

Akceptuję
HJ

dr hab. Halina Jurkowska
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Katedra Biochemii Lekarskiej
ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków
tel. 12 422 32 72

Kraków, 17 lipca 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Klaudii Maksymiuk

Rozprawa doktorska lek. wet. Klaudii Maksymiuk pt. „**Wpływ trimetyloaminy na funkcje układu krążenia i nerek**” wykonana została w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Marcina Ufnala. Badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach projektów: Opus 19 2020/37/B/ NZ5/00366, pt. „(TNT-CVD) Trimetyloamina jako toksyna w chorobach układu krążenia” oraz Opus 16 UMO-2018/31/B/NZ5/00038, pt. „Rola piezolitów i osmolitów w układzie krążenia w zdrowiu i chorobie” z Narodowego Centrum Nauki (kierownik projektów prof. dr n. med. Marcin Ufnal). Rozprawa doktorska ma formę powiązanych tematycznie dwóch artykułów opublikowanych w 2022 i 2024 roku w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF 11,1 (zgodnie z danymi *Journal Citation Reports* za 2022 r) i liczbie punktów MEiN 200. Publikacje (**Publikacja nr 1 i nr 2**) wchodzące w skład tego cyklu to prace oryginalne. W obu tych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a jednocześnie w **Publikacji nr 1** jest także autorem korespondencyjnym. Szczegółowy spis tych publikacji zamieszczony w rozprawie doktorskiej przedstawia się następująco:

1. **Maksymiuk K.**, Szudzik M., Samborowska E., Chabowski D., Konop M., Ufnal M. *Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases. PLoS One, 2024; 19(1): e0297474. DOI: 10.1371/journal.pone.0297474. IF 3,7, Punkty MNiSW wg listy z 2024r: 100.*
2. **Maksymiuk K.M.**, Szudzik M., Gawryś-Kopczyńska M., Onyszkiewicz M., Samborowska E., Mogilnicka I., Ufnal M. *Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats. Journal of Translational Medicine, 2022; Oct 15;20(1):470. DOI: 10.1186/s12967-022-03687-y. IF 7,4, Punkty MNiSW wg listy z 2024r: 100.*

Rozprawa doktorska liczy 80 stron podzielonych na rozdziały: Słowa kluczowe, Nazwa i Numer projektu badawczego, Dedykacje, 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 cel pracy, PUBLIKACJA nr 1, PUBLIKACJA nr 2, Podsumowanie i wnioski, Opinie Komisji Etycznej, Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji. Do Wstępu dołączona jest Bibliografia (61 pozycji, wszystkie opublikowane w języku angielskim). Zgodnie z załączonymi Oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktorantki szacowany jest w **Publikacji nr 1** na 60%, a w **Publikacji nr 2** na 55%; obejmował przeprowadzenie przez Doktorantkę doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

Opublikowanie wyników badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk w czasopismach z wysokim współczynnikiem oddziaływania bardzo dobrze świadczy o ich aktualności i znaczeniu. Doktorantka jest we wszystkich pracach wchodzących w skład tego cyklu pierwszym autorem i jednocześnie w jednej z nich jest autorem korespondencyjnym co wskazuje na Jej zasadniczą rolę w powstaniu tych prac.

Trimetyloamina (TMA) wytwarzana jest przez bakterie jelitowe ze źródeł takich jak cholina, karnityna, czy betaina. Monooksygenazy flawinowe (FMOs) utleniają w wątrobie TMA do tlenu trimetyloaminy (TMAO). Większość danych literaturowych pokazuje, że podwyższony poziom TMAO w osoczu ma związek z wyższym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Jednakże istnieją również prace sugerujące korzystne działanie TMAO. Znacznie mniej wiadomo na temat roli trimetyloaminy w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych i nerek.

Głównym celem przedstawianej do oceny rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk było określenie fizjologicznych stężeń trimetyloaminy, tlenu trimetyloaminy i ich prekursorów takich jak cholina i karnityna u zwierząt laboratoryjnych (mysz domowa, szczur wędrowny, kawia domowa), a także zbadanie w modelu szczurzym wpływu trimetyloaminy na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego oraz nerek.

W **Publikacji nr 1** (Maksymiuk K., Szudzik M., Samborowska E., Chabowski D., Konop M., Ufnal M. *Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases. PLoS One, 2024; 19(1): e0297474*) określono fizjologiczne stężenia choliny, karnityny, TMA,

TMAO oraz stosunek TMAO/TMA w kale, osoczu, moczu, oraz wybranych tkankach (wątroba, nerki, serce, płuca) u myszy domowej, szczura wędrownego i kawii domowej. Zbadana została również ekspresja (na poziomie mRNA i białka) monooksygenaz flawinowych (FMO1, FMO3, FMO5) u tych trzech gatunków zwierząt w sercu, płucach, wątrobie i nerkach.

Wykazano, że istnieją istotne różnice w stężeniach TMA i TMAO w tkankach myszy, szczurów i kawii; z kolei stężenie TMAO w osoczu wszystkich badanych gatunków zwierząt było porównywalne. Spośród badanych gatunków zwierząt, największe stężenia TMA stwierdzono u myszy. W wątrobie myszy wykazano najwyższe stężenie TMA oraz najniższe stężenie TMAO. U badanych gatunków zwierząt wysokie stężenia metyloamin zaobserwowano w nerkach, a niskie w sercu i płucach. U szczurów, w wątrobie i rdzeniu nerki stwierdzono największy stosunek TMAO/TMA w porównaniu do myszy i kawii. Stosunek TMAO/TMA w moczu był największy u szczurów.

Wykazano także, że ekspresja monooksygenaz flawinowych w wątrobie i nerkach różni się pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt. U szczurów stwierdzono wysoką ekspresję (na poziomie mRNA i białka) FMO3 i FMO5 w wątrobie, a także wykazano ekspresję FMO1 i FMO3 w korze i rdzeniu nerki. U kawii w wątrobie niższa jest ekspresja (na poziomie białka) FMO3 i FMO5; z kolei w korze i rdzeniu nerki u kawii, ekspresja FMO3 (badana na poziomie białka) jest najwyższa spośród badanych gatunków. W wątrobie myszy ekspresja FMO5 (badana na poziomie białka) jest najwyższa w porównaniu do kawii i szczura.

W Publikacji nr 2 (Maksymiuk K.M., Szudzik M., Gawryś-Kopczyńska M., Onyszkiewicz M., Samborowska E., Mogilnicka I., Ufnal M. *Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats. Journal of Translational Medicine, 2022; Oct 15;20(1):470*) badano wpływ przewlekłego, doustnego podania trimetyloaminy na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego oraz nerek, a także na ekspresję monooksygenaz flawinowych u szczurów.

Wykazano szkodliwy wpływ TMA na nerki i układ sercowo-naczyniowy u szczurów. Stwierdzono m.in., że TMA wpływa na zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi (ciśnienia skurczowego), wzrost stężenia glukozy, białka, KIM-1 (cząsteczka-1 uszkodzenia nerek) i wzrost stosunku białko/kreatynina w moczu, a także powoduje zmiany histologiczne w nerkach. Stwierdzono ponadto, że stężenie TMA w surowicy jest znacząco niższe niż stężenie TMAO. U szczurów (w grupie kontrolnej) największe stężenia TMA i TMAO zaobserwowano w korze i rdzeniu nerki, a najniższe w sercu; stężenie TMA w wątrobie było większe niż TMAO,

a w płucach zaobserwowano odwrotną zależność. Utlenianie TMA do TMAO może zmniejszać toksyczne działanie trimetyloaminy. U szczurów, którym podawano TMA następował znaczący wzrost TMAO a niewielki TMA w tkankach; dobowe wydalanie TMA i TMAO było zwiększone; obniżona była ekspresja FMO3 w korze nerek oraz FMO1 i FMO3 w rdzeniu nerek.

Zapoznanie się z rozprawą doktorską lek. wet. Klaudii Maksymiuk zmusza mnie jako recenzenta, do sformułowania kilku uwag, które nie umniejszają jednak wartości recenzowanej pracy:

- 1) Na str.9 rozprawy doktorskiej, w zdaniu „Niniejsza praca doktorska wnosi nową wiedzę dotyczącą stężeń TMA, TMAO i ich prekursorów, jak również aktywności FMO u najczęściej badanych zwierząt laboratoryjnych” - w mojej opinii bardziej właściwe byłoby podanie zamiast „aktywności” słowa „ekspresji”, gdyż w pracy nie badano aktywności FMO, a ekspresję FMO;
- 2) Na str. 19 w pkt 1b, w zdaniu „Porównanie ekspresji i poziomu białek FMO1, FMO3 i FMO5 w tkankach” – w mojej opinii bardziej poprawne byłoby sformułowanie „Porównanie ekspresji FMO1, FMO3 i FMO5 (na poziomie mRNA i białka) w tkankach”, gdyż badana była ekspresja FMOs na poziomie mRNA (techniką Real-Time-PCR) i na poziomie białka (techniką Western blot).
- 3) W części rozprawy doktorskiej poprzedzającej załączone publikacje, zawierającej Wstęp będący dobrym wprowadzeniem do prezentowanych w nich zagadnień, oraz dobrze sformułowane Cele główne i szczegółowe, zabrakło mi w tym wprowadzeniu rozdziału zawierającego listę metod badawczych jakie stosowano w ramach realizacji pracy doktorskiej w obu opublikowanych pracach.

Wniosek końcowy:

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska lek. wet. Klaudii Maksymiuk pt. „Wpływ trimetyloaminy na funkcje układu krążenia i nerek” prezentuje wyniki stanowiące oryginalny wkład do nauki; umożliwiają one lepsze zrozumienie metabolizmu trimetyloaminy i tlenku trimetyloaminy, a także ich roli w chorobach sercowo-naczyniowych i nerek. Doktorantka wywiązała się z postawionych celów pracy, a badania przeprowadzone zostały z wykorzystaniem aktualnie stosowanych i powszechnie akceptowanych metod badawczych. Wyniki badań zawarte w pracy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk dostarczają ważnych danych dla wyboru odpowiedniego modelu zwierzęcego do badań przedklinicznych.

Cykl publikacji składający się na pracę doktorską lek. wet. Klaudii Maksymiuk jest spójny i dobrze opracowany, co świadczy, że Doktorantka posiada dużą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jej zainteresowania, jak również umiejętność prowadzenia i interpretowania wyników badań w świetle dostępnej literatury.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska 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 mojej ocenie przedłożona praca w pełni kwalifikuje Doktorantkę do dalszych etapów przewodu doktorskiego, o co niniejszym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Zakład Biochemii i Chemii Medycznej UJ CM

Halina Jurkowska
dr hab. n. med. Halina Jurkowska

dr hab. Halina Jurkowska