

Dr hab. n. med. Michał Hawranek  
Kierownik Pracowni Hemodynamiki  
III Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii  
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze,  
Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska  
Śląskie Centrum Chorób Serca  
Sklodowskiej-Curie 9, 41-800 Zabrze

Zabrze, 15.07.2023

## **Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych**

**lekarza Marcina Choroszy**

**zatytułowanej**

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

### **UWAGI WSTĘPNE**

Przedstawiona praca doktorska pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych” została przygotowana przez lek. Marcina Choroszy pod opieką naukową Prof. dr hab. Beata Sobieszcańska z Katedra i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. WHO-World Health Organization), choroby sercowo-naczyniowe (CVD) pozostają główną przyczyną śmierci i niepełnosprawności na całym świecie. Dzięki rozwojowi metabolomiki i metagenomiki, mikrobiota jelitowa coraz częściej jest wskazywana jako modulator przebiegu CVD. Aktywność mikrobioty jelitowej prowadzi do powstania cząsteczek, które po wchłonięciu z jelita uczestniczą bezpośrednio lub pośrednio w patogenezie CVD.

Pojedyncza warstwa komórek śródbłonna, mająca bezpośredni kontakt z krwią, odgrywa główną rolę w początkowych etapach rozwoju miażdżycy. Ekspozycja śródbłonna na działanie sił mechanicznych (przepływ krwi pod ciśnieniem) lub związków chemicznych (toksyczne metabolity, wolne rodniki) może prowadzić do jego dysfunkcji. Pierwszym etapem tworzenia blaszki miażdżycowej jest dysfunkcja komórek śródbłonna, która obejmuje zmiany metaboliczne, morfologiczne i czynnościowe komórek. Aktywowane zapalnie komórki śródbłonna zmieniają swój kształt, co wpływa na utratę ciągłości bariery błony wewnętrznej i ułatwia penetrację lipoprotein osocza w głąb ściany naczynia. Wśród licznych czynników indukujących rozwój zmian miażdżycowych takich jak hiperlipidemia, nadciśnienie oraz cukrzyca, coraz częściej wymieniana jest mikroflora jelit.

Bakterie wchodzące w skład mikrobioty jelitowej można podzielić na cztery najważniejsze gromady: : *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. Dysbioza jelit związana ze wzrostem liczebności jednej z gromad np. obejmujących bakterie Gram-ujemne, będące źródłem endotoksyny i spadkiem liczebności innej gromady np. obejmującej bakterie Gram-dodatnie, będące

producentami korzystnych dla człowieka krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA). Taki stan powoduje spadek SCFA oraz wzrost poziomu endotoksyny w krwiobiegu- endotoksemi.

W rozwoju chorób sercowo-naczyniowych szczególna rola przypisywana jest metabolitom bakteryjnym o udowodnionym działaniu toksycznym dla komórek śródbłonka w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* na modelu zwierzęcym. Do proaterogennych metabolitów zaliczany jest dobrze scharakteryzowany tlenek trimetyloaminy (TMAO), który indukuje stres oksydacyjny w śródbłonku i zwiększa jego trombogenność. Podobnie szkodliwy wpływ na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych wywiera indoksył, wątrobowy metabolit bakteryjnego indolu. Indoksył usuwany jest z krążenia poprzez filtrację nerkową, stąd u chorych z zaburzoną funkcją nerek, metabolit ten osiąga we krwi wysokie stężenia, toksyczne dla śródbłonka naczyń krwionośnych. Poza metabolitami, dysbioza przyczynia się do przeciekania do krwiobiegu bakteryjnych antygenów, z których endotoksyna (lipopolisacharyd, LPS) pełni istotną rolę w indukowaniu ogólnoustrojowego stanu zapalnego. W ostatnich latach znacząco wzrosła liczba badań wskazujących na rolę metabolicznej endotoksemii w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i miażdżycy naczyń krwionośnych.

Endotoksemia metaboliczna definiowana jest jako niewielki wzrost poziomu LPS w osoczu (2-3-krotny wzrost ponad poziom wykrywany u osób zdrowych), który towarzyszy diecie o wysokiej zawartości tłuszczów nasyconych [26,27]. W przeciwieństwie do ostrej endotoksemii, związanej z bakteryjnym zakażeniem krwi, np. bakterie miażdżycy i sepsą, metaboliczna endotoksemia charakteryzuje się obecnością niskiego poziomu LPS we krwi (<10 ng/ml) i podoстрыm, ogólnoustrojowym stanem zapalnym, prowadzącym ostatecznie do rozwoju szeregu chorób [28,29]. Endotoksyna może być produkowana przez bakterie zasiedlające różne okolice organizmu człowieka, np. przez mikrobiotę jamy ustnej, jednak jej głównym źródłem we krwi jest mikrobiota jelitowa.

