



Katedra i Zakład Patofizjologii
UNIwersytet Medyczny w Lublinie

ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 00; fax. 81 448 65 01

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. med. Maksymiliana Marka Onyszkiewicza z Zakładu Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pt. „Wpływ kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego na regulację ciśnienia tętniczego” przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Marcina Ufnala

Badania ostatnich lat wskazują na istotną rolę mikroty jelitowej zarówno w warunkach fizjologicznych jak i w patogenezie wielu chorób, w tym chorób układu krążenia takich jak nadciśnienie tętnicze, miażdżyca, choroba niedokrwienna serca. Jednym z mechanizmów poprzez które mikrobiom jelitowy wpływa na funkcję odległych narządów jest produkcja przez bakterie aktywnych biologicznie metabolitów działających zarówno miejscowo w obrębie przewodu pokarmowego jak również po wchłonięciu do krwiobiegu bezpośrednio na naczynia krwionośne i inne odległe narządy. Większość badań na temat mikrobioty jelitowej skupia się na ocenie jej składu, współcześnie zwłaszcza metodami genomicznymi jak mikromacierze czy sekwencjonowanie nowej generacji. Znacznie mniej uwagi poświęcono znaczeniu metabolitów bakterii jelitowych w regulacji funkcji fizjologicznych jak i w patogenezie chorób. Wynika to z faktu, że do niedawna nie zdawano sobie sprawy, że metabolity te są obecne w tkankach gospodarza lub też zakładano, że w małych stężeniach w jakich z reguły występują nie mogą mieć istotnego znaczenia fizjologicznego.

Celem recenzowanej pracy doktorskiej było badanie wpływu dwóch krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych produkowanych przez bakterie jelitowe w wyniku fermentacji błonnika pokarmowego, kwasu masłowego oraz kwasu walerianowego, na mechanizmy regulacji ciśnienia tętniczego. Rozprawa doktorska jest oparta na 3 opublikowanych pracach: 1) **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, 245, 166-175, 2) **Onyszkiewicz, M.**, Gawrys-Kopczyńska, 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, 471, 1441-1453, 3) **Onyszkiewicz M**, Gawrys-Kopczynska M, Sałagaj M, Aleksandrowicz M, Sawicka A, Koźniwska E, Samborowska E, Ufnal M. Valeric acid lowers arterial blood pressure in rats. *European Journal of Pharmacology* 2020, 877. Pierwsza z prac jest pracą przeglądową, a pozostałe dwie pracami oryginalnymi. Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich trzech publikacji. Sumaryczny Impact Factor trzech publikacji wynosi ponad 10.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje 75 stron wydruku komputerowego i obejmuje stronę tytułową, słowa kluczowe, podziękowania, wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp uzasadniający połączenie publikacji w jeden cykl, zakres i cel pracy, kopie publikacji, podsumowanie i wnioski, kopie uchwał komisji etycznej oraz oświadczenia współautorów o ich udziale w realizacji każdej z trzech prac. Układ pracy jest typowy dla prac doktorskich opartych na wynikach już opublikowanych w czasopiśmie.

W publikacji przeglądowej (praca nr. 1) przedstawiono znaczenie metabolitów bakterii jelitowych w regulacji funkcji oraz chorobach układu krążenia. W pracy omówiono kolejno mechanizmy współzależności między mikrobiotą układu pokarmowego i układem krążenia a następnie skupiono się na znaczeniu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w tym kwasu octowego, propionowego, masłowego. W kolejnej części pracy omówiono kontrowersyjne wyniki badań nt. znaczenia trimetyloaminy (TMA) oraz tlenku trimetyloaminy (TMAO) w patogenezie chorób układu krążenia oraz chorób metabolicznych. Praca jest wyczerpująca, napisana w sposób ciekawy i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy doktorskiej. W pracy zamieszczono trzy ryciny podsumowujące mechanizmy omówione w tekście. Piśmiennictwo liczy 174 pozycje. Opracowanie tej publikacji przeglądowej świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu doktoranta to wykonania badań będących podstawą pracy doktorskiej.

W publikacji nr. 2 przedstawiono wyniki badania wpływu kwasu masłowego na regulację ciśnienia tętniczego. Badania wykonano *in vivo* u szczurów w znieczuleniu ogólnym oraz *ex vivo* na izolowanych naczyniach oporowych. W badaniach *in vivo* oznaczano stężenie endogennego kwasu masłowego w jelicie grubym, krwi żyły wrotnej oraz krwi obwodowej.

Następnie podawano egzogenny kwas masłowy w kilku dawkach dojelitowo lub dożylnie, a następnie monitorowano średnie ciśnienie tętnicze i akcję serca metodą bezpośrednią po wprowadzeniu cewnika do tętnicy udowej podłączonego do rejestratora BIOPAC MP160. Jednocześnie monitorowano EKG w celu oceny skorygowanego odstępu QT jako wskaźnika ewentualnych zaburzeń repolaryzacji. W celu zbadania mechanizmu działania kwasu masłowego dodatkowym grupom szczurów podawano: 1) antagonistę receptorów dla krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych GRP41/43, kwas 3-hydroksymasłowy, 2) inhibitor syntazy tlenu azotu, L-NAME, 3) bloker zwojów układu autonomicznego, heksametonium, 4) antagonistę receptorów cholinergicznym, atropinę. U niektórych zwierząt wykonywano podprzeponową wago-tomię w celu oceny znaczenia sygnalizacji aferentnej za pośrednictwem nerwu błędnego w działaniu dojelitowo podanego kwasu masłowego. Badania *ex vivo* wykonano na izolowanych tętnicach krezkowych oraz tętnicach mięśnia smukłego. Tętnice opróżnione z krwi umieszczano w płynie wieloelektrolitowym i poddawano ciśnieniu transmuralnemu w wysokości 50 mmHg (tętnica krezkowa) lub 80 mmHg (tętnica z mięśnia smukłego). Badania reaktywności naczyń wykonano oceniając ich rozmiar pod mikroskopem w warunkach bez przepływu krwi po podaniu odpowiednich substancji narzędziowych. W pierwszym etapie indukowano skurcz tętnic za pomocą agonisty receptorów alfa-adrenergicznych, fenylefryny. Integralność śródbłonna oceniano mierząc działanie naczyniorozszerzające acetylocholinę. Stężenie kwasu masłowego oznaczano metodą ultrasprawną chromatografią cieczową i detektora masowego z potrójnym kwadropolem.

Badania wykonane w tej pracy wykazały, że stężenie kwasu masłowego jest znacznie większe w jelicie grubym niż we krwi, z kolei we krwi jest większe w żyłach wrotnej niż w we krwi obwodowej, co jest zgodne z faktem, że źródłem kwasu masłowego jest mikrobiom jelita grubego. Kwas masłowy podany dożylnie powodował zależny od dawki przejściowy spadek średniego ciśnienia tętniczego, ale nie dochodziło do zmian częstości akcji serca. Kwas 3-hydroksymasłowy nie wpływał na oceniane parametry hemodynamiczne, zmniejszał jednak hipotensyjne działanie kwasu masłowego. Dożylnie podanie inhibitora syntazy tlenu azotu, L-NAME, powodowało zgodnie z oczekiwaniami znaczny wzrost ciśnienia tętniczego, ale związek ten nie miał wpływu na działanie hipotensyjne kwasu masłowego. Kwas masłowy podany do światła jelita grubego powodował zależny od dawki długotrwały spadek średniego ciśnienia tętniczego, któremu towarzyszyło zwolnienie akcji serca. Kwas masłowy nie wpływał na

długość skorygowanego odstępu QT. Działaniu kwasu masłowego podanego dojelitowo na ciśnienie tętnicze i akcję serca zapobiegała częściowo podprzeponowa wagotomia lub podanie heksametonium, ale nie zapobiegało podanie atropiny. Ponadto działaniu dojelitowo podanego kwasu masłowego na średnie ciśnienie tętnicze oraz akcję serca zapobiegało dojelitowe podanie kwasu 3-hydroksymasłowego. Sam kwas 3-hydroksymasłowy nie miał wpływu na ciśnienie tętnicze, ale powodował spadek częstości akcji serca. Kwas masłowy rozszerzał tętnice badane *ex vivo*. Kwas 3-hydroksymasłowy zapobiegał działaniu kwasu masłowego na tętnicę mięśnia smukłego, ale nie miał wpływu na jego działanie na tętnicę krezkową.

W pracy nr. 3 wykonano podobne badania w odniesieniu do kwasu walerianowego. Wykazano, że kwas walerianowy występuje w największym stężeniu w świetle jelita grubego, a w znacznie mniejszych (mikromolarnych) stężeniach we krwi żyły wrotnej, krwi obwodowej i tkankach (mózg, wątroba, nerki, serce, płuca) oraz moczu. Po dojelitowym podaniu znakowanego kwasu walerianowego pojawia się on już po kilku minutach w tkankach obwodowych co świadczy o efektywnym wchłanianiu. Dojelitowe podanie kwasu walerianowego powoduje krótkotrwały trwający około 5 minut spadek średniego ciśnienia tętniczego oraz częstości akcji serca, jednak kwas walerianowy nie miał wpływu na długość skorygowanego odstępu QT. Działaniu hipotensyjnemu kwasu walerianowego zapobiegało częściowo wcześniejsze podanie kwasu 3-hydroksymasłowego. Natomiast podprzeponowa wagotomia nie wpływała na działanie kwasu walerianowego. Zarówno wagotomia jak i heksametonium wydłużały hipotensyjne działanie kwasu walerianowego. *Ex vivo* kwas walerianowy rozszerzał tętnice krezkowe. Jego działanie na tętnicę mięśnia smukłego było słabsze i występowało w większych stężeniach. Kwas 3-hydroksymasłowy zmniejszał działanie kwasu walerianowego na tętnicę krezkową, ale nie miał wpływu na jego działanie na tętnicę mięśnia smukłego. Kwas walerianowy podawany dożylnie spowodował krótkotrwały spadek ciśnienia tętniczego, czemu nie towarzyszyło zwolnienie akcji serca. Natomiast podawanie kwasu walerianowego w ciągłej infuzji wywoływało efekt hipotensyjny przez cały czas jego podawania.

Z wykonanych badań wyciągnięto następujące trzy najważniejsze wnioski: 1) W warunkach fizjologicznych stężenie kwasu masłowego i kwasu walerianowego jest najwyższe w jelicie grubym, które jest głównym habitatem mikroflory, 2) Kwas masłowy i kwas walerianowy przedostają się z jelita grubego do układu krążenia powodując istotny efekt hipotensyjny,

oddziałując zarówno poprzez układ nerwowy, jak również bezpośrednio na naczynia, 3) Kwas masłowy i kwas walerianowy są ważnymi mediatorami oddziaływania pomiędzy mikrobiotą przewodu pokarmowego a układem krążenia.

Prace doktorską lek. med. Maksymiliana Marka Onyszkiewicza oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona kontynuację wieloletnich prac Promotora na temat znaczenia fizjologicznego i znaczenia w patologii metabolitów mikrobioty jelitowej. Podjęcie badań na temat znaczenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w regulacji ciśnienia tętniczego jest w pełni uzasadnione. Kwasy te są jednymi z najważniejszych metabolitów bakterii jelitowych, przy czym uważane są one za metabolity „korzystne” i produkowane przez korzystne dla zdrowia gatunki bakterii. Ponadto zwiększenie zawartości błonnika w diecie jak i stosowanie pre- i probiotyków wspomagających wzrost „korzystnych” gatunków bakterii prawdopodobnie będzie zwiększać produkcję tych kwasów. Dotychczasowe badania na temat wpływu tych metabolitów na naczynia krwionośne i regulację ciśnienia tętniczego są nieliczne i fragmentaryczne. W badaniach wykonanych przez Doktoranta wykorzystano nowatorskie metody stosowane w zespole naukowym kierowanym przez Promotora jak oznaczanie stężenia kwasu masłowego i walerianowego w jelicie, krwi i tkankach, dojelitowe podawanie metabolitów oraz metoda monitorowania parametrów hemodynamicznych. Wysoko należy ocenić wykonanie badań *ex vivo* na izolowanych małych naczyniach oporowych, które są znacznie trudniejsze ale też dostarczają cenniejszych informacji niż łatwiejsze technicznie badanie dużych tętnic jak aorta, które jednak mają mniejsze znaczenie w regulacji oporu obwodowego. Należy podkreślić pracowitość wykonanych badań zarówno *in vivo* jak i *ex vivo*. Badania wykonane przez Doktoranta dostarczyły wielu nowatorskich informacji. W szczególności wykazano, że zarówno kwas masłowy jak i walerianowy podane dojelitowo powodują spadek ciśnienia tętniczego. W działaniu obu kwasów uczestniczą receptory GRP41/43, a w przypadku kwasu masłowego aferentna sygnalizacja za pośrednictwem nerwu błędnego i hamowanie aktywności układu współczulnego. Oba kwasy działają rozszerzająco na naczynia oporowe przy czym udział receptorów GRP41/43 jest uzależniony od badanego kwasu i konkretnego naczynia.

W trakcie lektury pracy nasunęły mi się pewne uwagi, które z obowiązku recenzenta przytaczam.

- 1) Ograniczeniem ocenianej pracy jest badanie wpływu na ciśnienie tętnicze oraz akcję serca w znieczuleniu ogólnym. Znieczulenie ogólne wpływa na aktywność układu autonomicznego, co może mieć wpływ na uzyskane wyniki. Lepszą metodą byłaby telemetria. Trzeba jednak dodać, że metoda ta jest stosowana tylko w nielicznych ośrodkach ze względu na wysokie koszty. Zastosowana przez autora metoda jest mimo swoich ograniczeń nadal powszechnie stosowana.
- 2) Wyniki uzyskane u zwierząt otrzymujących dożylnie L-NAME są trudne do interpretacji, ponieważ w takim układzie doświadczalnym związek ten hamuje syntezę NO nie tylko w śródbłonku, ale również w innych narządach istotnych dla regulacji ciśnienia jak nerki czy układ nerwowy. L-NAME podany dożylnie wpływa nie tylko na funkcję śródbłonka ale również kurczliwość mięśnia sercowego, transport sodu w kanalikach nerkowych, aktywność układu współczulnego czy odruch z baroreceptorów, a obserwowane zmiany ciśnienia są wypadkową wszystkich tych działań. Szkoda, że w celu oceny udziału NO autor nie zdecydował się na badanie wpływu inhibitora syntazy NO w układzie *ex vivo*.
- 3) Spadek ciśnienia tętniczego po dożylnym podaniu kwasu masłowego i jednocześnie brak zmian częstości akcji serca sugeruje, że kwas masłowy może hamować odruch z baroreceptorów. W przeciwnym razie spadek ciśnienia tętniczego powinien wywołać przyspieszenia akcji serca. Kwestia ta powinna zostać omówiona w dyskusji.
- 4) Wniosek o braku kardiotoksyczności jest trochę „na wyrost”. Autor badał jedynie długość bezwzględną oraz skorygowaną odstęp QT. Na tej podstawie można co najwyżej wyciągnąć wniosek o braku wpływu na proces repolaryzacji lub działania proarytmicznego, chociaż ściślej mówiąc wymagałoby to oceny potencjałów pojedynczych kardiomiocytów. natomiast w pracy nie badano innych aspektów kardiotoksyczności np. wpływu na kurczliwość czy żywotność komórek.
- 5) W pracy nr. 2 uzyskano kilka wyników, które warte są przedyskutowania. Po pierwsze, gdzie zlokalizowane są receptory GRP41/43 na które działa kwas masłowy podany dojelitowo? Czy działa on na receptory znajdujące się w zakończeniach nerwu błędnego, czy też ma podwójne działanie zarówno na zakończenia nerwu błędnego jak i po wchłonięciu bezpośrednio na naczynia krwionośne? Po drugie, jeżeli kwas 3-hydroksymasłowy hamuje działanie kwasu masłowego na tętnicę z mięśnia smukłego ale

nie hamuje jego działania na tętnice krezkowe, to jakie receptory są zaangażowane w tym drugim przypadku? Wreszcie, chociaż kwas 3-hydroksymasłowy zmniejszył działanie kwasu masłowego to sam powodował pewne zwolnienie akcji serca – jaki mechanizm może wyjaśniać taki efekt?

- 6) Szkoda, że autor nie pokusił się o dalsze badania mechanizmu działania kwasów w układzie *ex vivo* poprzez zastosowanie takich metod jak uszkodzenie śródbłonna, podanie inhibitora syntazy NO lub innych mediatorów pochodzenia śródbłonkowego (np. EDHF, który w małych naczyniach oporowych ma większe znaczenie niż NO), inhibitorów kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów itp.
- 7) Przedyskutowania wymaga inny wpływ kwasu 3-hydroksymasłowego na działanie kwasu masłowego i kwasu walerianowego na tętnicę krezkową i tętnicę z mięśnia smukłego.
- 8) Zastrzeżenia budzi sposób prezentacji wniosków na stronie 50-51 pracy doktorskiej. Na stronie 50 podsumowano w 8 punktach najważniejsze wyniki, natomiast na stronie 51 wymieniono 3 najważniejsze wnioski. Niektóre z punktów zawartych na stronie 50 mają charakter wniosków (np. punkt dotyczący udziału receptorów GRP41/43). Część z punktów na stronie 50 jest bardzo podobnych dla obu prac oryginalnych (dotyczących kwasu masłowego i kwasu walerianowego). Bardziej racjonalne wydaje się przedstawienie wniosków bez podziału na „najważniejsze wyniki” i „najważniejsze wnioski”. Ponadto autor mógł pokusić się o sformułowanie syntetycznych wniosków na podstawie wyników przedstawionych w obu publikacjach z podkreśleniem podobieństw i różnic w działaniu obu kwasów. Warto byłoby też umieścić w pracy tabelę z podsumowaniem najważniejszych wyników z podkreśleniem podobieństw i różnic w działaniu kwasu masłowego i walerianowego.

Przedstawione powyżej uwagi nie zmniejszają wysokiej wartości ocenianej pracy doktorskiej. Jako osoba, która sama zajmuje się badaniami doświadczalnymi na zwierzętach zdaję sobie sprawę, że wykonanie sugerowanych dodatkowych badań wymaga dużego nakładu czasu i środków finansowych. Nie bez znaczenia są też kwestie etyczne związane z koniecznością wykorzystania dodatkowych zwierząt. Dlatego uwagi te traktuję bardziej jako sugestie dalszych badań niż krytykę przedstawionej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi wartościowy wkład w rozwój nauki. Podjęcie badań na ten temat jest w pełni uzasadnione. Badania wpisują się w kierunek konsekwentnie realizowany przez zespół Promotora od wielu lat. Metody badawcze są adekwatne do celu pracy. Wyniki mają istotne znaczenie poznawcze, a potencjalnie także praktyczne. Na podkreślenie zasługuje nowatorska tematyka pracy oraz fakt, że jej wyniki zostały już opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. W związku z tym mam zaszczyt wnioskować do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie lek. med. Maksymiliana Marka Onyszkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin dn. 5.10.2020

Prof. dr hab. Jerzy Bełtowski



Katedra i Zakład Patofizjologii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie