



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

INSTYTUT GENETYKI I MIKROBIOLOGII

ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocławtel. +48 71 375 62 13 | +48 71 325 21 51
fax +48 325 21 51

igm@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

Uniwersytet Medyczny
we WrocławiuRPW/11186/2023 P
Data: 2023-07-04

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77
51-148 Wrocław
tel. +48 71 37 56 290

Wrocław, 2023-06-28

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. Marcina Choroszy,
zatytułowana

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

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. Marcina Choroszy została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Beaty Sobieszkańskiej z Katedry i Zakładu Mikrobiologii, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Praca z obszaru medycyny, metagenomiki, metabolomiki, oraz mikrobiologii i immunologii poświęcona jest roli mikroflory w chorobach sercowo-naczyniowych.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie były realizowane przy finansowaniu w ramach dwóch grantów badawczych:

1. Uczelniany grant dla młodych naukowców nr STM.A130.20.158 pt. „Wpływ indykanu na stres oksydacyjny komórek śródbłonna u osób z chorobami sercowo-naczyniowymi.” Okres finansowania: styczeń 2020 – grudzień 2020.
2. Grant nr RID.Z501.20.009 dla wybitnych doktorantów pt. „The heart-gut axis: role of bacterial metabolites in the atherogenesis”, realizowany w ramach środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie „Regionalna Inicjatywa Doskonałości”. Środki w wysokości 50 tys zł na realizację w latach 2020 – 2022.

OCENA MERYTORYCZNA

Choroby układu krążenia, w tym niedokrwienne serca, są chorobami cywilizacyjnymi, dotyczącymi głównie osób z krajów rozwiniętych. Jednymi z przyczyn pogorszenia kondycji zdrowotnej osób chorych są długotrwały stan zapalny i miażdżycy tętnic wieńcowych towarzyszące nadciśnieniu tętniczemu, zaburzeniom metabolicznym lipidów, otyłości czy nałogowemu paleniu papierosów. W ostatnich latach wiele badań wskazuje na znaczący wpływ mikrobiomu na funkcjonowanie organizmu człowieka, zarówno w aspekcie ochrony przed patogenami, immunomodulacyjnym, metabolicznym, czy funkcjonowania różnych układów, w tym nerwowego

i krążeniowego. Dlatego też problematyka badawcza pracy doktorskiej Pana Marcina Choroszego skupia się na tym aktualnie ważnym temacie oceny potencjalnego związku pomiędzy różnym składem mikrobioty jelitowej a chorobami sercowo-naczyniowymi, w tym chorobą niedokrwienną serca („oś serce-jelito”).

Oryginalność podjętych badań dotyczyła analizy składu flory bakteryjnej jelit osób z chorobą niedokrwienną serca i osób zdrowych oraz powiązania tych wyników z oceną wpływu wybranych metabolitów bakteryjnych na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych. Ponieważ nadal nie do końca wiadomo, jakie dokładnie składniki mikroflory jelit są związane z chorobą niedokrwienną serca, oraz jakie potencjalnie metabolity bakterii są niekorzystne lub korzystne w rozumieniu zdrowia człowieka, dlatego uzyskane rezultaty badań mogą mieć znaczący wpływ na prewencję i predykcję oraz personalizowaną terapię chorób niedokrwiennych w przyszłości, co ma ogromne znaczenie dla poprawy zdrowia całej populacji.

Praca doktorska oparta jest na cyklu dwóch monotematyczny oryginalnych prac anglojęzycznych w recenzowanych czasopismach naukowych znajdujących się na liście filadelfijskiej:

1. Choroszy M, Sobieszcańska B, Litwinowicz K, Łaczmański 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**

Sumaryczny IF = 12,287

Sumaryczna punktacja MEiN = 240 pkt

W obu pracach z cyklu monotematycznego Doktorant jest pierwszym i wiodącym autorem zaangażowanym w tworzenie koncepcji badania, metodologię, analizy oraz opracowanie wyników, i przygotowanie finalnej wersji manuskryptów. Co więcej w artykule nr 2 opublikowanym w *Metabolites*, Pan Marcin Choroszy jest również autorem korespondencyjnym.

W pierwszym artykule zakres prac doświadczalnych wykonanych przez Doktoranta obejmował:

- a) analizę mikrobiomu jelit 15 badanych chorych i 15 zdrowych osób z wykorzystaniem metody biologii molekularnej, która opiera się na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z amplifikacją bakteryjnego 16S rRNA. Metoda ta pozwala na identyfikację genomów drobnoustrojów tworzących dany ekosystem.

b) ocenę wpływu wybranych metabolitów na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych - badania *in vitro* z wykorzystaniem modelowych toksyn: endotoksyny (LPS) oraz siarczanu indoksyłu (wątrobowego metabolitu indolu wytwarzanego przez bakterie jelitowe).

Oceniano wybrane parametry komórkowe: żywotność i morfologię, poziom wytwarzanych wolnych rodników tlenowych oraz wybrane cechy swoiste dla trombogennych komórek tj., poziom prezentowanej E-selektyny, adhezję monocytów i poziom uwalnianej chemokiny prozapalnej MCP-1, będącej chemoatraktantem dla monocytów. Oceniano zarówno bezpośredni jak i pośredni wpływ każdego metabolitu oraz ich połączeń na śródbłonek naczyniowy.

Drugi artykuł stanowiący cykl publikacji dotyczył analizy porównawczej (meta-analiza i przegląd systematyczny) dostępnych danych na temat zmian mikrobiomu jelit w chorobach sercowo-naczyniowych, włącznie z analizami statystycznymi.

W efekcie realizacji pracy doktorskiej zdołano wykazać, że:

1. Chorobie niedokrwiennej serca towarzyszy dysbioza jelit, która promuje zmiany trombogenne śródbłonna naczyniowego.
2. U chorych z chorobą niedokrwinną serca znamienne jest spadanie liczby *Bacteroidetes* oraz wzrost liczby *Proteobacteria* w mikrobiomie jelit. Zmiany te stanowią czynnik promujący miażdżycę naczyń krwionośnych.
3. Bakteryjne metabolity przeciekające z jelit do krwi w warunkach dysbiozy, w klinicznie nieistotnych stężeniach, wzajemnie potęgują swój toksyczny wpływ na śródbłonek naczyniowy.
4. Zmiana diety, wpływając na profil mikrobioty jelit i jej aktywność metaboliczną może stanowić ważny element terapeutyczny w chorobach sercowo-naczyniowych.

Podsumowując część dysertacji poświęconej opisowi cyklu prac oryginalnych, stwierdzam, że podjęte nowe obszary badawcze oraz zakres wykonanych eksperymentów, analiz i uzyskanych wyników, z nadmiarem spełniają wymagania stawiane pracom doktorskim. Doktorant udowodnił, że ma umiejętność dostrzegania, formułowania i rozwiązywania postawionego problemu badawczego, a następnie go analizuje i krytycznie dyskutuje.

Moje pytania i uwagi do Doktoranta:

1. Prosiłabym o doprecyzowanie udziału własnego Doktoranta w realizację badań i przygotowanie obu publikacji.
2. Prosiłabym o uzupełnienie wniosków płynących z drugiej publikacji, bo dyskusja tam zawarta była bardzo wnosząca i ciekawa.
3. Prosiłabym o wyjaśnienie rozbieżności pomiędzy opisem enterotypów I-III i ich przedstawicieli, a opisem podsumowania wniosków zamieszczonych w punkcie na stronie 70:
„Wzrost liczby bakterii z grup *Firmicutes* i *Proteobacteria*, czyli przewagę enterotypu III, dominującego przy diecie bogato-białkowej i bogato-tłuszczowej.
• Znaczący spadek liczby bakterii z grupy *Bacteroidetes*, wskazujący niedobór enterotypu II, dominującego przy diecie agrarnej, tj. opartej na warzywach i ziarnach.”
4. Czy rzeczywiście sama zmiana diety jest w stanie znacząco i stabilnie wpłynąć na profil mikrobioty jelit, tak aby uzyskać skład gatunkowy korzystny pod względem metabolicznym? Innymi słowy, czy braki pewnych gatunków korzystnych dla zdrowia lub obecność gatunków szkodliwych jesteśmy w stanie uzupełnić/eradykować jedynie przy doborze odpowiedniej diety?
5. Jakiego Pana zdaniem ma znaczenie ogólnodostępność i szerokie spożycie preparatów probiotycznych zawierających bakterie mlekowe (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) oraz produktów spożywczych fermentowanych na chorobę niedokrwienną serca? Czy wnioski płynące z meta-analizy w publikacji 2 oznaczają bezpośredni związek tych drobnoustrojów z jednostką chorobową, czy może jest to zbieg dwóch niezależnych sytuacji, czyli że nawyki żywieniowe (spożycie pokarmów fermentowanych) są jedynie efektem towarzyszącym, a nie przyczyną choroby. Do tej pory twierdziliśmy, że taka dieta jest ze wszech miar pożyteczna dla utrzymania dobrej kondycji zdrowotnej.
6. Podobne pytanie: Jaka dieta według Pana będzie korzystnie wpływać na utrzymanie odpowiedniej proporcji głównych grup mikroflory jelitowej, czyli poszczególnych enterotypów?
7. Czy wiadomo coś o znaczącym innych metabolitów bakteryjnych niż te badane w pracy, na kondycje zdrowotną człowieka?
8. W części „Wstęp” brakuje źródeł pochodzenia Rycin 1-3.

OCENA METODOLOGICZNA

Co do formalnej strony dysertacji, Doktorant, zastosował układ oraz sposób prezentacji odpowiedni dla cyklu monotematycznego przyjęty dla prac doświadczalnych w naukach medycznych. Dysertacja zawiera ogółem 98 stron i składa się z następujących części:

Streszczenie, Summary, Wstęp, Cele i założenia projektu badawczego, Materiały i Metody, Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej (strony 27-69), Podsumowanie wyników badań, Wnioski, Piśmiennictwo z 38 anglojęzycznymi pozycjami bibliograficznymi z listy JCR publikowanymi w ostatnich 20 latach, Nota Biograficzna z podaniem źródła finansowania badań, Dorobek naukowy Doktoranta, Oświadczenia Współautorów zamieszczone na stronach 80-93, Załączniki zawierające kopie zgód Komisji Bioetycznej, Wykaz zastosowanych skrótów.

Czytając część opisową, cel i metodologię pracy, stwierdzam, że Kandydat posiada szeroką wiedzę specjalistyczną w tematyce klinicznych i mikrobiologicznych aspektów chorób, a jednocześnie potrafi klarownie i przystępnie opisać najważniejsze elementy konieczne do wprowadzenia czytelnika w obszar teoretyczny i praktyczny pracy. Rozdział Materiały i Metody składa się z 6 punktów, które dotyczyły głównie badań opisanych w **artykule 1:**

- 5.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów z uwzględnieniem uzyskania wymaganych zgód komisji bioetycznej
- 5.2. Opis poboru materiału klinicznego od pacjentów (próbki kału i surowicy)
- 5.3. Oznaczenia poziomów endotoksyny i indoksyłu w surowicy badanych osób
- 5.4. Metody zastosowane do analizy mikrobiomu jelit badanych osób
- 5.5. Metody zastosowane w badaniach in vitro (hodowle linii komórkowych, żywotność i morfologia komórek, różnicowanie monocytów w makrofagi, uzyskanie podłoży kondycjonowanych, stymulacja komórek HUVEC, badania trombogenności komórek śródbłonna)
- 5.6. Analizy statystyczne

Metodologia analiz porównawczych: meta-analiza i przegląd systematyczny dostępnych danych na temat zmian mikroflory jelit w chorobach sercowo-naczyniowych, opisane zostały w głównej mierze w załączonej publikacji 2.

Założenia pracy zostały jasno przedstawione na bazie aktualnego stanu wiedzy i luk poznawczych posiłkując się bardzo dobrze dobraną literaturą anglojęzyczną z listy JCR. Tekst pracy jest napisany starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym, z wykorzystaniem poglądowych rycin, w tym przedstawiających wizualizację planów badawczych, sposób realizacji celów i schemat eksperymentalny.

Ocena pozostałego dorobku Kandydata

Poza opublikowanym cyklem prac monotematycznych, Pan Choroszy jest również współautorem 7 prac naukowych, w tym 4 opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach z listy Journal Citation Report:

- Scientific Reports, 2022, 140 punktów, IF (4,997)
- Sports Medicine, 2021, 200 punktów, IF (11,928)
- Virulence, 2021, 100 punktów, IF (5,428)
- American Journal of Drug and Alcohol Abuse, 2020, 70 punktów, IF (3,829)


Całościowy punktowy dorobek publikacyjny Kandydata wynosi: Sumaryczny IF: 38,469 oraz Sumaryczna punktacja MEIN: 765 pkt.

Doktorant był aktywnie zaangażowany w zdobywanie finansów na realizację projektów badawczych, między innymi w ramach funduszy dla wybitnych doktorantów. W dorobku nie ma niestety informacji na temat prezentacji wyników przez Doktoranta na konferencjach naukowych.

Podsumowanie rozprawy doktorskiej - konkluzja

Podsumowując przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską Pana lek. Marcina Choroszy, stwierdzam, że jest to nowatorska praca badawcza, której wyniki zostały opublikowane w formie monotematycznego cyklu w anglojęzycznych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF). Rozprawa została napisana w sposób przejrzysty i zrozumiały, z zachowaniem ciągłości logicznej przeprowadzanych analiz i wyciąganych wniosków oraz przy wykorzystaniu odpowiednich źródeł literatury międzynarodowej z listy JCR. Kandydat wykazał się dużymi umiejętnościami stosowania metod i technik badawczych w zakresie współczesnej metagenomiki, meta-analiz, statystyki oraz mikrobiologii i medycyny. Poza tym, pozostała aktywność naukowa, w tym dorobek publikacyjny Doktoranta oraz efektywne zdobywanie finansów na realizację badań przy jednoczesnym realizowaniu staży podyplomowych oraz rezydentury w dziedzinie kardiologii, zasługują na pochwałę. Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedkładam na ręce Przewodniczącego Wysockiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie lek. Marcina Choroszy do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
KIEROWNIK

prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa