

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Dyscyplina naukowa: Weterynaria

Lek. wet. Piotr Teodorowski

Rozprawa doktorska

Tytuł rozprawy doktorskiej

Badania nad aktywnością przeciwprzywrotniczą (anti-*Babesia canis*) suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro*

Ph.D. thesis title

***In vitro* studies on the antiprotozoal activity (anti-*Babesia canis*) of dried habanero peppers containing capsaicin.**

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie

Promotor: prof. dr hab. Łukasz Adaszek

Lublin, rok 2023

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem

i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis

promotora

.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów/Promotora~~ pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora

.....

* niepotrzebne skreślić

*Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Łukaszowi Adaszкови
za cenne uwagi merytoryczne, cierpliwość,
poświęcony czas i nieocenioną pomoc
w wykonywaniu badań i redagowaniu pracy,
a także za życzliwość i wspaniałą atmosferę.*

SPIS TREŚCI

Strona

1. Wstęp	5
1.1. Czynniki etiologiczne babeszjozy psów	5
1.2. Epidemiologia choroby i cykl rozwojowy pasożytów	6
1.3. Patogeneza	6
1.4. Objawy kliniczne	8
1.5. Rozpoznawanie	11
1.6. Leczenie	13
1.7. Właściwości kapsaicyny	15
2. Cel badań	21
3. Materiały i Metodyka	22
3.1. Określenie zawartości kapsaicyny w suszu z papryczek habanero	22
3.2. Szczepy pasożytów wykorzystane w badaniu	24
3.2.1. Izolacja DNA	24
3.2.2. Startery do reakcji PCR	25
3.2.3. Warunki PCR	25
3.2.4. Elektroforeza	26
3.2.5. Przygotowanie produktu PCR do sekwencjonowania	27
3.2.6. Sekwencjonowanie	28
3.3. Hodowla <i>in vitro</i>	28
3.3.1. Aktywność przeciwpirowotniacza suszu z papryczek zawierającego kapsaicynę	30

4. Wyniki	31
4.1. Wyniki jakościowego i ilościowego określenia zawartości kapsaicyny w suszu z papryczek	31
4.2. Polimorfizm szczepów <i>Babesia canis</i> wykorzystywanych do badań hodowlanych	32
4.3. Aktywność przeciwpirotniacza suszu z papryczek habanero in vitro	37
5. Dyskusja	44
6. Wnioski	55
7. Piśmiennictwo	56
8. Streszczenie	68
9. Summary	70

1. WSTĘP

1.1. Czynniki etiologiczne babeszjozy psów

Babeszjoza (piroplazmoza) jest transmisyjną chorobą przenoszoną przez kleszcze. Jej czynnikiem etiologicznym są wewnątrzerytrocytarne pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*, rodziny *Babesidae*, rzędu *Piroplasmida*, typu *Apicomplexa* (Adaszek i in. 2009a).

Na podstawie morfologii komórki wyróżnia się dwie grupy tych pasożytów - większe o wielkości około 3–5 μm określane mianem *B. canis* oraz mniejsze o wymiarach 1–3 μm - *B. gibsoni* (Adaszek 2006). Wyniki badań serologicznych, molekularnych oraz fakt przenoszenia *Babesia canis* przez różne gatunki kleszczy, pozwoliły na wyróżnienie w obrębie tej grupy piroplazm czterech podgatunków (*B. canis* - przenoszonych przez *Dermacentor reticulatus*, *B. rossi* - przenoszonych przez *Haemaphysalis leachii*, *B. vogeli* - przenoszonych przez *Rhipicephalus sanguineus*. Czwarty podgatunek został wykryty u psów w Stanach Zjednoczonych i nie ustalono jeszcze jego nazwy, podobnie jak i nie określono jego wektora). Obecnie określane są one jako oddzielne gatunki (Carcy i in. 2015). Dotychczas u psów w Polsce stwierdzono występowanie jedynie *Babesia canis*. Analiza genomu tych pierwotniaków pozwoliła na dalszą ich klasyfikację taksonomiczną i wykazanie w obrębie tego gatunku trzech różniących się zjadliwością szczepów, określonych mianem 18S RNA-A, 18S RNA-B i 18S RNA-C (Adaszek i Winiarczyk 2008, 2010, Łyp i in. 2015).

1.2. Epidemiologia

Babeszjoza występuje na całym świecie. Jej przypadki opisywano w Europie (Gothe i Wegerdt 1991; Duh i in. 2004; Foldvari i in. 2005; Adaszek i in. 2009b), Południowej Afryce (Reyers i in. 1998; Collett 2000; Matjila i in. 2004), Azji (Inokuma i in. 2003, 2004), Australii (Jefferies i in. 2003), Ameryce (Harvey i in. 1988; Herwaldt i in. 1996; Kordick i in. 1999) oraz Izraelu (Baneth i in. 1998). W Polsce pierwszy przypadek choroby opisano na Lubelszczyźnie w roku 1966 (Adaszek i Winiarczyk 2013). Dzisiaj inwazja ta stwierdzana jest z mniejszą lub większą częstotliwością na terenie całego kraju (Zygner i Frydrych 2005; Zygner i in. 2007; Zygner i Gójska –Zygner 2011; Adaszek i in. 2009b).

1.3. Patogeneza

Zachorowania na babeszjozę pojawiają się wiosną oraz jesienią i związane są z sezonową aktywnością kleszczy. Do zarażenia psów dochodzi podczas inwazji tymi pajęczakami (Ryc.1). W trakcie pobierania krwi przez kleszcze do organizmu psa zostają wprowadzone sporozoity, które przekształcają się w trofozoity, a następnie w obrębie krwinek czerwonych ulegają podziałom na dwa gruszkowate merozoity. Z czasem doprowadzają one do destrukcji erytrocytów, co klinicznie objawia się anemią (Gundlach i Sadzikowski 2004).



Ryc.1. Kleszcze *Dermacentor reticulatus* są głównym wektorem inwazji *Babesia canis*

Drogami przenoszenia inwazji o mniejszym znaczeniu są transfuzja krwi, droga transplacentarna oraz kontakt otwartych ran z zarażoną krwią np. podczas walk psów (Adaszek i Winiarczyk 2013).

Anemia w przebiegu babeszjozy jest następstwem wewnątrz- jak i zewnątrznaczyniowej hemolizy. Rozwój niedokrwistości powodowany jest zarówno mechanicznym oddziaływaniem pierwotniaków na erytrocyty i ich niszczeniem podczas wydostawania się *Babesia* z tych komórek, jak i działaniem pośrednim piroplazm, prowadzącym do tzw. zwiększonej kruchliwości erytrocytów na skutek zmian w ciśnieniu osmotycznym krwi (Schetters i Eling 1999). Dodatkowo pewne substancje uwalniane przez piroplazmy (SPA- rozpuszczalny antygen pierwotniaczy) mogą aktywować transformację fibrynogenu oraz stymulować kalikreinę do zapoczątkowania przemiany kininogenu w kininę. Następstwem tych procesów jest zwiększenie lepkości erytrocytów, ich odkładanie się w kapilarach i zastój krwi w naczyniach włosowatych, co może prowadzić do rozwoju ostrej niedokrwistości i dysfunkcji narządów wewnętrznych np. nerek, rozpadu mięśni prążkowanych lub zaburzeń nerwowych. Zjawiska te nasilają hemolizę i potęgują zaburzenia krzepnięcia krwi (Milczak i in. 2004; Schetters i Eling 1999). Rozwój anemii w przebiegu babeszjozy może mieć tło immunologiczne. Po zarażeniu erytrocytów przez pierwotniaki część ich antygenów zostaje wkomponowanych w błonę krwinek czerwonych. Są one rozpoznawane przez przeciwciała opłaszczające opadnięte pasożytami komórki, a następnie eliminowane przez fagocyty (Taboda i in. 2006).

Obserwowana w przebiegu babeszjozy anemia, niezależnie od jej podłoża, ma charakter postępujący, a jej następstwami są hemoglobinemia, hemoglobinuria, bilirubinemia i rozwój żółtaczki. Spadkowi liczby erytrocytów towarzyszy niedostateczne zaopatrywanie tkanek w tlen, następstwem czego jest przestawienie

szlaków metabolicznych organizmu na tory beztlenowe, co z kolei prowadzi do rozwoju kwasicy i przyczynia się do uszkodzenia komórek i tkanek. Zaburzenia przepływu krwi zwłaszcza w układzie naczyń włosnaczkowych mogą prowadzić do rozwoju wewnątrznaczyniowego zespołu wykrzepiania (DIC) i nasilać istniejącą już hipoksję. Wszystkie z przedstawionych powyżej nieprawidłowości, łącznie z blokowaniem kłębuszków nerkowych przez pozostałości uszkodzonych erytrocytów, prowadzą do rozwoju drugiego obok anemii syndromu chorobowego obserwowanego w babeszjozie jakim jest niewydolność wielonarządowa, objawiająca się zaburzonymi funkcjami nerek, wątroby, niekiedy wystąpieniem objawów nerwowych, słabością mięśni i stawów. Brak podjęcia terapii piroplazmozy skutkuje rozwojem wstrząsu i śmiercią zarażonego zwierzęcia (Herwaldt i in. 1996).

1.4. Objawy kliniczne

Przebieg choroby uzależniony jest od wielu czynników takich jak zjadliwość szczepów pierwotniaków, wiek zwierzęcia, przebyte szczepienia przeciwko piroplazmozie, pora roku i in. Powszechnie wiadomym jest, że różne szczepy pasożytów charakteryzuje różna zjadliwość (Schetters i in. 2009; Adaszek i in. 2009).

Pierwsze objawy babeszjozy są niespecyficzne. U zarażonych zwierząt pojawia się gorączka, apatia, spadek apetytu, przyspieszenie tętna i zwiększenie częstości oddechów. Z czasem pojawia się błądliwość błon śluzowych, hemoglobinuria, a niekiedy wymioty i biegunka (Adaszek 2006; Adaszek i in. 2009). Ponieważ elementy uszkodzonych erytrocytów mogą blokować kłębuszki nerkowe i prowadzić do uszkodzenia wątroby, w zaawansowanym procesie chorobowym można zaobserwować brak oddawania moczu oraz zażółcenie błon śluzowych (Ryc.2)

(Bastos i in. 2004). Niekiedy u psów występują objawy nerwowe (Adaszek i in. 2013; Jacobson 2006). Badaniem hematologicznym na ogół stwierdza się niski poziom erytrocytów oraz trombocytów, spadek hematokrytu, zaś liczba białych ciałek krwi może być podwyższona lub obniżona w zależności od organizmu (Inokuma i in. 2004).

Ryc.2. Uogólniona żółtaczka u psa w przebiegu babeszjozy.



Uważa się, że zarażenia *B. canis*, w porównaniu z wywoływanymi przez *B. gibsoni*, przebiegają ostrzej ze względu na szybszą hemolizę krwi powodowaną przez pierwszy z wymienianych pasożytów (Groves i Yap 1968).

Niejednokrotnie choroba prowadzi do śmierci zwierzęcia. Na ogół jest ona wynikiem anemii hemolitycznej prowadzącej do wstrząsu (Bourdoiseau 2006; Baric i in 2009, 2013). Rozwijający się w przebiegu choroby i nieleczonego zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (ang. disseminated intravascular coagulation DIC) może również prowadzić do padnięć (Baric i in 2009, 2013). Śmierć może być także następstwem rozwijającej się kwasicy metabolicznej przy braku dostatecznej ilości tlenu. Gromadzący się wówczas kwas mlekowy jest przyczyną uszkodzenia komórek (Adaszek i Winiarczyk 2013). Upadki zwierząt mogą także wynikać z uszkodzenia kłębuszków nerkowych przez elementy rozpadłych erytrocytów bądź też

kompleksy antygen- przeciwciała. Rozwija się wówczas azotemia, prowadząca do mocznicy i intoksykacji organizmu.

Z badań Máthé i in. (2006) wynika, iż najczęściej stwierdzanymi komplikacjami w przebiegu babeszjozy psów są niewydolność wątroby (44%), zapalenie trzustki (33%), ostra niewydolność nerek (31%) oraz DIC (24%). Rzadziej autorzy ci stwierdzali występowanie anemii immunologicznej (10%), ostrej niewydolności oddechowej (6%) oraz uszkodzeń mózgu (3%). Śmiertelność w przebiegu inwazji, w zależności od grupy wiekowej oraz komplikacji towarzyszących piroplazmozie, dochodziła nawet do 67%. Obserwacje własne potwierdzają spostrzeżenia Máthé i in. Zaznaczyć jednak należy, że śmiertelność w przebiegu choroby u psów w Polsce jest niższa niż przedstawiona przez badaczy węgierskich. Może to wynikać z dużej znajomości istoty choroby przez właścicieli psów, zwłaszcza na terenach gdzie występuje ona endemicznie oraz wczesnego rozpoznawania choroby przez lekarzy weterynarii i szybkiego wdrożenia odpowiedniego leczenia.

Najbardziej charakterystycznym zaburzeniem hematologicznym stwierdzanym u chorych psów jest trombocytopenia (Adaszek i in. 2009b). Jak donosi Zygner i in. (2007) wykazać ją można u 99,5% pacjentów z tą chorobą. Małopłytkowość ma podłoże immunologiczne i pojawia się, zanim dojdzie do rozwoju anemii i leukopenii (Taboda i in. 2006). Innymi obserwowanymi nieprawidłowościami hematologicznymi są spadek liczby erytrocytów, spadek hematokrytu leukopenia bądź leukocytoza. Na wczesnym etapie choroby niedokrwistość jest normocytarna i normobarwliwa, w późniejszym czasie przybiera charakter anemii makrocytarnej, niedobarwliwej. W rozmazach krwi wykazać również można zwiększoną liczbę retikulocytów (Taboda i in. 2006). Niemal w każdym przypadku wczesnej babeszjozy notuje się leukopenię i trombocytopenię. Leukocytoza notowana jest na późniejszym

etapie inwazji, gdy dojdzie do uszkodzenia wątroby lub nerek. U pacjenta z niespecyficznymi objawami chorobowymi, u którego badaniem hematologicznym stwierdzono leukopenię i trombocytopenię, ewentualnie dodatkowo anemię, w rozpoznaniu różnicowym zawsze należy rozważyć babeszjozę (Adaszek i in. 2009b, 2012).

