



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSZYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	31-07-2023
L. dz. RN-BM/	1376

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/13239/2023 P
Data:2023-07-31

I KATEDRA I KLINIKA KARDIOLOGII

Warszawa, 11.07.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł: „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych”

Autor: lek. Marcin Choroszy z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się zależnościom pomiędzy nieprawidłowym składem mikroflory jelitowej a chorobą niedokrwienną serca. Dostępne są dane wskazujące na istnienie tzw. osi serce-jelito, związanej z obecnością w krwioobiegu metabolitów nieprawidłowej flory bakteryjnej jelit indukującej przewlekły stan zapalny śródbłonna tętnic. Wśród licznych czynników wpływających na rozwój zmian miażdżycowych, obok klasycznych czynników tj. hiperlipidemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, coraz częściej wymieniana jest także nieprawidłowa mikroflora jelit. Wciąż jednak nie w pełni zidentyfikowano nieprawidłowości składu flory bakteryjnej jelit, tzw. dysbiozy jelitowej, które swoiście wiązałyby się z wystąpieniem choroby niedokrwiennej serca.

Wobec powyższych rozważań temat przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej, mającej na celu ocenę różnic profilu mikroflory jelit pomiędzy osobami z chorobą niedokrwienną serca a osobami zdrowymi oraz zbadanie wpływu wybranych metabolitów bakteryjnych na komórki śródbłonna oceniam jako aktualny, ważny poznawczo i mający istotne implikacje kliniczne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska oparta jest na dwóch pracach: pracy oryginalnej oraz przeglądzie systematycznym piśmiennictwa z meta-analizą, które opublikowane zostały w języku angielskim w recenzowanych czasopismach:

Nutrients (IF: 6,71 MNiSW: 140),

Metabolites (IF: 5,58 MNiSW: 100).

Doktorant jest pierwszym Autorem w.w. artykułów. Oprócz dwóch prac wchodzących w skład cyklu w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej, Doktorant jest Współautorem 7 innych publikacji opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych.

Rozprawa została opatrzona spisem treści, streszczeniami w języku polskim i angielskim, wprowadzeniem, opisem celów i założeń projektu, opisem materiałów i metod, wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską, omówieniem wyników, podsumowaniem wniosków, wykazem piśmiennictwa, notą biograficzną Doktoranta, oświadczeniami Współautorów oraz wykazem stosowanych skrótów. Załączono również informację o uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu.

Całość rozprawy została zredagowana w sposób staranny. Istotnym walorem pracy są ryciny, które w przystępny sposób podsumowują wykonane analizy.

Tytuł pracy właściwie odzwierciedla treść rozprawy.

Wprowadzenie stanowi wartościowy element rozprawy, w którym Doktorant uzasadnia wybór tematu badawczego, opisuje patomechanizm miażdżycy, wyszczególniając poszczególne etapy rozwoju blaszki miażdżycowej. Doktorant w precyzyjny i przystępny sposób omawia rolę mikroflory jelit w chorobach sercowo-naczyniowych, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu metabolicznej endotoksemii na śródbłonek naczyniowy, odnosząc się przy tym do piśmiennictwa (łącznie 38 pozycji piśmiennictwa).

W rozprawie klarownie sprecyzowano główny cel pracy, którym była analiza porównawcza mikrobiomu jelit osób z chorobą niedokrwienną serca i osób zdrowych oraz ocena wpływu wybranych metabolitów bakteryjnych na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych.

Materiał i metody zostały opisane rzeczowo i przejrzysto. Warto podkreślić bogatą metodologię zrealizowanych badań opisanych w pracy oryginalnej, wykorzystującą nowoczesne techniki biologii molekularnej. Nowatorskim podejściem w przeprowadzonych badaniach była ocena zarówno bezpośredniego, jak i pośredniego wpływu ocenianych metabolitów na śródbłonek osocza, z uwzględnieniem badania współtoksyczności, co istotnie przybliżyło model badawczy do warunków *in vivo*.

W pracy oryginalnej (Publikacja 1) przeanalizowano grupę odpowiednio 15 z chorobą niedokrwienną serca oraz 15 zdrowych ochotników. Choroba niedokrwienna serca (choroba wieńcowa) rozpoznawana była na podstawie obecności co najmniej 50% zwężenia światła jednego lub wielu naczyń w koronarografii. Grupa badana nie była homogenna w kontekście prezentowanego typu zespołu wieńcowego: na podstawie Tabeli nr 1 w Publikacji nr 1 można stwierdzić, że 10 pacjentów miało koronarografię z powodu przewlekłego zespołu wieńcowego, a 5 chorych z powodu ostrego zespołu wieńcowego.

Materiał badawczy stanowiły próbki krwi (stężenie endotoksyny – lipopolisacharydu [LPS] oceniano z wykorzystaniem homogennego testu LAL, stężenie siarczanu indoksyłu z zastosowaniem immunoenzymatycznego testu Indoxyl Sulphate ELISA kit oraz próbki kału (analiza mikrobiomu w wykorzystaniem technik biologii molekularnej).

Badania *in vitro* wykonano na pierwotnej, unieśmiertelnionej linii komórkowej ludzkich komórek śródbłonna HUVEC oraz linii ludzkich monocytów THP-1.

Ocenę trombogenności komórek śródbłonna poddawanych ekspozycji na badane metabolity prowadzono na podstawie adhezji monocytów linii THP-1 oraz stężenia E-selektyny i białka chemotaktycznego monocytów-1 (MCP-1).

Sekwencjonowanie 16S rRNA potwierdziło cechy dysbiozy jelitowej u pacjentów w grupie badanej, z CAD, korespondującą z podwyższonym stężeniem LPS i siarczanu indoksyłu w surowicach pacjentów. Porównanie mikroflory jelit pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i osób zdrowych wykazało wzrost liczby bakterii z grup *Firmicutes* i *Proteobacteria*, znaczący spadek liczny bakterii z grupy *Bacteroides*, znaczący wzrost liczebności bakterii z rzędu *Coriobacteriales* i *Enterobacteriales* oraz wzrost liczebności

bakterii z rodziny *Ruminococcaceae* – grup drobnoustrojów o ustalonej roli w rozwoju miażdżycy tętnic.

LPS i siarczan indoksyłu wykazały współtoksyczność wobec komórek śródbłonka, indukując produkcję reaktywnych form tlenu, selektywny E i MCP-1. Ponadto oba te metabolity promowały trombogenność komórek śródbłonka potwierdzoną adhezją monocytów.

Publikację 2 stanowi przegląd systematyczny i meta-analiza mające na celu przegląd dostępnych danych dotyczących związku pomiędzy nieprawidłowościami flory jelitowej a rozwojem choroby niedokrwiennej serca. Projekt zgodnie z obecnymi standardami zarejestrowany został w bazie International Prospective Register of Systematic Reviews PROSPERO ID CRD42020187549. Prace wykonano zgodnie z wytycznymi PRISMA. Spośród 1181 zidentyfikowanych artykułów, do przeglądu systematycznego włączono 21 prac, natomiast meta-analizą objęto 7 prac spełniających przyjęte kryteria. Wykonany przegląd systematyczny i meta-analiza wskazały na silną korelację między dysbiozą jelita a rozwojem zmian miażdżycowych wśród osób z chorobami sercowo-naczyniowymi. Wśród osób z chorobą niedokrwinną serca obserwowano m.in. spadek liczebności *Bacteroides*.

W podsumowaniu Doktorant zaznaczył, że bezpośrednie i znaczące zwiększenie stresu oksydacyjnego oraz trombogenności komórek śródbłonka występowało przy podwyższonych stężeniach endotoksyny i indoksyłu stwierdzonych w surowicy chorych, szczególnie po połączeniu obu metabolitów – co wskazuje na ich współtoksyczność. Oceniane metabolity znacząco zwiększały stres oksydacyjny i trombogenność śródbłonka również pośrednio, wskazując, że ich obecność w krążeniu, nawet w minimalnych stężeniach, aktywuje makrofagi i zwiększa ich toksyczność.

Doktorant prawidłowo dobrał i zastosował metody statystyczne.

Dyskusja w obu publikacjach włączonych do cyklu została zaprezentowana w logiczny i przystępny sposób, pozwalając zrozumieć przeprowadzone analizy i uzyskane wyniki w zakresie oceny mikrobiomu jelit osób z chorobą niedokrwinną serca i osób zdrowych,

porównania uzyskanych wyników sekwencjonowania mikrobiomu z dostępnymi danymi na temat zmian mikrobiomu jelit w chorobach sercowo-naczyniowych oraz analizy wpływu wybranych metabolitów bakteryjnych na komórki śródbłonka w badaniach *in vitro*.

Wnioski w poszczególnych pracach odnoszą się do sformułowanych wyjściowo celów każdej analizy. Całość rozprawy Doktorant podsumował w czterech punktach, wskazując iż: i) chorobie niedokrwiennej serca towarzyszy dysbioza jelit, która promuje zmiany trombogeniczne śródbłonka naczyniowego, ii) u chorych z chorobą niedokrwinną serca znamienne jest spadek liczebności *Bacteroides* oraz wzrost liczebności *Proteobacteria* w mikrobiomie jelit – zmiany te stanowią czynnik promujący miażdżycę naczyń wieńcowych, iii) bakteryjne metabolity przeciekające z jelit do krwi w warunkach dysbiozy w klinicznie nieistotnych stężeniach, wzajemnie potęgują swój toksyczny wpływ na śródbłonek naczyniowy, iv) zmiana diety, wpływając na profil mikrobioty jelit i jej aktywność metaboliczną może stanowić ważny element terapeutyczny w chorobach sercowo-naczyniowych.

Zarówno w dysertacji, jak i w każdej z prac wchodzących w skład cyklu publikacji znajdują się rzetelnie przygotowane podrozdziały Ograniczenia badania (*Limitations*), świadczące o dojrzałości badawczej Doktoranta. Streszczenia w języku polskim i angielskim zostały przedstawione w sposób przejrzysty i podsumowują najważniejsze aspekty rozprawy. Warto zaznaczyć, że przedstawione badania Doktorant realizował jako beneficjent grantu dla wybitnych doktorantów Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu uzyskanego w 2020 r.

Pytania i uwagi do Doktoranta:

- 1) Czy rozważano doprecyzowanie kryteriów włączenia w celu uzyskania bardziej homogennej grupy badanej obejmującej np. specyficznie pacjentów z przewlekłym lub pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym?
- 2) W badaniu jako grupę kontrolną przanalizowano 15 zdrowych ochotników. W jaki sposób weryfikowano ich stan zdrowia przed włączeniem do grupy kontrolnej?
- 3) Ilu chorych spośród włączonych do badania pacjentów miało interwencję na tętnicy wieńcowej z implantacją stentu, ilu z nich przyjmowało lek przeciwplatek (np.



kwas acetylosalicylowy) w chwili pobrania krwi i kału na badania? Czy leczenie przeciwplatekcyjne może wpływać na mikrobiom jelitowy?

- 4) Czy zdaniem Doktoranta ocena metabolitów bakteryjnych w osoczu lub w kale może w przyszłości mieć znaczenie w predykcji destabilizacji blaszki miażdżycowej i w konsekwencji ostrego zespołu wieńcowego?
- 5) Doktorant prawidłowo opisał ograniczenia badania w postaci małej grupy badanej, dostrzegł i skomentował także istotną różnicę w reprezentacji płci w grupie badanej vs. grupie kontrolnej. Przy tak nielicznej grupie analizowanych chorych pewne wątpliwości mogą budzić także numeryczne różnice w wieku grupy badanej (67 ± 9 [54-90]) i grupy kontrolnej ($57,2 \pm 11$ [47-74]).

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi oryginalne dokonanie Doktoranta i świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu pracy naukowej, wymaganym od kandydata na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2018 poz. 1668) w związku z czym mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. Marcina Choroszego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając istotne znaczenie podjętych badań, ich nowatorski charakter oraz zaprezentowaną przez Doktoranta bardzo dobrą znajomość zakresu podjętej problematyki, pozwalam sobie także postawić wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Łączę wyrazy szacunku i poważania,



Dr hab. n. med. i n. o zdr. Mariusz Tomaniak

I Katedra i Klinika Kardiologii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego