczne odkrycia z aktualnymi zastosowaniami RA. Podkreśla znaczenie i wpływ RA w różnych dziedzinach, od rolnictwa po medycynę, wskazując wszechstronność tych substancji. Rozdział ten jest solidną podstawą do dalszego eksplorowania tematu pracy i dostarcza czytelnikowi kompleksowego wglądu w historię i stan obecny.

Dalsza część tego rozdziału dotycząca charakterystyki rodentycydów antykoagulacyjnych jest wystarczająco szczegółowa i zawiera istotne informacje na temat budowy chemicznej, toksykodynamiki oraz toksykokinetyki rodentycydów antykoagulacyjnych. Doktorant dokładnie przedstawia strukturę chemiczną i sposób działania rodentycydów. Kompleksowo opisuje różne generacje rodentycydów, ich struktury molekularne, a także mechanizm działania, proces wchłaniania, dystrybucji, metabolizm i wydalanie w organizmie zwierząt. W szczególności wyjaśnienia mechanizm działania RA i ich wpływu na procesy krzepnięcia krwi i wskazuje na różne drogi, którymi RA mogą dostać się do organizmu, co ma znaczenie dla oceny ryzyka ekspozycji. W dalszej części rozdziału Doktorant kompleksowo przedstawia analizę źródeł narażenia, wchłaniania, dystrybucji i toksyczności rodentycydów antykoagulacyjnych (RA) dla różnych gatunków zwierząt. Szczegółowo omawia różne formy, w jakich RA są dostępne, oraz ryzyko związane z ich stosowaniem, zarówno pierwotnym, jak i wtórnym, dla zwierząt docelowych i nie docelowych podkreślając ryzyko związane z wtórnym narażeniem zwierząt wolnożyjących.

Następna część tego rozdziału obejmuje analitykę rodentycydów antykoagulacyjnych w materiale biologicznym: zawiera szczegółowe informacje na temat poszczególnych technik analitycznych oraz przygotowania próbek do analizy instrumentalnej. Doktorant przedstawia ewolucję metod analitycznych, od klasycznych technik spektrofotometrycznych po współczesne metody chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS), które są obecnie standardem w analizie tych związków. Dokładnie przedstawił różne techniki analityczne i ich ewolucje w czasie



ostatnich lat. Podkreśla znaczenia wyboru odpowiedniej techniki analitycznej dla uzyskania wiarygodnych wyników w wymiarze potwierdzającym.

W końcowej części rozdziału Doktorant skupia się na kryteriach analitycznych dla metod toksykologicznych używanych do oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych (RA). Podkreśla brak unormowań prawnych dotyczących wymagań, które powinny spełniać metody analityczne w diagnostyce toksykologicznej, zwracając uwagę na konieczność walidacji metod zgodnie z przewodnikiem SANTE/12682/2019. Wskazuje na konieczność stosowania metod walidowanych zgodnie z określonymi kryteriami, co zapewnia wiarygodność wyników i podkreśla zalety lub niedostatki detektorów UV-Vis i FLD oraz spektrometrii mas w zapewnieniu wysokiej selektywności i wykrywalności analitów. Zwraca uwagę, że obecny brak unormowań prawnych może prowadzić do niejednorodności w ocenie metod analitycznych i ich przydatności w diagnostyce toksykologicznej. Ponadto, Autor w swoich rozważaniach wskazuje na problemy związane z efektem matrycy w próbkach poddanych rozkładowi gnilnemu, które mogą wpływać na wyniki analiz.

Brak nadzoru nad stosowaniem rodentycydów antykoagulacyjnych i brak monitorowania ich pozostałości w żywności, mogące stanowić potencjalne narażenie zdrowia i życia zwierząt i ludzi, przyczyniły się do ukształtowania celu niniejszej rozprawy doktorskiej. Mając powyższe na uwadze, Doktorant postanowił opracować i zwalidować metodę analityczną do oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych, która pozwoliłaby diagnozować zatrucia zwierząt oraz ocenić ryzyko pośrednich zatruc zwierząt drapieżnych.

Do osiągnięcia tego celu Doktorant postanowił:

- zastosować technikę chromatografii cieczowej połączoną ze spektrometrią mas do potwierdzenia obecności rodentycydów antykoagulacyjnych w materiale biologicznym,
- zwalidować opracowane procedury zgodnie z wymogami dla metod stosowanych w diagnostyce toksykologicznej,
- analizować próbki z przypadków zatruc zwierząt w latach 2018 – 2022, których podejrzewano, że przyczyną są rodentycydy antykoagulacyjne,



- ocenić potencjalne narażenia zwierząt drapieżnych na zatrucia pośrednie rodentycydami antykoagulacyjnymi w Polsce.

W rozdziale „Materiał i metodyka badań” wynoszącym 19 stron zawarte są eksperymentalne aspekty przeprowadzonych przez Doktoranta badań. Rozdział ten wzbogacony jest o dwie ryciny. W ramach pracy nad metodą oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych w materiale biologicznym, Doktorant podjął szereg działań związanych z przygotowaniem i analizą próbek. Wybrał wątroby i surowice jako materiał badawczy, ze względu na ich przydatność w wykrywaniu RA. Pozyskał próbki od różnych gatunków zwierząt, w tym ptaków drapieżnych i padlinożernych, myszy, psów i kotów.

W dalszej części rozdziału Doktorant opisał postępowanie z próbkami do badań oraz zamieścił informacje nt. substancji i roztworów wzorcowych stosowanych w tych badaniach. Ponadto, zamieścił informację nt. użytych odczynników, materiałów, aparatury, sprzętu laboratoryjnego i stosowanych metod analitycznych. W pracy nad metodami oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych w materiale biologicznym Doktorant zastosował dwie główne metody: przesiewową i potwierdzającą, które poddał walidacji.

Szczegółowe przedstawienie procedur metodycznych, zawartych w tym rozdziale, powinien pozwolić osobie biegłej w technikach chromatograficznych i spektrometrii mas odtworzyć badania.

Rozdział „Przebieg i wyniki badań” zajmuje 40 stron i zawiera opis procedur oraz wyniki analiz umieszczonych w ośmiu tabelach i trzydziestu rycinach. Doktorant opisuje przebieg opracowania metody oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych, który obejmował kilka kluczowych etapów, w tym optymalizację warunków detekcji za pomocą techniki spektrometrii mas, optymalizacji warunków rozdziału chromatograficznego, optymalizacji warunków ekstrakcji i czyszczenia ekstraktów, optymalizacji doboru stosowanych sorbentów, które były następnie wykorzystywane w dalszej analizie jakościowej i ilościowej. W dalszej części rozdziału Doktorant opisuje wyniki walidacji metody oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych w wątrobie i surowicy. Następnie przedstawia wyniki analiz próbek pochodzących od ptaków drapieżnych i padlinożernych, wyniki analiz prób pochodzących od psów i kotów oraz mysz wolnożyjących.



Wyniki tych badań, jednoznacznie podkreślają potrzebę monitorowania i kontroli stosowania rodentycydów, a także innych substancji silnie toksycznych (karbaminiany), aby zapobiegać przypadkom zatruc zwierząt domowych. Ponadto, mogą one być wykorzystane do dalszych badań nad wpływem tych substancji na zdrowie i środowisko. Dyskusja na temat metod oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych (RA) podkreśla znaczenie postępu w technikach analitycznych dla weterynaryjnej diagnostyki toksykologicznej. Rozwój tych technik umożliwił identyfikację zatruc zwierząt przez RA oraz inne substancje toksyczne, co jest kluczowe dla ochrony zdrowia zwierząt i środowiska.

Podsumowując, przedstawione wyniki badań wskazują na skrupulatne i metodyczne podejście Doktoranta do opracowania metody analitycznej, która ma na celu zapewnienie dokładnego i wiarygodnego oznaczania rodentycydów antykoagulacyjnych w materiale biologicznym w wymiarze potwierdzającym. Dzięki temu możliwa będzie skuteczna diagnostyka toksykologiczna oraz ocena ryzyka zatruc pośrednich. Należy podkreślić, że prezentowane „Wyniki” potwierdzają, że autor bardzo dobrze opanował warsztat badawczy i swobodnie posługuje się nowoczesnymi technikami analitycznymi.

W rozdziale „Dyskusja” doktorant na 26 stronach skonfrontował swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób wyeksponował oryginalne wyniki własne, co dowodzi nie tylko dobrego opanowania tematyki badawczej ale także czytania, oraz dojrzałości w umiejętnym kierowaniu się logicznym wywodem, w którym ważne miejsce pełni celne dobieranie argumentów z piśmiennictwa naukowego. Informacje zawarte w tym rozdziale z pewnością przyczynią się do lepszego zrozumienia problematyki związanej z zatruciami rodentycydami antykoagulacyjnymi zwierząt towarzyszących i wolnożyjących.

Na podstawie uzyskanych wyników Autor sformułował sześciu syntetycznych wniosków końcowych podkreślających wagę wpływu rodentycydów antykoagulacyjnych (RA) na zdrowie zwierząt i środowisko. Podkreślają konieczność dalszych badań nad skutkami ekspozycji zwierząt na RA oraz potrzebę opracowania strategii ograniczającej ich stosowanie. Zwracają uwagę na konieczność ochrony bioróżnorodności i ekosystemów poprzez kontrolowane użycie RA.

Podsumowując, praca lek. wet. Bartosza Sella jest bardzo starannie przygotowaną rozprawą doktorską, która wnosi wartościowy wkład w dziedzinę Toksykologii



i Ekotoksykologii. Przedstawia kompleksowe spojrzenie na problematykę rodentycydów antykoagulacyjnych, ich wpływ na środowisko i zdrowie zwierząt. Analizuje obecność i wpływ tych substancji w łańcuchach pokarmowych, zwracając uwagę na ich długotrwałą obecność w tkankach i narządach zwierząt oraz ryzyko zatruc wtórnych. Podkreśla konieczności stosowania metod analitycznych w wymiarze potwierdzającym do wykrywania rodentycydów ze względu na istotne znaczenie dla ochrony zdrowia zwierząt i środowiska. Temat jest szczególnie aktualny i ważny, biorąc pod uwagę rosnące obawy dotyczące bezpieczeństwa ekologicznego oraz weterynaryjnej ochrony zdrowia publicznego. Szczegółowy opis metod analitycznych i wyników badań wskazuje na gruntowne podejście do tematu. Jestem przekonany, że rozprawa ta wnosi znaczący wkład w rozwój nauki. Gratuluję Autorowi pracy oraz obu promotorom za osiągnięcia i wspólną pracę nad tym ważnym tematem.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobne uchybienia zauważone przeze mnie podczas czytania rozprawy, które powinny zostać poprawione przy oddaniu pracy do druku.

W dalszej części ostatniego akapitu na stronie 30 zauważyłem określenie „krążenie wewnątrzwątrobowe” cytuję: „Zhydrolizowane metabolity, zanim dostaną się do krążenia ogólnego, poddawane są koniugacji z kwasem glukuronowym w trakcie krążenia wewnątrzwątrobowego”. Sugeruję Doktorantowi by w dalszym redagowaniu tematu ująć sprzęganie RA z kwasem glukuronowym w ramach reakcji drugiej fazy biotransformacji zachodzących w hepatocytach.

Brak jest informacji o przeprowadzonej analizie statystycznej wyników, pomimo dużej liczby badanych próbek. W opinii recenzenta warto byłoby pokusić się o przeprowadzenie próby określenia różnic statystycznie istotnych uzyskanych wyników stężeń rodentycydów antykoagulacyjnych w tkankach i narządach zwierząt objętych badaniem. Podniosłoby to wartość wykonanych prac w kontekście publikacji wyników w renomowanych czasopismach naukowych.

Wniosek końcowy

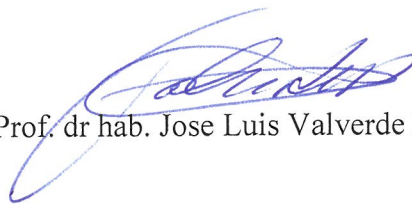
Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską lek. wet. Bartosza Sella uważam, że autor pracy posiadał wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy analitycznej, a otrzymane wyniki



logicznie zinterpretować. W moim przekonaniu praca dokumentuje ważne zagrożenie ekspozycji zwierząt na toksyczne działanie rodentycydów antykoagulacyjnych obecnych w ekosystemach, a uwagi krytyczne dotyczą jedynie usterek redakcyjnych i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji.

Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Bartosza Sella pt. „Zatrucia zwierząt rodentycydami antykoagulacyjnymi – aspekty analityczne i ocena zagrożeń”, w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim, określonych w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. z późniejszymi zmianami „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynarii, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie lek. wet. Bartosza Sella do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny oraz innowacyjnie ważny charakter recenzowanej dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.


Prof. dr hab. Jose Luis Valverde Piedra

