

## STRESZCZENIE

Choroby sercowo-naczyniowe, do których zaliczamy chorobę niedokrwienną serca, są obecnie jednymi z najistotniejszych chorób cywilizacyjnych, które dotyczą miliony osób na całym świecie. Chorobę niedokrwienną serca charakteryzuje zaburzenie równowagi pomiędzy podażą, a zapotrzebowaniem mięśnia sercowego w tlen. Najczęstszą przyczyną zachwiania tej równowagi jest miażdżyca tętnic wieńcowych unaczyniających serce, której podłożem jest przewlekły proces zapalny. Stan ten prowadzi do rozwoju swoistych zmian w ścianie naczynia, tzw. blaszek miażdżycowych, które zwężają jego światło. Znanych jest wiele czynników ryzyka prowadzących do miażdżycy, a tym samym do choroby niedokrwiennej serca, np. nadciśnienie tętnicze, nikotynizm, czy dyslipidemia. W ostatnim okresie coraz większą uwagę badaczy zwraca potencjalny związek pomiędzy nieprawidłowym składem mikroflory jelitowej, czyli dysbiozą jelit a chorobami sercowo-naczyniowymi, w tym chorobą niedokrwienną serca. Od czasu, w którym termin „oś serce-jelito” na stałe pojawił się w literaturze naukowej, przedstawiono liczne dowody wskazujące na rolę dysbiozy jelit w rozwoju miażdżycy tętnic wieńcowych. Wyniki wielu badań wskazują, że metabolity nieprawidłowej flory jelit dostające się do krwiobiegu indukują przewlekły stan zapalny śródbłonna naczyń krwionośnych, który może promować bądź przyspieszać rozwój miażdżycy. Nadal nie są znane zmiany mikroflory jelit ściśle związane z chorobą niedokrwienną serca. Wiedza ta umożliwiłaby podjęcie badań interwencyjnych, np. wskazanie diety umożliwiającej korzystne zmiany składu mikroflory jelit lub określenie czy stosowane leki nie ulegają degradacji lub niepożądanym modyfikacji w jelicie pod wpływem zmienionej mikroflory. Stąd, szczegółowe poznanie zmian mikroflory jelit i jej roli w rozwoju różnych chorób, nie tylko sercowo-naczyniowych, ma ogromne znaczenie dla poprawy zdrowia całej populacji. Obecne metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS), np. sekwencjonowanie 16S rRNA, a także badania metabolomiczne mikroflory jelit umożliwiają bardzo dokładne określenie jej profilu, co w niedalekiej przyszłości zapewne umożliwi dokładną charakterystykę mikrobioty w chorobach sercowo-naczyniowych oraz wskaże kierunki terapii spersonalizowanej.

Moja praca doktorska skupiła się na ocenie różnic profilu mikroflory jelit między osobami z chorobą niedokrwienną serca a osobami zdrowymi oraz na badaniach wpływu wybranych metabolitów bakteryjnych na komórki śródbłonna.

Przeprowadzony przeze mnie przegląd 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-analizy. 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, co potwierdziły moje kolejne badania prezentowane w publikacji pt. „*Co-toxicity of endotoxin and indoxyl sulfate, gut-derived bacterial metabolites, to vascular endothelial cells in coronary arterial disease accompanied by gut dysbiosis.*”

W ramach tych badań, metodą sekwencjonowania 16rRNA przeanalizowany został skład mikroflory jelitowej 15 chorych z chorobą niedokrwienną serca hospitalizowanych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu oraz 15 zdrowych ochotników. Wyniki tej analizy dały podstawę wyboru rodzaju i stężenia bakteryjnych metabolitów do badań *in vitro* na komórkach śródbłonna. 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 śródbłonce naczyniowym.

Uzyskane wyniki badań stanowią znaczący wkład w rozwijającą się dziedzinę wiedzy, jaką są wzajemne relacje między organizmem człowieka a kolonizującymi go drobnoustrojami.

## SUMMARY

Cardiovascular diseases, including ischemic heart disease, are currently one of the most significant civilization diseases, affecting millions of people worldwide. An imbalance between the supply and demand of oxygen to the heart muscle characterizes ischemic heart disease. The main cause of this imbalance is atherosclerosis of the coronary arteries, which is the result of a chronic inflammatory process that causes abnormal changes in the vessel wall, called atherosclerotic plaques, which narrow its lumen. Many risk factors, such as hypertension, nicotine use, and dyslipidemia, are known to lead to atherosclerosis. The potential link between an abnormal composition of the intestinal microflora, i.e., gut dysbiosis, and cardiovascular disease, including ischemic heart disease, has recently attracted increasing research attention. As the concept of the heart-gut axis has become more commonly recognized in the scientific literature, a number of studies have demonstrated the role of gut dysbiosis in coronary artery atherosclerosis. Numerous studies indicate that metabolites of abnormal intestinal flora entering the bloodstream induce chronic inflammation of the vascular endothelium, which can promote or accelerate the development of atherosclerosis.

Nevertheless, changes in the gut microflora associated explicitly with ischemic heart disease are still unknown. Through this knowledge, intervention studies could be conducted, for example, to identify a diet that will improve the composition of intestinal microflora or to determine whether the drugs administered are degraded or undesirably modified in the intestine by the altered microflora, leading to a loss of activity in the body. Hence, a detailed understanding of changes in the gut microflora and its role in the development of various diseases, not just cardiovascular diseases, is of great importance for improving the general population's health. Current next-generation sequencing (NGS) methods, such as 16S rRNA sequencing and metabolomic studies of the intestinal microflora, make it possible to determine its profile in great detail, which will probably enable accurate characterization of the microbiota in cardiovascular diseases and provide directions for personalized therapy.

My dissertation focused on evaluating the differences in the gut microbiota profile between people with ischemic heart disease and healthy individuals and studying the effects of selected bacterial metabolites on endothelial cells.

A systematic review of the scientific literature I have conducted and a meta-analysis is presented in the publication titled "Human gut microbiota in coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis" enabled me to identify changes in the gut microbiota profile in cardiovascular disease that may be related to its adverse effects on the vascular endothelium. The materials included in the systematic review came from 21 original research papers, but only 7 authors provided us with the data necessary for the meta-analysis. This study showed that patients with coronary artery disease had significantly reduced intestinal microbiota diversity (reduced alpha and beta diversity indices), clearly indicating intestinal dysbiosis. The main differences in the composition of the microbiome in patients with coronary artery disease were a decreased number of

bacteria from the *Bacteroidetes* cluster and the *Lachnospiraceae* family and an increase in the number of bacteria from the *Enterobacteriaceae* family, as well as the *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera, compared to healthy subjects. The demonstrated changes in the composition and quantity of the intestinal microbiota may be a potential factor adversely affecting the vascular endothelium, confirmed by my subsequent research in the publication "Co-toxicity of endotoxin and indoxyl sulfate, gut-derived bacterial metabolites, to vascular endothelial cells in coronary arterial disease accompanied by gut dysbiosis."

As part of this study, the composition of the intestinal microflora of 15 patients with ischemic heart disease hospitalized at the Regional Specialist Hospital in Wroclaw and 15 healthy volunteers was analyzed by 16 rRNA sequencing. The results of this analysis provided the basis for selecting the type and concentration of bacterial metabolites for in vitro studies on endothelial cells. The research showed a significant decrease in *Bacteroidetes* and an increase in Gram-negative *Enterobacteriaceae*, a source of endotoxin (LPS) and indole, in subjects with ischemic heart disease, as did a systematic review with meta-analysis. Indole formed in the intestines is converted in the liver to indoxyl sulfate, a toxic metabolite that kidneys remove from the body after binding to plasma albumin. This compound, at high concentrations, damages the kidneys (hence is termed uremic toxin) and is primarily associated with kidney disease. The level of indoxyl, determined in blood samples taken from sick and healthy subjects, was very low (about 13 uM) since ill and healthy subjects with any kidney disease were eliminated from the study. In contrast to indoxyl, the endotoxin level in the patients was significantly higher than in the healthy subjects - the average endotoxin level in the patient group was about 3 ng/ml, while in the healthy subjects, the LPS level was below the detection threshold of the LAL test used in the study. So far, the effects of low concentrations of indoxyl and endotoxin on the vascular endothelium have not been studied, which was a novel element of my research, as was the evaluation of the co-toxicity of indoxyl and endotoxin. Both of these metabolites at low concentrations exerted significant deleterious effects on endothelial cells, manifested by oxidative stress, inflammation, and increased endothelium thrombogenicity. In addition, stimulation of endothelial cells with endotoxin and indoxyl potentiated the harmful effects of each tested metabolite used separately. This study's results confirmed an increase in Gram-negative bacilli of the *Enterobacteriaceae* family and their potentially toxic metabolites, accompanied by a decrease in beneficial anaerobic bacteria of the *Bacteroidetes* cluster, which can promote vascular endothelial lesions.

The study results significantly contribute to the growing field of knowledge, the interrelationship between the human body and the microorganisms that colonize it.