

Warszawa, 18 lipca 2024 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Artura Nowińskiego pt.****„Wpływ metabolitów bakterii jelitowych na regulację ciśnienia tętniczego”**

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

Rozprawa doktorska obejmuje 60 stron poprzedzonych spisem treści, spisem rycin i tabel, wykazem skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Układ jest typowy dla prac doświadczalnych, posiada 7 podstawowych części; wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski (a właściwie podsumowanie wyników i wnioski) oraz spis piśmiennictwa (138 pozycji). Zawiera 14 rycin, z których ta umieszczona na początku wstępu w syntetyczny sposób przybliży czytelnikowi najważniejsze mechanizmy związane z potencjalnym udziałem metabolitów bakterii jelitowych w regulacji układu sercowo-naczyniowego.

Wpływ metabolitów mikrobioty jelitowej na ciśnienie tętnicze krwi stanowi od wielu lat obszar zainteresowań zespołu, w którym doktorant prowadził swoje badania. W przedstawionej do oceny dysertacji doktorant podjął się zbadania znaczenia jednego spośród drugorzędowych kwasów żółciowych (KŻ), które w odróżnieniu od kwasów pierwszorzędowych pochodzą od bakterii jelitowych, w regulacji krążenia ustrojowego. Przedmiotem zainteresowania doktoranta był wpływ kwasu dezoksycholowego (DCA, ang. deoxycholic acid) na hemodynamikę ogólnoustrojową u szczurów, zbadanie mechanizmów związanych z oddziaływaniem DCA na układ krążenia; ponadto dostarczenie nowych danych na temat fizjologicznych stężeń kwasu dezoksycholowego we krwi oraz ocena tempa usuwania tego kwasu z osocza. Jednocześnie próbowano ustalić czy efekty tego kwasu na hemodynamikę ogólnoustrojową, przede wszystkim ciśnienie tętnicze, mogą być związane z wpływem na funkcje serca.

Znaczenie badań podjętych przez doktoranta jest bardzo ważne, ponieważ długotrwałe podwyższone ciśnienie tętnicze (nadciśnienie) jest schorzeniem o charakterze społecznym obejmującym dużą część populacji. Jest ono także jednym z podstawowych czynników ryzyka rozwoju zmian patologicznych w układzie sercowo-naczyniowym, a także przewlekłej choroby nerek. Dlatego celem leczenia jest nie tylko redukcja wartości ciśnienia tętniczego, ale również zapobieganie rozwojowi powikłań w obrębie serca, czy też naczyń mózgu oraz nerek, co zwiększa szanse na wydłużenie życia oraz poprawę jego jakości. Wobec tego podjęcie przez doktoranta badań, które mogą rozszerzyć naszą wiedzę o wpływie metabolitów bakterii jelitowych na ciśnienie tętnicze krwi oraz funkcjonowanie serca, należy uznać za w pełni uzasadnione.

Hipoteza badawcza zakładała, że DCA, który jest wytwarzany przez bakterie jelitowe, wywiera istotny wpływ na ciśnienie tętnicze i pracę serca u szczurów, a głównym celem było ustalenie efektów DCA na hemodynamikę ustrojową po podaniu obwodowym (dożylnym) i ośrodkowym (do komory bocznej mózgu). Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ustalenie fizjologicznego stężenia DCA i wpływu antybiotyków na jego produkcję oraz ustalenie tempa zmian stężenia kwasu w osoczu po podaniu dożylnym.
2. Zbadanie mechanizmów odpowiedzialnych za efekty hemodynamiczne DCA po podaniu obwodowym.
3. Ustalenie wpływu DCA na ośrodkową regulację układu krążenia – po podaniu ośrodkowym.

W badaniach dotyczących metabolitów bakteryjnych zwierzęta dobiera się 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. Może należałoby to uwzględnić w tytule dysertacji, z którego nie wynika, że badania dotyczą tylko modelu zwierzęcego. Tytuł jest dość ogólny i dopiero po przeczytaniu streszczenia zostajemy poinformowani, że chodzi o jeden konkretny metabolit bakteryjny.