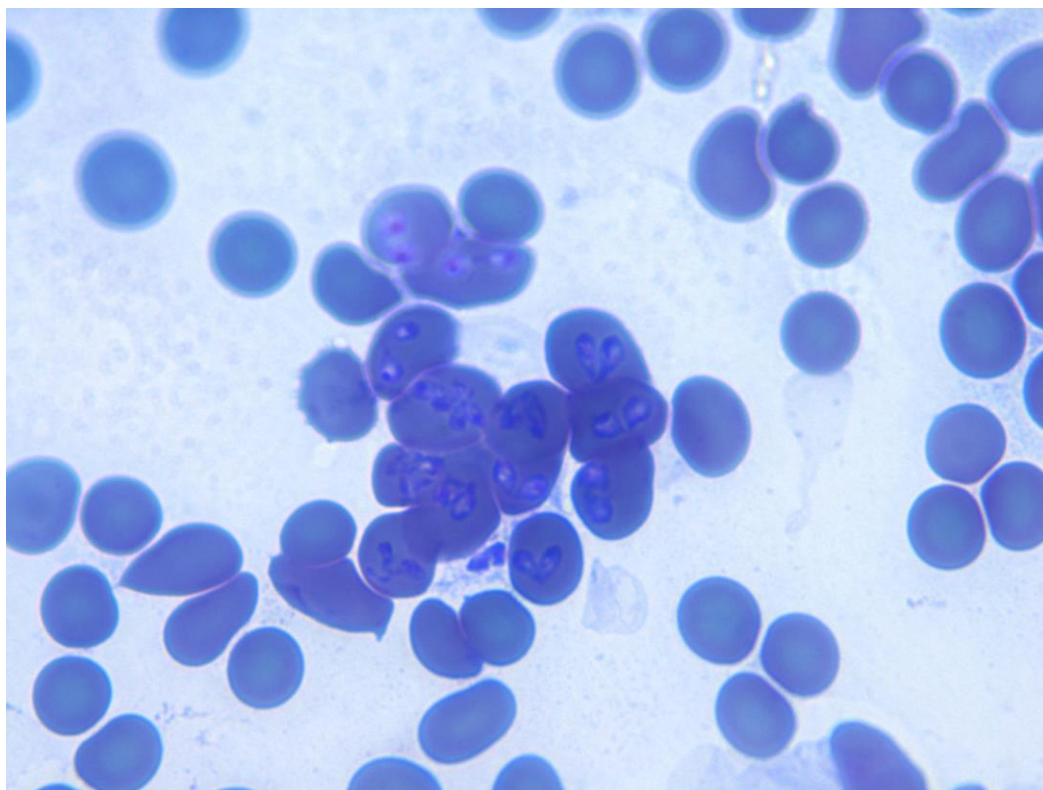
Wyniki badań biochemicznych są odzwierciedleniem upośledzenia funkcji wątroby i nerek oraz następstwem braku pobierania przez dłuższy czas pokarmu przez chore zwierzęta. U pacjentów najczęściej obserwuje się wzrost aktywności AST, ALT oraz AP, podwyższone stężenia mocznika i kreatyniny, a także hipoalbuminemię i hipoglikemię (Furlanello i in. 2005; Zygner i in. 2007; Fabisiak i in. 2010; Zygner i in., 2012; Zygner i in. 2013; Zygner i in. 2014; Adaszek i in. 2009; Adaszek i Winiarczyk 2013).

1.5. Rozpoznawanie

Rozpoznanie babeszjozy psów stawiane jest na podstawie informacji uzyskanych z wywiadu (obecność kleszczy na powierzchni ciała zwierząt, brak profilaktyki przeciwko ektopasożytom), znajomości sytuacji epizootycznej choroby na danym terenie, wyników badania klinicznego (gorączka, anemia, żółtaczka, hemoglobinuria), rezultatów badań hematologicznych i biochemicznych surowicy krwi oraz mikroskopowej oceny rozmazów krwi barwionych metodami Giemzy, Romanowskiego czy Diff-Quick (Adaszek 2006). Gruszkowate trofozoity *B. canis* można wykazać w erytrocytach krwi psów już w 2-3 dni po zarażeniu (Ryc. 3). Najwyższą parazytemię, wahającą się na poziomie 4,5%, obserwuje się około czternastego dnia po zarażeniu, w tym okresie w zaatakowanych erytrocytach można

wykazać 2, 4, 6 a nawet 8 merozoitów, stykających się ze sobą węższą częścią komórek (Adaszek i Winiarczyk 2013).

Ryc. 3. Rozmaz krwi barwiony metodą Giemzy. W obrębie erytrocytów widoczne pierwotniaki *Babesia canis*.



Badanie rozmazów krwi wymaga pewnego doświadczenia. Elementy niewyplukanego barwnika mogą być niekiedy mylnie wzięte przez niedoświadczonych laborantów za komórki pierwotniaków. Ponadto na wczesnym etapie choroby, gdy parazytemia jest niska, trudno jest wykazać obecność *Babesia* w erytrocytach zarażonych psów. Podobna sytuacja ma miejsce przy nasilonej hemolizie, gdy dochodzi do jednoczesnego rozpadu wielu czerwonych ciałek krwi i uwalniania pasożytów do osocza. Wszystko to sprawia, że w przypadkach podejrzenia piroplazmozy, w których mikroskopowa ocena rozmazów krwi daje wynik wątpliwy wskazane jest przebadanie tego materiału techniką PCR (ang. polymerase chain re

action - łańcuchowa reakcja polimerazy). Łańcuchowa reakcja polimerazy jest niezwykle czułą metodą pozwalającą na wykazanie obecności materiału genetycznego *Babesia* już przy parazytemii wynoszącej zaledwie 0,0001% (Ano i in. 2001). Dodatkowo określanie sekwencji uzyskanych amplikonów dostarcza cennych informacji do analizy epidemiologicznej i taksonomii (Adaszek i Winiarczyk 2008). Badania serologiczne, mimo że możliwe do przeprowadzenia nie znajdują szerszego zastosowania w diagnostyce choroby. Najczęściej w tym celu wykorzystywany jest odczyn immunofluorescencji (Anderson i in. 1980).

1.6. Leczenie

Terapia babeszjozy polega na podawaniu preparatów przeciwpięciwotniaczych oraz leczeniu wspomagającym. To ostatnie obejmuje podtrzymywanie funkcji nerek i wątroby, płynoterapię, antybiotykoterapię, podawanie glikokortykosterydów celem hamowania rozwoju anemii tła immunologicznego, a także transfuzję krwi (Adaszek i in. 2009; Adaszek i in. 2012).

W chwili obecnej najczęściej stosowanym w zwalczaniu babeszjozy psów lekiem przeciwpięciwotniaczym jest należący do karbanilidów dipropionian imidokarbu (Zygner i Frydrych 2005; Adaszek i in. 2009; Adaszek i in. 2012). Mechanizm jego działania polega na uszkodzaniu jąder komórkowych pasożyta i zmianach morfologii jego komórki, np. powstawanie wakuoli w cytoplazmie. Pod wpływem działania leku zahamowaniu ulega synteza DNA w komórkach *Babesia*. Ponadto preparat ten wywołuje hipoglikemię w organizmie gospodarza, co utrudnia pierwotniakom pobieranie glukozy. Z tego względu w przypadkach, gdy aplikacji imidokarbu towarzyszy płynoterapia do nawadniania pacjentów w pierwszym etapie

leczenia nie należy stosować roztworów glukozy. Lek nie jest metabolizowany w organizmie i wydalany jest w postaci niezmienionej, głównie z kałem i moczem.

Aplikacji imidokarbu, podobnie jak innych leków przeciwpirotniaczych, może towarzyszyć wystąpienie objawów niepożądanych takich jak ślinienie, łzawienie czy biegunka, a także ból w miejscu iniekcji (Adaszek i in. 2020). Objawy związane z pobudzeniem układu przywspółczulnego można znieść stosując atropinę (Zygner i Frydrych 2005; Adaszek i in. 2009). Aby zmniejszyć toksyczność chemioterapeutyku, jego dawkę zalecaną przez producenta - 3-6 mg/kg mc, można podzielić na dwie i aplikować preparat dwukrotnie w odstępach dwunastogodzinnych. Niekiedy konieczne jest powtórzenie terapii imidokarbem po upływie dwóch tygodni od pierwszego podania leku, co związane jest z pewnego rodzaju zdolnością pierwotniaków do unikania jego działania i przetrwaniem okresu aktywności chemioterapeutyku w śledzionie. Dlatego też po zakończeniu leczenia babeszjozy konieczny jest monitoring pacjenta, polegający na kilkukrotnej analizie rozmazów jego krwi pobieranej w odstępach dwutygodniowych. Przedawkowanie imidokarbu może skutkować uszkodzeniem nerek (Solano-Gallego et al., 2008). Niekiedy notuje się oporność pierwotniaków *Babesia* na terapię imidokarbem (Zygner i Frydrych 2005). W takich przypadkach alternatywnym leczeniem może być podawanie chlorochiny hamującej syntezę DNA pierwotniaka, diminazenu zaburzającego procesy tlenowe pasożytów (Farwell i in. 1982; Harvey i in. 1988), pentamidyny (Farwell i in. 1982), klindamycyny (Stegman i in. 2003), metronidazolu, ewentualnie błękitu trypanu (Fowler i in. 1972; Adaszek i in. 2013) (Tab. 1). Wszystkie z wymienionych powyżej chemioterapeutyków cechuje jednak, w porównaniu z imidokarbem, znacznie niższa skuteczność w zwalczaniu inwazji piroplazm, zwłaszcza na tle *Babesia canis*.

Z uwagi na problemy związane ze zmniejszającą się skutecznością leków przeciwpirotniaczych oraz nie zawsze dobrą ich tolerancją przez zwierzęta istnieje konieczność prowadzenia badań nad nowymi substancjami, które mogłyby być wykorzystywane w zwalczaniu inwazji *Babesia*. W ostatnim czasie takimi badaniami objęto ekstrakty roślinne oraz pewne białka ekstrahowane z kleszczy (Kasahara i in. 2005; Murnigsih i in. 2005; Badral i in. 2017; Guz i in 2019).

Na przestrzeni ostatnich lat zaobserwowano zwiększające się zainteresowanie zawartą w papryczkach habanero kapsaicyną i jej właściwościami leczniczymi, także w odniesieniu do zwalczania inwazji pierwotniaczych u ludzi i zwierząt (Vieira-Araújo i in. 2018).

1.7. Właściwości kapsaicyny

Kapsaicyna (trans-8-metylo-N-wanilino-6-nonenamid) jest organicznym związkiem z grupy alkaloidów, o wzorze chemicznym: $C_{18}H_{27}NO_3$ i masie cząsteczkowej 305,41 g/mol

Stosunkowo duże jej ilości znajdują się w owocach różnych odmian papryk, a sam związek odpowiedzialny jest za pikantny smak tego warzywa (Adaszek i in. 2019).

Kapsaicyna wykazuje zróżnicowany wpływ na organizm ludzi i zwierząt. Potwierdzono jej działanie drażniące i przeciwbólowe, możliwość wpływu na termoregulację, metabolizm tkanki tłuszczowej (działanie odchudzające), działanie antyoksydacyjne, obniżające ciśnienie krwi oraz działanie przeciwnowotworowe. Kapsaicyna może być wchodzić w skład repelentów skierowanych przeciwko owadom (Pieńko 2013)

Alkaloid ten wykorzystywany jest do produkcji leków przeciwbólowych. W leczeniu bólu może być stosowany zewnętrznie w postaci roztworów, maści, kremów, plastrów w zakresie stężeń wag. 0,025-10% (Calixto i in. 2005). W takich postaciach preparaty zawierając kapsaicynę są najczęściej wykorzystywane w znoszeniu bólu przewlekłego, nieadaptacyjnego jak: bóle mięśniowo-stawowe, czy nerwobóle, a także w stanach braku tolerancji przez pacjenta innych preparatów przeciwbólowych (De Lourdes i in. 2011)

Mechanizm działania kapsaicyny polega na zdolności jej wiązania się z receptorem waniloidowym TRPV1 (ang. transient receptor potential vanilloid subtype 1) (Cromer i McIntyre 2008), który w dużych ilościach znajduje się w podwzgórze, na zakończeniach neuronów czuciowych, w zwojach nerwowych korzenia grzbietowego, oraz nerwu trójdzielnego. Receptor ten obecny jest także w nerkach, wątrobie, pęcherzu moczowym, trzustce (O'Neil i Brown 2003). Kapsaicyna, po związaniu się z receptorem TRPV1 powoduje otwarcie kanału kationowego, efektem czego jest napływ kationów do wnętrza komórki i jej depolaryzacja. Powstający w następstwie tego potencjał czynnościowy przekazywany jest do rdzenia kręgowego i jest odpowiedzialny za odczuwanie ciepła i bólu. Pod wpływem kapsaicyny może dochodzić do rozszerzenia naczyń skórnych i zwiększenia oddawania ciepła co skutkuje rozwojem hipotermii, z drugiej jednak strony alkaloid ten może powodować przyspieszenie metabolizmu, a co za tym idzie stymulować wytwarzanie ciepła w organizmie i wzrost temperatury wewnętrznej ciała (Olszewska 2010).

Niskie dawki kapsaicyny, aplikowane jednokrotnie powodują spadek temperatury ciała (hipotermia) (Hori, 1984). Jest to efekt uwalniania przez receptor wspomnianych już wcześniej substancji P i CGRP, pod wpływem których odchodzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych i zwiększonej wymiany ciepłej ustroju z

otoczeniem. Drugim elementem przyczyniającym się do rozwoju stanu hipotermii jest spadek tempa metabolizmu, który wyraża się zmniejszonym zużyciem tlenu, co skutkuje obniżeniem produkcji ciepła (Meghvansi i in. 2010).

Gdy alkaloid podawany jest regularnie przez dłuższy czas prowadzi do inaktywacji receptora wanilidowego i unieczynnienia mechanizmów warunkujących rozwój hipotermii, efektem czego może być wzrost temperatury wewnętrznej organizmu. Długotrwale utrzymująca się inaktywacja receptora TRPV1 może być jednak niekorzystna, czy wręcz szkodliwa dla organizmu i może prowadzić do obniżenia skuteczności obrony organizmu przed przegrzaniem (Romanovsky i in. 2009).

W medycynie estetycznej człowieka, wiele uwagi poświęca się kapsaicynie jako substancji wpływającej na metabolizm tłuszczów i przyczyniającej się do redukcji masy ciała. Wykazano, że substancja ta powoduje hamowanie transkrypcji genów białek stymulujących proces adipogenezy, czyli akumulacji tkanki tłuszczowej (Joo i in. 2010). Ponadto pobudza transkrypcję genów białek związanych z procesem termogenezy. Dodatkowo nasila wytwarzanie ciepła poprzez wzrost wydzielania epinefryny i norepinefryny z nadnerczy. Wpływa dodatkowo na transkrypcję genów odpowiedzialnych za produkcję enzymów katalizujących redukcję tłuszczów, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia ilości tkanki tłuszczowej, i spadku masy ciała. Działanie odchudzające alkaloidu uwarunkowane jest więc takimi mechanizmami jak: wzrost utleniania tłuszczów, wzrost zużycia energii związany z aktywacją współczulnego układu nerwowego przez katecholaminy oraz spadkiem apetytu (Yoshioka i in. 1998; Belza i in. 2007). Tego typu działanie potwierdzono zarówno u ludzi, jak i zwierząt laboratoryjnych (Hu i in. 2017; Zheng i in. 2017; Shen i in. 2017; Medina-Contreras i in. 2017; Zsiborás i in. 2016)

Kolejną właściwością kapsaicyny, która stała się obiektem badań medycznych, jest jej wpływ na obniżanie ciśnienia tętniczego. Hipotensja indukowana kapsaicyną jest prawdopodobnie efektem pobudzania receptora TRPV1 w śródbłonku naczyniowym. W następstwie tego dochodzi do napływu jonów wapnia do wnętrza komórki i stymulacji fosforylacji kinazy białkowej typu A (PKA). Dzięki temu zwiększa się aktywność syntazy tlenku azotu (II) i dochodzi do nasilonej produkcji NO (Yang i in. 2010). Tlenek azotu zwiotcza mięśniówkę gładką naczyń krwionośnych, prowadząc do poszerzenia światła naczyń krwionośnych oraz do zmniejszenia oporów obwodowych, i spadku ciśnienia krwi.

Kapsaicyna wykazuje ochronne działanie na układ sercowo naczyniowy nie tylko poprzez zapobieganie rozwojowi nadciśnienia tętniczego, lecz także poprzez zapobieganie rozwojowi choroby wieńcowej oraz rozwojowi zawałów. Te właściwości alkaloidu związane są z jego aktywnością antyoksydacyjną efektem której jest opóźniona oksydacja lipoprotein LDL, (Luo i in. 2011). Prawdopodobnie dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym kapsaicyna mogłaby być wykorzystywana w profilaktyce choroby Alzheimerera. Zaobserwowano, że u Indian zjadających znaczne ilości ostrych papryczek zapadalność na tę neurodegeneracyjną chorobę jest znacznie niższa, aniżeli w innych populacjach (Meghvansi i in. 2010).

Kapsaicyna może być wykorzystywana w zapobieganiu rozwojowi nowotworów, aczkolwiek wykazuje także korzystne oddziaływanie i pewnego stopnia skuteczność w stosunku do już istniejących chorób nowotworowych. W tym aspekcie jej działanie związane jest z indukowaniem apoptozy komórek nowotworowych, w wyniku hamowania ostatniego etapu procesu oddychania komórkowego zachodzącego w mitochondriach. Apoptoza komórek nowotworowych jest konsekwencją hamowania przez kapsaicynę transportu elektronów z NADH do

ubichinonu, lub też jej bezpośrednim wiązaniem z koenzymem Q, co powoduje zmianę kierunku przepływu elektronów i powstawanie reaktywnych form tlenu w nadmiarze. Konsekwencją tego jest rozproszenie transbłonowego potencjału w mitochondriach (Surh 2002) mającego podstawowe znaczenie dla funkcjonowania tych organelli. Apoptoza rozpoczyna się od załamania potencjału transbłonowego, natomiast aktywne formy tlenu mogą powodować uszkodzenie struktury i zaburzenie funkcji mitochondriów, a w konsekwencji śmierć komórki nowotworowej (Adaszek i in 2017; Dębiak i in. 2018).

Substancja ta wykazuje także działanie przeciwbakteryjne. Potwierdzono jej aktywność w stosunku do takich drobnoustrojów jak: *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, czy *Helicobacter pylori* (Kurita i in. 2002; Lee i in. 2007). Ostatnio przeprowadzone badania wykazały, że w warunkach in vitro hamuje aktywność szczepów *Streptococcus pyogenes* opornych na działanie erytromycyny (Marini i in. 2015). Oczywiście aktywność przeciwbakteryjna jest ściśle skorelowana ze stężeniem tego alkaloidu (im jest ono wyższe, tym aktywność jest większa), a sam mechanizm działania polega na wywoływaniu przez kapsaicynę stresu osmotycznego, niszczeniu struktury błony komórkowej czy hamowanie ekspresji genów odpowiedzialnych za wzrost komórki (Kurita i in. 2002). Wykazano także, że kapsaicyna może wykazywać aktywność przeciwwirusową. Obserwacje prowadzone przez Bourneet i in. (1999) co prawda nie potwierdziły, by alkaloid ten w warunkach in vitro hamował replikację wirusa HSV (herpes simplex virus) świnek morskich, jednak podawanie go w formie cis-kapsaicyny działało ochronnie na organizm tych gryzoni i chroniło je przed rozwojem skórnej postaci herpeswirozy, a w przypadku zakażeń przewlekłych aplikacja alkaloidu znacznie skracala okres powrotu do zdrowia.

W ostatnim czasie coraz więcej uwagi poświęca się kapsaicynie jako lekowi przeciwpasożytniczemu. Wykazano, że stosowana w kombinacji z antymonianem megaluminy cechuje się bardzo dobrym efektem bójącym w stosunku zarówno do promastigotów, jak i amastigotów *Leishmania infantum* (Vieira-Araújo i in. 2018). Dane niepublikowane wskazują, iż kapsaicyna wykazuje działanie repelentne w stosunku do kleszczy, a u psów otrzymujących kapsaicynę w celu zahamowania choroby nowotworowej, u których doszło do inwazji pierwotniakami *Babesia* obserwowano szybszy ich powrót do zdrowia w porównaniu ze zwierzętami, które nie otrzymywały tego alkaloidu. Z tego względu istnieje konieczność określenia aktywności przeciwpierwotniaczej kapsaicyny oraz ustalenia, czy związek ten może pretendować do miana leku alternatywnego w stosunku do imidokarbu w terapii babeszjozy psów

2. Cel badań

Ponieważ jak wskazują dotychczasowe obserwacje babeszjoza psów jest chorobą o bardzo zróżnicowanym przebiegu klinicznym, stanowiącą w dalszym ciągu problem natury terapeutycznej, celem prowadzonych badań było określenie skuteczności przeciwpirotniczej suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w warunkach *in vitro* w stosunku do pasożytów *Babesia canis* utrzymywanych w hodowli erytrocytów psów.

3. Materiał i metody

3.1. Określenie zawartości kapsaicyny w suszu z papryczek habanero

W celu wyekstrahowania kapsaicynoidów w 200 ml szklanej butelce z teflonową nakrętką umieszczono 10 g wysuszonej papryki, a następnie dodano 30 ml etanolu (Merck). Tak przygotowaną próbkę zakręcono i umieszczono w łaźni wodnej w temperaturze 80°C. Proces ekstrakcji prowadzono przez 4 godziny. Mieszaninę ekstrakcyjną mieszano ręcznie co godzinę. Po upływie 4 godzin ekstrakt wyjęto z łaźni wodnej i ochłodzono do temperatury pokojowej. Następnie 1-2 ml otrzymanego supernatantu przefiltrowano (0.20 µm Syringe – driven Filter Unit, Millex ®, Merck) do 1.5 ml szklanej fiolki.

Analizę chromatograficzną kapsaicyny wykonano przy użyciu aparatu Hitachi Chromaster (Merck) z detektorem diodowym (DAD). Do analizy wykorzystano kolumnę (Aeris™ Widepore, Phenomenex®) wypełnioną żelem krzemionkowym C18 o średnicy porów 3.6 µm, szerokości 2.1 mm i długości 150 mm. Szybkość przepływu wynosiła 0.4 ml min⁻¹, temperatura analizy 20 °C. Pomiary dokonano przy długości fali $\lambda = 280$ nm. Zastosowaną gradientową metodę rozdzielania (Tabela 1) przy wykorzystaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej, rozpuszczalnik A stanowił 0.1% roztwór TFA w wodzie, a rozpuszczalnik B metanol (Merck). Objętość nastrzyku badanej próbki oraz standardu analitycznego wynosiła 10 µl.

Tabela 1. Warunki gradientowej metody rozdzielania próbki przy wykorzystaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej

Czas	%A	%B
0	95	5
30	5	95
40	5	95
40.1	95	5
50	95	5

Piki, które pojawiły się na chromatogramie zidentyfikowano poprzez porównanie ich czasów retencji z czasem retencji standardu analitycznego kapsaicyny (8-metylo-*n*-wanililo-6-nonedamid) (8-methyl-*n*-vanill-6-nonenamide) (Sigma Chemical C.) analizowanego w takich samych warunkach. Roztwór wzorcowy kapsaicyny przygotowano rozpuszczając 0.1 mg standardu kapsaicyny w metanolu. Ilościowe oznaczenie kapsaicyny w otrzymanych próbkach przeprowadzono wykorzystując pola powierzchni zidentyfikowanych pików.

Wszystkie rozpuszczalniki wykorzystane podczas analizy były czystości HPLC.

3.2. Szczepy pasożytów wykorzystane w badaniu

W badaniach wykorzystano trzy genotypy pierwotniaków *Babesia canis* (18S RNA-A, 18S-RNA-B i 18S-RNA-C), pozyskane od chorych psów z klinicznych przypadków babeszjozy. Różnicowanie szczepów pierwotniaków dokonywano w oparciu o procedurę przedstawioną przez Adaszka i Winiarczyka (2008) oraz Łypa i in. (2015). Krew pobraną od chorych psów porcjowano. Sto mikrolitrów wykorzystywano do badań molekularnych celem określenia genotypu *Babesia*, pozostałą część wykorzystywano do badań hodowlanych.

3.2.1. Izolacja DNA

Izolację DNA z pełnej krwi do reakcji PCR wykonywano za pomocą zestawu Blood Mini (A&A Biotechnology Gdynia nr kat. 022-50) oraz QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen nr kat. 51304) według następującej procedury:

1. Do probówki o pojemności 1,5 ml typu eppendorf odmierzano 100 μ l krwi świeżej lub mrożonej.
2. Do krwi dodawano 200 μ l uniwersalnego buforu lizującego LT, zawartego w zestawie oraz 20 μ l proteinazy K. Całość mieszano i inkubowano przez 20 min w łaźni wodnej w temp. 37°C.
3. Próbkę intensywnie mieszano przez 20 s, a następnie наносzono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA, którą wirowano przez 1 min przy prędkości 13 tys./obr./min w wirówce Sigma 1-13.
4. Następnie do minikolumny wprowadzano 500 μ l roztworu płuczającego A1 i wirowano 1 min. przy prędkości 13 tys./obr./min.

5. Minikolumnę przenoszono do nowej probówki 2 ml i płukano 400 μ l roztworu płuczającego A1, po czym całość wirowano przez 2 min. przy prędkości 13 tys./obr./min.
6. Osuszoną minikolumnę umieszczano w nowej probówce 1,5 ml i dodawano do niej 100 μ l buforu elucyjnego Tris (10 mM TRIS, HCl 8,5), inkubowano przez 5 min w temp. pokojowej, a następnie wirowano przez 1 min przy prędkości 13 tys./obr./min.
7. Minikolumnę usuwano, a eluat na dnie probówki zawierający oczyszczone DNA przechowywano w temp. -20°C do czasu dalszych analiz.

3.2.2. Startery do reakcji PCR

W reakcji PCR wykorzystano startery komplementarne do wysoce konserwatywnych sekwencji genu 18S RNA *B. canis*:

BAB GF2: 5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3'

BAB GR2: 5'-CCA AAG ACT TTG ATT TCT CTC-3',

Reakcja PCR z zastosowaniem tych oligonukleotydów pozwoliła na amplifikację odcinka DNA o długości 559 par zasad.

Synteza starterów została wykonana w Instytucie Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk w Warszawie.

3.2.3. Warunki PCR

Łańcuchową reakcję polimerazy przeprowadzano w termocyklerze Biometra. Warunki reakcji dla *B. canis* opracowano według Adaszka i Winiarczyka (2008), z użyciem kontroli dodatniej i ujemnej. Kontrolą dodatnią było DNA *B. canis*

wyzolowane z krwi psa chorego na babeszjozę, zaś kontrolą ujemną DNA krwi psa zdrowego.

Każda reakcja składała się z 50 cykli, w których etap denaturacji przebiegał w 92°C przez 60 s, przyłączanie starterów odbywało się w temp. 52°C przez 60 s, a wydłużanie nici w temp 72°C trwało 90 s.

W skład mieszaniny reakcyjnej o końcowej objętości 54 µl wchodziły:

- woda dejonizowana	37,4 µl
- MgCl ₂ (25 mM)	3,6 µl
- starter BAB GF2 (50 pm/µl)	1,0 µl
- starter BAB GR2 (50 pm/µl)	1,0 µl
- bufor dla Taq polimerazy 10x	5,0 µl
- d NTP (10 mM, Fermentas #EPO402)	0,5 µl
- Taq Polimeraza (5 u/µl, Fermentas #RO192)	0,5 µl
- DNA	5,0 µl

3.2.4. Elektroforeza

Uzyskane produkty reakcji PCR analizowane były metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, w buforze TBE przy napięciu 10 V/cm przez 50 min. Po wybarwieniu produktów amplifikacji bromkiem etydyny określano ich wielkość w odniesieniu do wzorca masowego DNA ladder 100 bp (Gibco BRL).

3.2.5. Przygotowanie produktu PCR do sekwencjonowania

Uzyskane w wyniku reakcji PCR produkty amplifikacji DNA *B. canis* przed sekwencjonowaniem poddawano oczyszczaniu na kolumnkach za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen nr kat. 28104) według następującej procedury:

1. Do 1 objętości próbki DNA dodawano 5 objętości buforu PB i mieszano na wstrząsarce (Heidolph reax 2000).
2. Tak przygotowane próbki nanoszono na kolumny do oczyszczania DNA, które umieszczano w probówkach o objętości 2 ml i wirowano przez 60 s przy 13 tys./obr./min.
3. Eluat usuwano, a kolumny przemywano 750 μ l buforu PE i wirowano przez 60 sekund z prędkością 13 tys./obr./min.
4. Eluat ponownie usuwano, a kolumny wirowano „na sucho” przez kolejne 60 s.
5. Następnie kolumny przenoszono do czystych probówek typu eppendorf 1,5 ml, na środek membrany nanoszono 50 μ l buforu EB (10 mM TRIS, HCl 8,5) i pozostawiano w temp. pokojowej przez 60 s.
6. Całość wirowano przez 60 sekund z prędkością 13 tys./obr./min.
7. Oczyszczony produkt zawarty w końcowym eluacie analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, a następnie wysyłano w suchym lodzie do sekwencjonowania.

3.2.6. Sekwencjonowanie

Oczyszczone produkty reakcji PCR *B. canis* poddawano sekwencjonowaniu w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania odbierano poprzez pocztę elektroniczną, po czym opracowywano je za pomocą programu komputerowego Lasergene DNA Star.

Wykorzystując ten sam program analizowano sekwencje izolatów własnych *B. canis* i porównywano je z odpowiadającymi im sekwencjami izolatów z banku genów, izolowanymi wcześniej z terenów naszego kraju 18S RNA –A, 18S RNA-B i 18S RNA-C (Adaszek i Winiarczyk 2008, Carcy i in. 2015, Łyp i in. 2015).

Do dalszych badań wykorzystano po pięć szczepów każdego z genotypów

3.3. Hodowla *in vitro*

Krwinki czerwone (RBCs) z próbek krwi pobranych od chorych osobników przygotowano *ex tempore* do zakładania hodowli. Przygotowywano trzy układy hodowlane. W pierwszym prowadzono hodowlę szczepów *B. canis* 18S RNA-A, w drugim 18S RNA-B, zaś w trzecim 18S RNA-C.

Pełną krew odwirowywano (500×g przez 20 min), supernatant (osocze oraz kożuszek buffy layer) usuwano, osad erytrocytów (0.2 ml) zawieszano w 1 ml 0.15 M buforu fosforanowego (PBS), a następnie odwirowywano (885×g przez 3 min.). Supernatant ponownie usuwano, a osad z krwinek czerwonych odwirowywano dwukrotnie jak przedstawiono powyżej, zawieszając go każdorazowo w 1 ml PBS. Po ostatnim wirowaniu supernatant usuwano, a uzyskane erytrocyty wykorzystywano do zakładania hodowli. Hodowlę prowadzono w 96 dołkowych płytkach (IWAKI). Do

dołków wprowadzano zawiesinę 50 μ l krwinek czerwonych i 350 μ l płynu hodowlanego RPMI-1640 medium (Biomed Lublin Poland) suplementowanego 40% surowicą psią (Pel-Freez Biologicals, Rogers, AZ), i buforowanego 20 mM HEPES. Dodatkowo płyn hodowlany zawierał antybiotyki: streptomycynę i penicylinę o końcowym stężeniu odpowiednio 200 μ g/ml streptomycyny i 200 U/ml penicyliny.

Hodowlę inkubowano w 37°C w atmosferze 5% CO₂. Codziennie usuwano około 300 μ l płynu hodowlanego, zwracając uwagę by nie naruszyć osadu erytrocytów i zastępowano go 300 μ l świeżego medium. Co 7 dni do hodowli wprowadzano 20 μ l zawiesiny niezarażonych krwinek czerwonych.

Niezarażone krwinki pozyskiwane od zdrowego, niezdradzającego objawów babeszjozy psa w wieku 3 lat, u którego badaniem mikroskopowym krwi oraz PCR wykluczono babeszjozę. Krew pobierano do probówek z EDTA i odwirowywano (500 \times g przez 20 min) celem uzyskania osadu z erytrocytów, który, po usunięciu z probówki supernatantu wykorzystywano w dalszej części badania.

Pasażowanie hodowli erytrocytów polegało na zastąpieniu starego płynu hodowlanego nowym (HL-1 i EMEM z dodatkiem 40% surowicy psiej). 100 μ l zawiesiny erytrocytów przenoszono do nowych dołków płytki i uzupełniano do objętości 400 μ l świeżym płynem odżywczym (rozcieńczenie 1:4) z dodatkiem 10% świeżych (niezarażonych) erytrocytów.

Parazytemię oceniano przy udziale mikroskopu Leica DMI8 wyposażonego w oprogramowanie LAS – Leica Application Software (Leica, Niemcy). Parametry analizy były następujące: tryb światła przechodzącego i jasnego pola, obiektyw immersyjny, powiększenie 100x, rozdzielczość XY: 0.254 μ m, rozdzielczość Z: 0.479 μ m wykonując codziennie cienkie rozmazy krwi barwione metodą Diff-Quick na odtłuszczonych szkiełkach, (Lehtinen i in. 2008, Adaszek i Winiarczyk 2011).

3.3.1. *Aktywność przeciwpirowotniacza suszu z papryczek zawierającego kapsaicynę*

Po uzyskaniu parazytemii rzędu 0.8% w warunkach *in vitro* przystąpiono do oceny aktywności przeciwpirowotniaczej kapsaicyny w każdym z trzech układów hodowlanych. Aktywność tą oceniano na 24- dołkowych płytkach inkubowanych przez 24 h w temp 37 °C i w obecności 5% CO₂. W skład hodowli wchodziło: 250 µl zawiesiny erytrocytów zarażonych *B. canis* szczepami: 18S RNA-A, 18S RNA –B, lub 18S RNA-C, 75 µl zawiesiny niezarażonych krwinek czerwonych, 10 µl badanej substancji oraz 665 µl płynu hodowlanego (HL-1).

By określić aktywność ant-*Babesia* badanej substancji *in vitro* susz z papryczek habanero zawierający kapsaicynę rozpuszczano w 0.5 ml DMSO, przygotowując następnie jego rozcieńczenia 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, i 10⁻⁵. Oceniano aktywność przeciwpirowotniaczą każdego rozcieńczenia. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano dipropinian imidokarbu (Schering-Plough Animal Health), w stężeniu 10, 1, 0.1, 0.01, i 0.001 µg/ml, natomiast jako kontrolę negatywną 0.5% wodny roztwór DMSO.

Po 24 h inkubacji, usuwano 700 µl supernatantu z nad erytrocytów i zastępowano go 690 µl świeżego płynu hodowlanego z dodatkiem 10 µl roztworu zawierającego kapsaicynę/imidokarb/DMSO. Po kolejnych 24 h wykonywano rozmazy z hodowli barwione metoda Giemzy w celu określenia stopnia parazytemii. Następnie z każdego dołka usuwano 750 µl zawiesiny hodowli zastępując ją zawiesiną 75 µl niezarażonych erytrocytów i 700 µl świeżego płynu hodowlanego. Po 72 h, około 700 µl płynu hodowlanego usuwano bez dodawania do hodowli nowych roztworów badanych substancji. Po 96h ponownie wykonywano rozmazy z hodowli barwione metoda Giemzy, po czym eksperyment kończono.

Stopień hamowania parazytemii w hodowli (inhibitory rate) obliczano wg wzoru:

(Inhibitory rate) = $[(A-B)/A] \times 100\%$, gdzie A: parazytemia (%) w układzie z substancją kontrolną (imidokarb), B: parazytemia (%) w układzie z substancją badaną (Murnigsih i in., 2005).

Nasilenie parazytemii (%) *B. canis* w hodowli określano obliczając w mikroskopie świetlnym pod obiektywem immersyjnym liczbę krwinek czerwonych opadniętych pasożytami przypadającą na 1000 erytrocytów. Stopień aktywności przeciwpierwotniaczej badanych roztworów określano następująco: jeżeli hamowanie parazytemii było niższe niż 50% roztwór oceniano jako nieaktywny. Gdy stopień hamowania parazytemii wahał się w granicach 50 do 80%, aktywność roztworu oceniano jako średnią. W sytuacji gdy hamowanie parazytemii było powyżej 80% aktywność roztworu określano jako silną (Murnigsih i in. 2005). Wpływ badanych rozcieńczeń suszu z papryczek habanero zawierających kapsaicynę na namnażanie pasożytów wyrażano w wartościach IC_{50} . Wartość IC_{50} wyznaczano z wykresu obrazującego stopień hamowania namnażania merozoitów *B. canis* w zależności od użytego stężenia badanego roztworu. Jako standard wykorzystano dipropinian imidokarbu (Subeki i in. 2004, 2005 a,b,c).

4. Wyniki

4.1. Wyniki jakościowego i ilościowego określenia zawartości kapsaicyny w suszu z papryczek habanero

Analizę zawartości: kapsaicyny, norkapsaicyny, nornorkapsaicyny i homokapsaicyny w próbce papryki chili dokonywano metodą chromatografii cieczowej. Kapsaicynę i dihydrokapsaicynę identyfikowano na podstawie widm i czasów retencji substancji wzorcowych, natomiast pozostałe związki na podstawie mas cząsteczkowych. Każda

badana próbka analizowana była niezależnie trzykrotnie. Wyniki zawartości kapsanoidów w badanych próbkach przedstawiono w Tabeli 2

Tabela 2. Wyniki analizy jakościowej i ilościowej kapsanoidów zawartych w suszu z papryczek habanero

Związek	Zawartość (mg/ml.) *
Kapsaicyna	4,30
Dihydrokapsaicyna	3,01
Nordihydrokapsaicyna	0,18
Homodihydrokapsaicyna	0,10
Norkapsaicyna	Śladowe ilości
Nornorkapsaicyna	Śladowe ilości
Homokapsaicyna	Nie wykryto

*zawartość kapsaicyny, norkapsaicyny, nornorkapsaicyny i homokapsaicyny podano w przeliczeniu na kapsaicynę,

*zawartość dihydrokapsaicyny, nordihydrokapsaicyny, homodihydrokapsaicyny podano w przeliczeniu na dihydrokapsaicynę

4.2. Polimorfizm szczepów *Babesia canis* wykorzystywanych do badań hodowlanych

Badaniu molekularnemu poddano próbki krwi pochodzące od 48 psów, u których badaniem mikroskopowym potwierdzono babeszjozę. DNA pochodzące z próbek krwi od psów poddano amplifikacji z zastosowaniem starterów BAB GF2 i BAB GR2. Materiał genetyczny 18S RNA pierwotniaków wykazano w próbkach krwi

wszystkich psów u których badaniem mikroskopowym potwierdzono babeszjozę. Wielkość produktu amplifikacji dla wszystkich próbek wynosiła 559 pz.

Sekwencjonowaniu poddano wszystkie 48 produkty PCR, które charakteryzował najsilniejszy sygnał w elektroforezie- co świadczyło o dużej ilości amplifikowanego DNA. Czytelne sekwencje produktów amplifikacji DNA *B. canis* uzyskano dla wszystkich 48 badanych próbek Porównanie uzyskanych sekwencji nukleotydowych izolatów uzyskanych w badaniach własnych przy pomocy programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich wzajemnej homologii w przedziale 98,3-100,0%.

Analiza tych sekwencji pozwoliła na wyodrębnienie trzech grup polimorficznych oznaczonych jako: 18S RNA-A (29 próbek), 18 S-RNA-B (12 próbek). i 18S RNA-C (7 próbek). Do grupy 18 S-RNA-A zaszeregowano izolaty, które cechowało 100% podobieństwo sekwencji nukleotydowej (Ryc.4). Sekwencję tą uznano za wzorcową i do niej przyrównywano sekwencje pozostałych izolatów uzyskanych w badaniach.

```
GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAG
CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCA
ATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTG
CGTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGCTTTTGGGAAT
TTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTT
GAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTG
GTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTAT
TTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCG
AAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGG
```

ATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGAC
TAGTGATTGGAGGTCGTCGTTTTTTGACCCCTTCAGGAACTTGAGAGAAA
TCAAAGTCTTTGG

Ryc. 4 Sekwencja nukleotydowa fragmentu genu 18S RNA izolatów *B. canis* zakwalifikowanych do grupy 18S RNA-A.

Grupę 18S RNA-B utworzyły izolaty, których sekwencja nukleotydowa wykazywała podobieństwo rzędu 99,6% z sekwencją izolatów grup A. Różnica 0,4% pomiędzy sekwencjami izolatów grup A i B, wynikała z inwersji GA→AG w pozycjach 150 i 151 badanego fragmentu genu 18S RNA (Ryc.5).

GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAG
CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCA
ATAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTG
CGTTAGCGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGCTTTTGGGAAT
TTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTT
GAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTG
GTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTAT
TAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCG
AAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGG
ATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGAC
TAGTGATTGGAGGTCGTCGTTTTTTGACCCCTTCAGGAACTTGAGAGAAA
TCAAAGTCTTTGG

Ryc. 5 Sekwencja nukleotydowa fragmentu genu 18S RNA izolatów *B. canis* zakwalifikowanych do grupy 18S RNA-B.

Grupę 18S RNA-C utworzyły izolaty o wspólnej sekwencji (Ryc.6), wykazującej podobieństwo rzędu 98% z grupą 18S RNA-A oraz z grupą 18S RNA-B

GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAG
CAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCA
ATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTG
CGTTTCGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGCTTTTGGGAAT
TCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTT
GAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTG
GTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTAT
TAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCG
AAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGG
ATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGAC
TAGTGATTGGAGGTCGTCGTTTTTTGACCCCTTCAGGAACTTGAGAGAAA
TCAAAGTCTTTGG

Ryc. 6. Sekwencja nukleotydowa fragmentu genu 18S RNA izolatów *B. canis* zakwalifikowanych do grupy 18S RNA-C.

Różnice w podstawieniach nukleotydowych w badanej sekwencji genu 18S RNA badanych szczepów pasożytów prezentuje Tabela 3

Tabela 3. Polimorfizm amplifikowanego fragmentu 18S RNA izolatów *B. canis*

Odmiany polimorficzne	Położenie nukleotydów w pozycji 150 i 151
Odmiana polimorficzna nr 1 (grupa 18 SRNA-A)	GA
Odmiana polimorficzna nr 2 (grupa 18SRNA B)	AG
Odmiana polimorficzna nr 3 (grupa 18S RNA-C)	TT

Sekwencje izolatów własnych, grup filogenetycznych 18S RNA-A, 18S RNA-B i 18S RNA-C porównywano za pomocą programu DNA Star MegAligne z odpowiadającymi im sekwencjami izolatów polskich *B. canis*, opublikowanych przez Adaszka i Winiarczyka (2008), dostępnymi w bazie danych PubMed NCBI : EU622793 i EU 622792

Wykazano, iż wszystkie izolaty grupy 18S RNA-A wykazują 100% homologię badanej sekwencji z EU622793, zaś izolaty grupy 18SRNA-B 100% homologię z EU622792. Szczepy 18S RNA-C odpowiadały szczepom *B. canis* opisanych przez Łypa i in (2015) odpowiedzialnych za rozwój subklinicznej babeszjozy.

4.3. Aktywność przeciwpirotniacza suszu z papryczek habanero in vitro

Aktywność przeciwpirotniaczą rozcieńczeń suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w stosunku do *B. canis* przedstawiono w Tabelach 4-6. Jako kontrolę dodatnią wykorzystano dipropionian imidokarbu. Dodanie imidokarbu do hodowli pirotniaków w stężeniu 10, 1, lub 0.1 µg/ml hamowało namnażanie się pasożytów w 100% zarówno w hodowli pirotnej, jak i w kolejnych pasażach. Aktywność ta przejawiała się brakiem zmiany koloru hodowli, który pozostawał jasnoczerwony. Przy stężeniu 0.01 i 0.001 µg/ml, aktywność leku w hamowaniu parazytemii wynosiła odpowiednio 60 i 30%,

Kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero w rozcieńczeniu 10^{-1} (stężenie 430 µg/ml) charakteryzowała się silną aktywnością przeciwpirotniaczą, blokując parazytemię niezależnie od badanego układu (zarażonego pirotniakami 18S-RNA A, 18S-RNA-B, lub 18S-RNAC) w stopniu 80-90% (Tabele 4-6) Aktywność ta przejawiała się brakiem zmiany koloru hodowli, który pozostawał jasnoczerwony.

Różnice w skuteczności anty-*Babesia* pojawiały się przy wyższych rozcieńczeniach suszu z papryczek. Stwierdzono, że najskuteczniejsze jego działanie odnosi się do szczepów 18S-RNA-B. Rozcieńczenie suszu zawierające kapsaicynę w stężeniu 43 µg/ml i 4,3 µg/ml wykazywało silne działanie przeciwpirotniacze

hamując parazytemię odpowiednio w 90 i 80%. Aktywność w hamowaniu parazytemii przy stężeniu kapsaicyny 0,43 $\mu\text{g/ml}$ określano jako średnią (50%), zaś przy stężeniu 0,043 wyniosła ona już zaledwie 30%.

W przypadku hodowli zarażonych szczepami 18S RNA-A, skuteczność przeciwpierwotniacza suszu zawierającego kapsaicynę była niższa aniżeli we wcześniej opisanym układzie. Przy stężeniu kapsaicyny 43 $\mu\text{g/ml}$ i 4,3 $\mu\text{g/ml}$ określano ją jako średnią (stopień hamowania parazytemii wynosił odpowiednio 60 % i 50%), przy wyższych rozcieńczeniach (zawartość kapsaicyny w suszu 0,43 $\mu\text{g/ml}$ i 0,043 $\mu\text{g/ml}$) uznawano, że jest on nieaktywny (blokowanie parazytemii w stopniu zaledwie 30%).

Także w przypadku hodowli zarażonych szczepami 18S RNA-C, skuteczność przeciwpierwotniacza suszu zawierającego kapsaicynę była niższa aniżeli w pierwszym z badanych układów. Przy stężeniu kapsaicyny 43 $\mu\text{g/ml}$ określano ją jako średnią (stopień hamowania parazytemii wynosił 50%), przy pozostałych rozcieńczeniach (zawartość kapsaicyny w suszu 4,3 $\mu\text{g/ml}$, 0,43 $\mu\text{g/ml}$ i 0,043 $\mu\text{g/ml}$) uznawano, że jest on nieaktywny (blokowanie parazytemii w stopniu zaledwie 30-40%).

We wszystkich układach, w hodowlach, gdzie rozcieńczenie suszu z papryczki habanero zawierające kapsaicynę w stężeniu przy którym hamowanie parazytemii było niższe aniżeli 50% obserwowano zmianę koloru hodowli na czekoladowy.

Tabela 4. Wpływ stężenia kapsaicyny zawartej w suszu z papryczek habanero na hamowanie parazytemii *B. canis* w hodowli zarażonej szczepami 18S RNA A

Badana substancja	Stężenie badanej substancji (µg/ml)	Rozcieńczenie	Stopień hamowania inwazji (%)± SD	<i>B. canis</i> (IC ₅₀ µg/ml)
Dipropionian imidokarbu	10	10 ⁻¹	100%	0.009
	1	10 ⁻²	100%	
	0.1	10 ⁻³	100%	
	0.01	10 ⁻⁴	60% ± 5%	
	0.001	10 ⁻⁵	30% ± 5%	
Kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero	430	10 ⁻¹	80 ± 5 %	4.3
	43	10 ⁻²	60 ± 5 %	
	4.3	10 ⁻³	50 ± 5 %	
	0.43	10 ⁻⁴	30 ± 5 %	
	0.043	10 ⁻⁵	30 ± 5 %	

Tabela 5. Wpływ stężenia kapsaicyny zawartej w suszu z papryczek habanero na hamowanie parazytemii *B. canis* w hodowli zarażonej szczepami 18S RNA B

Badana substancja	Stężenie badanej substancji (µg/ml)	Rozcieńczenie	Stopień hamowania parazytemii (%)± SD	<i>B. canis</i> (IC ₅₀ µg/ml)
Dipropionian imidokarbu	10	10 ⁻¹	100%	0.009
	1	10 ⁻²	100%	
	0.1	10 ⁻³	100%	
	0.01	10 ⁻⁴	60% ± 5%	
	0.001	10 ⁻⁵	30% ± 5%	
Kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero	430	10 ⁻¹	90 ± 5 %	0.43
	43	10 ⁻²	90 ± 5 %	
	4.3	10 ⁻³	80 ± 5 %	
	0.43	10 ⁻⁴	50 ± 5 %	
	0.043	10 ⁻⁵	30 ± 5 %	

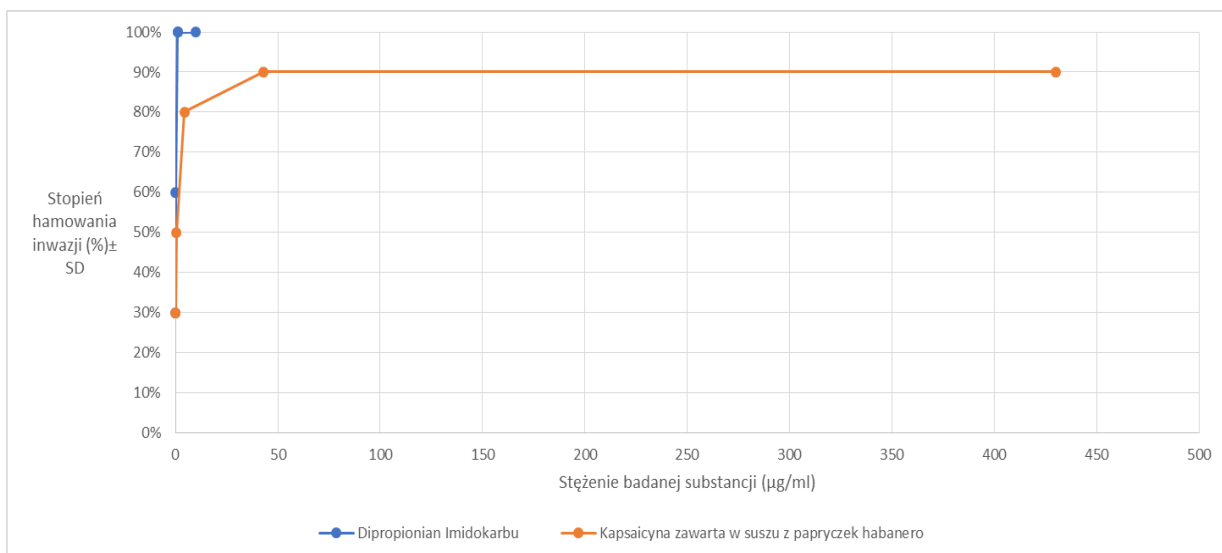
Tabela 6. Wpływ stężenia kapsaicyny zawartej w suszu z papryczek habanero na hamowanie parazytemii *B. canis* w hodowli zarażonej szczepami 18S RNA C

Badana substancja	Stężenie badanej substancji (µg/ml)	Rozcieńczenie	Stopień hamowania inwazji (%)±SD	<i>B. canis</i> (IC ₅₀ µg/ml)
Dipropionian imidokarbu	10	10 ⁻¹	100%	0.009
	1	10 ⁻²	100%	
	0.1	10 ⁻³	100%	
	0.01	10 ⁻⁴	60% ± 5%	
	0.001	10 ⁻⁵	30% ± 5%	
Kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero	430	10 ⁻¹	80 ± 5 %	43
	43	10 ⁻²	50 ± 5 %	
	4.3	10 ⁻³	40 ± 5 %	
	0.43	10 ⁻⁴	30 ± 5 %	
	0.043	10 ⁻⁵	30 ± 5 %	

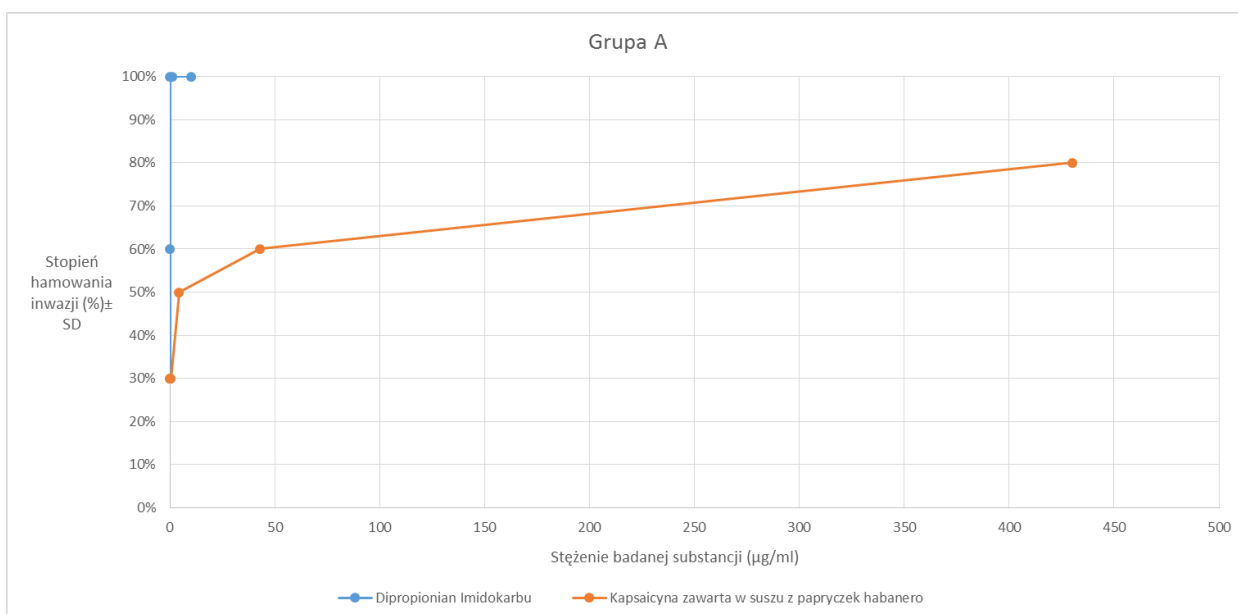
Różnice w aktywności przeciwpierwotniaczej suszu z papryczek habanero, zawierającej kapsaicynę w stosunku do poszczególnych badanych szczepów pasożytów znalazły swoje odzwierciedlenie w różnych wartościach IC₅₀ kapsaicyny w poszczególnych układach, która wynosiła w hodowli zarażonej szczepami 18S-RNA-B 0,43 µg/ml, w hodowli zarażonej szczepami 18S-RNA-A 4,3 µg/ml, zaś w hodowli 18S-RNA-C 43 µg/ml (Ryc.7).

Ryc. 7. Wartości IC50 kapsaicyny w hodowlach erytrocytów zarażonych szczepami 18S-RNA-B (a) 18S-RNA-A (b) i 18S-RNA-C (c)

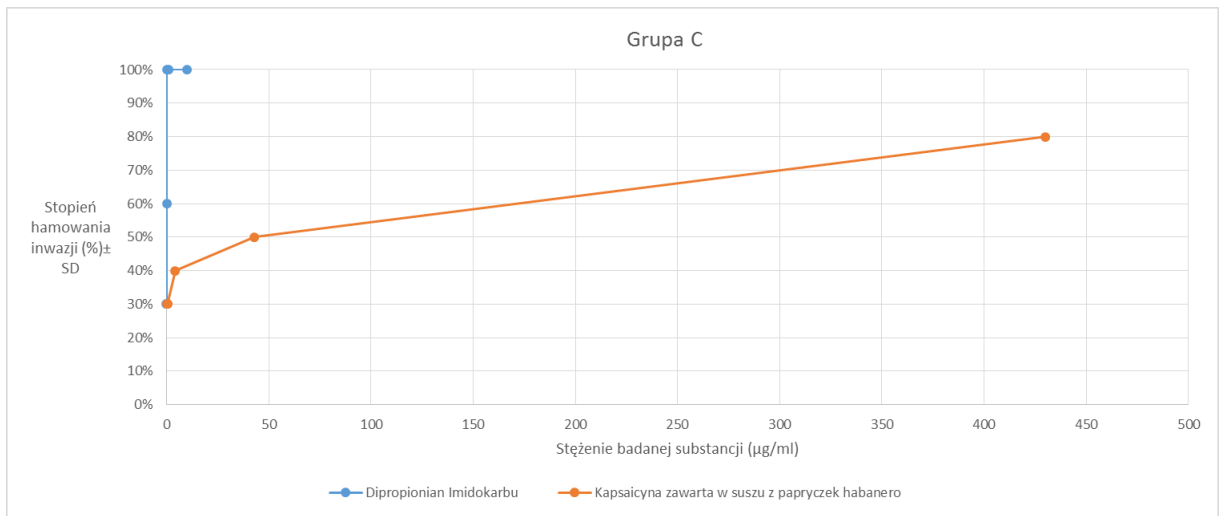
a)



b)



c)



4. Dyskusja

Przeprowadzone badania są jednymi z pierwszych nad oceną przydatności suszu papryczek habanero w hamowaniu namnażania się pierwotniaków *Babesia canis* w warunkach *in vitro*.

Głównym związkiem o działaniu przeciwpierwtwotniaczym zawartym w tej roślinie wydaje się być kapsaicyna. Oprócz kapsaicyny w papryce znajdują się inne kapsaicynoidy. Są to min.: dihydrokapsaicyna ale również nordihydrokapsaicyna, homokapsaicyna, homodihydrokapsaicyna, norkapsaicyna oraz nornorkapsaicyna. Najwięcej jest kapsaicyny i dihydrokapsaicyny, które stanowią od 80 do 90 % wszystkich kapsaicynoidów. Stosunek zawartości kapsaicyny do dihydrokapsaicyny wynosi od 1:1 do 2:1.

Kapsaicynoidy są głównymi komponentami ostrych przypraw (chili, pieprz cayenne, papryka). Ich zawartość w przyprawach waha się od 0,1 mg/g w czerwonej papryce, 2,5 mg/g w chili do nawet 60 mg/g w oleożywicach z papryki (mieszanka olejków eterycznych i ekstraktu). W pieprzu cayenne średnia zawartość kapsaicyny i dihydrokapsaicyny wynosi odpowiednio 1,32 i 0,83 mg/g suchej masy (Lopez-Hernandez i in. 1996). W badaniach własnych ustalono, że stężenie dwóch głównych kapsanoidów w analizowanych papryczkach habanero jest ponad trzykrotnie wyższe niż w pieprzu cayenne i wynosi: 4,30 mg/kg s.m (kapsaicyna) i 3,01 mg/kg s.m (dihydrokapsaicyna). W zależności od gatunku papryki może ona zawierać od 0.22 do 20 mg kapsaicynoidów w gramie suchej masy. Habanero należy do najostrzejszych papryk, a ostrość wynika z wysokiej koncentracji kapsaicyny – w gnieździe nasiennym może ona wynosić nawet 1500 ppm to jest 1,5 g w kilogramie produktu. Wyniki badań własnych pokrywają się z rezultatami uzyskanymi przez Lopez-Hernandez i in. (1996)

według których zawartość kapsaicyny i dihydrokapsaicyny w papryce z gatunku habanero (orange habanero) wynosi:

Kapsaicyna: 6639 ± 348 mg kg⁻¹ (suchej masy)

Dihydrokapsaicyna: 3727 ± 179 mg kg⁻¹ (suchej masy), zaś sucha masa w papryce wynosi od 11 do 22%.

Biosynteza kapsacynoidów w roślinach przebiega dwutorowo: za pośrednictwem szlaku biosyntezy fenylopropanoidów oraz szlaków metabolizmu kwasów tłuszczowych (Ochoa-Alejo i in. 1993; Contrera-Padilla i in. 1998). Stężenie tych alkaloidów w roślinach stopniowo wzrasta w miarę rozwoju owoców papryki, osiągając maksymalny poziom około 40-50 dnia (Contrera-Padilla i in., 1998), po czym spada na skutek procesów peroksydacji. Badania wykazały, że pewne stany jak np. stres wodny zwiększa stężenie kapsacynoidów w roślinach, gdyż niedobór wody wpływa na szlaki przemian fenylopropanoidów (Estrada i in. 1999). Zwiększony poziom kapsacynoidów w roślinach obserwowany w stresie wodnym może także wynikać ze zwiększonej aktywności enzymów takich jak: amoniakolizazy fenyloalaninowej (PAL), 4-hydroksylazy kwasu cynamonowego (C4H) i CS, zaangażowanych w biosyntezę kapsaicyny (Sung i in. 2005).

Farmakokinetyka kapsaicyny u ludzi i zwierząt została poznana dość dobrze. W badaniach przeprowadzonych na 12 osobach wykazano, iż 3% roztwór tej substancji (w różnych rozpuszczalnikach jak: 70% alkohol izopropylowy, olej mineralny, glikol propylenowy, czy 20% alkohol) jest szybko wchłaniana przez skórę i szybko osiąga maksymalne stężenie w surowicy. Okres półtrwania alkaloidu wynosi około 24 h (Pershing i in. 2004). Po podaniu doustnym blisko 94% kapsaicyny jest wchłaniane w przewodzie pokarmowym, a maksymalne stężenie osiągnęte jest w surowicy po upływie 1 godziny. Maksymalna dystrybucja 24,4 % podanej kapsaicyny

we krwi, wątrobie, nerkach i jelitach obserwowana była w ciągu pierwszej godziny, po czym spadała, a samego alkaloidu nie można było wykazać w tkankach po upływie 4 dni (Suresh i in. 2010). Metabolizm kapsaicyny wygląda podobnie u ludzi, szczurów i psów. Zidentyfikowano trzy główne metabolity tego alkaloidu, którymi są: 16-hydroksykapsaicyna, 17-hydroksykapsaicyna i 16,17-dihydrokapsaicyna (Chanda i in., 2008). W badaniach *in vitro* prowadzonych na liniach komórkowych ludzkiej skóry wykazano, że biotransformacja kapsaicyny zachodzi wolno i większość substancji w komórkach pozostaje w stanie niezmiennym, a jedynie niewielka jej część ulega przemianom do wanilylaminy i kwasu wanilowego. Wskazuje to, że enzymy cytochromu P450 tylko w niewielkim stopniu uczestniczą w przemianach kapsaicyny w skórze, w przeciwieństwie do ich udziału w transformacji tego alkaloidu w wątrobie. Kapsaicyna wydalana jest głównie przez nerki, a w niewielkiej ilości, w postaci niezminionej z kałem (Kawada i in. 1985).

W badaniach własnych podjęto próbę oceny skuteczności przeciwprzywrotniczej suszu z papryczek habanero zawierającego kapsaicynę w stosunku do trzech szczepów *Babesia canis* izolowanych od psów z klinicznych przypadków babeszjozy.

Różnicowanie pasożytów dokonywano w oparciu o wyniki PCR i sekwencjonowanie uzyskanych amplikonów. Technika PCR w kombinacji z sekwencjonowaniem produktów amplifikacji jest obecnie jednym z podstawowych narzędzi wykorzystywanych w badaniach epidemiologicznych wielu chorób zakaźnych i inwazyjnych oraz w taksonomii. W badaniach własnych zsekwencjonowano produkty amplifikacji PCR, które charakteryzował najsilniejszy sygnał w elektroforezie- co świadczyło o dużej ilości amplifikowanego DNA. Analiza tych sekwencji pozwoliła na wyodrębnienie trzech szczepów pasożytów, które

określono jako: 18S-RNA-A, 18S-RNA-B i 18S-RNA-C. Kryterium zaszeregowania do grup A i B było ułożenie nukleotydów w pozycjach 150 i 151 badanej sekwencji

Wszystkie izolaty grupy A posiadały w pozycji 150 guaninę i adeninę w pozycji 151. Z kolei u izolatów grupy B doszło do inwersji tych zasad i adenina znajdowała się w pozycji 150, zaś guanina w pozycji 151. Sekwencje, które zakwalifikowano do grupy C wykazywały zarówno w pozycji 150, jak i 151 tyminę

Zestawienie uzyskanych sekwencji nukleotydów izolatów uzyskanych w badaniach własnych za pomocą programu DNA Star MegAligne pozwoliło ustalić stopień ich wzajemnej homologii w przedziale 97,7-100,0%. Dalsze porównanie własnych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w bazie danych GenBank pozwoliło zakwalifikować pierwotniaki do gatunku *B. canis*, którego wektorem są kleszcze *Dermacentor reticulatus*. (Adaszek 2006).

Badania przeprowadzone w ostatniej dekadzie wskazują, że *B. canis* jest gatunkiem najczęściej wywołującymi babeszjozę u psów w Europie, a regiony północno- i południowo-wschodniej Polski uznawane są za obszary endemicznego występowania babeszjozy (Adaszek i in. 2020).

Uzyskane wyniki są potwierdzeniem wcześniejszych obserwacji odnośnie występowania na terenie Polski i Europy trzech głównych szczepów *B. canis* 18S RNA-A i 18S RNA-B i 18S RNA-C (Łyp 2015).

Leczenie pacjentów chorych na babeszjozę przebiega dwuetapowo. Pierwszym celem terapii jest eliminacja pasożytów z organizmu chorego osobnika, natomiast drugim - zapewnienie, lub przywrócenie prawidłowej funkcji układów i narządów oraz terapia niedokrwistości. Skuteczność leczenia babeszjozy uzależniona jest od prawidłowego rozpoznania choroby oraz szybkiego podania odpowiednich

chemioterapeutyków. W terapii przyczynowej najczęściej stosowany jest dipropionian imidokarbu, należący do karbanilidów (Adaszek i in. 2020). Mechanizm jego działania polega na uszkodzaniu jąder komórkowych pasożyta i zmianach morfologii komórki pierwotniaków, np. powstawanie wakuoli w cytoplazmie. Pod wpływem działania leku zahamowaniu ulega synteza DNA w komórkach. Ponadto preparat ten wywołuje hipoglikemię w organizmie gospodarza, co utrudnia pierwotniakom pobieranie glukozy. Zalecana dawka chemioterapeutyku wynosi 5-6,6 mg/kg. Imidokarb należy podawać podskórnie lub domięśniowo. Na ogół, we wczesnej babeszjozie odpowiedź ze strony organizmu na podanie leku jest szybka, co przejawia się produkcją nowych erytrocytów w ciągu 12-24 godzin po jego aplikacji. Lek nie jest metabolizowany w organizmie i wydalany jest w postaci niezmienionej, głównie z kałem i moczem. Jego okres półtrwania w osoczu wynosi 207 min, a 80% dawki podanej psom w bolusie dożylnym ulega eliminacji z organizmu w czasie 8 h. (Vial i Gorenflot 2006). Wykazuje skuteczność w zwalczaniu zarówno „dużych”, jak i „małych” gatunków *Babesia*. Niekiedy jest on także stosowany w profilaktyce choroby.

Aplikacji imidokarbu, mogą niestety towarzyszyć objawy niepożądane (Adaszek i in. 2020). Wczesne działania niepożądane związane z aplikacją chemioterapeutyku pojawiają się w przeciągu 10 minut po iniekcji i obejmują: nadmierne ślinienie, ból w miejscu iniekcji, wystąpienie biegunki, wymioty oraz apatię. Część z tych objawów można znieść stosując atropinę (Adaszek i in. 2009, Zygner i Frydrych 2005). Reakcje opóźnione mogą pojawiać się 10-12 godzin po rozpoczęciu leczenia i objawiają się drgawkami, silną apatią, rozwojem gorączki, zaburzonym rytmem pracy serca. Istnieją doniesienia o toksycznym wpływie imidokarbu na nerki i wątrobę i rozwoju indukowanej tym lekiem martwicy tych narządów (Lobetti 2010). Badania nad toksycznością imidokarbu prowadzone na

szczurach wykazały, że dawka śmiertelna (LD50) dla tego gatunku zwierząt wynosi 450-1200 mg/kg. Obserwacje prowadzone na psach wskazują, że podanie leku w nawet w ilości 9,9 mg/kg jest bezpieczne.

Pomimo tego, że imidokarb wydaje się być skutecznym preparatem w stosunku do *B. canis*, niekiedy obserwuje się oporność pasożytów na działanie tego chemioterapeutyku. Jak wynika z obserwacji własnych, w ostatnich latach stosunkowo często u chorych pacjentów konieczne jest powtórzenie terapii imidokarbem po upływie dwóch tygodni od pierwszej aplikacji leku, co związane jest m.in. z pewnego rodzaju zdolnością pierwotniaków do unikania jego działania i przetrwaniem okresu aktywności chemioterapeutyku w śledzionie. Dlatego też po zakończeniu leczenia babeszjozy konieczny jest monitoring pacjenta, polegający na kilkukrotnej analizie rozmazów jego krwi pobieranej w odstępach dwutygodniowych, lub regularne badanie krwi techniką PCR.

Pierwszy przypadek oporności *B. canis* na imidokarb w Polsce opisali Zygnier i Frydrych (2005). Kolejne przypadki oporności pierwotniaków na imidokarb u pięciu psów zanotowano w Klinice Chorób Zakaźnych UP w Lublinie, Wszystkie psy zarażone pierwotniakami zdradzały objawy ostrej babeszjozy manifestującej się: silną apatią, gorączką, błądnością błon śluzowych i zmianą zabarwienia moczu. Badaniem hematologicznym u wszystkich pacjentów stwierdzano trombocytopenię i leukopenię, podczas gdy liczba krwinek czerwonych pozostawała w normie, lub była nieznacznie obniżona.

Przypadki oporności pierwotniaków *Babesia* na imidokarb stanowią istotny problem dla praktyki lekarsko weterynaryjnej, wynikający z faktu, iż jedyną substancją zarejestrowaną w Polsce do leczenia tej choroby jest właśnie dipropionian imidokarbu. Przy braku skuteczności tego preparatu możliwości lekarzy weterynarii

w walce z chorobą są bardzo ograniczone. W takich przypadkach alternatywnym leczeniem jest podawanie chlorochiny hamującej syntezę DNA pierwotniaka, diminazenu zaburzającego procesy tlenowe pasożytów (Camacho i in. 2001, Farwell i in. 1982, Harvey i in. 1988), pentamidyny (Farwell i in. 1982), klindamycyny (Stegman i in. 2003), amikarbalidu, metronidazolu ewentualnie błękitu trypanu (Adaszek i Winiarczyk 2008, Fowler 1972). Wszystkie z wymienionych powyżej chemioterapeutyków cechuje jednak, w porównaniu z imidokarbem, znacznie niższa skuteczność w zwalczaniu inwazji piroplazm, zwłaszcza na tle *B. canis*, a przy tym leki te mogą także indukować u psów rozwój ciężkich objawów niepożądanych.

W związku z powyższym trwają prace nad pozyskaniem skutecznych, a jednocześnie nietoksycznych leków przeciwpirotwotniaczych, które stanowiłyby alternatywę dla obecnych chemioterapeutyków stosowanych w terapii babeszjozy psów. Duże nadzieje w tej kwestii wiąże się z preparatami pochodzenia roślinnego (Guz i in. 2019, AbouLaila i. in 2010 a,b).

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono kilka badań *in vitro* nad aktywnością anty-*Babesia* ekstraktów roślinnych wykorzystywanych w medycynie człowieka w leczeniu malarii (Elkhateeb i in., 2005, 2007, 2008; Kasahara et al., 2005; Murnigsih et al., 2005; Subeki et al., 2005a,b, 2007; Yamada et al., 2009). Taki kierunek badań wydaje się uzasadniony z uwagi na fakt, iż *Plasmodium* oraz *Babesia* mają podobny cykl życiowy, a ponadto w zarażonym organizmie oba pasożyty indukują rozwój anemii poprzez niszczenie erytrocytów.

Analiza składu roślin leczniczych pochodzących z Europy, Bliskiego Wschodu, Mongolii, Chin, a zwłaszcza Indonezji, pozwoliły na wykrycie różnych substancji takich jak flawonoidy, alkaloidy protoberberyny, oligostilbenoidy, czy związki polifenolowe, w tym pokrewne glikozydów, o potencjalnym działaniu

przeciwpierwotniaczym (Elkhateeb i in., 2005, 2007a,b; Murnigsih i in., 2005; Subeki i in., 2005a,b 2007; Kasahara i in., 2005; Yamada i in., 2009; Badral i in., 2017; Guz i in., 2019).

Większość badań nad skutecznością różnych ekstraktów roślinnych przeciwko pierwotniakom z rodzaju *Babesia* izolowanych od psów, skupiała się na ich aktywności hemolitycznej (a tym samym na aspekcie bezpieczeństwa) i ograniczała się niemal wyłącznie do *B. gibsoni*. Dopiero niedawno ekstrakty z *Achillea millefolium* (*Asteraceae*), rośliny znanej jako krwawnik pospolity, szeroko występującej w całej Europie, Azji, Afryce Północnej i Ameryce Północnej, zostały przebadane pod kątem ich działania przeciwko *B. canis*. W warunkach *in vitro* hamowały one namnażanie *B. canis* > 80% przy stężeniu 1 mg / ml (Guz i in., 2019). Okazało się, że także olejki eteryczne z *Eugenia caryophyllus* i *Citrus grandis* wykazują silne działanie anty- *B. canis* (Guz et al., 2020) oraz alkaloidy chinolinowe pozyskiwane z tropikalnych, afrykańskich roślin *Triphyophyllum peltatum* (*Dioncophyllaceae*) i *Ancistrocladus abbreviatus* (*Ancistrocladaceae*). Te ostatnie obok dosyć wysokiej skuteczności przeciwpierwotniaczej charakteryzują się dodatkowo niską toksycznością, wyrażającą się wywoływaniem nieznacznego stopnia hemolizy (< 0.7%),

W dostępnej literaturze obecne są jedynie trzy prace poświęcone skuteczności ekstraktów roślinnych przeciwko *B. canis* (Guz i in 2019, 2020; Bringmann i in 2020). Dlatego w badaniach własnych podjęto próbę wykorzystania kapsaicyny w hamowaniu namnażania pierwotniaków *Babesia canis* w warunkach *in vitro*. Alkaloid ten obok takich właściwości jak: działanie przeciwbólowe, odchudzające, termoregulacyjne, przeciwnowotworowe, czy hipotensyjne, wykazuje także aktywność przeciwbakteryjną, przeciwwirusową oraz przeciw pasożytniczą (Adaszek

i in. 2019, Vieira-Araújo i in. 2019) w związku z czym uznany został za właściwy do badań nad aktywnością przeciwpirotniaczą.

Skuteczność suszu z papryczek habanero przestudiowano w stosunku do trzech genotypów *Babesia canis* różniących się zjadliwością. Przeprowadzone badania własne były pierwszymi jak do tej pory, w których skupiono się nie tylko na aktywności przeciwpirotniaczej badanego specyfiku, lecz także na różnicach we wrażliwości poszczególnych szczepów pierwotniaków w stosunku do badanej substancji.

Najsilniejsze działanie suszu z papryczek habanero wykazano w stosunku do szczepu piroplazm 18S-RNA-B. Rozcieńczenie suszu zawierające kapsaicynę w stężeniu 43 µg/ml i 4,3 µg/ml hamowało parazytemię odpowiednio w 90 i 80%.

W przypadku hodowli zarażonych szczepami 18S RNA-A, skuteczność przeciwpirotniacza suszu zawierającego kapsaicynę była niższa aniżeli we wcześniej opisanym układzie. Przy stężeniu kapsaicyny 43 µg/ml i 4,3 µg/ml określano ją jako średnią (stopień hamowania parazytemii wynosił odpowiednio 60 % i 50%). Także w przypadku hodowli zarażonych szczepami 18S RNA-C, skuteczność przeciwpirotniacza suszu zawierającego kapsaicynę była niższa aniżeli w pierwszym z badanych układów. Przy stężeniu kapsaicyny 43 µg/ml określano ją jako średnią (stopień hamowania parazytemii wynosił 50%), przy pozostałych rozcieńczeniach (zawartość kapsaicyny w suszu 4,3 µg/ml, 0,43 µg/ml i 0,043 µg/ml) uznawano, że jest on nieaktywny (blokowanie parazytemii s stopniu zaledwie 30-40%).

Obserwacje własne pozwalają stwierdzić, iż poszczególne szczepy pierwotniaków *B. canis* izolowane od psów cechuje nie tylko różna zjadliwość, lecz

również różna wrażliwość na kapsaicynę. Najmniej zjadliwy szczep 18S RNA-B wykazywał 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.

Pomimo tego, że w żadnym układzie oraz w żadnym z badanych rozcieńczeń kapsaicyna nie hamowała parazytemii w 100% (jak miało to miejsce w układzie kontrolnym z dipropionianem imidokarbu przy jego rozcieńczeniach 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3}), to jednak osiągnięcie w tym względzie wartości rzędu 80-90% należy uznać za znaczne. Podobną aktywność w namnażaniu się *B. canis in vitro* wykazywały ekstrakty z korzeni i liści *T. peltatum* oraz czyste alkaloidy diklofilina A i C, N-metyldiklofilina A oraz jej pochodna, N-metyl-7-epi-diklofilina A, ancistrocladina A i B, oraz 6-O-methylhamatynina, w rozcieńczeniach 10^{-1} i 10^{-2} (Bringmann i in. 2020).

W badaniach własnych wartości IC₅₀ kapsaicyny w poszczególnych układach wynosiły: w hodowli zarażonej szczepami 18S-RNA-B 0,43 µg/ml, w hodowli zarażonej szczepami 18S-RNA-A 4,3 µg/ml, zaś w hodowli 18S-RNA-C 43 µg/ml. Konfrontując te dane z wynikami badań Guza i in (2019, 2020) można stwierdzić, że kapsaicyna charakteryzuje się silniejszą aktywnością przeciwparazytarną *in vitro* w porównaniu z innymi ekstraktami/olejkami roślinnymi. Spośród analizowanych przez wspomnianych powyżej badaczy olejków roślinnych najwyższą skuteczność wykazywały olejki z *Achillea millefolium*, *Eugenia caryophyllus* i *Citrus grandis* (wartość IC₅₀ wynosiły odpowiednio 51,0, 60,3 i 61,3 µg/ml). Mniej aktywne okazały się olejki z *Abies sibirica*, *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Mentha piperita* i *Pinus sylvestris* dla których wartości IC₅₀ wynosiły odpowiednio 134.3, 237.3, 239.3, 367.9, 837.5 i 907.3 µg/ml.

Analizując w mikroskopie świetlnym hodowle *B. canis* prowadzone w ramach podjętych badań oraz inkubując je z kapsaicyną dodawaną do poszczególnych układów w różnych stężeniach, nie wykazano by alkaloid ten obok hamowania namnażania się pierwotniaków wpływał na zmianę morfologii komórek pasożyta. Nieco inne obserwacje w tym względzie poczynili Subeki i in. (2005b), którzy wykazali, że alkaloid protoberberyna izolowany z indonezyjskiej liany *Arcangelisia flava*, wykazuje bardzo silny efekt hamujący namnażanie się pierwotniaków *B. gibsoni*, a przy tym indukuje istotne zmiany w komórce pasożyta takie jak: zmniejszenie rozmiarów jądra oraz zanikanie cytoplazmy

Wyniki badań własnych wykazały, że kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero wykazuje dosyć silne działanie polegające na hamowaniu namnażania się pierwotniaków *B. canis in vitro*.

Dodatnia korelacja pomiędzy niską wartością IC50 oraz brakiem występowaniem hemolizy w badanych układach wskazuje, że kapsaicyna jest substancją bezpieczną, nie uszkadzającą w warunkach *in vitro* krwinek czerwonych.

Obiecujące działanie przeciwpierwotniacze wykazywane przez niektóre z rozcieńczeń kapsaicyny uzasadnia bardziej wnikliwe badania nad wyjaśnieniem sposobu działania tego alkaloidu oraz jego skutecznością *in vivo*.

5. WNIOSKI

- Kapsaicyna zawarta w suszu z papryczek habanero obok wielu innych właściwości hamuje namnażanie się pasożytów *Babesia canis* w hodowlach erytrocytów *in vitro*.
- Obserwacje własne pozwalają stwierdzić, iż poszczególne szczepy pierwotniaków *B. canis* izolowane od psów cechuje nie tylko różna zjadliwość, lecz również różna wrażliwość na kapsaicynę. 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.
- Pomimo tego, że w żadnym układzie oraz w żadnym z badanych rozcieńczeń kapsaicyna nie hamowała parazytemii w 100% (jak miało to miejsce w układzie kontrolnym z dipropionianem imidokarbu przy jego rozcieńczeniach 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3}), to jednak osiągnięcie w tym względzie wartości rzędu 80-90% należy uznać za znaczne.
- Dodatnia korelacja pomiędzy niską wartością IC_{50} oraz brakiem występowaniem hemolizy w badanych układach wskazuje, że kapsaicyna jest substancją bezpieczną, nie uszkadzającą w warunkach *in vitro* krwinek czerwonych

6. PIŚMIENNICTWO

AbouLaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. 2010a: Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites. *Parasitol. Int.* 59, 278-282.

AbouLaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. 2010c: Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites. *Parasitol. Int.* 59, 278-282.

AbouLaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2010b: Inhibitory effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of Babesia parasites. *Parasitology.* 137, 785-791.

Adaszek L., Winiarczyk S. 2008: Molecular characterization of Babesia canis canis isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 152, 235-417.

Adaszek Ł., Garbal M., Adach P. 2020: Problemy związane z leczeniem babeszjozy psów. *Weterynaria w Praktyce* 17, 66-69.

Adaszek Ł. 2006: Wybrane aspekty epidemiologii babeszjozy, boreliozy i erlichiozy u psów. *Rozprawa doktorska.*

Adaszek Ł., Gadomska D., Mazurek Ł., Łyp P., Madany J., Winiarczyk S. 2019: Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine. *Res. Vet. Sci.* 123, 14-19.

Adaszek Ł., Gadomska D., Staniec M., Gołyński M., Łyp P., Ziętek J., Różańska D., Orzelski M., Śmiech A., Winiarczyk S. 2017: Clinical assessment of the anti-cancer activity of the capsaicin-containing habanero pepper extract in dogs: a preliminary study. *Med. Weter* 73, 404-411.

Adaszek Ł., Garbal M., Górna M., Ziętek J., Winiarczyk S. 2012: Terapia babeszjozy u zwierząt. *Weterynaria w Praktyce.* 1-2, 39-43.

Adaszek Ł., Górna M., Klimiuk P., Kalinowski M., Winiarczyk S. 2012: A presumptive case of cerebral babesiosis in a dog in Poland caused by a virulent *Babesia canis* strain. Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere. 40, 367-371.

Adaszek Ł., Winiarczyk S. 2011: In vitro cultivation of *Babesia canis canis* parasites isolated from dogs in Poland. Parasitol. Res. May;108:1303-7.

Adaszek Ł., Winiarczyk S. 2011: In vitro cultivation of *Babesia canis canis* parasites isolated from dogs in Poland. Parasitol. Res. 108, 1303-1307.

Adaszek Ł., Winiarczyk S. 2013: Babeszjoza psów. Elamed: ISBN:978-83-61190-38

Adaszek Ł., Winiarczyk S., Skrzypczak M. 2009: The clinical course of babesiosis in 76 dogs infected with protozoan parasites *Babesia canis canis*. Pol. J. Vet. Sci., 12, 81- 87.

Adaszek Ł., Winiarczyk S., Ziętek J. 2009: Hodowle in vitro pierwotniaków *Babesia* izolowanych od zwierząt. Med. Weter., 65, 12-14.

Anderson JF., Magnarelli LA., Sulzer AJ. 1980: Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for north american isolate of *Babesia gibsoni*. Am. J. Vet. Res. 41, 2102-2105.

Ano H., Makimura S., Harasawa R 2001.: Detection of babesia species from infected dog blood by polymerase chain reaction. J. Vet. Med. Sci. 63, 111-113.

Badral D., Odonbayar B., Murata T., Munkhjargal T., Tuvshintulga B., Igarashi I., Suganuma, K, Inoue N., Brantner A.H., Odontuya G. Sasaki K., Batkhuu J. 2017: Flavonoid and galloyl glycosides isolated from *Saxifraga spinulosa* and their antioxidative and inhibitory activities against species that cause piroplasmosis. J. Nat. Prod. 80, 2416-2423.

Baneth G., Breitschwerdt EB., Hegarty BC., Pappalardo B., Ryan J. 1998: A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel. Vet Parasitol. 74, 133-142.

Barić R., Kuleš J., Selanec J., Vrkić N., Zovko V., Zupančič M., Trampuš-Bakija A., Matijatko V., Crnogaj M., Mrljak V. 2013: Markers of coagulation activation, endothelial stimulation, and inflammation in dogs with babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1172-1178.

Barić R., Matijatko V., Kiš I., Kučer N., Živičnjak T., Lemo N., Žvorc Z., Brkljačić M., Mrljak V. 2009: Alterations in some blood coagulation parameters in naturally occurring cases of canine babesiosis. *Acta Vet. Hung.* 57,295-304.

Bastos V., Moreira SM., Passos LM. 2004: Retrospective study (1998-2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* Oct;1026:158-60.

Belza A., Frandsen E., Kondrup J. 2007: Body fat loss achieved by stimulation of thermogenesis by a combination of bioactive food ingredients: a placebo controlled, double-blind 8-week intervention in obese subjects. *International J. Obesity* 31, 121–130.

Bourdoiseau G. 2006: Canine babesiosis in France. *Vet. Parasitol.* 138, 118-125.

Bournet N., Bernstein D.I., Stanberry L.R. 1999: Civamide (cis-capsaicin) for treatment of primary or recurrent experimental genital herpes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2685-2688.

Bringmann G., Fayez S., Shamburger W., Feineis D., Winiarczyk S., Janecki R., Adaszek Ł. 2020: Naphthylisoquinoline alkaloids and their synthetic analogs as potent novel inhibitors against *Babesia canis* in vitro. *Vet. Parasitol.* 283, 109177

Calixto J.B., Kassuya C.A.L., Andre E., Ferreira J. 2005: Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics* 2005, 106: 179– 208.

Camacho A.T., Pallas E., Gestal J.J., Guitià F.J., Olmeda A.S., Goethert H.K., Telford S.R.: Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Vet. Rec.* 2001, 149, 552-555.

Carcy B., Randazzo S., Depoix D., Adaszek L., Cardoso L., Baneth G., Gorenflot A., Schetters TP. 2015: Classification of *Babesia canis* strains in Europe based on polymorphism of the Bc28.1-gene from the Babesia canis Bc28 multigene family. Vet. Parasitol. 211, 111-123.

Chanda S., Bashir M., Babbar S., Koganti A., Bley K. 2008: In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. Drug Metab. Dispos. 36, 670-675.

Collett M.G. 2000: Survey of canine babesiosis in South Africa. J. S. Afr. Vet. Assoc. 71, 180-186.

Contreras-Padilla M., Yahia E.M. 1998: Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. J. Agric. Food Chem. 46, 2075-2079.

Cromer B.A., McIntyre P. 2008: Painful toxins acting at TRPV1. Toxicon 51, 163-173.

De Lourdes Reyes-Escogido M., Gonzalez-Mondragon E. G., Vazquez-Tzompantzi E. 2011: Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. Molecules 16, 1253-1270.

Dębiak P., Gadomska D., Śmiech A., Ziętek J., Łyp P., Łojczyk-Szczepaniak A., Winiarczyk S., Adaszek L. 2018: Effectiveness of capsaicin containing dried habanero pepper extract in the treatment of primary hepatic cancer in geriatric dogs. Med. Weter. 74, 765-771.

Duh D., Tozon N., Petrovec M., Strasek K., Avsic-Zupanc T. 2004: Canine babesiosis in Slovenia: molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. Vet Res. 35, 363-368.

Elkhateeb A., Subeki Takahashi K., Matsuura H., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Yoshihara T., Nabeta K. 2005: Anti-babesial ellagic acid rhamnosides from the bark of *Elaeocarpus parvifolius*. Phytochemistry 66, 2577-2580.

- Elkhateeb A., Yamada K., Takahashi K., Matsuura H., Yamasaki M., Maede Y., Katakura K., Nabeta K. 2007b: Anti-babesial compounds from *Berberis vulgaris*. *Nat. Prod. Commun.* 2, 173-175.
- Elkhateeb A., Yamasaki M., Maede Y., Katakura K., Nabeta K., Matsuura H. 2008: Anti-babesial quassinoids from the fruits of *Brucea javanica*. *Nat. Prod. Commun.* 3, 145-148.
- Estrada B., Pomar F., Díaz J., Merino F., Bernal M.A. 1999: Pungency levels in fruits of the padron pepper with different water supply. *Hort. Sci.* 81, 385-396.
- Fabisiak M., Sapierzyński R., Kluciński W. 2010: Analysis of hematological abnormalities observed in dogs infected by a large *Babesia*. *Bulletin Veterinary Institut Pulawy*; 54, 167-170.
- Farwell G.E., LeGrand E.K., Cobb C.C. 1982: Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 507-511.
- Foldvari G., Hell E., Farkas R. 2005: *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Vet. Parasitol.* 127, 221-226.
- Fowler J.L., Ruff M.D., Fernau R.C., Furusho Y. 1972: *Babesia gibsoni*: chemotherapy in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 33, 1109-1114.
- Furlanello T., Fiorio F., Caldin M., Lubas G., Sollano-Gallego L. 2005: Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet. Parasitol.* 134, 77-85.
- Gothe R., Wegerdt S. 1991: Babesiosis of dogs in Germany: epidemiologic case analysis. *Tierarztl. Prax.* 19, 170-173.
- Groves MG., Yap LF. 1968: *Babesia gibsoni* from a dog in Kuala Lumpur. *Med. J. Malaya.* 22, 229.
- Gundlach L.J., Sadzikowski AB. 2004: *Parazytologia i parazytozy zwierząt*. Państwowe Wydawnictwo Rolne i Leśne, Warszawa.

Guz L., Adaszek Ł., Wawrzykowski J., Ziętek J., Winiarczyk S. 2019: In vitro antioxidant and antibabesial activities of the extracts of *Achillea millefolium*. *Pol. J. Vet. Sci.* 22, 369-376.

Guz L., Ziętek J., Puk K., Adaszek Ł. 2020: Inhibitory activities of essential oils against *Babesia canis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 23, 161-163.

Harvey J.W., Taboada J., Lewis J. 1988: Babesiosis in a litter of pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1751-1752.

Herwaldt B., Persing DH., Precigout EA., Goff WL., Mathiesen DA., Taylor PW., Eberhard ML., Gorenflot AF. 1996: A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. *Ann. Intern. Med.* 124, 643-650.

Hori T. 1984: Capsaicin and central control of thermoregulation. *Pharmacology and Therapeutics* 26, 389-416.

Hu J., Luo H., Jiang Y., Chen P. 2017: Dietary capsaicin and antibiotics act synergistically to reduce non-alcoholic fatty liver disease induced by high fat diet in mice. *Oncotarget*.

Inokuma H., Yoshizaki Y., Matsumoto K., Okuda M., Onishi T., Nakagome K., Kosugi R., Hirakawa M. 2004: Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Vet. Parasitol.* 121, 341-346.

Inokuma H., Yoshizaki Y., Shimada Y., Sakata Y., Okuda M., Onishi T. 2003: Epidemiological survey of *Babesia* species in Japan performed with specimens from ticks collected from dogs and detection of new *Babesia* DNA closely related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3494-3498.

Jacobson LS. 2006: The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004 *Vet. Parasitol.* 138, 126-139.

Jefferies R., Ryan UM., Muhlneckel CJ., Irwin PJ. 2003: Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. *J. Parasitol.* 89, 409-412.

Joo J.I., Kim D.H., Choi J.W., Yun J.W. 2010: Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. *J. Proteome Res.* 9, 2977-2987.

Kasahara K., Nomura S., Subeki Matsuura H., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Suzuki M., Trimurningsih Chairul Yoshihara T. 2005: Anti-babesial compounds from *Curcuma zedoaria*. *Planta Med.* 71, 482-484.

Kawada T., Iwai K. 1985: In vivo and in vitro metabolism of dihydrocapsaicin, a pungent principle of hot pepper, in rats. *Agric. Biol. Chem.* 49, 441-448.

Kordick S.K., Breitschwerdt E.B., Hegarty B.C., Southwick K.L., Colitz C.M., Hancock S.I., Bradley J.M., Rumbough R., Mcpherson J.T., MacCormack J.N. 1999: Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2631-2638.

Kurita S., Kitagawa E., Kim C.H., Momose Y., Iwahashi H. 2002: Studies on the Antimicrobial Mechanisms of Capsaicin Using Yeast DNA Microarray. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 532-536.

Lee I.O., Lee K.H., Pyo J.H., Kim J.H., Choi Y.J., Lee Y.C. 2007: Anti-inflammatory effect of capsaicin in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Helicobacter* 12, 510-517.

Lehtinen L.E., Birkenheuer A.J., Droleskey R.E., Holman P.J. 2008: In vitro cultivation of a newly recognized *Babesia* sp. in dogs in North Carolina. *Vet. Parasitol.* 151, 150-157.

Lobetti R. 2010: The pathophysiology of renal and cardiac changes in canine babesiosis: Pathophysiology of canine babesiosis, LAP Lambert Academic Publishing (January 11, 2010). ISBN-10: 3838336070

Lopez-Hernandez J., Oruna-Concha M. J., Simal-Lozano J., Gonzales-Castro M. J., Vazquez-Blanco M. E. 1996: Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in cayenne pepper and padron peppers by HPLC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92, 393-395

- Luo X.J., Peng J., Li Y.J. 2011: Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 1–7.
- Łyp P., Adaszek Ł., Furmaga B., Winiarczyk S. 2015: Identification of new 18S rRNA strains of *Babesia canis* isolated from dogs with subclinical babesiosis. *Pol. J. Vet. Sci.* 18, 573-577.
- Marini E., Magi G., Mingoia M., Pugnali A., Facinelli B. 2015: Antimicrobial and Anti-Virulence Activity of Capsaicin Against Erythromycin-Resistant, Cell-Invasive Group A Streptococci. *Front Microbiol.* 6, 1281.
- Máthé A., Vörös K., Papp L., Reiczigel J. 2006: Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet. Hung.* 54, 367-85
- Matjila P.T., Penzhorn B.L., Bekker C.P., Nijhof A.M., Jongejan F.: 2004: Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet. Parasitol.* 122, 119-125
- Medina-Contreras J.M.L., Colado-Velázquez J. 3rd, Gómez-Viquez N.L., Mailloux-Salinas P., Pérez-Torres I., Aranda-Fraustro A., Carvajal K., Bravo G. 2017: Effects of topical capsaicin combined with moderate exercise on insulin resistance, body weight and oxidative stress in hypoestrogenic obese rats. *Int. J. Obes. (Lond).* 41, 750-758.
- Meghvansi M.K., Siddiqui S., Haneef Khan Md., Gupta V.K., Vairale M.G., Gogoi H.K., Singh L. 2010: Naga chilli: A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications. *J. Ethnopharmacol.* 132, 1–14.
- Milczak A., Riha T., Abramowicz B., Madej E. 2004: Zaburzenia układu hemostazy w przebiegu babeszjozy psów. *Medycyna Weter.*, 60, 1067-1070
- 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.

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.

Ochoa-Alejo N., Gomez-Peralta J.E. 1993: Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) *J. Plant Physiol.* 141, 147-152.

Olszewska J. 2010: Kapsaicyna lek czy trucizna? *KOSMOS* 59, 133-139.

O'Neil R.G., Brown R.C. 2003: The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News Physiol. Sci.* 18, 26-31.

Pershing L.K., Reilly C.A., Corlett J.L., Crouch D.J. 2004: Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200, 73-81.

Pieńko T. 2013: Kapsaicyna-właściwości, zastosowania i perespektywy. *Biul. Wydz.Farm WUM.* 2, 11-17

Reyers F., Leisewitz A.L., Lobetti R.G., Milner R.J., Jacobson L.S., van Zyl M. 1998: Canine babesiosis in South Africa: more than one disease. Does this serve as a model for *falciparum* malaria? *Ann Trop. Med. Parasitol.* 92, 503-511.

Romanovsky A., Almeida M.C., Garami A., Steiner A., Norman M.H., Morrison S.F., Nakamura K., Burmeister J., Nucci T.B. 2009: The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in Thermoregulation: A Thermosensor It Is Not. *Pharmacol. Rev.* 61, 228–261.

Schettters T.P., Eling W.M. 1999: Can *Babesia* infections be used as a model for cerebral malaria? *Parasitol Today* 15, 492-497.

Schettters T.P., Kleuskens J.A., Van De Crommert J., De Leeuw P.W., Finizio A.L., Gorenflot A. 2009: Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. *Vet. Parasitol.* 162, 7-15.

- Shen W., Shen M., Zhao X., Zhu H., Yang Y., Lu S., Tan Y., Li G., Li M., Wang J., Hu F., Le S. 2017: Anti-obesity Effect of Capsaicin in Mice Fed with High-Fat Diet Is Associated with an Increase in Population of the Gut Bacterium *Front Microbiol.* 2017
- Solano-Gallego L., Trotta M., Carli E., Carcy B., Caldin M., Furlanello T. 2008: *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol.* 157, 211-221.
- Stegman J.R., Birkenheuer A.J., Kruger J.M., Breitschwerdt E.B. 2003: Transfusion associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222, 959-963.
- Subeki Matsuura H., Takahashi K., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Kobayashi S., Trimurningsih Chairul Yoshihara T. 2005a: Anti-babesial and anti-plasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 68, 537-539.
- Subeki Matsuura H., Takahashi K., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Suzuki M., Trimurningsih Chairul Yoshihara T. 2005b: Antibabesial activity of protoberberine alkaloids and 20-hydroxyecdysone from *Arcangelisia flava* against *Babesia gibsoni* in culture. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 223-227.
- Subeki Matsuura H., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Suzuki M., Trimurningsih Chairul Yoshihara T., 2004: Effects of central Kalimantan plant extracts on intraerythrocytic *Babesia gibsoni* in culture. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 871-874.
- Subeki Nomura S., Matsuura H., Yamasaki M., Yamato O., Maede Y., Katakura K., Suzuki M., Trimurningsih Chairul Yoshihara T. 2005c: Anti-babesial activity of some Central Kalimantan plant extracts and active oligostilbenoids from *Shorea balangeran*. *Planta Med.* 71, 420-423.
- Sung Y., Chang Y.Y., Ting N.L. 2005: Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, 35-42.
- Suresh D., Srinivasan K. 2010: Tissue distribution and elimination of capsaicin, piperine and curcumin following oral intake in rats. *Indian J. Med. Res.* 131: 682-691.

Taboada J., Lobetti R.: Babesiosis. W: Greene C.E. 2006: Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3rd ed. Saunders Elsevier, St. Louis, 722-736.

Vial H.J., Gorenflot A. 2006: Chemotherapy against babesiosis. *Vet. Parasitol.* 138, 147-160.

Vieira-Araújo F.M., Macedo Rondon F.C., Pinto Vieira Í.G., Pereira Mendes F.N., Carneiro de Freitas J.C., Maia de Moraes S. 2018: Sinergism between alkaloids piperine and capsaicin with meglumine antimoniate against *Leishmania infantum*. *Exp. Parasitol.* 188, 79-82.

Yamada K., Subeki Nabeta K., Yamasaki M., Katakura K., Matsuura H. 2009: Isolation of antibabesial compounds from *Brucea javanica*, *Curcuma xanthorrhiza*, and *Excoecaria cochinchinensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 776-780.

Yang Z.H., Wang X.H., Wang H.P., Hu L.Q., Zheng X.M., Li S.W. 2010: Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. *Urology* 75, 735-741.

Yoshioka M., St-Pierre S., Suzuki M., Tremblay A. 1980: Effects of red pepper added to high-fat and high-carbohydrate meals on energy metabolism and substrate utilization in Japanese women. *British J. Nutr.* 80, 503-510.

Zheng J, Zheng S, Feng Q, Zhang Q, Xiao X.2017: Dietary capsaicin and its anti-obesity potency: From mechanism to clinical implications. *Biosci Rep.*

Zsiborás C, Mátics R, Hegyi P, Balaskó M, Pétervári E, Szabó I, Sarlós P, Mikó A, Tenk J, Rostás I, Pécsi D, Garami A, Rumbus Z, Huszár O, Solymár M. 2016: Capsaicin and capsiate could be appropriate agents for treatment of obesity: a meta-analysis of human studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*

Zygner W., Frydrych M. 2005: Zastosowanie chlorochiny w leczeniu opornej na imidokarb babeszjozy u psa. *Życie Wet.* 80, 404-406.

Zygner W., Gójska O., Rapacka G., Jaros D., Wędychowicz H., 2007: Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia*, in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Vet. Parasitol.* 145, 146-151.

Zygner W., Gójska-Zygner O. 2011: Niedokrwistość w przebiegu babeszjozy u psów. *Życie. Wet.* 86, 788-92.

Zygner W., Gójska-Zygner O., Bąska P., Długosz E. 2014: Increased concentration of serum TNF alpha and its correlations with arterial blood pressure and indices of renal damage in dogs infected with *Babesia canis*. *Parasitol. Res.* 113, 1499-1503.

Zygner W., Gójska-Zygner O., Norbury L.J., Wedrychowicz H. 2012: Increased AST/ALT ratio in azotaemic dogs infected with *Babesia canis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 483-486.

Zygner W., Gójska-Zygner O., Wesołowska A., Wędrychowicz H. 2013: Urinary creatinine to serum creatinine ratio and renal failure index in dogs infected with *Babesia canis*. *Acta Parasitol.* 58, 297-303.

7. STRESZCZENIE

Babeszjoza - piroplazmoza jest chorobą przebiegającą z objawami anemii hemolitycznej. Jej czynnikiem etiologicznym są pierwotniaki należące do rodzaju *Babesia*, rodziny *Babesidae* rzędu *Piroplasmidia*, typu *Apicomplexa*. W Polsce oraz w innych krajach Europy głównym czynnikiem babeszjozy psów jest *B. canis*.

Pierwsze objawy babeszjozy są niespecyficzne. U zarażonych zwierząt pojawia się gorączka, apatia, spadek apetytu, przyspieszenie tętna i zwiększenie częstości oddechów. Z czasem pojawia się błądź błon śluzowych, hemoglobinuria, a niekiedy wymioty i biegunka. Badaniem hematologicznym na ogół stwierdza się anemię i trombocytopenię.

Z uwagi na problemy związane ze zmniejszającą się skutecznością leków przeciwpierwotniaczych oraz nie zawsze dobrą ich tolerancją przez zwierzęta istnieje konieczność prowadzenia badań nad nowymi substancjami, które mogłyby być wykorzystywane w zwalczaniu inwazji *Babesia*.

Na przestrzeni ostatnich lat zaobserwowano zwiększające się zainteresowanie zawartą w papryczkach habanero kapsaicyną i jej właściwościami leczniczymi, także w odniesieniu do zwalczania inwazji pierwotniaczych u ludzi i zwierząt.

Ponieważ jak wskazują dotychczasowe obserwacje babeszjoza psów jest chorobą o bardzo zróżnicowanym przebiegu klinicznym, stanowiącą w dalszym ciągu problem natury terapeutycznej, celem prowadzonych badań 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.

Badania przeprowadzono w trzech układach, na hodowlach erytrocytów zarażanych szczepami *B. canis* 18S RNA-A, 18S RNA-B i 18S RNA-C. Pasożyty różnicowano w oparciu o wyniki badań molekularnych (PCR oraz sekwencjonowanie). Do zarażonych hodowli dodawano ekstrakty z suszu z papryczek habanero zawierające wzrastające rozcieńczenia kapsaicyny. Aktywność przeciwpierwotniaczą suszu z papryczek habanero porównywano z aktywnością imidokarbu, służącego za wzorzec.

Najsilniejsze działanie suszu z papryczek habanero wykazano w stosunku do szczepu piroplazm 18S-RNA-B. Rozcieńczenie suszu zawierające kapsaicynę w stężeniu 43 $\mu\text{g/ml}$ i 4,3 $\mu\text{g/ml}$ hamowało parazytemię odpowiednio w 90 i 80%.

W przypadku hodowli zarażonych szczepami 18S RNA-A, skuteczność przeciwpirotocicznego suszu zawierającego kapsaicynę była niższa. Przy stężeniu kapsaicyny 43 $\mu\text{g/ml}$ i 4,3 $\mu\text{g/ml}$ określano ją jako średnią (stopień hamowania parazytemii wynosił odpowiednio 60 % i 50%). Także w przypadku hodowli zarażonych szczepami 18S RNA-C, skuteczność przeciwpirotocicznego suszu zawierającego kapsaicynę była niższa aniżeli w pierwszym z badanych układów. Przy stężeniu kapsaicyny 43 $\mu\text{g/ml}$ określano ją jako średnią (stopień hamowania parazytemii wynosił 50%), przy pozostałych rozcieńczeniach (zawartość kapsaicyny w suszu 4,3 $\mu\text{g/ml}$, 0,43 $\mu\text{g/ml}$ i 0,043 $\mu\text{g/ml}$) uznawano, że jest on nieaktywny (blokowanie parazytemii s stopniu zaledwie 30-40%).

Wartości IC₅₀ kapsaicyny w poszczególnych układach wynosiły: w hodowli zarażonej szczepami 18S-RNA-B 0,43 $\mu\text{g/ml}$, w hodowli zarażonej szczepami 18S-RNA-A 4,3 $\mu\text{g/ml}$, zaś w hodowli 18S-RNA-C 43 $\mu\text{g/ml}$.

Obserwacje własne pozwalają stwierdzić, iż poszczególne szczepy pierwotniaków *B. canis* izolowane od psów cechuje nie tylko różna zjadliwość, lecz również różna wrażliwość na kapsaicynę. Najmniej zjadliwy szczep 18S RNA-B wykazywał jednocześnie najwyższą wrażliwość na alkaloid, podczas, gdy szczep 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.

Dodatnia korelacja pomiędzy niską wartością IC₅₀ oraz brakiem występowaniem hemolizy w badanych układach wskazuje, że kapsaicyna jest substancją bezpieczną, nie uszkadzającą w warunkach *in vitro* krwinek czerwonych.

Obiecujące działanie przeciwpirotociczne wykazywane przez niektóre z rozcieńczeń kapsaicyny uzasadnia bardziej wnikliwe badania nad wyjaśnieniem sposobu działania tego alkaloidu oraz jego skutecznością *in vivo*.

8. SUMMARY

Canine babesiosis is a common and clinically significant tick-borne disease caused by hematozoan parasites of the genus *Babesia*. The classification of *Babesia spp.* places them in order *Piroplasmida* within the phylum *Apicomplexa*. The main etiological factor in Poland and other European country causing canine babesiosis is *B.canis*.

The first symptoms of babesiosis are non-specific. Infected animals suffer from fever, apathy, the decrease of appetite. Higher blood pressure and the increasing numbers of breath are also noticeable. In the longer term, pale mucous membrane, hemoglobinuria, vomiting and diarrhea can also occur. Hematology study generally concludes aneamia and thrombocytopenia

Considering problems incident to decreasing effectiveness of antiprotozoal agents as well as animals' not always positive drug tolerance, there is a necessity to conduct research on some new substances that could be used to combat the invasion of *Babesia*.

In recent years increasing interest in capsaicin contained in habanero peppers and its healing properties, concerning combat the antiprotozoa invasions on both human being and animals, were observed.

The purpose of conducted in vitro research was determining the antiprotozoal effectiveness of dried habanero peppers containing capsaicin in relation to *Babesia canis* parasites kept in dogs' erythrocytes culture. Since the recent observations indicate that dog's babesiosis is a disease of varied clinical courses which is still considered as a therapeutical problem.

The research was conducted in three groups of red cells cultures infected with *B. canis* 18S-RNA-A, 18S-RNA-B and 18S-RNA-C strains. Differentiation of parasites was based on the results of molecular tests (i.e. PCR and sequencing). Dried habanero peppers extract, consisting increasing dilution of capsaicin, was added to infected cultures. The antiprotozoal effectiveness of the extract was compared with imidocarb effectiveness, which served as a model.

The most successful effectiveness of dried habanero peppers was shown in relation to piroplasma 18S-RNA-B strain. The dilution of extract consisting capsaicin

at concentration 43 µg/ml and 4.3 µg/ml contained parasitemia adequately in 90% and 80%.

In the case of cultures infected with 18S-RNA-A strains, the antiprotozoal effectiveness of dried habanero peppers consisting capsaicin, was lower. At both concentrations, i.e. 43 µmg/ml and 4.3 µg/ml, it was stated as moderate, as the level of containment parasitemia totalled adequately 60% and 50%. The antiprotozoal effectiveness of dried habanero peppers was lower in cultures infected with 18S-RNA-C strains than in the first examined group. At the concentration of capsaicin 43 µg/ml was stated as moderate as the level of containment parasitemia totalled 50%. Considering the rest of concentrations, the content of capsaicin in dried habanero peppers was 4.3 µg/ml, 0.43 µg/ml and 0.043 µg/ml, it was considered not to be activated as the level of containment parasitemia was between 30% to 40%.

Considering several research groups the IC50 values of capsaicin were as follows. The cultured infected with 18S-RNA-B strains totalled 0.43 µg/ml, another one infected with 18S-RNA-A strains reached 4.3 µg/ml and the last researched culture infected with 18S-RNA-C equalled 43 µg/ml.

It may be stated, based on own observations, that particular strains of *B. canis*, isolated from dogs are featured not only by its virulence] but also different sensitivity to capsaicin. The least malignant strain i.e. 18S-RNA-B showed the highest sensitivity to alkaloid at the same time. In comparison with 18S-RNA-B strain, responsible for progression of acute babesiosis 18S-RNA-B strains as well as responsible for progression of chronic and subclinical babesiosis 18S-RNA-C strains. Both seem to be more resistant to the effect of the mentioned substance.

A positive correlation between low value of IC50 and nonoccurrence of hemocytolysis regarding researched groups shows that capsaicin is a safe substance that does not damage red cells in vitro.

Promising antiprotozoal effect shown in some of dilution of capsaicin proves profound research aiming at finding an explanation of its effect as well as its effectiveness in vitro.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data31.03.2023.....

Podpis promotoraJuliana Idun.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów~~/~~Promotora pomocniczego~~* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data30.03.2023.....

Podpis autoraPiotr Sawicki.....

* niepotrzebne skreślić