



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

lek. Marcin Choroszy

Rozprawa doktorska

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

Promotor

Prof. dr hab. Beata Sobieszcańska
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Wrocław, 2023

Recenzenci

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa

Zakład Biologii Patogenów i Immunologii

Wydział Nauk Biologicznych

Uniwersytet Wrocławski

Dr hab. n. med. Michał Hawranek

III Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii

Wydział Nauk Medycznych w Zabrze

Śląski Uniwersytet Medyczny

Dr hab. n. med. Mariusz Tomaniak

I Katedra i Klinika Kardiologii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Składam serdeczne podziękowania mojej Promotor Pani prof. dr hab. Beacie Sobieszkańskiej za życzliwość, cierpliwość, oraz cenne uwagi merytoryczne w trakcie powstawania rozprawy doktorskiej.

Dziękuję współautorom publikacji oraz uczestnikom przeprowadzonych przeze mnie badań.

Dziękuję również moim Rodzicom, Siostrze, mojej dziewczynie Patrycji i Przyjaciołom, którzy byli ze mną przez ten czas i udzielali mi wsparcia, kiedy tego potrzebowałem.

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE	5
2. SUMMARY	8
3. WSTĘP	11
3.1. Rozwój miażdżycy naczyń krwionośnych.....	11
3.2. Rola mikroflory jelit w chorobach sercowo-naczyniowych.....	13
3.3. Wpływ metabolicznej endotoksemii na śródbłonek naczyniowy	15
4. CELE I ZAŁOŻENIA PROJEKTU BADAWCZEGO	17
4.1. Analiza mikrobiomu jelit osób z chorobą niedokrwioną serca i osób zdrowych	18
4.2. Wpływ wybranych metabolitów na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych– badania in vitro.....	18
5. MATERIAŁY I METODY.....	20
5.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów.....	20
5.2. Próbkki kału i surowicy.....	20
5.3. Oznaczenia poziomów endotoksyny i indoksyłu w surowicy badanych osób.....	20
5.4. Metody zastosowane do analizy mikrobiomu jelit badanych osób	21
5.5. Metody zastosowane w badaniach in vitro	21
5.5.1. Hodowle linii komórkowych	21
5.5.2. Żywotność i morfologia komórek.....	22
5.5.3. Różnicowanie monocytów w makrofagi.....	23
5.5.4. Uzyskanie podłoża kondycjonowanych	23
5.5.5. Stymulacja komórek HUVEC	24
5.5.7. Badania trombogenności komórek śródbłonka.....	24
5.6. Analizy statystyczne	26
6. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	27
8. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ	70
9. WNIOSKI	72
10. PIŚMIENNICTWO	73
11. NOTA BIOGRAFICZNA.....	77
13. DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA	78
14. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	80
14. ZAŁĄCZNIKI.....	94
15. WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	98

1. 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 miażdżycy 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 śródbłonka 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 personalizowanej.

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 śródbłonka.

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 μM), 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 śródbłonku naczyniowym.

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

2. 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.

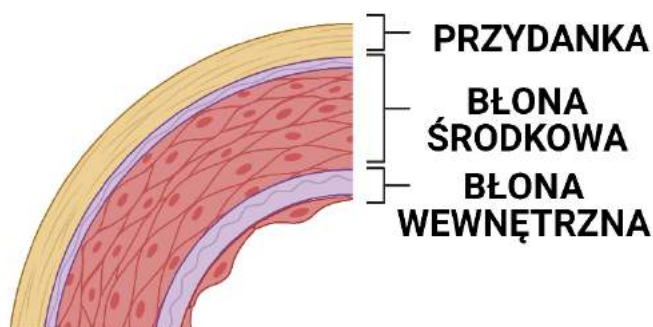
The study results significantly contribute to the growing field of knowledge, the interrelationship between the human body and the microorganisms that colonize it.

3. WSTĘP

3.1. Rozwój miażdżycy naczyń krwionośnych

Miażdżycza tętnic jest przewlekłym procesem zapalnym, który prowadzi do powstawania charakterystycznych, lokalnych zmian w ścianach naczyń, tzw. blaszek miażdżycowych. Blaszką miażdżycową zbudowaną jest z lipidowego rdzenia i pokrywającej go włóknistej powłoki. W początkowym okresie złogi miażdżycowe przemieszczają się pod warstwę śródbłonka i wraz z powiększaniem swoich rozmiarów stopniowo zwężają światło naczynia, zaburzając prawidłowe ukrwienie mięśnia sercowego. Proces rozwoju blaszki miażdżycowej trwa latami i jest bezobjawowy. Jednak z czasem, stan ten ulega progresji do odczuwanych przez chorego objawów, z których najbardziej znamionym jest ból w klatce piersiowej. Zmiany zapalne w tętnicach powstają wieloetapowo i są związane z charakterystyczną budową ściany naczyń [1,2].

Ściana tętnic składa się z trzech warstw: wewnętrznej, tworzonej przez komórki śródbłonka, środkowej- zbudowanej z błony sprężystej i okrężnie ułożonych komórek mięśni gładkich, zawieszonych w bogatej we włókna kolagenowe macierzy międzykomórkowej oraz zewnętrznej, tzw. przydanki, obejmującej włókna sprężyste i kolagenowe zakotwiczące ścianę naczynia do tkanki łącznej, zawierającej fibroblasty, komórki tuczne oraz komórki mięśniówki gładkiej (Ryc.1).



Ryc.1 Schemat budowy ściany tętnicy.

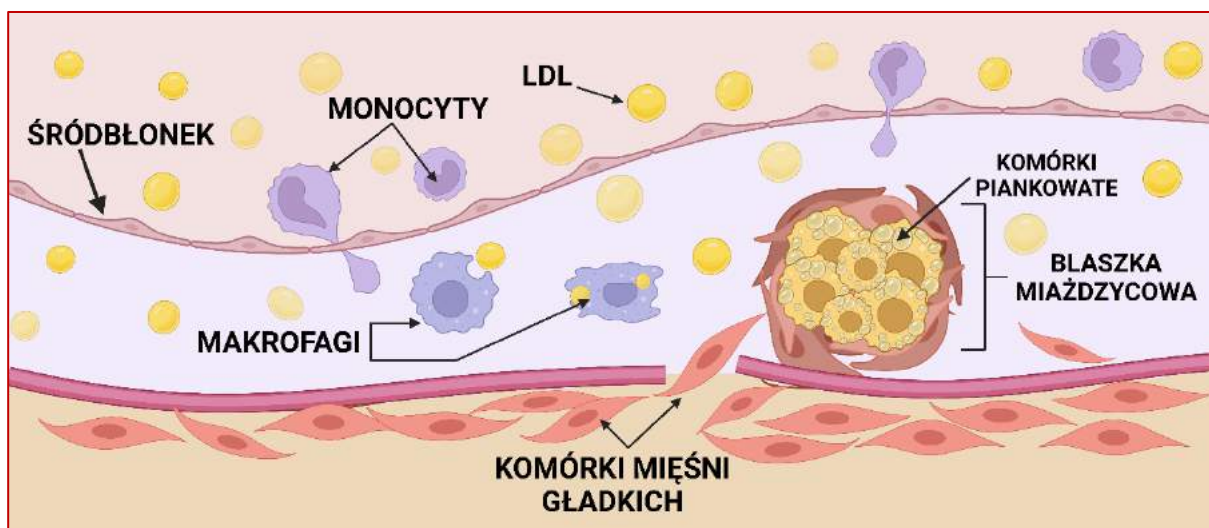
Pojedyncza warstwa komórek śródbłonka, mająca bezpośredni kontakt z krwią, odgrywa główną rolę w początkowych etapach rozwoju miażdżycy. Prawidłowy śródbłonek tworzy barierę nieprzepuszczalną dla większości wielkocząsteczkowych związków transportowanych przez krew, np. lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Kluczową rolę śródbłonka jest utrzymywanie równowagi pomiędzy procesami

