

Olsztyn, 15-06-2023

Prof. dr hab. Andrzej Rychlik
Katedra Diagnostyki Klinicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
W Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej

lek. wet. Piotra Teodorowskiego

**„Badania nad aktywnością przeciwpirotwotniaczą (anty-*Babesia canis*)
suszu papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro*”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Łukasza Adaszka.**

Podstawę prawną recenzji stanowi pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, powołujące się na uchwałę Rady Dyscypliny z dnia 27 kwietnia 2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej lek. wet. Piotra Teodorowskiego.

Babeszjoza, czasem nazywana piroplazmozą lub malarią północy, to choroba wywoływana przez jednokomórkowe pasożyty – pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*. Babeszjozę odnotowuje się z różną częstotliwością na niemal wszystkich kontynentach. W Polsce inwazja tego pasożyta stwierdzana jest na terenie całego kraju. Jeszcze kilka czy kilkanaście lat temu zachorowania rozpoczynały się wczesną wiosną i trwały do późnej jesieni. Okresowe występowanie zarażeń jest oczywiście związane z sezonowością występowania wektorów przenoszących te zarazki, czyli kleszczy. W ostatnich latach, wraz z ocieplaniem się klimatu, występowaniem łagodniejszych zim i cieplejszych jesieni, wydłuża się okres,

w którym kleszcze są aktywne, przez co czas w którym mogą zarażać pierwotniakami *Babesia canis* jest coraz dłuższy. W Poliklinice Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego obecnie obserwujemy przypadki babeszjozy prawie przez cały rok kalendarzowy. Babeszjoza ze względu na ciężkość zachorowań, wysoką śmiertelność oraz utrudnioną diagnostykę i leczenie stanowi poważny problem zdrowotny u psów. Szczególnie w ostatnich latach narasta problem efektywności leczenia tej choroby z uwagi na zwiększającą się oporność pasożyta na stosowaną terapię. W związku z tym podjęcie przez lek. wet. Piotra Teodorowskiego badań nad skutecznością przeciwpierwotniaczą substancji zawartych w ekstrakcie z suszu z papryczek habanero uważam za uzasadnione.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 71 stron maszynopisu, w tym 12 strony piśmiennictwa, zawierających 109 pozycji literatury. Ponadto praca zawiera 6 tabel i 7 rycin przedstawiających wyniki badań. Układ pracy jest zbliżony do klasycznego i zawiera spis treści, wstęp, cel badań, materiał i metodykę, opis wyników. W kolejnych rozdziałach Autor omawia wyniki swoich badań (dyskusja), przedstawia wnioski oraz bibliografię. Końcowe rozdziały monografii stanowią streszczenia w języku polskim i angielskim.

Wstęp pracy, obejmujący 15 stron, podzielony został na 7 podrozdziałów. W pierwszych trzech Doktorant (w oparciu o bogate piśmiennictwo) w sposób jasny i czytelny przedstawił czynniki etiologiczne babeszjozy, epidemiologię oraz jej patogenezę. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autor przedstawił szczegółowo mechanizmy patofizjologiczne tej choroby w różnych układach, podkreślając m.in. wpływ układu immunologicznego. Wnikliwy opis tych mechanizmów w oparciu o bogatą literaturę świadczy o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta do podjętego zadania badawczego. Autor słusznie podkreślił, podsumowując dotychczasową wiedzę na ten temat, że

spadkowi liczby erytrocytów towarzyszy niedostateczne zaopatrywanie tkanek w tlen, czego następstwem jest przesunięcie szlaków metabolicznych na tory beztlenowe. Konsekwencją takich zmian jest przesunięcie równowagi kwasowo-zasadowej w kierunku kwaśnym. Zaistniałe zaburzenia przyczyniają się do uszkodzenia komórek i tkanek, co prowadzi do niewydolności wielonarządowej czyli drugiego, obok anemii, syndromu chorobowego, jaki obserwujemy w przebiegu babeszjozy. W kolejnych rozdziałach zostały omówione objawy kliniczne, rozpoznanie i leczenie tej choroby. Lek. wet. Piotr Teodorowski w rozdziale omawiającym objawy kliniczne podkreślił fakt, że początkowo objawy kliniczne babeszjozy są mało specyficzne i w przypadku braku badań hematologicznych, często choroba kończy się zejściem śmiertelnym zwierzęcia. Podsumowując ten rozdział Autor, słusznie zauważył, w oparciu o dane literaturowe, że u pacjenta z niespecyficznymi objawami chorobowymi, u którego badaniem hematologicznym stwierdzono i leukopenię i trombocytopenię, w rozpoznaniu różnicowym należy zawsze rozważyć babeszjozę. W rozdziale „Rozpoznanie” doktorant podsumował obecnie dostępne sposoby rozpoznania tej choroby, akcentując fakt, że w przypadkach podejrzenia piroplazmozy, w których mikroskopowa ocena rozmazów daje wynik wątpliwy, wskazane jest przebadanie tego materiału techniką PCR. Zastosowanie tej techniki pozwala na wykazanie materiału genetycznego *Babesia* już przy parazytemii wynoszącej zaledwie 0,0001%. W kolejnym rozdziale monografii doktorant omówił dotychczasowe sposoby leczenia babeszjozy, ze szczególnym uwzględnieniem leków jakie podajemy przy terapii tej choroby. Podsumowując ten rozdział słusznie zauważył, że w związku ze zmniejszającą się skutecznością leków przeciwpirotniaczych oraz dość istotnymi objawami ubocznymi po ich zastosowaniu, istnieje konieczność prowadzenia badań nad nowymi substancjami, które mogłyby zwiększyć efektywność terapii tej choroby. Takimi substancjami mogą być ekstrakty roślinne m.in. z papryczek habanero zawierających kapsaicynę. W związku z tym ostatni rozdział wstępu lek. wet. Piotr Teodorowski poświęcił

omówieniu właściwości terapeutycznych kapsaicyny. Autor szczegółowo przedstawił, w oparciu o bogatą literaturę, zróżnicowany wpływ tego alkaloidu na organizm ludzi i zwierząt. Dotychczas wykazano jej działanie przeciwbólowe, termoregulacyjne, hipotensyjne, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne czy przeciwwirusowe. Potwierdzono jej wpływ na metabolizm tłuszczów a także wykazano jej skuteczność jako składnik repelentów przeciwko owadom. W ostatnich latach wykazano jej działanie repelentne również w stosunku do kleszczy. W dostępnej literaturze brakuje jednak danych dotyczących określenia aktywności przeciwpiętowniczej kapsaicyny. Doktorant, aby wypełnić tę lukę, jako cel pracy stawia określenie skuteczności przeciwpiętowniczej ekstraktu z suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro* w stosunku do trzech szczepów *Babesia canis*, izolowanych od psów z klinicznych przypadków babeszjozy. W tym kontekście podjęty temat należy uznać jako bardzo aktualny pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a cel badań logiczny i precyzyjnie określony.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorant szczegółowo opisał procedurę, jaką zastosował w swoich badaniach. Badania przeprowadził w trzech układach, na hodowlach erytrocytów zarażanych szczepami *B. canis* 18S RNA-A, 18S RNA-B i 18S RNA-C. Pasożyty różnicował w oparciu o wyniki badań molekularnych (PCR oraz sekwencjonowanie). Różnicowanie szczepów pierwotniaków dokonywano w oparciu o procedurę opisaną przez Adaszka i Winiarczyka oraz Łypę. W kolejnym etapie badań do zarażonych hodowli dodawano ekstrakty z suszu z papryczek habanero zawierające wzrastające rozcieńczenia kapsaicyny. Aktywność przeciwpiętowniczą ekstraktu z suszu z papryczek habanero porównywano z aktywnością imidokarbu, służącego za wzorzec. Szczegółowo opisane kolejne etapy badań wskazują na dobre merytoryczne przygotowanie lek. wet. Piotra Todorowskiego do podjętego zadania badawczego.

Wyniki badań Autor zaprezentował na 12 stronach, które zawierały 5 tabel i 4 ryciny. Przeprowadzone badania wykazały, że kapsaicyna zawarta w ekstrakcie z suszu z papryczek habanero w rozcieńczeniu 10^{-1} (stężenie 430 $\mu\text{g/ml}$) charakteryzowała się silną aktywnością przeciwpierwotniaczą, blokując parazytemię niezależnie od badanego układu w stopniu 80-90%. Aktywność ta przejawiała się brakiem zmiany koloru hodowli, który pozostawał jasnoczerwony. Różnice w skuteczności anty-*Babesia* pojawiały się przy wyższych rozcieńczeniach suszu z papryczek. Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta wykazały występowanie nowych szczepów *Babesia canis*, co może mieć istotne znaczenie dla diagnostyki i terapii tej choroby.

Dyskusja w recenzowanej rozprawie doktorskiej zaplanowana została w sposób przemyślany i obejmuje praktycznie wszystkie elementy związane z badanym zagadnieniem. Wykazane przez doktoranta obserwacje pozwalają stwierdzić, że poszczególne szczepy pierwotniaków *B. canis* izolowane od psów cechuje nie tylko różna zjadliwość, lecz również różna wrażliwość na kapsaicynę. Autor wykazał, że najmniej zjadliwy szczep 18S RNA-B wykazuje jednocześnie najwyższą wrażliwość na alakloid, podczas, gdy szczepy 18S RNA-A – odpowiedzialne za rozwój ostrej babeszjozy oraz 18S RNA-C odpowiedzialny za rozwój przewlekłej/subklinicznej babeszjozy są bardziej odporne na działanie tej substancji. Zdaniem Recenzenta wyniki zrealizowanych przez Doktoranta badań, są bardzo obiecujące, pomimo tego, że w żadnym układzie oraz w żadnym z analizowanych rozcieńczeń kapsaicyna nie hamowała parazytemii w 100%. Osiągnięcie w tym względzie wartości rzędu 80-90% należy uznać za wartościowe. Doktorant, porównując swoje wyniki badań z wynikami badań innych autorów, stwierdził, że kapsaicyna charakteryzuje się silniejszą aktywnością przeciwpierwotniaczą *in vitro* w porównaniu z innymi ekstraktami/olejkami roślinnymi. Lek wet. Piotr Teodorowski w swoich badaniach wykazał również, że dodatnia korelacja pomiędzy niską wartością IC_{50}

(połowa maksymalnego stężenia hamującego) oraz brakiem występowaniem hemolizy w badanych układach wskazuje, że kapsaicyna jest substancją bezpieczną, nie uszkadzającą w warunkach *in vitro* krwinek czerwonych. Ma to istotne znaczenie w aspekcie prowadzenia dalszych badań nad możliwością praktycznego zastosowania kapsaicyny w leczeniu babeszjozy.

Przedstawione, jako szósty rozdział dysertacji, wnioski w pełni znajdują uzasadnienie merytoryczne w uzyskanych wynikach badań. Niektóre wnioski przedstawione przez Doktoranta, (tj. drugi i trzeci) zawierają informacje dotyczące wyników i ten fragment wniosku można usunąć bez uszczerbku dla jego wartości merytorycznej. Zdaniem Recenzenta wnioski stanowiące podsumowanie całości pracy powinny być bardziej uogólnione.

Oceniana rozprawa została zaplanowana, wykonana i przedstawiona poprawnie. Została napisana czytelnym i zrozumiałym językiem. Z obowiązku recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę na pewne niedoskonałości redakcyjne stwierdzone w recenzowanej pracy:

- Doktorant, opisując susz z papryczek habanero, czy jak podaje w Materiałach i Metodach susz z wysuszonej papryki, jaki stosował w swoich badaniach powinien określić, jaka była to odmiana lub nazwa produktu. Pod nazwą habanero mogą się kryć odmiany gatunku *Capsicum chinense* o różnej zawartości kapsaicyny. W przypadku jednej odmiany zastosowanej w badaniach także należy podać jej nazwę lub nazwę produktu, jaki był użyty w doświadczeniu.
- We wstępie autor napisał, że w Polsce dotychczas stwierdzono u psów występowanie tylko *Babesia canis*. W dostępnej literaturze są jednak informacje, że w naszym kraju izolowano także *Babesia gipsoni*.

- W rozdziale „Materiał i Metody” brakuje informacji dotyczących oznaczania innych kapsaicynoidów, których dane Autor podał w rozdziale ‘Wyniki’.
- Zdaniem recenzenta dla lepszej czytelności pracy literatura dotycząca tego samego autora powinna być szeregowana w kolejności ukazywania się pozycji w poszczególnych latach. Ponadto, jeżeli pracę danego autora ukazały się w tym samym roku, to powinny być oznaczone kolejnymi literami alfabetu. Autor w pracy co prawda oznaczał w ten sposób cytowane publikacje, jednakże nie uwzględnił tego sposobu pozycjonowania piśmiennictwa w wykazie. Ponadto w spisie brakuje następujących pozycji: Adaszek i Winiarczyk 2010, Surh 2002, Subeki i in.2007.
- We wnioskach opisano szczep odpowiedzialny za ostrą babeszjozę jako RNA-B a powinno być RNA-A. Podobnie w obu streszczeniach
- Na str. 54 autor pisze: „Wyniki badań własnych wykazały, że kapsaicynę zawarta w suszu z papryczek habanero wykazuje dosyć silne działanie „. W pracach naukowych należy unikać mało precyzyjnych określeń typu: „dosyć silne”
- Zamieniłbym również na stronie 9 frazę „prowadzić do padnięć” na „prowadzić do upadków”.
- Doktorant często używa w pracy, także w tytule, frazy „badanie aktywności przeciwpirotniaczej suszu z papryczek habanero”. Suszu nie rozcieńczamy i zdaniem recenzenta lepiej brzmi fraza „badanie aktywności przeciwpirotniaczej ekstraktu z suszu...”. Ponadto pisze o rozcieńczeniach suszu z papryczek a lepiej brzmi fraza „rozcieńczenia ekstraktu z suszu z papryczek”.
- Jakość zdjęcia dokumentująca rozmaz krwi z pierwotniakami w erytrocytach (str. 12) mogłaby być lepsza. Ponadto powinna zawierać skalę zastosowanego powiększenia.

- Przed oddaniem pracy do druku należy usunąć błędy redakcyjne (literowe), ujednoczyć nazewnictwo dotyczące kapsainocydów (kapsainocydy czy kapsanoidy) a także wyjaśnić skróty zawarte w monografii.

Zawarte w recenzji uwagi mają charakter redakcyjny, więc nie obniżają wartości merytorycznej pracy.

Podsumowując ocenę całokształtu dysertacji, pragnę jeszcze raz podkreślić trafność i przydatność tematu. Przeprowadzone badania mają dużą wartość poznawczą i aplikacyjną. Wykazały, że kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero hamuje namnażanie się pasożytów *Babesia canis* w hodowlach erytrocytów *in vitro*. Należy podkreślić, że są to pierwsze badania, w których skupiono się nie tylko na aktywności przeciwpierotniaczej badanego specyfiku, lecz także na różnicach we wrażliwości poszczególnych szczepów pierwotniaków w stosunku do badanej substancji. Zdaniem Recenzenta wnioski zamieszczone w pracy mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad poszukiwaniem nowych leków, przydatnych, a biorąc pod uwagę coraz mniejszą skuteczność dotychczas stosowanych preparatów, wręcz niezbędnych, do zwalczania babeszjozy.

W konkluzji stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autora lek. wet. Piotra Teodorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 15.06.2023