Dane z aktualnych publikacji wskazują na istotną rolę mikrobioty jelitowej jako czynnika ryzyka rozwoju miażdżycy. Dodatkowo, szereg związków z nią związanych, takich jak cytrulina czy TMAO może mieć związek z rokowaniem pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i stanowić element stratyfikacji ryzyka. Podjęty przez doktoranta temat jest aktualny i w istotny sposób może wpłynąć na obecny stan wiedzy w tym obszarze. Profilaktyka rozwoju miażdżycy jest jednym z podstawowych celów medycyny sercowo-naczyniowej a wskazanie kolejnych obszarów terapeutycznych, które mogą pozytywnie wpłynąć na redukcję populacyjnego ryzyka rozwoju miażdżycy ma duże znaczenie kliniczne.

## **OCENA FORMALNA**

Praca doktorska ma postać 98-stronicowej monografii, włączając w to streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię. Praca została podzielona na piętnaście rozdziałów i ma typowy układ dla oryginalnych prac badawczych z wyraźnym podziałem na wstęp, cele, metodykę i materiał badawczy, wyniki, wnioski. Rozprawa została oparta o cykl dwóch spójnych tematycznie artykułów – jednej pracy oryginalnej i jednej metaanalizy, które zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania:

1. **Choroszy M**, Sobieszcańska B, Litwinowicz K, Łaczmanski Ł, Chmielarz M, Walczuk U, Roleder T, Radziejewska J, Wawrzyńska M. *Co-toxicity of Endotoxin and Indoxyl Sulfate, Gut-Derived Bacterial Metabolites, to Vascular Endothelial Cells in Coronary Arterial Disease Accompanied by Gut Dysbiosis*. *Nutrients* 2022;14(3):424.

**IF: 6,706 Pkt MNiSW: 140**

2. **Choroszy M**, Litwinowicz K, Bednarz R, Roleder T, Lerman A, Toya T, Kamiński K, Sawicka-Śmiarowska E, Niemira M, Sobieszcańska B. *Human Gut Microbiota in Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Metabolites* 2022; 12(12):1165

**IF: 5,581 Pkt MNiSW: 100**

Łączny IF dla prac włączonych do cyklu wynosi 12,287 a punktacja MNiSW wynosi 240 punktów. Nie podano procentowego wkładu doktoranta w poszczególne prace. Rozprawa zawiera 5 rycin. Należy zaznaczyć, że rycina 4 i 5 nie posiada opisu oraz numeru ryciny.

Doktorant zebrał pełne, wartościowe i aktualne piśmiennictwo – łącznie 38 pozycji. Większość pozycji piśmiennictwa cytowanych przez Doktoranta zostało opublikowanych w czasopismach anglojęzycznych o wysokim wskaźniku oddziaływania. O znaczeniu i aktualności tematu podjętego przez Doktoranta wskazuje fakt, że wiele pozycji piśmiennictwa pochodzi z ostatnich pięciu lat.

## **WSTĘP**

Zawiera 6 stron, na których Doktorant w sposób syntetyczny opisuje przesłanki patofizjologiczne oraz obecny stan wiedzy dotyczący roli mikrobioty jelitowej zarówno w kontekście obserwowanych różnic w jej składzie u osób z miażdżycą jak i wpływu poszczególnych substancji na funkcję śródbłonka. Wstęp jest syntetyczny, wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne Doktoranta, zorientowanie w przedmiocie tematu oraz umiejętność krytycznej analizy wyników literaturowych, co prowadzi w logiczny sposób do przedłożenia założeń i celów badania. Wstęp zawiera dodatkowo starannie opracowane ryciny ilustrujące rolę procesu zapalnego w rozwoju blaszek miażdżycowych. Stanowią one istotne uzupełnienie treści i jako że nie posiadają źródeł zakładam, że zostały przygotowane przez Doktoranta. Należy podkreślić ich wysoką jakość i ilustratywność.

## **ZAŁOŻENIE I CELE PRACY**

Cele pracy zostały przedstawione zwięźle i wynika z wstępu oraz przesłanek do przeprowadzonych badań.

1. Celem podjętych badań była analiza porównawcza mikrobiomu jelit osób z chorobą niedokrwienną serca i osób zdrowych oraz ocena wpływu wybranych metabolitów bakteryjnych na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych.

Realizacja celu pracy składała się z dwóch części, z których każda obejmowała dwa etapy:

1. a) analiza mikrobiomu jelit osób z chorobą niedokrwienną serca i osób zdrowych  
b) analiza porównawcza uzyskanych wyników sekwencjonowania mikrobiomu z dostępnymi danymi na temat zmian mikrobiomu jelit w chorobach sercowo-naczyniowych
2. a) wpływ wybranych na podstawie wyników analizy mikrobiomu metabolitów bakteryjnych na komórki śródbłonka - badania *in vitro*

Uważam, że hipotezy badawcze oraz cele pracy są poprawnie sformułowane. Z uwagi na relatywnie niewielką liczbę opublikowanych badań obserwacyjnych w tym obszarze praca Doktoranta stanowi istotne uzupełnienie aktualnego stanu wiedzy. Zrealizowanie założonego planu badania może przełożyć się na praktykę kliniczną poprzez określenie roli mikrobiomu jelit w schorzeniach sercowo-naczyniowych oraz wpływie na funkcję śródbłonka naczyń.

## **MATERIAŁ I METODY**

Rozdział ten obejmuje 7 stron i szczegółowo opisuje materiał oraz metodykę pracy oryginalnej. Przedstawia charakterystykę badanej populacji, metody pobierania próbek oraz oznaczenie poziomów endotoksyny i indoksyłu w surowicy badanych osób a także metody zastosowane do analizy mikrobiomu jelit badanych osób. W dalszej części opisane są metody zastosowane w badaniach *in vitro*. Przedstawiona metodyka świadczy o dobrym przygotowaniu doktoranta do prowadzenia badań i ilustruje złożoność badań przeprowadzanych *in vitro*.

## **PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Pierwsza praca cyklu obejmowała badanie 15 chorych z potwierdzoną chorobą niedokrwienną serca oraz 15 zdrowych ochotników. W ramach badań, metodą sekwencjonowania 16rRNA przeanalizowany został skład mikroflory jelitowej. Wyniki tej analizy dały podstawę wyboru rodzaju i stężenia bakteryjnych metabolitów do badań *in vitro* na komórkach śródbłonka. Przeprowadzona analiza wykazała u osób z chorobą niedokrwienną serca, podobnie jak przegląd systematyczny z meta-analizą, znaczący spadek ilości *Bacteroidetes* oraz wzrost ilości Gram-ujemnych pałeczek jelitowych, będących źródłem endotoksyny (LPS) oraz indolu. Indol powstający w jelitach jest konwertowany w wątrobie do siarczanu indoksyłu (IS)- toksycznego metabolitu, który po związaniu z

albuminą osocza jest usuwany z organizmu przez nerki. Upośledzona funkcja nerek uniemożliwia prawidłowe usuwanie IS z organizmu, co prowadzi do kumulowania się tego związku w toksycznym stężeniu, stąd zaliczany jest do toksyn mocznicowych. Poziom indoksyłu, oznaczony w próbkach krwi pobranych od badanych osób chorych i zdrowych, był bardzo niski (ok. 13  $\mu\text{M}$ ), gdyż z badań wyeliminowano pacjentów obciążonych chorobami nerek. W przeciwieństwie do indoksyłu, poziom endotoksyny u chorych był znacząco wyższy niż u osób zdrowych— średni poziom endotoksyny w grupie chorych wynosił ok. 3 ng/ml, natomiast w grupie osób zdrowych poziom LPS był poniżej progu wykrywalności testu LAL zastosowanego w badaniach. Dotychczas nie badano wpływu niskich stężeń indoksyłu oraz endotoksyny na śródbłonek naczyń krwionośnych, co było nowatorskim elementem moich badań, podobnie jak ocena współtoksyczności indoksyłu i endotoksyny. Oba te metabolity w niskich stężeniach wywierały znaczący, szkodliwy wpływ na komórki śródbłonna, przejawiający się stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym oraz zwiększoną trombogennością. Ponadto, stymulacja komórek śródbłonna endotoksyną i indoksyłem potęgowała szkodliwy wpływ każdego z badanych metabolitów stosowanych osobno. Wyniki tych badań potwierdziły, że wzrost ilości pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz ich potencjalnie toksycznych metabolitów, przy równoczesnym spadku korzystnie oddziałujących bakterii beztlenowych z gromady *Bacteroidetes*, może promować zmiany chorobowe w śródbłonie naczyniowym.

