

Gdańsk, 31 sierpnia 2020 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lek. Maksymiliana Marka Onyszkiewicza w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pt. „Wpływ kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego na regulację ciśnienia tętniczego”.

Badania eksperymentalne i kliniczne ostatnich lat wskazują na coraz większy wpływ mikroflory jelitowej i metabolitów bakterii jelitowych na regulację układu krążenia, w konsekwencji ich udział w patogenezie chorób układu krążenia. Bakterie jelitowe bytujące w jelitach metabolizują składniki pokarmowe i wytwarzają szereg związków chemicznych, które przekraczają barierę jelito-krew i przedostają się do krążenia ustrojowego. Należy pogratulować i podkreślić, że Zespół Profesora Marcina Ufnala w znacznym stopniu przyczynił się do światowego postępu naukowego w zakresie badań nad metabolitami bakterii jelitowych i ich związku z regulacją ciśnienia tętniczego i powikłań narządowych, o czym świadczy rosnąca liczba publikacji Zespołu Profesora Ufnala w tej dziedzinie w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Rola krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w regulacji ciśnienia tętniczego takich jak kwas masłowy i kwas walerianowy, które powstają w jelicie grubym podczas bakteryjnej fermentacji błonnika pokarmowego jest nieznana. Istnieją pojedyncze doniesienia naukowe o wpływie kwasu masłowego na układ krążenia, jednakże nie ma żadnych badań dotyczących wpływu kwasu walerianowego pochodzącego od bakterii jelitowych na funkcję układu krążenia. Mechanizm działania obu związków na układ sercowo-naczyniowy jest nieznany.

Pomimo postępu w zakresie metod profilaktycznych i terapeutycznych, nadciśnienie tętnicze stanowi istotny problem epidemiologiczny na świecie, należy do chorób cywilizacyjnych, i pozostaje główną przyczyną przedwczesnej chorobowości i śmiertelności z powodu chorób układu krążenia. Stąd też celem, m.in. WHO we współpracy z międzynarodowymi organizacjami (tj. Resolve to Save Lives, CDC, Lancet Commission on

Hypertension, inne) jest zmniejszenie przedwczesnych zgonów z powodu chorób układu krążenia o 1/3 do 2030 roku, m. in. poprzez metody profilaktyczne (prewencję) i poprawę skuteczności leczenia nadciśnienia tętniczego. Zatem poznanie nowych mechanizmów wpływających na regulację ciśnienia tętniczego, np. związków chemicznych wytwarzanych poprzez bakterie jelitowe, będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej, może mieć istotne implikacje kliniczne na rozwój nowych kierunków badań nad nadciśnieniem tętniczym.

W swojej rozprawie doktorskiej lek. Maksymilian Marek Onyszkiewicz podjął się zbadania nowatorskiego i dotychczas nieznanego zagadnienia, którego celem była ocena wpływu kwasu masłowego i kwasu walerianowego na regulację ciśnienia tętniczego oraz zbadanie mechanizmów związanych z oddziaływaniem tych związków na układ krążenia.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Maksymiliana Marka Onyszkiewicza liczy 75 stron, na które składa się cykl trzech prac oryginalnych, opatrzonych wspólnych tytułem: „Wpływ kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego na regulację ciśnienia tętniczego”, rozprawa ta zawiera wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl, założenia i cele pracy, podsumowanie i wnioski, opinie uchwały I Lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie oraz oświadczenia wszystkich współautorów publikacji. Rozprawa została przygotowana w sposób staranny, co umożliwiło przejrzyste przedstawienie badanego zagadnienia oraz danych zebranych przez doktoranta.

Należy podkreślić, że rozprawa doktorska lek. Maksymiliana Onyszkiewicza stanowi cykl trzech prac oryginalnych, opublikowanych w czasopismach recenzowanych o zasięgu międzynarodowym. Prace te były opublikowane w latach 2019-2020 roku i we wszystkich trzech publikacjach doktorant jest pierwszym autorem. Łączna punktacja *Impact Factor* przedstawionego cyklu trzech publikacji będących przedmiotem rozprawy wynosi **9.552**, a punktacja MNiSW wynosi **270**.

W publikacji nr 1, współautorstwo Onyszkiewicz, M., Jaworska, K., Ufnal, M. Short chain fatty acids and methylamines produced by gut microbiota as mediators and markers in the circulatory system. *Experimental Biology and Medicine* 2020, volume: 245, pages: 166-175. IF: 3,005, punkty MNiSW: 70, doktorant dokonał przeglądu istniejącego stanu wiedzy na temat krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i metyloamin wytwarzanych przez bakterie jelitowe oraz ich związku z regulacją układu krążenia. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą wywierać efekty hipotensyjne poprzez wpływ rozszerzający na naczynia krwionośne. Zatem przepuszczalność bariery jelitokrew jak i bakterie jelitowe mogą wpływać na zmiany stężeń krótkołańcuchowych kwasów

tłuszczowych w układzie krążenia. W swojej pracy przeglądowej doktorant szczegółowo opisał mechanizmy wpływu bakterii jelitowych na regulację ciśnienia tętniczego oraz bezpośredniego wpływu kwasu octowego, propionowego i kwasu masłowego na autonomiczną regulację układu krążenia. W publikacji tej doktorant podsumował również rolę tlenku trimetyloaminy oraz jej toksycznego prekursora trimetyloaminy na funkcję serca i naczyń. Doktorant podsumował, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą mieć istotne implikacje kliniczne, gdyż mogą być traktowane jako mediatory i markery chorób układu krążenia. Ponadto, doktorant zasugerował, że podawanie wyselekcjonowanych szczepów bakterii (probiotyków) produkujących wskazane metabolity lub podawanie bezpośrednio metabolitów bakterii jelitowych może stanowić element terapeutyczny w prewencji chorób układu krążenia. Praca ta jest napisana w sposób jasny i zrozumiały, zawiera trzy Ryciny wykonane przez doktoranta, które w sposób obrazowy przedstawiają mechanizmy i wpływ działania omawianych związków wytwarzanych przez bakterii jelitowe. Należy podkreślić, że doktorant dokonał przeglądu aż 174 pozycji piśmiennictwa do napisania tej publikacji, co świadczy o znajomości tematu, dotychczasowej wiedzy pod kątem planowania pracy doktorskiej i kierunku dalszych badań.

W publikacji nr 2, autorstwo: Onyszkiewicz, M., Gawrys-Kopczynska, M., Konopelski, P., Aleksandrowicz, M., Sawicka, A., Kozniwska, E., Samborowska, E., Ufnal, M. 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, volume: 471, pages: 1441-1453. IF: 3.377, punkty MNiSW: 100, doktorant badał wpływ kwasu masłowego na parametry hemodynamiczne u 14-16 tygodniowych szczurów. Wyniki jego badań wykazały, że stężenie kwasu masłowego jest o trzy rzędy wielkości większe w jelicie grubym niż we krwi obwodowej. Zwiększenie stężenia kwasu masłowego w jelicie, uzyskane poprzez podanie egzogenego roztworu kwasu masłowego, prowadziło do istotnego spadku ciśnienia tętniczego i zmniejszenia częstości skurczów serca. W pracy tej doktorant również wykazał, że efekt hipotensyjny był hamowany przez wykonanie podprzeponowej wagotomii, dożylne podanie heksametonium, dookreżnicze podanie 3-hydroksymaślanu, ale nie przez dożylne podanie atropiny. W doświadczeniach ex vivo kwas masłowy wykazał działanie wazodylatacyjne zarówno w stosunku do tętnicy krezkowej, jak i do tętnicy wyizolowanej z mięśnia smukłego. Doktorant wykazał, że dożylne podawanie kwasu masłowego wywiera krótszy efekt hipotensyjny bez wpływu na akcję serca w porównaniu do kwasu masłowego podawanego dookreżniczo. Doktorant podsumował, że jelito grube wydaje się być najważniejszym miejscem oddziaływania kwasu masłowego. Dwu-trzykrotne zwiększenie stężenia kwasu masłowego w jelicie grubym znacząco obniża ciśnienie tętnicze za pośrednictwem receptorów GPR41/43 oraz aferentnej impulsacji z jelita

za pośrednictwem nerwu błędnego. Współudział doktoranta w przygotowaniu tej publikacji był znaczny, samodzielnie opracował metodologię badań, oznaczył stężenia kwasu masłowego w tkankach, przeprowadził szereg badań hemodynamicznych szczegółowo omówionych w metodologii badań zawartej w publikacji, co świadczy o znajomości warsztatu naukowego doktoranta, przeprowadził analizę statystyczną, wykonał większości wykresów i rycin zawartych w publikacji.

W publikacji nr 3, współautorstwo Onyszkiewicz M, Gawrys-Kopczynska M, Sałagaj M, Aleksandrowicz M, Sawicka A, Koźniewska E, Samborowska E, Ufnal M. Valeric acid lowers arterial blood pressure in rats. *European Journal of Pharmacology* 2020, volume: 877. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173086. IF: 3.170, Punkty MNiSW: 100, doktorant badał stężenie endogennego kwasu walerianowego u 14-16 tygodniowych szczurów. W swoich badaniach eksperymentalnych lek. Maksymilian Onyszkiewicz wykazał, że stężenie kwasu walerianowego jest o 4 rzędy wielkości większe w jelicie grubym, niż we krwi obwodowej. W publikacji tej doktorant wykazał, że podanie dookrężnicze egzogenego, znakowanego izotopowo (VA-D9) kwasu walerianowego prowadzi do obecności tego kwasu w innych tkankach takich jak mózg, wątroba, nerki oraz serce, i wywołuje krótkotrwałe obniżenie ciśnienia tętniczego i akcji serca. Efekt ten został zahamowany przez dookrężnicze podanie 3-hydroksymaślanu (niespecyficzny antagonistą krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych za pośrednictwem receptorów GPR41/43), ale bez wpływu na dożylną podanie atropiny oraz wykonanie podprzeponowej wagoatomii. Efekt hipotensyjny uzyskany przez dookrężnicze podanie roztworu kwasu walerianowego został znacząco wydłużony pod wpływem heksametonium (ganglioplegiku) podanego dożylnie. W doświadczeniach *ex vivo* kwas walerianowy wykazał działanie naczyniorozszerzające w stosunku do tętnicy krezkowej, jak również tętnicy wyizolowanej z mięśnia smukłego. Dożylna podanie kwasu walerianowego u szczurów prowadziło do krótkotrwałego działania hipotensyjnego, jednocześnie nie wywierając istotnego wpływu na częstość skurczów serca. Efekt hipotensyjny został znacząco wydłużony poprzez zastosowanie dożylnego wlewu kwasu walerianowego w infuzji ciągłej. Niniejsze badanie po raz pierwszy wykazało, że kwas walerianowy szybko przenika przez barierę jelito-krew i wpływa na narządy uczestniczące w regulacji ciśnienia tętniczego, wywołuje istotny efekt hipotensyjny związany z pobudzeniem receptorów dla krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (GPR41/43) oraz działaniem naczyniorozszerzającym, bez zaangażowania aferentnej impulsacji przywspółczulnej z jelita grubego (jak w przypadku wpływu kwasu masłowego). W niniejszej publikacji wkład doktoranta w powstawanie pracy był znaczący, obok opracowania koncepcji i metodologii badań, lek. Maksymilian Onyszkiewicz określił stężenie badanego kwasu w tkankach, przeprowadził szereg badań hemodynamicznych z użyciem badanych substancji,

przeprowadził analizę statystyczną wyników oraz wykonał większość wykresów i rycin do publikacji.

