

Olsztyn, 15.06.2023 r.

prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj  
Katedra Epizootiologii  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski  
w Olsztynie

## OCENA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Piotra Damiana Teodorowskiego**  
pt. „**Badania nad aktywnością przeciwpięrowotniaczą (anty-*Babesia canis*) suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro*”  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Łukasza Adaszka, w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych**

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Podstawę formalną recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 27 kwietnia 2023 r.

Babeszjoza psów to ciężka, często śmiertelna transmisyjna choroba przebiegająca z objawami niedokrwistości hemolitycznej. Jej przyczyną są przenoszone przez kleszcze wewnątrzerytrocytarne pierwotniaki z rodziny *Babesidae*. W Polsce jest to najczęściej *Babesia canis canis*.

Mimo, że pierwsze przypadki babeszjozy, zwanej dawniej piropłazmozą, zanotowano w Polsce jeszcze w latach 60. XX w, to przez wiele lat choroba ta uważana była za rzadką, wręcz egzotyczną, typową dla krajów śródziemnomorskich. Obecnie możliwe, że wskutek zmian klimatycznych i związanym z tym dłuższym sezonem aktywności kleszczy, stała się jedną z powszechniejszych transmisyjnych chorób psów w Polsce, zwłaszcza we wschodnich rejonach kraju.

Dotychczas, mimo prób, nie udało się opracować szczepionki w pełni chroniącej psy przed rozwojem babeszjozy. Leczenie z zastosowaniem preparatów przeciwpięrowotniaczych również nie zawsze bywa skuteczne i wskaźnik śmiertelności z powodu babeszjozy jest wciąż wysoki. Lekiem z wyboru jest imidokarb, którego działanie polega na uszkodzeniu jądra komórkowego pierwotniaka, lecz niestety, preparat ten bywa też przyczyną wielu reakcji

niepożądanych. Dodatkowo, notowana jest coraz częściej oporność *Babesia* na działanie tego leku. Pozostałe dostępne na rynku preparaty o podobnym zastosowaniu cechuje ograniczona skuteczność. Rodzi to konieczność poszukiwania nowych środków możliwych do stosowania w terapii babeszjozy w przypadkach nieskuteczności lub braku tolerancji imidokarbu przez organizm leczonych zwierząt. W związku z tym podjęcie przez lek. wet. Piotra Teodorowskiego badań nad aktywnością przeciwpierwotniaczą substancji zawartych w papryczkach habanero uważam za uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, o konstrukcji typowej dla tego rodzaju opracowań, liczy 71 stron i składa się z 9 rozdziałów takich jak Wstęp, Cel badań, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo oraz Streszczenia w językach polskim i angielskim. Dysertacja zawiera 6 tabel i 7 rycin.

We wstępie podzielonym na siedem podrozdziałów lek. wet. Piotr Teodorowski w wyczerpujący sposób opisał czynnik etiologiczny babeszjozy psów, jego cykl rozwojowy, systematykę, epidemiologię i patogenezę choroby, objawy kliniczne, metody diagnostyczne oraz metody leczenia stosowane w babeszjozie. W rozdziale tym zostały również opisane właściwości kapsaicyny i sposoby wykorzystywania tej substancji w leczeniu różnych schorzeń u ludzi i zwierząt. Podkreślone zostały właściwości bakterio- i wirusobójcze kapsaicyny oraz potencjalne właściwości przeciwpasożytnicze, sugerujące możliwość zastosowania jej w leczeniu babeszjozy. Wstęp dowodzi bardzo dobrej znajomości badanej problematyki i piśmiennictwa oraz uzasadnia celowość podjętych badań.

W rozdziale zatytułowanym „Cel badań” lek. wet. Piotr Teodorowski w jednym zdaniu opisał przedmiot prowadzonych badań, którym było określenie skuteczności przeciwpierwotniaczej suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro* w stosunku do *B. canis* utrzymywanych w hodowli erytrocytów psów.

Rozdział „Materiał i metody”, liczący 10 stron, został podzielony na trzy podrozdziały opisujące poszczególne etapy badań. Pierwszy etap dotyczy ekstrakcji kapsaicynoidów z suszu papryczek habanero oraz określenia zawartości kapsaicyny metodą chromatograficzną. Drugi etap poświęcony jest selekcjonowaniu trzech genotypów *B. canis* wykorzystanych w kolejnym etapie badań. Opisano izolację DNA, startery i warunki zastosowane w PCR oraz elektroforezie, sposoby przygotowania uzyskanego produktu reakcji do sekwencjonowania oraz metody analizy uzyskanych sekwencji. Następnie opisane zostały sposoby przygotowania i prowadzenia hodowli *in vitro* *B. canis* w erytrocytach, jak też kryteria oceniania parazytemii.

Ostatni etap badań dotyczył oceniania aktywności przeciwpierwotniaczej badanej substancji w hodowli zarażonych erytrocytów.

Zastosowana w pracy doktorskiej metodyka, mimo swojej złożoności, została jasno przedstawiona.

Wyniki badań przedstawiono na 12 stronach w trzech podrozdziałach w sposób opisowy i graficzny. Rozdział zawiera 5 tabel i 4 ryciny.

Interesującym elementem badań jest wyodrębnienie trzech grup polimorficznych *B. canis* i powiązanie przynależności polimorficznej pierwotniaka z chorobotwórczością. Najliczniejsza grupa 18S RNA-A pochodziła z przypadków ostrej babeszjozy, pozostałe 18S RNA-B i 18S RNA-C z przypadków o przebiegu podklinicznym. Wyniki te potwierdzają występowanie nowych szczepów *B. canis* w Polsce. Ma to istotne znaczenie dla zrozumienia różnic w przebiegu choroby i poznania jej patogenez, a w przyszłości może mieć znaczenie diagnostyczne.

Aktywność ekstraktu z papryczek w porównaniu do imidokarbu oceniano na podstawie zmiany koloru hodowli. Najwyższą aktywność przeciwpierwotniaczą wykazano przy rozcieńczeniu  $10^{-1}$  (430 mg/ml), gdzie zdolność do hamowania parazytemii we wszystkich grupach polimorficznych oceniono na 80-90%. Szkoda, że nie została zamieszczona rycina z fotografią dokumentującą różnice zabarwienia hodowli.

Interesującym elementem recenzowanej rozprawy jest rozdział „Dyskusja” liczący 11 stron, zawierający krytyczną analizę wyników badań własnych w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Lek. wet. Piotr Teodorowski w rozdziale tym dowiódł umiejętności prowadzenia naukowej polemiki, a odpowiednio dobrane piśmiennictwo świadczy o szerokiej znajomości badanej problematyki.

Recenzowaną pracę doktorską wieńczą cztery wnioski dokumentujące zaplanowane cele badawcze oraz wykaz 109 pozycji piśmiennictwa dowodzących umiejętności doboru literatury odpowiedniej do analizy i dyskusji uzyskanych wyników badań własnych. Na końcu zamieszczone zostały streszczenia w językach polskim i angielskim.

Podsumowując, należy stwierdzić, że wykonane przez Doktoranta obszerne i pracochłonne badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych zasługujących na pozytywną ocenę. Lek. wet. Piotr Teodorowski wykazał, że kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero hamuje namnażanie się *B. canis* w hodowlach erytrocytów *in vitro*. Szczepy *B. canis* izolowane od psów cechuje nie tylko różna zjadliwość, lecz również różna wrażliwość na kapsaicynę, a skuteczność hamowania wzrostu pierwotniaków na poziomie 80-90% w porównaniu do imidokarbu określono jako znaczną. Niewątpliwie jednym z cenniejszych praktycznych aspektów recenzowanej pracy jest

wykazanie, że kapsaicyna jest substancją bezpieczną, nie uszkadzającą w warunkach *in vitro* krwinek czerwonych.

Uzyskane wyniki stanowią interesujący materiał badawczy rzucający nowe światło na możliwości terapeutyczne babeszjozy psów.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak kilka nieścisłości i błędów, których Autor nie ustrzegł się przygotowując ostateczną wersję rozprawy, zatem jako recenzent zobowiązana jestem przedstawić je w formie uwag krytycznych.

- Szyk wyrazów w tytule „**Badania nad aktywnością przeciwpiertwotniaczą (anty-*Babesia canis*) suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro***” sprawia, że jest on nieco zawyły. Jeśliby Autor zamierzał opublikować wyniki, to sugeruję zmienić szyk zdania na „Badania *in vitro* nad aktywnością przeciwpiertwotniaczą (anty-*Babesia canis*) kapsaicyny zawartej w suszu z papryczek habanero”.
- We wstępie (str. 5) Doktorant napisał, że „Dotychczas u psów w Polsce stwierdzono występowanie jedynie *Babesia canis*”. Tymczasem w literaturze krajowej dostępnych jest co najmniej kilka artykułów, w tym autorstwa Promotora pracy, na temat izolacji w Polsce coraz częściej również *B. gipsoni*.
- W pracy Doktorant zamieścił wiele niewyjaśnionych, nie w pełni lub nieprawidłowo opisanych skrótów. Sądzę, że zamieszczenie listy zastosowanych w pracy skrótów w dużej mierze zapobiegłoby temu problemowi.
  - Str. 7 - (SPA- rozpuszczalny antygen pierwotniaczy) - pochodzący od: Soluble Parasitic Antigen.
  - Str. 8 – DIC - wewnątrznaczyniowy zespół wykrzepiania - wyjaśnienie (Disseminated Intravascular Coagulation) zawarto na stronie 9. Powinno być w miejscu pierwszego zastosowania skrótu
  - Str. 16 - CGRP – receptor Calcitonin Gene-Related Peptide
  - Str. 22 - roztwór TFA – kwas trifluoroctowy (trifluoroacetic acid)
  - Str. 23 – HPLC – chromatografia wysokosprawna, (High Performance Liquid Chromatography)
  - Str. 30 – DMSO – dimetylosulfotlenek (Dimethylsulfoxide)
  - Str. 31 – wartość IC<sub>50</sub> - połowa maksymalnego stężenia hamującego (Half maximal inhibitory concentration).

- Str. 45 – CS – domyślam się, że to Capsaicin Synthetase
- Ogólnie przyjętą zasadą w piśmiennictwie naukowym jest opisywanie rycin u dołu, a tabel na górze. W recenzowanej pracy panuje dowolność, np. ryc. 1 opisana na dole, ryc. 2 u góry.
- Na str. 14 „Wstępu” Autor, opisując metody leczenia babeszjozy odwołuje się do tabeli 1. Tabela oznaczona jako pierwsza znajduje się na str. 23, w rozdziale „Materiał i metody” i dotyczy warunków gradientowych metody rozdzielania próbki przy wykorzystaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej. Przypuszczam, że w rozdziale „Wstęp” nie o tę tabelę chodziło Autorowi.
- „Wirus HSV” (str. 20) – skrót HSV zawiera już w sobie słowo wirus.
- Podobnie „reakcja PCR” (str. 25) – w skrócie zawarte jest już słowo „reakcja”.
- Cel badań ani żadne inne zdanie nie powinno zaczynać się od spójnika „ponieważ” (str. 21).
- W spisie treści widnieje rozdział zatytułowany „Materiał i Metodyka”, tymczasem w pracy, na str. 22 rozdział ten zatytułowano „Materiał i metody”.
- Tabela 1 zatytułowana „Warunki gradientowej metody rozdzielania próbki przy wykorzystaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej” wymaga dodatkowego opisu zawartych w niej symboli (%A, %B) oraz podania jednostki czasu.
- W rozdziale „Materiały i metody” opisana została metoda oznaczania kapsaicyny, natomiast w rozdziale „Wyniki” podane zostały rezultaty analizy jakościowej i ilościowej różnych kapsaicynoidów. W rozdziale „Materiały i metody” zabrakło informacja o metodach analizy zawartości kapsaicynoidów.
- W rozdziale „Wyniki” znalazła się również informacja, że badana krew pochodziła od 48 psów podejrzanych o babaeszjozę. To dane na temat materiału badawczego, zatem również powinny znaleźć się już w poprzednim rozdziale.
- W pracy Doktorant pisze o zawartych w papryczkach habanero na przemian kapsaicynoidach lub kapsanoidach (Tabela 2, str. 14, 32, 44, 45). Określenia te powinny być jednolite w całej pracy.
- W całej pracy Autor często pisze o rozcieńczeniach suszu z papryczek. Powszechnie wiadomo, że rozcieńczyć można tylko roztwór. Może więc lepiej brzmiałoby rozcieńczenie ekstraktu z suszu z papryczek.
- W całej pracy: określenie *in vitro* powinno być pisane kursywą. Tymczasem kursywa stosowana jest naprzemiennie.

- W pracach naukowych, a za taką należy uznać rozprawę doktorską, przyjęto podawanie pełnej nazwy patogenu, gdy wymienia się go po raz pierwszy – w tym wypadku to *Babesia canis*. W dalszej części pracy powinien być stosowany już tylko skrót (tu: *B. cans*). W recenzowanej pracy pisane jest to różnie.
- W dyskusji Doktorant zaznacza, że głównymi związkami o działaniu przeciwpierwotniaczym w suszu z papryczek habanero są kapsaicyna i dihydrokapsaicyna, natomiast w materiałach i metodach dowiadujemy się o działaniu jedynie kapsaicyny na hodowle erytrocytarne zarażone babeszją. Dobrze by było rozważyć, czy w przypadku przyszłych publikacjach badań zamiast o kapsaicynie z suszu papryczek nie pisać o kapsaicynoidach z suszu. Z opisu metod można wywnioskować, że nie rozdzielano tych substancji.
- W dyskusji lek. wet Piotr Teodorowski porusza temat skuteczności przeciwko pierwotnikom różnych ekstraktów roślinnych wymieniając jedynie nazwy łacińskie licznych gatunków roślin, z których ekstrakty uzyskano. Nie podano tu nazw polskich, jak goździkowiec korzenny, pomelo, krwawnik, jodła syberyjska, rozmaryn lekarski, cynamonowiec cejloński, mięta, sosna zwyczajna, czy eukaliptus gałkowy.
- Paradoksalnie, nigdzie w pracy nie znalazła się łacińska nazwa papryczki habanero (*Capsicum chinese*), która jest „głównym bohaterem” dysertacji.
- We wnioskach oraz w streszczeniach szczep 18S RNA-A (odpowiedzialny za rozwój ostrej babeszjozy) błędnie oznaczono jako B.
- W spisie piśmiennictwa zabrakło kilku cytowanych w pracy pozycji literaturowych: Adaszek i Winiarczyk 2010 (str. 5), Surh 2002 (str. 19), Subeki i in. 2007 (str. 50, 51), Elkhateeb i in. 2007 a (str. 51).
- Dwie pozycje (Adaszek, Winiarczyk, 2011 oraz Murnigsih i in, 2005) zostały zamieszczone dwukrotnie, jedna (Contreras-Padilla i Yahia, 1998) nie była cytowana.
- Dwie pozycje Adaszek i in. z roku 2009 oraz dwie Adaszek i in z roku 2012 powinna być oznaczone jako a i b.

Przedstawione uwagi krytyczne, mające w większości charakter dyskusyjny, porządkowy lub wynikające z pośpiechu czy roztargnienia Doktoranta nie umniejszają w znaczący sposób wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej i nie mają fundamentalnego wpływu na jej pozytywną ocenę.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Piotra Teodorowskiego pt. „Badania nad aktywnością przeciwpiwowotniczą (anty-*Babesia canis*) suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro*” odpowiada warunkom określonym Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie Wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 16668 z późn. zm.), dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Piotra Teodorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 15 czerwca 2023 r.



prof. dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj