



**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk**

Zakład Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Kompanowska-Jeziarska – Kierownik

Tel: (48 22) 608 66 21

Fax: (48 22) 668 55 32

e-mail: renal@imdik.pan.pl

Warszawa, 04.02.2022 r.

dr hab. n. med. Leszek Dobrowolski

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Piotra Konopelskiego pt.

**Wpływ kwasu indolo-3-propionowego, bakteryjnego metabolitu tryptofanu, na równowagę energetyczną, wodno-elektrolitową oraz ciśnienie tętnicze u szczurów,**

wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej, Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

W ostatnich latach coraz więcej badań naukowych skupia się na wykazaniu roli metabolitów bakterii zasiedlających układ pokarmowy ssaków w regulacji homeostazy ustroju, dotyczy to również bakteryjnych metabolitów tryptofanu. Ten egzogeny aminokwas ulega licznym przekształceniom w ustroju, w następstwie których powstaje wiele metabolitów zarówno endogennych jak i produktów metabolizmu jelitowej flory bakteryjnej. Dotychczas wykazywano, że bakteryjne metabolity tryptofanu, m.in. indol, siarczan indoksyli, skatol, kwas indolo-3-octowy, kwas indolo-3-propionowy wpływają bezpośrednio na procesy zachodzące w jelitach, np. na szczelność bariery jelito-krew, ale także na te ogólnoustrojowe zaangażowane w regulację układu krążenia, czy też energetyczną organizmu gospodarza mikrobioty jelitowej. Wiedza na temat roli poszczególnych metabolitów, mechanizmów ich działania w poszczególnych procesach jest nadal niewielka. Patrząc perspektywicznie, manipulacja składem bakterii jelitowych (mikrobioty jelitowej), a tym samym poziomem metabolitów tryptofanu, może się stać narzędziem w leczeniu wielu chorób, takich jak nadciśnienie czy otyłość. Dlatego też badania w tym obszarze należy uznać za ważne dla rozwoju nauk medycznych.

02-106 Warszawa  
ul. A. Pawińskiego 5  
Tel.: (0-22) 668 52 50  
Fax: (0-22) 668 55 32  
[www.imdik.pan.pl](http://www.imdik.pan.pl)

Mikrobiota jelitowa i wpływ jej metabolitów na ciśnienie tętnicze krwi (BP, *blood pressure*) stanowi od wielu lat obszar zainteresowań zespołu, w którym doktorant prowadził swoje badania. W przedstawionej do oceny dysertacji doktorant chciał zbadać, jak jeden z bakteryjnych metabolitów tryptofanu, kwas indolo-3-propionowy (IPA), wpływa na równowagę energetyczną, wodno-elektrolitową oraz ciśnienie tętnicze w modelu zwierzęcym.

Celem pracy doktorskiej było ustalenie wpływu IPA na bilans energetyczny, BP u szczurów, zbadanie mechanizmów związanych z oddziaływaniem tego związku na układ krążenia; ponadto dostarczenie nowych danych na temat fizjologicznych stężeń metabolitów tryptofanu we krwi i jelicie grubym. Jednocześnie próbowano ustalić czy efekty IPA na BP mogą być związane z działaniem kardi toksycznym. Postawiony cel pracy doktorskiej uważam za ważny naukowo i zdecydowanie wart realizacji.

Do badań dotyczących efektów metabolitów mikrobioty jelitowej na organizm gospodarza powinno się dobierać zwierzęta głównie ze względu na objętość jelita grubego, zwłaszcza jego proporcję do całego przewodu pokarmowego. U szczurów wynosi ona 61%, dlatego też wydają się one dobrze dobranym przez doktoranta modelem do tego typu badań.

Rozprawa doktorska obejmuje łącznie 101 stron w tym m.in. wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, zestawienie publikacji stanowiących pracę doktorską ich krótkie omówienie, podsumowanie wyników i wnioski oraz oświadczenia współautorów publikacji.

Forma przedstawienia rozprawy doktorskiej jest zgodna z ustawą oraz regulacjami WUM dotyczącymi nadawania stopni naukowych i nie może budzić zastrzeżeń. Trzon dysertacji stanowią dwa artykuły oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Wcześniej opublikowanie wyników pracy doktorskiej jest pewną formą weryfikacji jej poziomu naukowego. Podczas oceny całości należy jednak wziąć pod uwagę, że każda z publikacji była oceniana jako dzieło osobne, a nie cykl, czy choćby element cyklu. Niemniej, dysertacja w formie już wydrukowanych publikacji jest bardzo wartościowa i zasługuje na uznanie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. P. Konopelskiego to zbiór trzech prac opublikowanych między marcem 2018 r. a listopadem 2021 r. w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i łącznym współczynniku oddziaływania (IF, *impact factor*) powyżej 10. Cykl publikacji został ułożony chronologicznie i otwiera go praca przeglądowa:

1. Konopelski, P., Ufnal, M. Indoles-gut bacteria metabolites of tryptophan with pharmacotherapeutic potential. *Current Drug Metabolism*, 2018; 19(10): 883-890.  
DOI: 10.2174/1389200219666180427164731;

Dwie kolejne to wspomniane oryginalne prace doświadczalne:

2. Konopelski, P., Konop, M., Gawryś-Kopczyńska, M., Podsadni, P., Szczepanska, A., Ufnal, M. Indole-3-propionic acid, a tryptophan-derived bacterial metabolite, reduces weight gain in rats. *Nutrients*, 11(3), 591, (2019).

DOI: 10.3390/nu11030591

3. Konopelski, P., Chabowski, D., Aleksandrowicz, M., Koźniewska, E., Podsadni, P., Szczepańska, A., Ufnal, M. Indole-3-propionic acid, a tryptophan-derived bacterial metabolite, increases blood pressure via cardiac and vascular mechanisms in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2021. (Artykuł przyjęty do druku w czasie składania rozprawy do oceny).

DOI: 10.1152/ajpregu.00142.2021

Zbiór zawiera prace wieloautorskie (od jednego do sześciu współautorów) z afiliacjami łącznie trzech warszawskich ośrodków badawczych. We wszystkich publikacjach doktorant jest pierwszym autorem, a promotor autorem korespondencyjnym. Z dołączonych do dysertacji odpowiednich oświadczeń współautorów wynika, że rola doktoranta w prowadzonych badaniach, opracowaniu wyników i przygotowania manuskryptów była znacząca i wynosiła co najmniej 55%. Jego indywidualny wkład został jasno określony i polegał na: opracowaniu koncepcji, metodologii badań, formułowaniu wniosków, pracach analitycznych, przeprowadzeniu badań u narkotyzowanych zwierząt oraz na hodowlach komórkowych, przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników z tych badań, wykonaniu większości rycin zawartych w tych publikacjach. W przypadku pracy przeglądowej to także krytyczna ocena omawianej literatury naukowej. Przedstawiona przez lek. Piotra Konopelskiego rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne, także wymagania w zakresie możliwości ustalenia indywidualnego wkładu Doktoranta w składające się na nią publikacje.

Rozprawa doktorska w formie zbioru publikacji to dowód na przygotowanie doktoranta do dalszej samodzielnej pracy naukowej. Opublikowanie wyników swoich prac eksperymentalnych wymagało od doktoranta przejścia przez kolejne etapy związane z pracą naukową: począwszy od opracowania koncepcji projektu badań, aż do przygotowania otrzymanych wyników pracy doświadczalnej i laboratoryjnej do publikacji, jak również wymagało nabycia umiejętności współpracy z innymi badaczami.

Pierwszą w zbiorze jest praca opublikowana w styczniu 2018 r., (IF 2,277), w której dokonano przeglądu dotychczasowych wyników badań zarówno na modelach zwierzęcych, jak i u ludzi dotyczących udziału metabolitów tryptofanu mikrobioty jelitowej, przede wszystkim indoli, w etiologii chorób sercowo-naczyniowych i metabolicznych. Ponieważ od czasu powstania tej pracy przeglądowej upłynęły cztery lata, ciekaw jestem czy pojawiły się nowe publikacje, dotyczące roli IPA w regulacji krążenia, które mogłyby być pomocne w interpretacji wyników doktoratu. Oczekuję, że zostaną one przytoczone przez Doktoranta w dyskusji wyników podczas obrony.

Dwie kolejne prace w zestawie (IF 4,546; 3,619) dotyczą wpływu IPA na gospodarkę energetyczną, wodno-elektrolitową oraz ciśnienie tętnicze u szczurów.

Każda publikacja poświęcona jest badaniu innego aspektu działania metabolitów tryptofanu, a przede wszystkim IPA na organizm gospodarza. Doktorant wykazał, że jelito grube jest najważniejszym miejscem oddziaływania tych metabolitów, skąd mogą szybko przenikać przez barierę jelito-krew i docierać do organów odpowiedzialnych za ww. regulację metabolizmu czy też ciśnienia tętniczego. U szczurów Sprague Dawley (w pierwszej z prac) wykazano, że dwukrotne zwiększenie stężenia IPA we krwi obwodowej, w następstwie tygodniowej suplementacji tym metabolitem, wywołało znaczące obniżenie przyrostu masy ciała, bez istotnego wpływu na ilość przyjmowanego pokarmu oraz bilans wodno-elektrolitowy.

Z kolei w w drugiej pracy, biorąc pod uwagę podobieństwo efektów metabolicznych tryptofanu oraz IPA Doktorant postanowił ocenić, czy ten metabolit będzie wywierał zbieźny z tryptofanem wpływ na układ krążenia. Tym razem badania przeprowadzono u szczurów normotensyjnych szczepu Wistar Kyoto (WKY). Wykazano u narkotyzowanych zwierząt hipertensyjny efekt dożylniej infuzji IPA, a najwyższy wzrost BP obserwowano przy zastosowaniu dawki podwyższającej około siedmiokrotnie stężenie tego metabolitu we krwi. Wyniki badań *in vivo* i *ex vivo* dotyczących mechanizmów efektu hipertensyjnego IPA wskazują, że mechanizm tego efektu może być złożony. Wykazano, że w tym działaniu IPA na BP pośredniczył układ współczulny i było ono związane ze wzrostem kurczliwości mięśnia sercowego oraz naczyń krwionośnych, które było zapewne efektem działania metabolitu tryptofanu na mięśniówkę gładką naczyń oraz hamowaniem działania naczyniorozszerzających czynników uwalnianych z endotelium.

Co ważne w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych badanego metabolitu tryptofanu, nie stwierdzono jego działania kardi toksycznego, nawet w stężeniu tysięcy krotnie wyższym od normalnego. Reasumując, wyniki badań przedstawione w dysertacji dostarczają poważnych argumentów do celowości kontynuowania badań nad długoterminowymi efektami działania IPA oraz potencjałem farmakoterapeutycznym modyfikacji jego stężenia w płynach ustrojowych.

Opisane wyżej wyniki prac składających się na niniejszą rozprawę zostały wcześniej recenzowane i opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach. To zwalnia mnie z obowiązku szczegółowego recenzowania założeń prac, poprawności ich metodyki oraz uzyskanych wyników i sposobu ich interpretacji. Mogę natomiast stwierdzić jednoznacznie, że badania zostały przeprowadzone bardzo rzetelnie i poprawnie.

Skorzystam z okazji i zaznaczę, że forma klasyczna pracy doktorskiej wymaga od autora dogłębnej analizy porównawczej otrzymanych wyników i ich dyskusję, czego brakuje przy formie „spinki” wcześniej opublikowanych prac. Mam kilka komentarzy i pytań:

-) Nie zostało wyjaśnione, dlaczego Doktorant zdecydował się na badania z użyciem różnych szczepów szczurów. W publikacji nr 2 wykorzystano szczury szczepu Sprague Dawley, a w kolejnej ze szczepu WKY. Być może różnice w stężeniach IPA we krwi niezbędne do wywołania zwiększenia ciśnienia tętniczego lub zmniejszenia przyrostu masy ciała, czy też

zmian gospodarki wodno-elektrolitowej wynikają z różnic między szczepami szczurów w ich wrażliwości na metabolit tryptofanu?

-) Dlaczego zdecydowano się na podawanie IPA dożylnie (i.v.), a nie dookreźniczo (i.c.), z okolic gdzie w warunkach naturalnych powstaje badany metabolit tryptofanu i tam jest wchłaniany?

-) Uważam, że rycina podsumowująca efekty i mechanizmy działania kwasu 3 indolo-propionowego na podstawie wyników uzyskanych w pracach oryginalnych wzbogaciłaby dysertację.

-) Ostatni wniosek „Modyfikacja stężenia IPA w organizmie gospodarza może stanowić punkt uchwytu dla farmakoterapii otyłości oraz nadciśnienia tętniczego” jest wnioskiem chyba niezbyt zręcznie sformułowanym. Punkt uchwytu działania leku jest to miejsce, a więc tkanka lub narząd, w których lek wywiera swoje działanie główne. Autor nie wskazał, o które miejsca w organizmie chodzi. Na pewno uzyskane wyniki wskazują na celowość prób ustalenia schematów leczenia z wykorzystaniem korygowania we krwi stężenia pochodzącego z metabolizmu bakterii jelitowych IPA; można oczekiwać, że takie modyfikacje w znaczący sposób winny poprawić efektywność terapii otyłości oraz nadciśnienia tętniczego.

Na koniec uwagi redakcyjne. „Wykaz stosowanych skrótów” – zawiera praktycznie dwa skróty IPA i LDH oraz niepotrzebnie kilka powszechnie stosowanych skrótów, jak m.in. - dla między innymi, bądź, notabene, w ogóle nieużywany w tekście ok. - dla około. Przy okazji, chociaż autor wprowadził skrót IPA, używał go na przemian z pełną nazwą, tak więc można było „Wykaz ...” po prostu pominąć.

Podsumowując, Doktorant uzyskał wiele wyników, które poszerzają naszą wiedzę i przybliżają do zrozumienia roli metabolitów mikrobioty jelitowej oraz mechanizmów ich działania w regulacji bilansu energetycznego i układu krążenia. Przedstawiona rozprawa zawiera zbiór dobrze przemyślanych, spójnych tematycznie publikacji, przyczyniających się do lepszego poznania omawianej tematyki, stanowią one cenne uzupełnienie dostępnej literatury naukowej. Moje krytyczne komentarze nie umniejszają wartości otrzymanych wyników, lecz powinny stanowić podstawę do dyskusji.

Przedstawiony mi materiał spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Doktorant wykazał się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania publikacji naukowej oraz nabył szereg umiejętności niezbędnych do pracy ze zwierzętami będącymi w narkozie, poddanymi zabiegom chirurgicznym. Ponadto, co równie ważne w działalności naukowej, doktorant wykazał się umiejętnością pracy w wieloosobowym, wielośrodkowym zespole badawczym.

Reasumując, **przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek. Piotra Konopelskiego poświęcona problemowi niezwykle istotnemu zarówno z poznawczego, jak też praktycznego punktu widzenia spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ( Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z**

**dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.).**

Przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Piotra Konopelskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej. Zebrane w niej prace mają wysoki poziom merytoryczny i wnoszą wiele nowych informacji rozszerzających naszą wiedzę na temat mechanizmów działania metabolitów mikrobioty jelitowej na układ krążenia. O wartości zbioru publikacji składających się na dysertację lek. Piotra Konopelskiego świadczą dodatkowo wysokie sumy zarówno wskaźników oddziaływania ( $IF = 10,4$ ) oraz punktów wg MNiE (łącznie 250), które przewyższają znacznie wymogi dla prac doktorskich.



---

dr hab. Leszek Dobrowolski