We **Wstępie** autor na początku przypomniał najważniejsze mechanizmy związane z potencjalnym udziałem metabolitów bakterii jelitowych w regulacji układu sercowo-naczyniowego. Omówił działanie bariery jelito-krew (BJ-K), szlaki transportu między światłem jelit, a naczyniami krwionośnymi. Jednakże nie wspominał o równie ważnej jak transport paracelularny, przezkomórkowej endocytozie. Z fizjologicznego punktu widzenia, to dwa istotne szlaki BJ-K w kontekście zaburzenia jej integralności, tzw. „nieszczelnego jelita” (ang. leaky gut). A jak pisze sam autor, zmiany przepuszczalności BJ-K mogą być markerem dla chorób sercowo-naczyniowych (ChSN), takich jak miażdżyca, czy niewydolność serca. Proszę o wyjaśnienie, co skłoniło autora do pominięcia tego szlaku w opisie funkcjonowania BJ-K?

Następnie doktorant omówił udział, zarówno pozytywny, jak i negatywny, różnych metabolitów bakterii jelitowych (mikrobioty) w patogenezie ChSN. Na końcu rozdziału przedstawił aktualny stan wiedzy na temat metabolizmu KŻ i ich udziału w regulacji homeostazy ustrojowej, układu sercowo-naczyniowego. Podsumowując, wiedza na temat roli poszczególnych metabolitów, mechanizmów ich działania w poszczególnych procesach jest nadal niewielka, to otwiera przestrzeń do prowadzenia kolejnych badań mających na celu poszerzenie stanu wiedzy o roli KŻ w patogenezie ChSN.

W rozdziale **Metodyka** przedstawiono w sposób jasny i wystarczająco dokładny przebieg eksperymentów oraz metodykę przeprowadzonych badań. Ze względu na dużą liczbę serii eksperymentalnych Tabela 3 („Podsumowanie serii eksperymentalnych – wstrzyknięcia DCA in vivo”) stanowi duże ułatwienie w śledzeniu uzyskanych przez doktoranta wyników. Zwraca uwagę fakt, że w doświadczeniach z wykorzystaniem zwierząt autor sięgnął po metody pomiarowe inwazyjne wymagające dobrego opanowania chirurgii małych zwierząt.

Do tej części pracy nasuwają się następujące uwagi:

- w podrozdziale „Zwierzęta” nie zamieszczono konkretnych informacji odnośnie paszy, którą były karmione zwierzęta. Należałoby podać, czy była to pasza hodowlana czy bytowa, nazwę producenta i składu paszy, choćby w odniesieniu do zawartości w niej sodu;
- brakuje wyjaśnienia dlaczego do badań użyto szczurów Sprague-Dawley, chociaż na podstawie załączonego zezwolenia komisji etycznej wynika, że wnioskowano o wykorzystanie w badaniach szczurów Wistar Kyoto;
- w podrozdziale „Wpływ antybiotykoterapii na stężenie DCA w osoczu” nie podano, czy próbki krwi pobierano po wcześniejszym (jak długim okresie) odstawieniu paszy? W praktyce klinicznej krew w takim badaniu pobiera się od pacjentów na czczo.

**Wyniki** uzyskane podczas przeprowadzonych badań przedstawiono w rozdziale 4. na 15 stronach, w tym 11 rycinach i dwóch tabelach. Rozdział jest napisany w sposób przemyślany. Opis wyników jest rzeczowy i przejrzysty.

Do najważniejszych osiągnięć pracy należy wykazanie, że zarówno zakres i trwałość zwiększenia ciśnienia tętniczego krwi (BP) po dożylnym podaniu DCA były zależne od zastosowanej dawki (Fig. 2). Efekt hipertensyjny, jego wielkość i czas trwania narastały wraz ze zwiększeniem podawanej dawki DCA, po podaniu największej dawki (36 mmol/kg masy ciała) wzrost BP był najwyższy i utrzymywał się do końca obserwacji (90 min od podania DCA), podczas gdy efekt hipertensyjny niższych dawek 12 i 4 mmol/kg był proporcjonalnie mniejszy i krótszy (odpowiednio po 30 i 10 min BP nie różniło się od wartości wyjściowych). To samo dotyczyło wpływu DCA na HR (częstość skurczów serca). Zmiany BP i HR korelowały z dynamiką stężenia DCA w osoczu. Nawet 90 min po podaniu największej dawki DCA, stężenie kwasu w osoczu było nadal znacząco wyższe od wartości wyjściowej (podobnie jak BP i HR), podczas gdy po dawce najmniejszej już po 30 min było podobne do wartości wyjściowej. Wyniki te wskazują wyraźnie na zależność efektu hemodynamicznego DCA od jego stężenia we krwi.