Prezentowana analiza wnosi istotne informacje związane z wpływem mikroflory jelitowej i jej metabolitów na śródbłonek naczyń krwionośnych. Przedstawione wyniki mogą świadczyć, że zaburzenia mikrobioty jelitowej mogą być jednym z czynników predysponujących do rozwoju miażdżycy, w tym miażdżycy tętnic wieńcowych. Potwierdzenie tego faktu może prowadzić do rozwoju kolejnych strategii redukcji ryzyka rozwoju schorzeń sercowo-naczyniowych.

Drugą pracą oryginalną wchodząca w skład cyklu jest systematyczny literatury naukowej wraz z meta-analizą, którego wyniki zostały przedstawione w publikacji pt. „*Human gut microbiota in coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis*”, umożliwiły mi określenie zmian profilu mikrobioty jelit w chorobach sercowo-naczyniowych, które mogą być związane z jej niekorzystnym wpływem na śródbłonek naczyniowy. Materiały włączone do przeglądu systematycznego pochodziły z 21 oryginalnych prac badawczych, jednak Autorzy tylko siedmiu z nich udostępnili dane konieczne do przeprowadzenia meta-analzy. Najważniejszą różnicą wykazaną w tych badaniach było znacznie zmniejszone zróżnicowanie mikroflory jelit u osób chorych (obniżone wskaźniki alpha i beta różnorodności), wyraźnie wskazujące na dysbiozę jelit u chorych. Główne różnice w składzie mikrobiomu u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca dotyczyły zmniejszonej ilości bakterii z gromady *Bacteroidetes* i z rodziny *Lachnospiraceae* oraz wzrostu ilości bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, a także rodzaju *Lactobacillus* oraz *Streptococcus* w porównaniu do osób zdrowych. Wykazane zmiany składu i ilości mikrobioty jelit mogą stanowić potencjalny czynnik niekorzystnie wpływający na śródbłonek naczyniowy.

Prezentowana metaanaliza została przeprowadzona w sposób prawidłowy i obejmuje wszystkie istotne publikacje z tego obszaru. Wnioski z tej pracy są logicznym wstępem do pracy oryginalnej wchodzącej w skład cyklu.

## **WYNIKI**

W rozprawie nie ma osobnego rozdziału opisującego wyniki. Niemniej jednak są one zawarte w pracach włączonych do cyklu. Dodatkowo, na stronie 70 znajduje się podsumowanie wyników badań

## **DYSKUSJA**

Rozprawa nie zawiera osobnego rozdziału pod tytułem dyskusja. Wyniki zostały wyczerpująco przedyskutowane w poszczególnych pracach cyklu. Biorąc pod uwagę charakter prac zasadnym byłoby dodanie rozdziału „Ograniczenia analizy”

## **WNIOSKI**

Wnioski są sformułowane zwięźle i wynikają z wyników przeprowadzonej pracy badawczej, a także odpowiadają na postawione na wstępie cele badania. Potwierdzają one nie tylko znaczenie badawcze uzyskanych wyników, ale także możliwość praktycznego przełożenia wniosków na praktykę kliniczną. Wydaje się, że we wniosku drugim zdanie „Zmiany te stanowią czynnik promujący miażdżycę naczyń krwionośnych” nie wynika z przeprowadzonej analizy. Podobnie, wniosek 4 wskazuje raczej perspektywy dalszych działań niż podsumowuje przeprowadzone badania (w analizach brak porównania wpływu diety na mikrobiotę jelitową).

## **UWAGI I KOMENTARZE**

W odniesieniu do ewentualnych ograniczeń rozprawy oraz moich uwag pragnę zauważyć, że analizowana rozprawa doktorska nie ma istotnych ani merytorycznych wad. Prace wchodzące w skład cyklu zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach i nie wymagają istotnego komentarza.

Przedstawione powyżej uwagi po części wynikają z ciekawości naukowej recenzenta, a ponadto mają w większości mają charakter techniczny. Nie mają wpływu na wysoką ocenę merytoryczną dysertacji.

## UWAGI KOŃCOWE

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska lek. Marcina Choroszczy pt „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668) i może być skierowana do publicznej obrony.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Marcina Choroszczy jest pracą wartościową pod względem naukowym, dobrze przygotowaną warsztatowo i wnosi elementy poznawcze związane z rolą dysbiozy jelitowej w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.

Dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Marcina Choroszczy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, zważywszy na nowatorskie elementy poznawcze zawarte w recenzowanej dysertacji, a także potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Dr hab. n. med.  
**Michał Hawranek**  
Specjalista chorób wewnętrznych  
KARDIOLOG

