

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, 31.08.2020 r.

dr hab. n. med. Leszek Dobrowolski

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Maksymiliana Onyszkiewicza pt.

**Wpływ kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego
na regulację ciśnienia tętniczego**

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

Uważa się, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (KKT) jako produkty metabolizmu bakterii na wiele sposobów odpowiadają za utrzymanie homeostazy w organizmie człowieka. Powstają one w wyniku fermentacji niestrawionych polisacharydów - to główne, a jednocześnie końcowe, produkty metabolizmu bakterii bytujących w świetle jelita grubego. Tak więc manipulacja składem bakterii jelitowych (mikrobioty jelitowej), a tym samym poziomem KKT, może się stać narzędziem w leczeniu wielu chorób.

Dotychczas najwięcej badań dotyczyło roli KKT w regulacji prawidłowego funkcjonowania układu pokarmowego, czy też ich wpływu na układ odpornościowy gospodarza mikrobioty jelitowej. W ciągu ostatnich lat wzrosło zainteresowanie wpływem KKT na układ krążenia. Mikrobiota jelitowa i wpływ jej metabolitów 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 oceny znaczenia wybranych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, pochodzących od bakterii jelitowych w regulacji krążenia ustrojowego. Celem pracy doktorskiej było ustalenie wpływu kwasu masłowego (BA, ang. *butyric acid*) i kwasu walerianowego (VA, ang. *valeric acid*) na ciśnienie tętnicze (BP) u szczurów, zbadanie mechanizmów związanych z oddziaływaniem tych związków na układ krążenia; ponadto dostarczenie nowych danych na temat fizjologicznych stężeń kwasu masłowego i walerianowego w tkankach oraz ocena stopnia przenikania tych KKT przez barierę jelito-krew. Jednocześnie próbowano ustalić czy efekty tych kwasów na BP mogą być związane z działaniem kardiotoksycznym.

W badaniach dotyczących KKT 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.

Rozprawa doktorska obejmuje łącznie 75 stron w tym m.in. wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, zestawienie publikacji stanowiących pracę dokorską 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 stanowi spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w języku angielskim w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Taka forma rozprawy, w postaci zestawienia („spinki”) już wydrukowanych publikacji, nadal nie jest powszechna. Wcześniejsze opublikowanie wyników doktoratu jest pewną formą weryfikacji jego poziomu naukowego, jednakże przy ocenie całości należy też wziąć pod uwagę, że każda publikacja jest recenzowana przez czasopismo jako dzieło osobne, a nie zbiór, czy nawet element zbioru. Niemniej, dysertacja w formie już wydrukowanych publikacji jest bardzo wartościowa i zasługuje na uznanie.

Na marginesie. Ostatnio redakcje wielu czasopism zachęcają lub wręcz zmuszają do zamieszczania materiałów dodatkowych do zaakceptowanych do druku publikacji. Wobec tego może należałoby rozważyć czy recenzenci dysertacji nie powinni otrzymać także tych materiałów (np. w osobnym pliku, jako załącznik do dysertacji).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. M. Onyszkiewicza to zbiór opublikowanych między listopadem 2019 r. a marcem 2020 r. trzech prac w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF, *impact factor*), powyżej 3,000 - odpowiednio: 3,139; 3,158; 3,263 (zgodnie z informacją na stronie czasopisma w sierpniu br.), z których dwie to oryginalne prace doświadczalne.

Zbiór składa się z niżej wymienionych publikacji:

1. Onyszkiewicz, M. i wsp. Short chain fatty acids and methylamines produced by gut microbiota as mediators and markers in the circulatory system.
Experimental Biology and Medicine 2020; 245: 166-175.
DOI: 10.1177/1535370219900898
2. Onyszkiewicz, M. i wsp. Butyric acid, a gut bacteria metabolite, lowers arterial blood pressure via colon-vagus nerve signaling and GPR41/43 receptors.
Pflugers Archiv - European Journal of Physiology 2019; 471: 1441-1453.
DOI: 10.1007/s00424-019-02322-y
3. Onyszkiewicz, M. i wsp. Valeric acid lowers arterial blood pressure in rats.
European Journal of Pharmacology 2020; 877.
DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173086

Prace są wieloautorские (od trzech do ośmiu autorów) 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 50%. Jego indywidualny wkład został jasno określony i polegał na: opracowaniu koncepcji, metodologii badań, formułowaniu wniosków, pracach analitycznych, przeprowadzeniu badań u narkotyzowanych zwierząt oraz przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników z tych badań, wykonaniu większości rycin zawartych w tych publikacjach. Wszyscy autorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie tych prac w dysertacji doktorskiej lek. Maksymiliana Onyszkiewicza.

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 umiejętności współpracy z innymi badaczami.

Pierwszą w zbiorze jest praca opublikowana w styczniu 2020 r., (IF 3,139), w której dokonano przeglądu dotychczasowych wyników badań dotyczących metabolitów mikrobioty jelitowej, w tym niektórych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT), mogących wpływać na ustrojowy układ krążenia. Niestety nie wiadomo dlaczego nie uwzględniono w przeglądzie roli kwasu walerianowego i kapronowego. Ponieważ od czasu powstania tej pracy przeglądowej upłynął rok, ciekaw jestem czy pojawiły się nowe publikacje, dotyczące roli KKT w regulacji krążenia, które mogłyby być pomocne w interpretacji wyników doktoratu.

Kolejne dwie prace „spinki” (IF 3,158; 3,263) dotyczą roli dwóch wybranych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, masłowego i walerianowego. Każda publikacja poświęcona jest badaniu jednego związku. Doktorant wykazał, że jelito grube jest najważniejszym miejscem oddziaływania tych kwasów, skąd mogą szybko przenikać przez barierę jelito-krew i docierać do organów odpowiedzialnych za regulację ciśnienia tętniczego. Już dwu lub trzykrotne zwiększenie stężenia tych kwasów w okrzynicy wywołało znaczący efekt hipotensyjny za pośrednictwem receptorów GPR 41/43. W badaniach prowadzonych przez doktoranta użyto tylko nieselektywnego antagonisty dla tych receptorów, który ograniczał działanie hipotensyjne obu kwasów. (Dlatego też na podstawie uzyskanych wyników nie można było ustalić, który z tych receptorów ma większe lub domnujące znaczenie w efektach poszczególnych kwasów). Natomiast tylko w przypadku kwasu masłowego wykazano, że obniżenie BP może być również efektem wzmożonej impulsacji aferentnej z jelita za pośrednictwem nerwu błędnego. Co ważne w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych badanych KKT, nie stwierdzono by ich efekty hipotensyjne były związane z działaniem kardi toksycznym.

Z kolei w badaniach *ex vivo* wykazano, że oba KKT mogą działać bezpośrednio na naczynia obwodowe (badano tętnicę kreskową, MA i tętnicę wyizolowaną z mięśnia

smukłego, GMA). Interesujące, że mechanizm działania naczyniorozszerzającego każdego z badanych KKT był różny dla badanych naczyń. I tak np. rozkurcz naczyń za pośrednictwem GPR41/43 dla kwasu masłowego wykazano w GMA, a dla kwasu walerianowego w MA. Ciekawe, że mimo niewielkiej różnicy w budowie kwasy te indukują w tych samych naczyniach odmienne mechanizmy prowadzące do rozkurczu.

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.

Mam kilka komentarzy i pytań. To niewątpliwie solidny doktorat, ale skorzystam z okazji i zaznaczę, że wolalbym recenzować go w formie klasycznej, która wymaga od autora bardziej dogłębnej analizy porównawczej otrzymanych wyników i ich dyskusję. Doktorant badał efekt hipotensyjny i jego mechanizmy dla każdego z KKT osobno, a przecież w warunkach naturalnych powstają one jednocześnie, podlegają zjawisku „cross-feedingu” działają za pośrednictwem tych samych receptorów. Chodzi mi o zestawienie podobieństw i odmienności w działaniu dwóch różnych związków na te same procesy. Tym bardziej, że są to związki o bardzo podobnej budowie. Brakuje ryciny podsumowującej mechanizmy działania obu kwasów na BP, a są one różne. Jakim zdaniem doktoranta mogą być przyczyny różnic w dynamice działania obu KKT?

Zarówno zakres i trwałość obniżenia BP po podaniu kwasu masłowego dookreśniczo wydają się być dawkozależne (Pub. 2, Fig. 2), podczas gdy po podaniu dożylnie efekt hipotensyjny utrzymywał się najkrócej po iniekcji najwyższej dawki (Pub. 2, Fig. 1). Zupełnie inaczej niż w analogicznych badaniach z użyciem kwasu walerianowego. Czy mógłby doktorant, w świetle dostępnej literatury, wyjaśnić co mogło być przyczyną takiego efektu kwasu masłowego?

Na końcu publikacji 2. zamieszczono rycinę (Fig. 4), na której w sposób schematyczny przedstawiono potencjalne mechanizmy działania kwasu masłowego. Chociaż w pracy wykazano, że dookreśnicze podanie BA podnosi stężenie kwasu w żyłę wrotnej, to na schemacie nie zaznaczono potencjalnego udziału metabolitów wątrobowych.

Ponadto brakuje wyjaśnienia na jakiej podstawie doktorant przyjął założenie, że tlenek azotu może pośredniczyć w efektach KKT i dlatego badał tylko w odniesieniu do BA?

W końcu komentarz, który być może wynika z mojej niewiedzy. W publikacjach 2. i 3. autorzy uważają, że jednym z ograniczeń ich badań jest to, że nie przeprowadzili badań z użyciem antagonisty receptora Olfr78. Jednakże nie przytoczyli żadnej pozycji z piśmiennictwa wskazującej na to, że badane przez doktoranta KKT mogły potencjalnie wpływać na układ krążenia za pośrednictwem tych receptorów.

Podsumowując Doktorant uzyskał bardzo dużo wyników, które przybliżają nas do zrozumienia roli metabolitów mikrobioty jelitowej oraz mechanizmów ich działania w regulacji układu krążenia. Rozprawa zawiera zbiór dobrze przemyślanych, spójnych tematycznie publikacji, przyczyniających się do lepszego poznania omawianej tematyki,

będąc cennym uzupełnieniem dostępnej literatury naukowej. Moje krytyczne komentarze nie umniejszają wartości otrzymanych wyników, lecz powinny stanowić dobry przyczynek 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. Maksymiliana Onyszkiewicza poświęcona problemowi niezwykle istotnemu zarówno z poznawczego, jak też praktycznego punktu widzenia spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2018, poz. 1668).

Przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Maksymiliana Onyszkiewicza 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. Maksymiliana Onyszkiewicza świadczą wysokie sumy zarówno wskaźników oddziaływania ($IF > 9,5$) oraz punktów wg MNiSW (łącznie 200), które przewyższają znacznie wymogi dla prac doktorskich.

dr hab. Leszek Dobrowolski