

dr hab. Jacek Karamon, prof. instytutu  
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

## RECENZJA

### **Rozprawy doktorskiej lek. wet. Piotra Damiana Teodorowskiego**

**pt.: „Badania nad aktywnością przeciwpiętowicią (anty-*Babesia canis*) suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro*” („*In vitro* studies on the antiprotozoal activity (anti-*Babesia canis*) of dried habanero peppers containing capsaicin)**

**wykonanej pod kierunkiem Promotora rozprawy prof. dr hab. Łukasza Adaszka z Katedry Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.**

Babeszjoza psów jest groźną, przenoszoną przez kleszcze chorobą wywoływaną przez pierwotniaki z rodziny *Babesia* pasożytujące wewnątrzkomórkowo w krwinkach żywiciela. W Polsce u psów mamy do czynienia jedynie z inwazją gatunku *B. canis*, w obrębie którego, m.in. dzięki badaniom prowadzonym przez promotora tej rozprawy, wyodrębniono szczepy różniące się zjadliwością. Inwazja ta stwierdzana jest na terenie całej Polski chociaż z większą częstotliwością we wschodnich rejonach kraju. Ze względu na coraz większą ekspozycję na kleszcze (z powodu cieplejszych zim - właściwie przez cały rok) oraz na często ciężki przebieg choroby u zarażonego zwierzęcia, inwazja tymi pierwotniakami stanowi istotny problem kliniczny i leczniczy w naszym kraju. W wielu przypadkach brak zastosowania skutecznego leczenia prowadzi do śmierci pacjenta. Ze względu na bardzo ograniczony asortyment skutecznych leków, celowym jest poszukiwanie alternatywnych i efektywnych rozwiązań leczniczych. Wychodząc naprzeciw potrzebom Pan lek. wet. Piotr Teodorowski podjął się badań nad tą jednostką chorobową skupiając się na opracowaniu nowej formuły leczniczej bazującej na naturalnych składnikach. Na obiekt badań eksperymentalnych nad anty-

pierwotniaczymi właściwościami trafnie wybrany został ekstrakt z papryczek habanero zawierający kapsaicynę.

Rozprawę doktorską lek. wet. Piotra Teodorowskiego stanowi monografia pod tytułem „**Badania nad aktywnością przeciwpierwotniaczą (anty-*Babesia canis*) suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach in vitro**”.

Przedłożona do recenzji praca ma postać monografii w typowym układzie. Podzielona jest na dziewięć głównych rozdziałów: 1. *Wstęp*, 2. *Cel badań*, 3. *Materiał i Metodyka*, 4. *Wyniki*, 5. *Dyskusja*, 6. *Wnioski*, 7. *Piśmiennictwo*, 8. *Streszczenie* w języku polskim, 9. *Streszczenie* w języku angielskim (*Summary*). Oprócz zasadniczej części rozprawy dokumentacja zawiera także oświadczenia promotora oraz autora pracy i *Spis treści*. Rozprawa obejmuje 71 stron maszynopisu wraz z 7 rycinami i 6 tabelami. Doktorant w pracy powołuje się na dane z obszernego piśmiennictwa w liczbie 109 pozycji.

We *Wstępie* Doktorant szczegółowo opisał aktualny stan wiedzy dotyczący babeszjozy psów. Na początku opisał czynnik etiologiczny - pierwotniaki z rodzaju *Babesia*. W sposób przystępny przybliżył czytelnikowi pewne zawiłości taksonomii tego pasożyta, przedstawiając ostatecznie bieżący stan badań w tym zakresie, włączając w to także wyniki analiz genetycznych. Zwięźle opisana została epidemiologia tej inwazji, a następnie przedstawiono patogenezę i objawy kliniczne, gdzie Autor szczegółowo opisuje przebieg inwazji w organizmie żywiciela, procesy zachodzące w jej trakcie oraz szereg symptomów chorobowych. Następnie zaprezentowane zostały sposoby rozpoznawania inwazji *Babesia* u psów, gdzie przedstawiono różne metody diagnostyczne, od metod mikroskopowych, przez serologiczne, do metod molekularnych (PCR). W kolejnym podrozdziale opisana została aktualna wiedza o sposobach leczenia babeszjozy psów. Przedstawiono tutaj głównie terapię najskuteczniejszym dostępnym lekiem jakim jest imidokarb. Poruszony tutaj został problem związany ze zmniejszającą się skutecznością leków przeciwpierwotniaczych oraz stosunkowo częstymi reakcjami niepożądanymi, co wymusza niejako konieczność prowadzenia badań nad alternatywnymi substancjami do zwalczania *Babesia*. Wychodząc z tego stwierdzenia Doktorant rozpoczyna opis właściwości alkaloidu kapsaicyna. Substancja ta (i jej pochodne), mechanizm działania, sposoby użycia w różnych działach medycyny, zostały scharakteryzowane bardzo szczegółowo. Ostatecznie w bardzo jasny sposób przedstawiono ten związek chemiczny jako kandydata na nowy lek przeciwpierwotniaczy, który mógłby być wykorzystany w zwalczaniu babeszjozy psów.

W rozdziale *Cel badań* Doktorant przedstawił jasno i w sposób konkretny cel badań, którym było określenie skuteczności przeciwpierwotniaczej suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro* w stosunku do pasożytów *Babesia canis* utrzymywanych w hodowli erytrocytów psów.

W rozdziale *Material i metody* szczegółowo opisano procedury badawcze oraz przebieg doświadczeń. **Na podkreślenie zasługuje fakt, że praca w zasadniczej części ma charakter eksperymentalny.** W pierwszej kolejności Doktorant przedstawił sposób przygotowania suszu z papryczek habanero i sposób określenia w nim zawartości kapsaicyny. Następnie opisano szczegółowo metody molekularne użyte w pracy (izolacja DNA, PCR, elektroforeza, sekwencjonowanie). Na końcu przedstawiono sposób prowadzenia hodowli erytrocytów oraz przebieg doświadczenia głównego dotyczącego oceny aktywności przeciwpierwotniaczej suszu z papryczek zawierającego kapsaicynę. Układ doświadczenia był następujący: zaplanowano badanie aktywności ekstraktu w trzech układach hodowlanych, każdy dla innego szczepu *B. canis*; susz z papryczek badano w każdym z układów w 5 rozcieńczeniach (od  $10^{-1}$  do  $10^{-5}$ ); jako kontrolę pozytywną wykorzystano dipropinian imidokarbu także w pięciu stężeniach. W trakcie doświadczenia oceniano stan parazytemii poprzez mikroskopowe badanie barwionych rozmazów hodowli krwinek. Stopień aktywności przeciwpierwotniaczej oceniano następująco: Hamowanie parazytemii powyżej 80% - silna aktywność, 50-80% - średnia aktywność, poniżej 50% - brak aktywności. Przy omawianiu tego rozdziału należy podkreślić wszechstronny warsztat badawczy wykorzystany przez doktoranta. W głównym nurcie pracy Doktorant musiał opanować prowadzenie i utrzymanie hodowli erytrocytów w tym badania mikroskopowe. Typowo klinicznym elementem była pozyskanie materiału od chorych psów. **Na uznanie zasługuje fakt, że ekstrakt do doświadczeń i ocenę zawartość substancji czynnej za pomocą chromatografii Doktorant wykonał specjalnie na potrzeby pracy, nie korzystając z dostępnych gotowych preparatów. Ponadto prawidłowo wdrożył także metody biologii molekularnej wraz z analizą sekwencji.**

Uzyskane rezultaty zostały przedstawione w rozdziale *Wyniki*. W pierwszej części opisano wyniki chromatograficznej oceny zawartości kapsaicyny i jej pochodnych w przygotowanym ekstrakcie z suszu. Uzyskano następujące stężenia: 4,30 mg/ml oraz 3,01 mg/ml odpowiednio dla kapsaicyny i dihydrokapsaicyny. Pochodne tych substancji stwierdzane były w kilkudziesięciokrotnie niższych stężeniach lub w śladowych ilościach. Za pomocą metody PCR potwierdzono obecność inwazji *Babesia* u wszystkich 48 psów włączonych w badania, u których wcześniej wykazano tę inwazję w badaniu mikroskopowym.

Analiza sekwencji uzyskanych produktów amplifikacji pozwoliła na wyodrębnienie trzech grup polimorficznych oznaczonych jako 18S RNA-A, 8S RNA-B i 8S RNA-C. Jest to istotny element pracy potwierdzający obecność wcześniej opisanych szczepów *B. canis* różniących się od siebie zjadliwością. Główne doświadczenie pracy doktorskiej przeprowadzone na hodowlach erytrocytów wykazało po pierwsze 100% skuteczność w hamowaniu namnażania się *B. canis* imidokarbu, który użyty był jako kontrola pozytywna eksperymentu. Natomiast zaobserwowano różnice w aktywności przeciwpirotniaczej ekstraktu suszu z papryczek habanero w zależności od stężenia oraz szczepu *B. canis* użytego w doświadczeniu. Tak więc ekstrakt rozcieńczony 1:10 ( $10^{-1}$ ) (zawierający 430 $\mu$ g/ml kapsaicyny) charakteryzował się silną aktywnością przeciwpirotniaczą (w stopniu 80-90%) wobec wszystkich badanych szczepów. Dopiero przy wyższych rozcieńczeniach suszu zaobserwowano różnice w skuteczności substancji w nim zawartych wobec poszczególnych szczepów pirotniaka. Stwierdzono, że przygotowany ekstrakt jest najbardziej aktywny wobec szczepu 18S-RNA-B, gdzie rozcieńczenie 1:100 i 1:1000 (zawierające 43 i 4,3 $\mu$ g/ml kapsaicyny) wykazywało silne działanie anty-*Babesia* (odpowiednio 90% i 80%), rozcieńczenie 1:10tys. (0,43 $\mu$ g/ml kapsaicyny) średnie, a dopiero w rozcieńczeniu 1:100tys. (0,043  $\mu$ g/ml kapsaicyny) wykazano brak aktywności (30% hamowania). Drugi w kolejności szczep, jeśli chodzi o wrażliwość na składniki suszu z papryczek, to szczep 18s-RNA-A. Tutaj przy rozcieńczeniu 1:100 i 1:1000 (43 i 4,3 $\mu$ g/ml kapsaicyny) uzyskano średnią aktywność przeciw *B.canis* (60% i 50%), podczas gdy kolejne rozcieńczenia uznano za nieaktywne. Natomiast najmniej wrażliwy na badany ekstrakt okazał się szczep 18s-RNA-C, gdzie najwyższym rozcieńczeniem, w którym uzyskano jakąkolwiek (średnią) aktywność było rozcieńczenie 1:100 (43  $\mu$ g/ml kapsaicyny). Należy zaznaczyć, że doświadczenie to wieńczy całość pracy dając bardzo ciekawe wyniki wzbogacające wiedzę o możliwościach alternatywnego leczenia babeszjozy psów. Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorant użył w eksperymencie hodowli erytrocytów zarażonych różnymi szczepami *B. canis* (które wcześniej wyizolował i zidentyfikował). Pozwoliło to na wychwycenie istotnych różnic w aktywności przeciwpirotniaczej badanej substancji, która uzależniona jest właśnie od szczepu. Co istotne, okazało się że szczep najbardziej zjadliwy, odpowiedzialny za ostrą postać babeszjozy okazał się mało wrażliwy na ekstrakt z suszu, w porównaniu do szczepu powodującego łagodniejszy przebieg choroby. Gdyby identyfikacja molekularna izolowanych pirotniaków nie była wykonana, mielibyśmy do czynienia z trudnymi do wyjaśnienia różnicami w aktywności badanego ekstraktu zawierającego kapsaicynę wobec *B. canis*.

Wyniki badań zostały gruntownie przedyskutowane w kolejnym rozdziale (*Dyskusja*) gdzie Doktorant odniósł się do dostępnej literatury związanej z obszarem badawczym objętym doktoratem. Sposób przeprowadzenia omówienia, prawidłowe użycie szerokiego zakresu piśmiennictwa podkreśla dobrą znajomość przedmiotu i umiejętność prowadzenia dyskusji przez Doktoranta. Na koniec Doktorant podsumował pracę prezentując cztery *Wnioski* odnoszące się do uzyskanych wyników badań.

Szczegółowa analiza dokumentacji ujawniła jednak, że autor nie ustrzegł się pewnych nieścisłości, które z obowiązku recenzenta zmuszony jestem przedstawić w formie uwag krytycznych.

- 1) W opisie czynnika etiologicznego (podrozdział 1.1, strona 5) daje się odczuć brak wyraźnego uszczegółowienia, że jest mowa o babeszjozie psów, a nie ogólnie o inwazji pierwotniaków z rodzaju *Babesia* występujących u różnych gatunków zwierząt i człowieka. Z formalnego punktu widzenia mamy tytuł całej pracy oraz tytuł podrozdziału odnoszący się do babeszjozy psów, jednak w trakcie lektury wskazane byłoby uściślić, od czasu do czasu, ten fakt. I tak, w pierwszym akapicie podrozdziału 1.1 jest mowa ogólnie o babeszjozie jako inwazji wywoływanej przez pierwotniaki z rodzaju *Babesia*, czyli nie tylko u psów. Dalej, w następnym akapicie, jest mowa o tym, że wyróżniamy dwie grupy tych pasożytów *B. canis*, *B. gibsoni*. Brak informacji, że rozpoczyna się opis gatunków odpowiedzialnych za babeszjozę psów, może wprowadzić czytelnika, przynajmniej chwilowo, w błąd. Takie doprecyzowanie (że mowa jest o babeszjozie psów) należałoby dodać w kilku miejscach wstępu: np. podrozdział 1.2. rozpoczyna się zdaniem "Babeszjoza występuje na całym świecie.." po czym wymieniane są dane ze świata i z Polski bez informacji, że mowa jest o przypadkach babeszjozy psów. Jest to uwaga raczej stylistyczna, jednak, dla jasności i z dbałości o czytelnika, podczas publikacji wyników badań w czasopiśmie naukowym dobrze będzie uściślić te wyrażenia.
- 2) Użycie terminu "opadnięte pasożytami komórki" (podrozdział 1.3, strona 7) w stosunku do piroplazm i krwinek wydaje się niezbyt trafne. Bardziej adekwatnym byłoby użycie terminu "zarażone pasożytami komórki". Termin "opadnięcie" stosuje się raczej w celu opisanego inwazji pasożytów zewnętrznych.
- 3) W opisie patogenezы (ostatnie zdanie podrozdziału 1.3, strona 9) doktorant użył zbyt jednoznacznego stwierdzenia: "brak podjęcia terapii piroplazmozy skutkuje rozwojem

wstrząsu i śmiercią zarażonego zwierzęcia". Jak wiadomo, przy braku leczenia może dojść do wstrząsu i śmierci, jednak nie musi. Należałoby to stwierdzenie zmodyfikować np. "...może skutkować rozwojem wstrząsu i śmiercią zarażonego zwierzęcia"

- 4) Podrozdział 3.2.1. Izolacja DNA (strona 25). Nie jest jasne dlaczego użyto dwóch zestawów do izolacji. Prawdopodobnie do części próbek użyto jednego zestawu, a do części drugiego. Należałoby to opisać. Ponadto, Doktorant zamieścił szczegółowy opis procedury izolacji DNA, co sugeruje że wg. tego protokołu wyizolowano DNA obydwoma zestawami. Tymczasem opisane etapy odpowiadają protokołowi zawartemu w instrukcji jednego z nich (Blood Kit A&A Biotechnology), który różni się znacząco od protokołu zalecanego przez producenta drugiego zestawu (QIAamp DNA mini Kit). Należałoby umieścić dodatkowo etapy izolacji dla zestawu QIAamp DNA Mini Kit, albo prościej, jeśli Doktorant wykonywał izolacje wg. zaleceń producenta, wystarczy zawrzeć informację, że izolację wykonano w/w zestawami wg. instrukcji producenta (i ewentualnie dodać odstępstwa od instrukcji jeśli takie były).
- 5) Doktorant błędnie opisał wzór do wyliczenia stopnia hamowania parazytemii w hodowli (Inhibitory rate)=[(A-B)/A]x100% (str. 31). Mianowicie wartość „A” została opisana jako „*parazytemia(%) w układzie z substancją kontrolną imidokarb*”. Tymczasem „A” we wzorze symbolizuje % parazytemii w układzie kontrolnym, ale z kontrolą negatywną (w tym przypadku była to 0,5% roztwór wodny DMSO).
- 6) Szkoda, że Doktorant nie zamieścił informacji o pochodzeniu chorych psów, od których pobierano krew z zarażonymi krwinkami. Uzyskalibyśmy interesujące dane epidemiologiczne dotyczące rozprzestrzenienia poszczególnych szczepów *B. canis*.
- 7) Podrozdział 4.3. (*Wyniki*). Wyniki dotyczące wpływu różnych stężeń kapsaicyny oraz imidokarbu na hamowanie parazytemii oceniano na podstawie mikroskopowej analizy rozmazów z hodowli erytrocytów. Z metodyki (str. 30) wynika, że barwione rozmazy z hodowli sporządzano co najmniej dwukrotnie w trakcie doświadczenia (po 48 godzinach doświadczenia, czyli po 24 godzinach od dodania roztworu zawierającego ekstrakt/imidokarb/DMSO) oraz ponownie na koniec (po 96 godzinach). W przedstawionych wynikach zabrakło informacji, które wyniki badania rozmazów były uwzględniane w analizie hamowania parazytemii przez ekstrakt z papryczek. Czy tylko te pobrane po 96h?
- 8) W dużej części pracy Doktorant posługuje się pewnym uproszczeniem opisując wyniki swoich badań poprzez użycie terminu „kapsaicyna”. Badania faktycznie dotyczą

aktywności suszu z papryczek habanero, co zresztą precyzyjnie określono w tytule i w celu pracy. Jak wiadomo, susz, obok kapsaicyny zawiera także inne kapsaicynoidy (w tym w podobnej zawartości dihydrokapsaicynę), ale również inne związki chemiczne, nie zdefiniowane w tej pracy. Skuteczność przeciw pierwotniacza, którą wykazano w pracy była wynikiem działania na *Babesia* mieszaniny związków chemicznych wchodzących w skład suszu. Bazując na literaturze można przypuszczać, że kapsaicyna była głównym czynnikiem aktywnym w tym zakresie. Jednak nie można wykluczyć interakcji (pozytywnej lub negatywnej) ze strony pozostałych substancji zawartych w badanym preparacie. Dlatego też, o ile w głównym tekście pracy stosowanie terminu „kapsaicyna” w miejsce „suzu” (na zasadzie skrótu myślowego) wydaje się dopuszczalne, o tyle w tak istotnym rozdziale jak „Wnioski” ta kwestia powinna być wyrażona precyzyjnie. I tak np. wniosek pierwszy powinien brzmieć „Suszu z papryczek habanero zawierający kapsaicynę hamuje namnażanie się pasożytów ...”, a nie: „Kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek...”, itd.

- 9) Ponadto, w pierwszym wniosku wydaje się zbędne stwierdzenie „Kapsaicyna (...) obok wielu innych właściwości” – praca nie dotyczyła innych właściwości kapsaicyny.
- 10) Wniosek drugi zawiera błąd rzeczowy dotyczący nazwy szczepu : „*Najmniej zjadliwy szczep 18S RNA-B wykazuje jednocześnie najwyższą wrażliwość na alkaloid, podczas, gdy szczepy 18S RNA-B – odpowiedzialne za rozwój ostrej babeszjozy oraz 18S RNA-C odpowiedzialny za rozwój przewlekłej/subklinicznej babeszjozy wydają się być bardziej odporne na działanie tej substancji.*”, powinno być „*Najmniej zjadliwy szczep 18S RNA-B wykazuje jednocześnie najwyższą wrażliwość na alkaloid, podczas, gdy szczepy 18S RNA-A – odpowiedzialne za rozwój ostrej babeszjozy oraz 18S RNA-C odpowiedzialny za rozwój przewlekłej/subklinicznej babeszjozy wydają się być bardziej odporne na działanie tej substancji.*”. Jest to znacząca pomyłka, występująca w newralgicznej części pracy jaką są *Wnioski*, która może wprowadzić u czytelnika sporo zamieszania. Niestety w streszczeniu (zarówno w wersji polskiej jak i angielskiej) błąd z drugiego wniosku dotyczący nazwy szczepu w powiązaniu z inną wrażliwością na ekstrakt z suszu został powielony.
- 11) Błędy edytorskie nie wpływające istotnie na treść zasadniczej części pracy:
  - a. Numeracja rozdziałów w tekście została zaburzona. Mianowicie, tym samym numerem (4.) opisano zarówno rozdział Wyniki jak i rozdział Dyskusja, co

pociąga za sobą zmianę numeracji także dalszych rozdziałów i niezgodność z numeracją rozdziałów w spisie treści.

- b. Numeracja stron w wersji elektronicznej jest nieprawidłowa – nastąpiło przesunięcie (o jedną stronę) w stosunku do papierowego oryginału, co sprawia, że w elektronicznej wersji strony rozdziałów w spisie treści nie odpowiadają numerom stron w tekście.
- c. W wielu miejscach pracy Doktorant użył kropki zamiast przecinka opisując liczby z ułamkami dziesiętymi (np. na stronach 22, 23, 37, 39, 40).
- d. W piśmiennictwie dwukrotnie przytoczono tę samą referencję - *Murnigsih T., Subeki Matsuura H., Takahashi K., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Suzuki M., Kobayashi S., Chairul Yoshihara T. 2005: Evaluation of the inhibitory activities of the extracts of Indonesian traditional medicinal plants against Plasmodium falciparum and Babesia gibsoni. J. Vet. Med. Sci. 67, 829-831.*
- e. W treści pracy Doktorant nie uniknął błędów edycyjnych w postaci tzw. literówek. Proporcjonalnie, szczególnie obfite w ten rodzaj pomyłek jest streszczenie. Przykłady:
  - Str. 68: „kapsacyjną” zamiast „kapsacyiną”
  - Str. 68: „badń” zamiast „badań”
  - Str. 68 „papryzek” zamiast „papryczek”
  - Str. 68 „Aktywnosc” zamiast „Aktywność”
  - Str. 69 „s stopniu” zamiast „w stopniu”
  - Str. 69 „kapsaicyne” zamiast „kapsaicynę”
  - Str. 69 „alakloid” zamiast „alkaloid”

Podsumowując, mimo że Doktorant nie ustrzegł się podczas redagowania rozprawy pewnych błędów, nie umniejszają one wartości naukowej pracy. Praca prezentuje bardzo oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Badania przeprowadzone podczas realizacji doktoratu były pracochłonne, a osiągnięte rezultaty istotnie wzbogaciły wiedzę w zakresie nowatorskich, alternatywnych i naturalnych metod zwalczania inwazji *Babesia canis* u psów. Doktorant wykazał się bardzo dobre przygotowanie i profesjonalizm w samodzielnym prowadzeniu badań w szerokim spektrum metodologii i technik badawczych: od badań



mikroskopowych, przez hodowle komórkowe, przygotowanie ekstraktu z wykorzystaniem chromatografii, do badań molekularnych łącznie z genotypowaniem.

**Reasumując przedstawioną ocenę, uważam, że recenzowana rozprawa doktorska Pana lek. wet. Piotra Damiana Teodorowskiego pt.: „Badania nad aktywnością przeciwpięrowotniaczą (anty-*Babesia canis*) suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro*” odpowiada w pełni warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) Wobec wymienionego faktu, przedkładaam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (zgodnie z Uchwałą Rady Dyscypliny z dnia 27 kwietnia 2023 r.) wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana lek. wet. Piotra Damiana Teodorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