Z kolei w badaniu echokardiograficznym wykazano, że dożylnie podane DCA powodowało zwiększenie pojemności minutowej serca bez istotnego wpływu na systemowy opór naczyniowy. Nawiązując do opisywanych powyżej obserwacji, można przypuszczać, że wzrost ciśnienia tętniczego był zależny od zwiększonej pojemności minutowej serca.

Zgodnie z oczekiwaniami zastosowana w badaniach antybiotykoterapia obniżyła stężenie DCA w osoczu poniżej czułości zastosowanej metody, co potwierdziło, że endogennym źródłem kwasu w organizmie jest mikrobiota jelitowa. Do badań efektów metabolitów bakterii jelitowych często stosuje się podawanie interesującej badacza substancji do okrzężnicy, w ten sposób zwieszając jej stężenie w jelitach, oczekując następnie wzrostu w osoczu. Oczywiście zakłada się, że samo zwiększenie stężenia w okrzężnicy będzie czynnikiem wystarczającym, by więcej metabolitu przeszło do krwioobiegu. Proszę o wyjaśnienie dlaczego autor w swojej pracy nie wykorzystał tej metody podawania DCA?

W badaniach nad poszukiwaniem mechanizmów efektów hipertensyjnych DCA ustalono, że efekt dożylnego podania tego KŻ nie był zależny od pobudzenia receptorów alfa i beta adrenergicznych, muskarynowych, farnesoid X (FXR), aktywności kanałów potasowych zależnych od ATP (K-ATP), czy też dehydrogenazy 11-hydroksysteroidowej typu 2 (11HSD2) wpływającej na metabolizm kortyzolu. Brak zmniejszenia odpowiedzi presyjnej wywoływanej przez DCA po zastosowaniu odpowiednich antagonistów i inhibitorów sugeruje, że za obserwowane efekty odpowiedzialne są inne mechanizmy. Podczas dyskusji doktorant wysuwa przypuszczenie, że być może są one związane ze specyficznymi receptorami dla DCA, których dotychczas nie zidentyfikowano. Ciekawe jaki typ receptorów miał doktorant na myśli, i np. gdzie wg doktoranta mogłyby być zlokalizowane. Należy jednak zauważyć, że chociaż liczba badanych przez autora potencjalnych mechanizmów była duża, to jednak nie objęła wszystkich znanych wpływających na układ krążenia. Chciałby zmiany aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron, czy też tlenu azotu.

Natomiast w badaniach z zastosowaniem podawania dokomorowego DCA nie udało się wykazać wpływu tego kwasu na ośrodkową regulację układu krążenia. Nie stwierdzono, by brak efektów DCA zależał od aktywności receptorów FXR oraz dehydrogenazy 11HSD2. Chciałbym, by doktorant rozwiął moje wątpliwości dotyczące celowości badania roli FXR, o którym wiadomo, że jego największą



ekspresję wykazywano w wątrobie. Co prawda jego naturalnymi ligandami są KŻ, ale najważniejszą funkcją tego receptora podczas jego aktywacji jest supresja syntezy KŻ z cholesterolu, przez działanie na enzym cholesterol 7-alfa hydroksylazę (CYP7A1). Czy w piśmiennictwie są dane wskazujące na inne efekty aktywacji FXR przez KŻ (być może specyficzne dla OUN)?

Do tej części rozprawy nasuwają się następujące uwagi:

- brakuje ryciny z wynikami dotyczącymi podawania DCA na tle glibenklamidu. Autor tylko wspomina, że uzyskane przez niego wyniki nie wskazywały, by po podaniu inhibitora K-ATP efekt dożylnego podania DCA był hamowany i konsekwentnie nie odsyła do żadnej ryciny;
- w podrozdziale „Wpływ antybiotykoterapii na stężenie DCA w osoczu” nie zamieszczono konkretnych informacji - jaka była czułość metody i jak była obliczona znamienność statystyczna między grupami, skoro w jednej grupie wartości nie różniły się od tła („szumów”) były poniżej wartości minimalnych możliwych do uzyskania zastosowaną metodą pomiarową;
- przydatne byłoby zamieszczenie ryciny syntetyzującej uzyskane wyniki, rodzaj graficznego podsumowania uzyskanych wyników ułatwiłoby czytelnikowi podążanie za wywodami autora w następnym rozdziale, wyrobienie sobie opinii o poglądzie autora na temat przyczyn efektów hipertensyjnych DCA *in vivo*, wobec bezpośredniego efektu naczyniorozszerzającego, wynikającego z badań *ex vivo* na tętnicy krezkowej oraz braku wpływu zabiegu podawania KŻ dokomorowo na efekty hemodynamiczne.