Wnioski wyciągnięte przez Doktoranta na podstawie przeprowadzonej analizy udokumentowanych wyników własnych i ich konfrontacji z bieżącym stanem wiedzy zwracają uwagę na najistotniejsze punkty końcowe uzyskane w badaniu, zostały one zweryfikowane założoną hipotezą badawczą i wykazały, że kwas masłowy oraz kwas walerianowy, które są wytwarzane przez bakterie jelitowe istotnie wpływają na ciśnienie tętnicze. Działanie obu kwasów z zastosowanych dawkach nie było związane z działaniem kardiotoksycznym.

W swojej rozprawie doktorskiej lek. Maksymilian Marek Onyszkiewicz po raz pierwszy wskazał na istotną rolę kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego wytwarzanych przez bakterie jelitowe w regulacji ciśnienia tętniczego. Badania lek. Maksymiliana Onyszkiewicza wskazują na najwyższe stężenie obu kwasów w jelicie grubym, które po przekroczeniu bariery jelito-krew wywierają efekt hipotensyjny, wpływając bezpośrednio na naczynia jak i włókna czuciowe nerwu błędnego unerwiające jelito. Wyniki badań doktoranta podkreślają ważną rolę obu kwasów w regulacji układu krążenia i ukierunkowują nurt dalszych badań dotyczących związku mikrobioty przewodu pokarmowego z chorobami układu krążenia. Uzyskane wyniki pracy doktorskiej lek. Maksymiliana Onyszkiewicza wskazują na potencjalną możliwość terapii niefarmakologicznej za pomocą diety (np. spożywanie błonnika pokarmowego), podawania szczepów bakterii mogących wpływać na wytwarzanie obu kwasów w jelicie grubym lub w przyszłości terapii farmakologicznej zawierającej badane związku w celu obniżenia ciśnienia tętniczego.

We wniosku końcowym stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Maksymiliana Onyszkiewicza pt. „Wpływ kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego na regulację ciśnienia tętniczego”, stanowi nowatorskie badanie naukowe, o czym świadczą uzyskane wyniki opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Należy podkreślić, że zainteresowanie tematyką badań i wpływu mikrobioty na choroby układu krążenia w literaturze światowej mocno rozwinęło się w ciągu ostatniej dekady, wśród tych badań publikacje Zespołu Profesora Marcina Ufnala stanowią znaczny udział i są cytowane. Lek. Maksymilian Onyszkiewicz podjął w swojej rozprawie temat o bardzo dużym znaczeniu z punktu widzenia mechanizmów działania hipotensyjnego kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego i wpływu obu kwasów wytwarzanych przez bakterie jelitowe na parametry hemodynamiczne układu krążenia. Wyniki tych badań eksperymentalnych mogą być podstawą zapoczątkowania badań nad długotrwałym efektem hipotensyjnym obu kwasów oraz badań klinicznych u ludzi. Doktorant sumiennie udokumentował w swojej rozprawie

doktorskiej wiedzę, znajomość problematyki mikroflory jelitowej i kluczową rolę bakterii jelitowych w powstawaniu zmian hemodynamicznych, umiejętność warsztatu naukowego i przygotowania manuskryptów do publikacji.

W mojej ocenie stwierdzam, że „Rozprawa doktorska lek. Maksymiliana Marka Onyszkiewicza spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)”. W związku z powyższym składam przed Wysoką Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Maksymiliana Marka Onyszkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na fakt, że praca ta wnosi znaczący nowatorski wkład w dotychczasową wiedzę, wyróżnia się oryginalnością, a uzyskane wyniki zostały już opublikowane w impaktowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, składam do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.



prof. dr hab. n. med. Dagmara Hering
Klinika Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii
Gdański Uniwersytet Medyczny