W **Dyskusji**, rozdział 5. rozprawy, autor z należyтым krytycyzmem omawia własne wyniki w odniesieniu do danych z aktualnego piśmiennictwa wykazuje się w tym rozdziale, podobnie jak we wstępie, znajomością problematyki, której dotyczy praca oraz odpowiednią znajomością literatury z tego zakresu. Ten fragment pracy świadczy o zdolności autora do odpowiedniego wykorzystania posiadanej wiedzy w celu budowania własnych hipotez.

Po dyskusji następuje kolejny rozdział pt. **Wnioski**. Na stronie 64 doktorant zawarł zarówno krótkie podsumowanie wyników badań (co nie zostało jednak wyróżnione w tytule rozdziału), jak też wnioski, co wg opinii wielu recenzentów nie jest zbyt dobrym zabiegiem. Podsumowanie powinno zawierać prezentację własnych wyników w skondensowanej formie. Natomiast wnioski to możliwość poczynienia pewnych uogólnień opartych na własnych wynikach.

Podsumowując, wyniki przedstawionych przez doktoranta badań poszerzają wiedzę i przybliżają nas do zrozumienia roli metabolitów mikroflory jelitowej w regulacji układu krążenia. Stanowią silną przesłankę do kontynuowania badań nad DCA, aby ocenić długoterminowe efekty działania tego kwasu żółciowego, mechanizmy działania oraz potencjał farmakoterapeutyczny modyfikacji jego stężenia w płynach ustrojowych. Należy się spodziewać, że korygowanie we krwi stężenia pochodzącego z metabolizmu bakterii jelitowych DCA mogłoby w znaczący sposób poprawić efektywność terapii nadciśnienia tętniczego. Dlatego też badania w tym obszarze należy uznać za ważne dla rozwoju nauk medycznych.

**Wykaz Piśmiennictwa** zamykający rozprawę obejmuje 138 odpowiednio dobranych anglojęzycznych pozycji, w tym, co warto podkreślić, dwa artykuły, których współautorem jest doktorant.

**Uwagi końcowe.** Wskazane byłoby wykazanie przez autora rozprawy większej staranności o językową i redakcyjną stronę pracy. Ograniczę się tylko do kilku przykładów. Np. w wykazie używanych skrótów (str. 8) przytoczone skróty pochodzą z języka angielskiego i są przetłumaczone na j. polski z wyjątkiem kilku: MACE, NLRP3, SHR i SHRSP. To samo dotyczy legendy do tabeli 2.

Natomiast we „Wstępie” w podrozdziale o siarkowodorze, historycznym rysie badań nad zastosowaniem siarkowodoru w terapii, brak jest informacji o dacie wydania książki *De Morbis ....*, co osłabia historyczny wydźwięk tej części podrozdziału.

W rozdziale „Wyniki”:

- jednostki dla HR są na rycinach podane w sposób niejednorodny, raz z j. angielskiego „bpm”, innym razem po polsku „uderzeń/min”, chociaż czytelniej byłoby np. „liczba uderzeń/min” lub „liczba skurczów/min”;

- Ryc. 9 – rozbieżność między dawką DCA w tytule i legendzie (36 vs 12);

- Ryc. 10 osie rzędnych - to nie są zmiany parametrów, tylko wartości pomiarowe parametrów;

- Ryc. 12 i 13 – tytuły powinny być zmienione, obecne sugerują, że parametry hemodynamiczne po podaniu dokomorowym rozpuszczalnika (kontrola) będą ponownie umieszczone, chociaż pokazano je już wcześniej na Ryc.11 (str. 54);

Ryc. 14 - proszę wyjaśnić co to znaczy „...n tętnic”? (str. 57).

Powyższe krytyczne uwagi mają charakter porządkowy i nie zmniejszają oceny merytorycznej przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Powinny być pomocne dla doktoranta przy przygotowaniu manuskryptu do publikacji i wskazówką do wnikliwszej jego korekty redakcyjnej przed wystąpieniem do recenzji.

Reasumując, **przedłożona do oceny rozprawa doktorska lek. Artura Nowińskiego poświęcona problemowi niezwykle ważnemu 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 Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Artura Nowińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Leszek Dobrowolski