krzepnięcia i antykoagulacji, dzięki syntezie różnych związków o charakterze przeciwwakrzepowym, np. siarczanu heparanu obecnego na powierzchni komórek oraz uwalnianemu do krwi tlenkowi azotu. Tlenek azotu posiada również działanie rozszerzające naczynia krwionośne, dzięki czemu zapewnia prawidłowy przepływ krwi w naczyniach. Poza tym, śródbłonek aktywnie uczestniczy w procesach immunologicznych poprzez ekspresję receptorów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną oraz sekrecję cytokin i chemokin pro- i anty-zapalnych, a także aktywność fagocytarną krążących makromolekuł [3]. Ekspozycja śródbłonka na działanie sił mechanicznych (przepływ krwi pod ciśnieniem) lub związków chemicznych (toksyczne metabolity, wolne rodniki) może prowadzić do jego dysfunkcji [4,5].

Pierwszym etapem tworzenia blaszki miażdżycowej jest dysfunkcja komórek śródbłonka, która obejmuje zmiany metaboliczne, morfologiczne i czynnościowe komórek. Aktywowane zapalnie komórki śródbłonka zmieniają swój kształt, co wpływa na utratę ciągłości bariery błony wewnętrznej i ułatwia penetrację lipoprotein osocza w głąb ściany naczynia. Ponadto, dysfunkcyjny śródbłonek zwiększa ekspresję na swojej powierzchni cząstek adhezyjnych, np. VCAM-1, ICAM-1, selektyny E i selektyny P, promujących przyleganie i penetrację leukocytów do wewnętrznej warstwy naczyń, która staje się trombogenna. Dodatkowo, komórki śródbłonka uwalniają szereg cytokin i chemokin prozapalnych, m.in. IL-1, IL-6, TNF- α , MCP-1, indukujących różnicowanie napływających monocytów do makrofagów o fenotypie prozapalnym (M1), o zwiększonej zdolności fagocytarnej. Produkowana przez aktywowane komórki śródbłonka chemokina MCP-1 jest silnym chemoatraktantem dla monocytów. Aktywowane makrofagi M1 fagocytują złogi lipidów w błonie zewnętrznej i przekształcają się w tzw. makrofagi piankowate, które cechują liczne kropelki lipidów w cytoplazmie. Nagromadzone cząsteczki lipidów ulegają modyfikacjom chemicznym, w których kluczową rolę odgrywa ich utlenienie, indukujące stres oksydacyjny. Cząsteczki utlenionego LDL (oxy-LDL) stymulują komórki śródbłonka do produkcji kolejnych cytokin prozapalnych, które działają jako silne chemoatraktanty, przyciągając krążące we krwi monocyty. Monocyty przylegają do powierzchni komórek śródbłonka i penetrują ścianę naczynia pod postacią makrofagów. Makrofagi te uczestniczą w fagocytozie cząsteczek oxy-LDL oraz komórek piankowatych, które ostatecznie ulegają apoptozie. Zmodyfikowane makrofagi syntetyzują płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF; **platelet-derived growth factor**), wzmagający proliferację komórek mięśni gładkich i syntezę

macierzy pozakomórkowej, która tworzy włóknistą pokrywę, otaczającą blaszkę od zewnątrz i zapewniającą jej stabilność (ryc. 2) [6–8].

Wśród licznych czynników indukujących rozwój zmian miażdżycowych takich jak hiperlipidemia, nadciśnienie oraz cukrzyca, coraz częściej wymieniana jest mikroflora jelit [9].



Ryc. 2 Schemat powstawania blaszki miażdżycowej. Opis w tekście.

3.2. Rola mikroflory jelit w chorobach sercowo-naczyniowych

Mikroflora (mikrobiota) jelit, reprezentowana przez wszystkie grupy drobnoustrojów, tj. wirusy, bakterie, grzyby i pierwotniaki, stanowi niezwykle złożony, kompleksowy ekosystem odgrywający ważną rolę w utrzymaniu homeostazy naszego organizmu. Drobnoustroje tworzące mikrobiotę w warunkach zdrowia pozostają w określonych wzajemnych interakcjach oraz stosunkach ilościowych, co wpływa na regulację procesów fizjologicznych i metabolicznych przewodu pokarmowego, np. perystaltykę jelit, absorpcję składników odżywczych, transport jonów i utrzymanie bariery nabłonka jelita [10,11]. Skład i aktywność metaboliczną mikrobioty jelit reguluje szereg czynników endogennych, np. hormony, enzymy trawienne, żółć oraz egzogennych, z których najważniejszą rolę pełni dieta. Prawidłowa dieta, dostarczająca odpowiednią ilość niefermentowanych w przewodzie pokarmowym człowieka węglowodanów, zawartych w roślinach oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych, utrzymuje delikatną równowagę mikrobioty. Poza dietą, na prawidłowy profil mikrobioty wpływ ma wiele innych czynników np. wiek, aktywność fizyczna, profil genetyczny osobnika,

przyjmowane leki (szczególnie antybiotyki), stres, a nawet zamieszkiwany obszar geograficzny czy zanieczyszczenie środowiska [12,13].

Dysbiozę jelit cechuje zmieniona liczebność i zróżnicowanie gatunków bakterii kolonizujących jelito, co koreluje ze zmienionym profilem metabolicznym mikrobioty. Obserwowana w dysbiozie przewaga potencjalnie patogennych gatunków bakterii komensalnych, tzw. patobiontów, prowadzi do wzrostu ilości prozapalnych antygenów, tzw. PAMP (**p**athogen **a**ssociated **m**olecular **p**attern), wykrywanych przez swoiste receptory komórkowe rozmieszczone na powierzchni niemal wszystkich komórek organizmu człowieka, tzw. PRR (**p**attern **r**ecognition **r**eceptor), do których należą m.in. receptory TLR. Interakcja bakteryjnych antygenów PAMP z receptorami PRR indukuje stan zapalny jelit, który rozszczelnia barierę nabłonka jelita, prowadząc do translokacji bakteryjnych metabolitów do krwiobiegu. Przeciekające do krwi bakteryjne metabolity indukują ogólnoustrojowy, przewlekły stan zapalny, związany z patogenezą zaburzeń metabolicznych obserwowanych m.in. w cukrzycy typu 2, niealkoholowym stłuszczeniu wątroby, oraz w wielu chorobach pozornie niezwiązanych z dysbiozą jelit, jak choroby neurodegeneracyjne i nowotworowe [14–17].

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 [18]. 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 [19]. Poza metabolitami, dysbioza przyczynia się do przeciekania do krwiobiegu bakteryjnych antygenów, z których endotoksyna (lipopolisacharyd, LPS) pełni istotną rolę w indukowaniu ogólnoustrojowego stanu zapalnego [20].

Bakterie wchodzące w skład mikrobioty jelitowej można podzielić na cztery najważniejsze gromady: : *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* [21]. 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- endotoksemię [22].

Dotychczasowe wyniki multiomicznych badań, wykorzystujących nowoczesną technologię sekwencjonowania, wskazują, że miażdżycy naczyń krwionośnych towarzyszą zmiany dysbiotyczne mikrobioty jelit, obejmujące spadek liczebności bakterii z gromady *Bacteroides* przy równoczesnym wzroście liczebności bakterii z gromady *Firmicutes* [23,24].

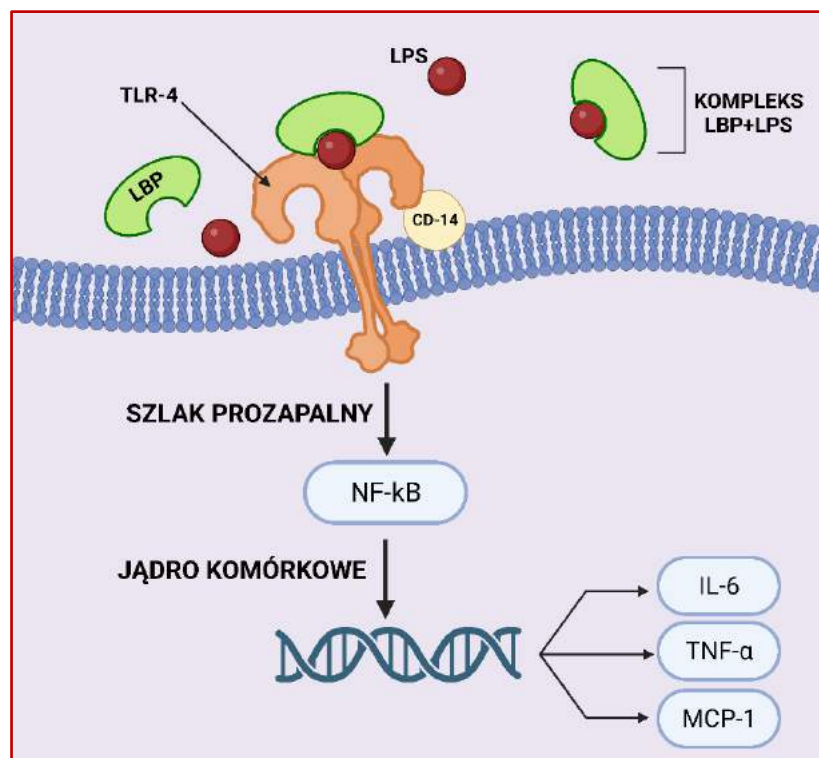
3.3. Wpływ metabolicznej endotoksemii na śródbłonek naczyniowy

W ostatnich latach znacząco wzrosła liczba badań wskazujących na rolę metabolicznej endotoksemii w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i miażdżycy naczyń krwionośnych [22,25].

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. bakteriami i sepsą, metaboliczna endotoksemia charakteryzuje się obecnością niskiego poziomu LPS we krwi (<10 ng/ml) i podostrym, 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 [25].

Metaboliczna endotoksemia indukowana jest przede wszystkim dietą wysokotłuszczową i wiąże się ze wzrostem przepuszczalności bariery jelitowej oraz pasażem endotoksyny i innych metabolitów bakteryjnych do krążenia [27]. Na rozwój metabolicznej endotoksemii ważny wpływ mają nasycone kwasy tłuszczowe pochodzące z diety i wchłaniane z jelita do krążenia, które podobnie do endotoksyny, indukują stan zapalny śródbłonna naczyń krwionośnych [30]. W badaniach na zwierzętach wykazano, że tłuszcze pokarmowe ułatwiają translokację endotoksyny z jelita do krążenia dzięki jej wiązaniu przez chylomikrony powstające w obrębie enterocytów [31,32]. Enterocyty nabłonka jelita internalizują endotoksynę z powierzchni apikalnej i transportują ją do aparatu Golgiego, gdzie powstają chylomikrony, w które wbudowywany jest LPS. Z uwagi na to, że LPS ma wysokie powinowactwo do chylomikronów, ich powstawanie sprzyja wchłanianiu endotoksyny i jej transportowi do układu limfatycznego jelita cienkiego,

a następnie do krążenia przez przewód piersiowy [31,33,34]. Lipoliza chylomikronów w krążeniu sprzyja uwalnianiu LPS, który następnie jest wiązany z glikoproteinami CD14 krążącymi w surowicy lub związanymi z powierzchnią komórek immunologicznych, tj. monocytów/makrofagów poprzez białko wiążące lipopolisacharyd (LBP; lipopolysaccharide-binding protein) [32]. Kompleks LPS-LBP-CD14 wchodzi w interakcję z receptorem TLR4 prezentowanym na monocytach/makrofagach, a także komórkach śródbłonna, inicjując syntezę i sekrecję cytokin prozapalnych, m.in. IL-1, IL-6, IL-8, TNF α (Ryc. 3) [32].



Ryc. 3. Indukowana endotoksyną aktywacja szlaku prozapalnego w monocytach i komórkach śródbłonna.

Metaboliczna endotoksemia ma niekorzystny wpływ na śródbłonek naczyń krwionośnych przede wszystkim u osób otyłych, u których endotoksemia koreluje z poposiłkową, skumulowaną chylomikronemią, wzrastającą wraz z ilością spożywanego tłuszczu [32]. Stąd, spożywanie posiłków wysokotłuszczowych przez długi okres ostatecznie prowadzi do hiperlipidemii, stale podwyższonego poziomu LPS we krwi i rozwoju chronicznego stanu zapalnego śródbłonna naczyń krwionośnych, który bezpośrednio przyczynia się do rozwoju blaszek miażdżycowych [35].

4. CELE I ZAŁOŻENIA PROJEKTU BADAWCZEGO

Wzrost zainteresowania rolą drobnoustrojów kolonizujących organizm człowieka w rozwoju różnych chorób stał się platformą wielokierunkowych badań na tym polu. Temat wpływu mikrobioty jelit na rozwój chorób sercowo-naczyniowych, biorąc pod uwagę częstość ich występowania, jest szczególnie ważny. Dodatkowo, z uwagi na podnoszoną od dawna rolę prawidłowej diety w patomechanizmie tych chorób, udział drobnoustrojów kolonizujących jelita człowieka i aktywnie uczestniczących w metabolizmie składników pokarmowych jest w pełni uzasadniony. Dieta jest kluczowym elementem kształtującym mikrobiotę jelit, jej skład i aktywność metaboliczną. Co więcej, jest to jeden z modyfikowalnych czynników ryzyka odgrywających znaczącą rolę w chorobach sercowo-naczyniowych.

Pomimo że wiele badań potwierdza udział drobnoustrojów jelitowych w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, nadal niewiele wiadomo o realnym wpływie mikrobioty jelit na patomechanizm tych chorób. Z całą pewnością zmiany wzajemnych proporcji grup drobnoustrojów, nierozzerwalnie związane ze zmianami ich aktywności metabolicznej, indukują szereg zmian w organizmie człowieka.

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*



4.1. Analiza mikrobiomu jelit osób z chorobą niedokrwienną serca i osób zdrowych

a) analizę mikrobiomu jelit badanych chorych i zdrowych wykonano metodą biologii molekularnej, która opiera się na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z amplifikacją bakteryjnego 16S rRNA. Metoda ta pozwala na zbadanie genomu mikrobioty danego ekosystemu, np. jelit, a następnie porównanie uzyskanych danych z dostępnymi bibliotekami genomowymi wszystkich znanych drobnoustrojów. Analiza komputerowa uzyskanych danych umożliwia więc poznanie genów drobnoustrojów tworzących dany ekosystem.

b) analizę porównawczą stanowiły: meta-analiza i przegląd systematyczny dostępnych danych na temat zmian mikroflory jelit w chorobach sercowo-naczyniowych. Porównywanie genomów bakteryjnych (mikrobiomów) między badanymi grupami, np. chorymi a zdrowymi, umożliwia ustalenie różnic składu mikroflory jelit, które mogą indukować w organizmie zmiany chorobowe.

4.2. Wpływ wybranych metabolitów na komórki śródbłonka naczyń krwionośnych- badania in vitro

a) do badań *in vitro* na śródbłonku naczyniowym wybrano endotoksynę oraz siarczan indoksyłu (indykan), będący wątrobowym metabolitem indolu wytwarzanego przez bakterie jelitowe. Wybór metabolitów był podyktowany zwiększonym występowaniem u osób chorych bakterii z gromady *Proteobacteria*, stanowiących najczęstszą przyczynę endotoksemii. Indoksył został wybrany ze względu na swoją toksyczność dla komórek śródbłonka oraz ze względu na fakt, że jest częstym metabolitem *Proteobacteria*. Stężenia obu metabolitów do badań zostały wybrane na podstawie ich średniego stężenia w próbkach surowicy badanych chorych oraz w stężeniach 10-krotnie wyższych w celu

potwierdzenia swoistości ich wpływu na komórki śródbłonna. Badania na komórkach śródbłonna obejmowały 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. Nowatorskim podejściem w tych badaniach była ocena bezpośredniego i pośredniego wpływu (z zastosowaniem podłoża kondycjonowanych z nad makrofagów) każdego metabolitu z osobna oraz w połączeniu (badanie współtoksyczności) na śródbłonek naczyń, co przybliżyło model badawczy do sytuacji *in vivo*.



Bezpośredni wpływ odzwierciedla oddziaływanie badanych metabolitów krążących we krwi na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych.

Pośredni wpływ odzwierciedla interakcję metabolitów krążących we krwi z leukocytami, które w odpowiedzi syntetyzują i wydzielają cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu i inne metabolity, oddziałujące na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów

Grupę badaną stanowiło 15 pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i 15 zdrowych ochotników. Choroba niedokrwienna serca była potwierdzona przy użyciu koronarografii, a do badania zakwalifikowano osoby z co najmniej 50% zwężeniem światła jednego lub wielu naczyń. Uczestnicy badania zostali zrekrutowani spośród pacjentów Oddziału Kardiologicznego Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu w okresie od marca do września 2020r. Kryteria wyłączenia obejmowały: choroby nerek definiowane jako wzrost poziomu kreatyniny $>2\text{mg/dl}$, choroby nowotworowe, choroby wątroby, aktywne choroby zakaźne i stosowanie antybiotyków w ciągu czterech tygodni przed pobraniem próbek. Wszyscy uczestnicy badania wyrazili pisemną zgodę, badanie przestrzegało wytycznych Deklaracji Helsińskiej i zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (numer autoryzacji KN-209/2020).

5.2. Próbkę kału i surowicy

Od wszystkich uczestników badania pobrano próbki kału oraz krwi. Pobierane sukcesywnie materiały w ciągu 4 godz. były dostarczone do laboratorium (próbki po pobraniu oraz podczas transportu przechowywano w temp. lodówki). W laboratorium, próbki kału były rozporcjowane i zamrażane w temp. -80°C . Próbkę krwi pobierano do suchej sterylnej probówki lub probówki z antykoagulantem w celu uzyskania osocza. W zależności od stopnia wykrzepiania, próbki krwi były odwirowywane lub umieszczane w inkubatorze o temperaturze 37°C , aby wykrzepić włóknik. Następnie, pobierano surowicę z nad skrzepu krwi, która była rozdzielana na mniejsze porcje i zamrażana w temperaturze -80°C .

5.3. Oznaczenia poziomów endotoksyny i indoksyłu w surowicy badanych osób

Poziom LPS w badanych próbkach oznaczano chromogennym testem LAL, po ogrzaniu próbek osocza w celu usunięcia nieswoistych inhibitorów reakcji. Poziom siarczanu indoksyłu oznaczono gotowym testem immunoenzymatycznym Indoxyl Sulphate ELISA kit, pozwalającym wykryć ten związek w osoczu i w surowicy. Oba testy wykonano zgodnie z dołączonymi instrukcjami producentów.

5.4. Metody zastosowane do analizy mikrobiomu jelit badanych osób

Z próbek kału izolowano DNA stosując kit firmy Qiagen (QIAamp DNA Stool Mini Kit) zgodnie z instrukcją producenta. Sekwencjonowanie i amplifikację hiperzmiennego regionu V3-V4 rybosomalnego RNA (rRNA) wykonała jako usługę zewnętrzną firma Genomed. Ilościową amplifikację w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Produkty amplifikacji po oczyszczeniu poddawano pirosekwencjonowaniu przy użyciu systemu MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu środowiska Snakemake, z wykorzystaniem algorytmów cutadapt, USEARCH3, phyloseq object, decipher idtaxa, z bazą SILVA jako referencyjną bazą danych.

5.5. Metody zastosowane w badaniach in vitro

5.5.1. Hodowle linii komórkowych

Badania wykonano na pierwotnej, unieśmiertelnionej linii komórkowej **ludzkich komórek śródbłonna HUVEC** (nr. kat. C-015-10C; ThermoFisher Scientific). Komórki hodowano w dedykowanym dla komórek śródbłonna podłożu EGM™ (Endothelial Cell Growth Medium-2 bullet kit™ z suplementami: hydrokortyzon, hFGF, VEGF, R3-IGF, kwas askorbowy, hEGF, heparyna; Lonza, Polska). Hodowlę prowadzono w butelkach do hodowli komórkowych opłaszczonych kolagenem (Rat tail collagen type I; Sigma-Merc) w stężeniu 10 µg/cm², w atmosferze 5% CO₂, temperaturze 37°C. Podłoże hodowlane zmieniano co 48 godzin. Do eksperymentów komórki trypsynizowano (Trypsyna-EDTA 0,25%; ThermoFisher Scientific), odwirowywano (1000 rpm, 10 min, 4°C) i ustalano gęstość zawiesiny komórek. Komórki wsiewano następnie do dołków płytek nieopłaszczanych kolagenem w ilości 4x10⁵ komórek/ml. Ponadto, aby wyeliminować wpływ czynników wzrostu obecnych w podłożu hodowlanym na wyniki badań, do wszystkich eksperymentów komórki zawieszano w podłożu hodowlanym M199 wzbogaconym 20% surowicą i preinkubowano przez 24 godz. Dodatek wysokiego stężenia surowicy był podyktowany użyciem w badaniach LPS, który do aktywacji receptora TLR4 na komórkach wymaga związania z surowicznym białkiem wiążącym endotoksynę, tj. LBP oraz glikoproteiny CD14. W doświadczeniach wymagających barwienia komórek, komórki HUVEC hodowano w płytkach 24-dołkowych z umieszczonymi w dołkach sterylnymi, okrągłymi szkiełkami o średnicy 13 mm.

Drugą linią komórkową zastosowaną w badaniach była **linia ludzkich monocytów THP-1** (nr. kat. EP-CL-0233; ELABScience) hodowana w podłożu RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific) z dodatkiem 10% inaktywowanej płodowej surowicy bydlęcej oraz antybiotykami: penicyliną i streptomycyną (ThermoFisher Scientific).

Gęstość zawiesiny komórek ustalano w kamerze Bürkera po barwieniu błękitem trypanu, który barwi martwe, uszkodzone komórki na niebiesko. W przypadku nieadherentnych komórek linii THP-1 gęstość zawiesiny komórek ustalano tak jak dla komórek śródbłónka z pominięciem trypsynizacji.

We wszystkich oznaczeniach komórki przed stymulacją płukano buforem fosforanowym (PBS) o pH 7.2 lub roztworem HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) o tej samej wartości pH. Oba roztwory do płukania były przed użyciem ogrzewane do temp. 37°C lub, jak wskazano w opisie testu, schłodzone w temp. lodówki (4°C).

5.5.2. Żywotność i morfologia komórek

Żywotność i proliferację komórek obu linii komórkowych, tj. HUVEC i THP-1 oznaczano w reakcji z MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Zawiesinę komórek (o gęstości 4×10^5 komórek/ml) wsiewano do dołków 96-dołkowej płytki hodowlanej i inkubowano do następnego dnia, po czym stymulowano przez 18 godz. badanymi metabolitami w wybranych stężeniach, tj. endotoksyna (LPS): 3 ng/ml i 30 ng/ml, indoksył (IS): 13 μ M i 130 μ M oraz LPS+IS w niskich stężeniach tj. 3 ng LPS + 13 μ M IS oraz 10-krotnie wyższymi stężeniami, opisanymi jako wysokie, tj. 30 ng/ml LPS + 130 μ M IS w celu potwierdzenia swoistego wpływu badanych związków. Po stymulacji komórek, zbierano podłoże hodowlane i dodawano świeże podłoże zawierające 5 mg/ml MTT. Płytki z komórkami inkubowano następnie 3 godz. w 37°C, w atmosferze wzbogaconej w 5% CO₂. Podczas inkubacji żywe komórki metabolizują MTT do fioletowych kryształów formazanu. Po inkubacji, ponownie zbierano podłoże hodowlane a powstałe kryształy formazanu rozpuszczano przez dodanie do dołków po 120 μ l DMSO (dimethyl sulfoxide). Po 10-minutowym wytrząsaniu płytki w celu całkowitego rozpuszczenia kryształów, powstały barwny roztwór (w objętości 100 μ l) przenoszono do dołków nowej płytki i dokonywano spektrofotometrycznego (Spektrofotometr UV/VIS 340) pomiaru intensywności barwy przy długości fali 570 nm. Pomiaru intensywności barwy odnoszono do komórek niestymulowanych, które traktowano jako kontrolę ujemną (100% żywotności

komórek). Natężenie barwy koreluje z żywotnością i ilością komórek – im więcej komórek, tym intensywniejsze zabarwienie.

W celu oceny zmian morfologii komórek stymulowanych badanymi metabolitami komórki HUVEC posiewano do dołków 24-dołkowych płytek ze szkiełkami. Po stymulacji i trzykrotnym płukaniu w PBS, komórki utrwalano 2% roztworem zbuforowanej formaliny przez 10 min. Po czterokrotnym płukaniu, komórki traktowano przez 5 min 0.5% roztworem Triton X-100 w PBS w celu rozszczelnienia błon komórkowych, aby umożliwić penetrację barwnika do cytoplazmy komórek. Po następnym czterokrotnym płukaniu w PBS, do komórek dodawano PBS z falloidyną znakowaną izotiocyanianem fluoresceiny (falloidyna-FITC; 50 $\mu\text{g/ml}$) i inkubowano w ciemności przez 40 min. Falloidyna-FITC barwi cytoszkielet aktynowy komórek. Po dwukrotnym odpłukaniu niezwiązanej falloidyny-FITC, do komórek dodawano na 5 min DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$ w PBS), tj. barwnik, który wbudowując się w DNA jądra komórkowego emituje niebieską fluorescencję. Następnie szkiełka z komórkami wyciągano z dołków, umieszczano na szkiełku podstawowym i po wysuszeniu oglądano w mikroskopie fluorescencyjnych (Olympus BX51). Morfologię komórek dokumentowano zdjęciami z co najmniej trzech pól widzenia.

5.5.3. Różnicowanie monocytów w makrofagi

Po namożeniu monocytu THP-1 różnicowano w makrofagi za pomocą 25 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) przez 72 godz. Po różnicowaniu, komórki utrzymywano przez 48 godz. w podłożu hodowlanym RPMI-1640 z 10% surowicą bez PMA w celu uzyskania modelu komórek morfologicznie i molekularnie odpowiadających dojrzałym makrofagom[36,37]. Uzyskane w ten sposób makrofagi określano jako MDM (tj. **monocyte-derived macrophages**).

5.5.4. Uzyskanie podłoży kondycjonowanych

W celu uzyskania podłoży kondycjonowanych, MDM stymulowano przez 18 godz. odpowiednimi stężeniami LPS (3 ng/ml i 30 ng/ml), IS (13 μM i 130 μM) oraz LPS+IS w niskich stężeniach (3 ng LPS + 13 μM IS) oraz wysokich (30 ng/ml LPS + 130 μM IS). Oba metabolity były rozcieńczane do odpowiednich stężeń w pełnym podłożu hodowlanym tj. RPMI-1640 z 10% FBS. Po stymulacji MDM, podłoża hodowlane z nad komórek zebrano, odwirowano (1200 rpm, 10 min, 4°C), a zebrane supernatanty

rozporcjowano i zamrażano w -80°C do czasu badań. Podłoże hodowlane znad MDM niestymulowanych stanowiło kontrolę ujemną. Mając na uwadze, że podłoża kondycjonowane znad makrofagów zawierają różne cytokiny, chemokiny i inne metabolity komórek, które mogą wykazywać cytotoksyczny wpływ na komórki *in vitro*, komórki śródbłonna stymulowano podłożem hodowlanym zawierającym 25% podłoża kondycjonowanych.

5.5.5. Stymulacja komórek HUVEC

Komórki HUVEC (4×10^5 kom./ml) wsiewano do dołków płytek hodowlanych i inkubowano do następnego dnia. Po jednokrotnym płukaniu, do komórek dodawano podłoże hodowlane zawierające badane metabolity w odpowiednich stężeniach lub podłoże hodowlane zawierające 25% podłoża kondycjonowanego. Po 18 godzinnej inkubacji oznaczano żywotność komórek (wg opisu powyżej), morfologię, produkcję wolnych rodników tlenowych (ROS) oraz trombogenność komórek śródbłonna w interakcji ze znakowanymi monocytami linii THP-1, a także poziomy MCP-1, E-selektyny.

5.5.6. Oznaczanie wolnych rodników tlenowych

Wolne rodniki tlenowe (ROS) uwalniane przez komórki śródbłonna niestymulowane oraz stymulowane badanymi metabolitami i kondycjonowanymi podłożami oznaczano za pomocą sondy fluorescencyjnej $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate). Komórki po 5-godzinnej stymulacji badanymi związkami płukano ogrzanym HBSS i traktowano HBSS z $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ($10 \mu\text{M}$) przez 30 min. w temp. 37°C i atmosferze 5% CO_2 . Po inkubacji, komórki płukano delikatnie ogrzanym HBSS i mierzono natężenie fluorescencji w spektrofotometrze Tecan Infinite M200 przy długości fali wzbudzenia 488 nm i długości fali emisji 525 nm. Pomiar natężenia fluorescencji ROS odnoszono do kontroli dodatniej, którą stanowiły komórki traktowane $50 \mu\text{M}$ H_2O_2 (100% produkcji ROS).

5.5.7. Badania trombogenności komórek śródbłonna

Ocenę trombogenności komórek śródbłonna traktowanych badanymi metabolitami określano na podstawie adhezji monocytów linii THP-1 oraz poziomu E-selektyny

i MCP-1. W tym celu, komórki linii HUVEC posiewano na szkiełka umieszczone w dołkach płytki hodowlanej i po całonocnej inkubacji traktowano wybranymi stężeniami LPS i IS lub kondycjonowanymi podłożami. Po 18-godzinnej stymulacji, komórki płukano dwukrotnie ogrzanym PBS, aby usunąć martwe komórki. Następnie do komórek dodawano zawiesinę monocytów barwionych fluorescencyjnie, co umożliwia ocenę ich adhezji do komórek śródbłonna.

Do fluorescencyjnego barwienia, hodowlę monocytów THP-1 odwirowywano, ustalano gęstość zawiesiny (1×10^6 komórek/ml) i dodawano Calcein-M (Sigma-Merc) w stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$. Po delikatnym wymieszaniu, komórki inkubowano w atmosferze 5% CO_2 , 37°C przez 1 godz. Po inkubacji do komórek dodawano równą objętość zimnego podłoża hodowlanego RPMI-1640 z 10% FBS, aby zatrzymać wychwyty barwnika przez komórki. Zawiesinę komórek odwirowywano, osad zawieszano w podłożu hodowlanym, aby uzyskać zawiesinę o gęstości komórek 5×10^5 komórek/ml. Tak przygotowane monocyty dodawano do komórek śródbłonna w ilości 0,5 ml/dołek i inkubowano 4 godz. Po zakończeniu inkubacji, komórki płukano 4-krotnie, aby usunąć niezwiązane lub luźno związane monocyty. Adhezję monocytów do komórek śródbłonna oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym i liczono monocyty przylegające do komórek śródbłonna z co najmniej 4 różnych pól widzenia. Średnią liczbę monocytów przylegających do komórek śródbłonna traktowanych metabolitami lub kondycjonowanymi podłożami porównywano do liczby monocytów przylegających do komórek nietraktowanych (kontroli ujemnej), którą przyjmowano jako 100%. Badanie powtarzano dwukrotnie, a rezultaty przedstawiono jako średnią uzyskanych wyników.

Poziom E-selektyny w komórkach śródbłonna stymulowanych LPS, IS oraz kondycjonowanymi podłożami oznaczano wg metody przedstawionej przez Grabnera [38]. Całonocny monolayer komórek HUVEC w dołkach płytek 6-dołkowych stymulowano metabolitami i kondycjonowanymi podłożami w odpowiednich stężeniach przez 18 godz., a następnie płukano dwukrotnie w ogrzanym roztworze HBSS i utrwalano 0,5% zimnym roztworem zbuforowanej formaliny przez 2,5 min. Po ponownym płukaniu komórek roztworem HBSS z 0,5% albuminą bydlęcą (BSA) dodawano znakowane FITC przeciwciała dla E-selektyny w stężeniu $10 \mu\text{g}/10^6$ komórek, które były rozcieńczone w roztworze HBSS z 0,02% saponiną. Po 45-minutowej inkubacji w ciemności, komórki płukano dwukrotnie w HBSS-saponina i trypsynizowano. Oderwane komórki odwirowano (1000 rpm, 4°C ; 10 min), płukano dwukrotnie w zimnym PBS i na koniec

rozcieńczano w PBS do objętości wyjściowej. Uzyskane zawiesiny komórek nanoszono po 100 μ l do 3 dołków czarnej płytki mikrotitracyjnej z przezroczystym dnem i wykonywano pomiar natężenia fluorescencji w spektrofotometrze Tecan Infinite M200 przy długości fali wzbudzenia i emisji 488/535 nm. Komórki HUVEC niestymulowane, traktowane w taki sam sposób jak komórki stymulowane, barwione izotypowym przeciwciałem mysim znakowanym FITC stanowiły kontrolę swoistości reakcji. Komórki niestymulowane stanowiły kontrolę ujemną. Reakcję powtarzano trzykrotnie, a wyniki stanowią średnią uzyskanych wyników.

Poziom MCP-1 oznaczano w podłożu hodowlanym znad komórek śródbłonna stymulowanych badanymi metabolitami i podłożami kondycjonowanymi zebranych po 5 godz. stymulacji. Zebrane znad komórek podłoże odwirowywano, aby usunąć resztki komórek, natomiast w uzyskanym supernatancie oznaczano poziom MCP-1 testem immunoenzymatycznym MCP-1 Human ELISA (ThermoFisher Scientific), wykonywanym zgodnie z instrukcją producenta. Stężenie MCP-1 w badanych próbkach odczytywano z krzywej wzorcowej. Każdą próbkę badaną nakrapiano do dwóch dołków i test powtarzano dwukrotnie. Poziom MCP-1 oznaczono również w podłożu kondycjonowanym.

5.6. Analizy statystyczne

Wyniki badań eksperymentalnych były analizowane testem *t*-studenta oraz jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA. Wyniki sekwencjonowania oceniano następująco: dla analiz różnorodności alfa, odczyty zostały znormalizowane do głębokości 5000. Różnorodność alfa była oceniana przy użyciu wskaźnika Chao1 i Fishera, indeksów Bulla i Simpsona oraz indeksu dominacji. Dodatkowo, różnorodność beta oceniano za pomocą głównej analizy składowych (PCoA) ważonego i nieważonego wskaźnika UniFrac oraz odległości Braya-Curtisa. Istotność statystyczna była testowana przy użyciu PERMANOVA z 9999 permutacjami. Istotność statystyczną określono za pomocą testu Wilcoxa oraz jednoczynnikowej analizy wariancji z testem post hoc Tukeya. Różnice w rozkładzie enterotypów w badanych grupach były analizowane przy użyciu testu chi kwadrat. Dla wszystkich metod przyjęto wartość $p < 0.05$ jako wskazującą na istotność statystyczną.

6. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

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.

Article

Co-toxicity of Endotoxin and Indoxyl Sulfate, Gut-Derived Bacterial Metabolites, to Vascular Endothelial Cells in Coronary Arterial Disease Accompanied by Gut Dysbiosis

Marcin Choroszy, Beata Sobieszczkańska, Kamil Litwinowicz, Łukasz Łaczmański, Mateusz Chmielarz, Urszula Walczuk, Tomasz Roleder, Jadwiga Radziejewska and Magdalena Wawrzyńska

Special Issue

Specialized Diet, Obesity and Associated Metabolic Disorders

Edited by

Dr. Karolina Szewczyk-Golec



<https://doi.org/10.3390/nu14030424>

Article

Co-toxicity of Endotoxin and Indoxyl Sulfate, Gut-Derived Bacterial Metabolites, to Vascular Endothelial Cells in Coronary Arterial Disease Accompanied by Gut Dysbiosis

Marcin Choroszy ¹, Beata Sobieszczkańska ^{1,*}, Kamil Litwinowicz ², Łukasz Łaczmanski ³, Mateusz Chmielarz ¹, Urszula Walczuk ¹, Tomasz Roleder ⁴, Jadwiga Radziejewska ⁵ and Magdalena Wawrzyńska ⁶

¹ Department of Microbiology, Wrocław Medical University, Chalubińskiego 4 Street, 51-657 Wrocław, Poland; marcin.choroszy@student.umw.edu.pl (M.C.); mateusz.chmielarz@student.umw.edu.pl (M.C.); urszula.walczuk@umw.edu.pl (U.W.)

² Department of Medical Biochemistry, Wrocław Medical University, Chalubińskiego 10 Street, 50-368 Wrocław, Poland; kamil.litwinowicz@student.umw.edu.pl

³ Laboratory of Genomics & Bioinformatics, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Weigla 12 Street, 53-114 Wrocław, Poland; lukasz.laczmanski@hirszfild.pl

⁴ Research and Development Centre, Regional Specialist Hospital, Kamińskiego 73a Street, 51-124 Wrocław, Poland; tomasz.roleder@wssk.wroc.pl

⁵ Klodzko County Hospital, 57-300 Klodzko, Poland; radziejewska.jadwiga@zoz.klodzko.pl

⁶ Department of Preclinical Studies, Faculty of Health Sciences, Wrocław Medical University, 50-367 Wrocław, Poland; magdalena.wawrzyńska@umw.edu.pl

* Correspondence: beata.sobieszczanska@umw.edu.pl



Citation: Choroszy, M.; Sobieszczkańska, 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*, 424. <https://doi.org/10.3390/nu14030424>

Academic Editor: Karolina Szweczyk-Golec

Received: 15 November 2021
Accepted: 13 January 2022
Published: 18 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Gut dysbiosis, alongside a high-fat diet and cigarette smoking, is considered one of the factors promoting coronary arterial disease (CAD) development. The present study aimed to research whether gut dysbiosis can increase bacterial metabolites concentration in the blood of CAD patients and what impact these metabolites can exert on endothelial cells. The gut microbiomes of 15 age-matched CAD patients and healthy controls were analyzed by 16S rRNA sequencing analysis. The in vitro impact of LPS and indoxyl sulfate at concentrations present in patients' sera on endothelial cells was investigated. 16S rRNA sequencing analysis revealed gut dysbiosis in CAD patients, further confirmed by elevated LPS and indoxyl sulfate levels in patients' sera. CAD was associated with depletion of *Bacteroidetes* and *Alistipes*. LPS and indoxyl sulfate demonstrated co-toxicity to endothelial cells inducing reactive oxygen species, E-selectin, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production. Moreover, both of these metabolites promoted thrombogenicity of endothelial cells confirmed by monocyte adherence. The co-toxicity of LPS and indoxyl sulfate was associated with harmful effects on endothelial cells, strongly suggesting that gut dysbiosis-associated increased intestinal permeability can initiate or promote endothelial inflammation and atherosclerosis progression.

Keywords: coronary artery disease; gut microbiome; dysbiosis; obesity; *Bacteroidetes*; LPS; indoxyl sulfate

1. Introduction

Coronary artery disease (CAD) includes stable and unstable angina, myocardial infarction, and sudden cardiac death, the primary cause of morbidity and mortality worldwide [1]. The mechanisms and risk factors involved in the pathogenesis of CAD have been well-documented over recent decades. However, early inducers triggering the cascade of inflammation and atherosclerotic plaques formation are only putative.

Gut dysbiosis related to the change in diversity and abundance of resident intestinal microbiota plays a vital role in cardiovascular diseases [2,3]. Gut dysbiosis induces chronic inflammation resulting in increased intestinal epithelial permeability and leakage of bacterial metabolites into the bloodstream [4]. Some of these metabolites can activate endothelial

cells and promote atherosclerosis. Moreover, bacterial metabolites may interact with each other increasing their mutual cytotoxicity to the endothelial cells directly or indirectly via the effect on monocyte/macrophage.

To date, few bacterial metabolites that exert deleterious effects on vascular endothelium have been recognized. One of those is indole, a tryptophan derivative produced by gut microbiota, oxidized to indoxyl sulfate (IS) in the liver and then removed from the body throughout kidneys filtration. The more indole is produced in the intestine, the more is oxidized in the liver and released into circulation. Elevated indoxyl level induces oxidative stress, pro-inflammatory response, and enhanced expression of adhesion molecules in endothelial cells. The toxic effect of indoxyl on endothelial cells contributes to chronic kidney disease (CKD) and is involved in cardiovascular diseases pathogenesis in CKD patients [5]. However, the impact of indoxyl on CAD pathogenesis in patients without renal impairment is still lacking.

Another well-known bacterial metabolite with deleterious effects on the endothelial cells is endotoxin (LPS), originating from the outer membrane of Gram-negative bacteria. A high-fat diet increases intestinal permeability resulting in metabolic endotoxemia. Continuous translocation of low doses of LPS from intestines into circulation eventually leads to endotoxin tolerance and the development of chronic hypoinflammation identified as a casual of atherosclerosis and many other diseases [6]. LPS influences the endothelium indirectly via pro-inflammatory cytokines or affects endothelial cells directly. In vascular endothelium, LPS upregulates nitric oxide synthase (iNOS), increases endothelium permeability, and enhances the expression of leukocytes' adhesion molecules.

Significant risk factors for the development of CAD are lipoproteins and the high-fat diet as their source. Low-density lipoproteins (LDL) entering arterial intima from the blood are considered the primary driver of atherogenesis [7]. Diet is also an essential factor regulating the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota. Hence, an unhealthy diet results in gut dysbiosis and leakage of bacterial metabolites into the circulation [8]. Furthermore, LPS induces the conversion of the endothelial surface from anti-coagulant to pro-coagulant and affects multiple signaling pathways via the TLR4 receptor [9]. Plasma lipoproteins such as HDL, LDL, and VLDL can sequester LPS from circulation to limit its harmful impact on the host cells [10]. LPS sequestration by plasma lipids, however, may become a pathway of its delivery into monocytes/macrophages infiltrating vascular endothelium activated by cytokines released by monocytes in response to bacterial metabolites. Moreover, at the site of clot formation, LPS alone or combined with indoxyl via ROS formation in ECs can promote lipids oxidation and the formation of foamy macrophages.

The present study focused on the association of gut dysbiosis and an *in vitro* analysis of the direct and indirect effects of indoxyl and LPS at the concentrations present in the sera of dysbiotic CAD patients on vascular endothelial cells. The study results demonstrated gut dysbiosis in CAD patients and elevated levels of bacterial metabolites, *i.e.*, LPS and indoxyl sulfate in their sera. *In vitro* co-toxicity of LPS and indoxyl sulfate in meager concentrations was associated with deleterious effects on endothelial cells, strongly suggesting that overweight-associated increased intestinal permeability can initiate or promote endothelial inflammation.

2. Materials and Methods

2.1. Study Participants

Fifteen CAD patients and 15 healthy individuals were enrolled in the study. CAD was confirmed by coronary angiography, and patients with $\geq 50\%$ stenosis in single or multiple vessels were qualified for the study. Study participants were recruited at Regional Specialist Hospital between March and September 2020. Biochemical parameters were assessed employing standard techniques at the Specialist Hospital's Laboratory (Table 1). The exclusion criteria included renal disease defined as an abnormal creatinine serum level (>2 mg/dL), malignancy, ongoing infectious disease, hepatic disease, and use of antibiotics

within four weeks before sample collection. Unfortunately, in the study, there are sex ratio differences between the CAD and control groups. CAD affects men more often than women; hence the patient group included mainly men. However, obtaining stool samples from healthy older adults for the study turned out unexpected difficult. For unknown reasons, perhaps embarrassment, men usually refused to provide stool samples, so the control group included mainly women. All study participants gave their written consents; the study followed guidelines of the Helsinki Declaration and was approved by Wrocław Medical University's Ethics Committee (authorization number KN-209/2020).

Table 1. Baseline clinical characteristics of the study cohort.

	CAD (Average) N = 15	Range	HC (Average) N = 15	Range	p-Value
Age (years)	67.2 ± 9	54–90	57 ± 11.1	47–74	p > 0.5
Sex(male/female)	11 / 4		5 / 10		
BMI	29.4 ± 5.05	23.6–39.26	25.95 ± 4.21	18.71–36.25	p < 0.05
CAD type	10 SA; 5-ACS		NO		
Indoxyl sulfate (µM)	13.1 ± 4.1	3.6–21.2	6.9 ± N3.5	2.1–15.7	p = 0.41
LPS (pg/mL)	2800 ± 1500	900–5500	8.5 ± 12.3	0.0–50	p < 0.0001

CAD, coronary artery disease; HC, healthy controls, SA—stable angina, ACS—acute coronary syndrome.

2.2. Microbiome Analysis

Stool samples from all participants, collected and transported to the laboratory in an ice bag, were stored at -80°C until processed. DNA was extracted from stool specimens using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. The hypervariable V3-V4 regions of the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene were amplified. Quantitative real-time polymerase chain reaction amplification was performed in triplicate. The products were purified, and then pyrosequencing was performed using the MiSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA). The entire workflow for microbiome analysis was run in Snakemake [11], cutadapt [12], USEARCH3 algorithm [13], phyloseq object [14], decipher idtaxa [15], with SILVA as reference database [16].

2.3. Endotoxin, Indoxyl Sulfate, Measurements in Patients Sera

LPS level was determined using Pierce™ LAL chromogenic assay (ThermoFisher Science, Basel, Switzerland), whereas IS was measured in plasma samples with Human Indoxyl Sulphate ELISA Kit (MyBioSource, Bergkällavägen, Sweden). Both assays were performed according to the manufacturer's instructions.

2.4. Cell Cultures and Conditioned Medium Preparation

Endothelial cells (primary human umbilical vein endothelial cell line HUVEC C-015-10C was obtained from ThermoFisher Scientific) were routinely cultured in an EBM-2 bullet kit medium (Lonza, Cologne, Germany). For experiments, HUVECs were trypsinized and seeded into cell culture plates at the density of 4×10^5 cells/mL in M199 medium (ThermoFisher Science, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and cultured overnight. The cells between passages 2 and 4 were used in the study. The human monocytic THP-1 cell line (EP-CL-0233) from Elabscience was cultured in RPMI-1640 medium (ThermoFisher Science, Basel, Switzerland) with 10% FBS and 1% antibiotics solution (penicillin, streptomycin). THP-1 cells were differentiated into monocyte-derived macrophages (MDM) with 50 ng/mL PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; Merc Life Science, Darmstadt, Germany) for 48 h. The obtained monocyte-derived macrophages (MDM) were stimulated for 18 h with LPS (from *Salmonella typhimurium*) and indoxyl sulfate (both from Merc Life Science, Darmstadt, Germany) at concentrations corresponding to a mean concentration detected in patients sera and ten times higher concentrations. Thus,

LPS was used at concentrations 3 ng/mL or 30 ng/mL and indoxyl at 13 μ M and 130 μ M. The mixtures of both metabolites at concentrations LPS 3 ng/mL + indoxyl 13 μ M, LPS 30 ng/mL + indoxyl 130 μ M were used to assess the co-toxicity of these both metabolites. Every time, before cell treatment, LPS and IS after dilution in a cell culture medium were preincubated for 1 h at 37 °C to interact with serum proteins, i.e., albumin for IS and LPS-binding protein (LBP) for LPS. The negative control included MDM in RPMI-1640 medium without LPS and indoxyl. After MDM stimulation with LPS and/or IS, the culture medium was drawn and centrifuged for 10 min at 1500 \times g rpm and filter-sterilized (0.22 μ m). The resultant supernatants (called conditioned media; CM) were frozen at -70 °C for further study. The CM from macrophages apart from LPS and indoxyl contains cellular metabolites and cytokines in concentrations toxic to cultured cells. Hence, CM was diluted with a cell culture medium to a concentration of 25% (hereafter referred to as CM25).

2.5. Cells Viability and ROS Measurement

HUVECs and MDM viability was assessed with 1 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Merc Life Science, Darmstadt, Germany). The cells were treated with LPS and IS at appropriate concentrations for 18 h and followed with incubation with MTT for 2 h at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. The MTT solution was removed, and 100 μ L DMSO was added to wells to dissolve violet formazan crystals. The reaction was read at 570 nm in a spectrophotometer UV/VIS 340. Cell morphology was assessed under an inverted microscope and after staining with phalloidin-FITC and DAPI to visualize the cell actin filaments and nuclei, respectively. The 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA; Merc Life Science, Darmstadt, Germany) was used to assess ROS production in HUVECs treated with LPS and IS at appropriate concentrations for 5 h. HUVECs treated with 50 μ M H₂O₂, and untreated cells served as a positive control and negative control, respectively. After treatment, cells were washed three times with Hank's Balanced solution (HBSS), and 10 μ M H2DCF-DA in HBSS was added to cells for 30 min. The fluorescent product was quantified with a spectrophotometer Tecan Infinite M200 plate reader at 488/525 nm.

2.6. Endothelial Cells Thrombogenicity Assessment

The effect of LPS and indoxyl on HUVECs thrombogenicity was investigated by monocyte adherence, E-selectin, and MCP-1 investigation. HUVECs were pre-treated for 5 h with LPS and indoxyl at appropriate concentrations in M199 medium supplemented with 10% FBS and CM25 diluted in M199 medium. THP-1 cells at the density 1×10^6 cell/mL were stained with 10 μ g/mL calcein-AM for 1 h and added to stimulated HUVEC cells for 4 h. Following three washes in HBSS, the number of THP-1 cells adhering to HUVECs was quantified under a fluorescence microscope (from six different fields of view) and expressed as the percentage of adhering monocytes relative to negative control, i.e., unstimulated HUVEC cells, considered 100%.

E-selectin level in HUVEC cells stimulated with LPS and indoxyl, and CM25 was assessed according to the protocol described by Grabner et al. [17]. Briefly, confluent HUVECs layers in a 6-well plate stimulated with CM25 or LPS and IS for 18 h was washed twice with PBS and fixed with cold 0.5% formalin in PBS for 2.5 min. Then, cells were washed with HBSS-BSA (0.5% w/v) before adding FITC-conjugated mouse monoclonal anti-human E-selectin antibody (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) at concentration 10 μ g per 1×10^6 cells in HBSS with 0.02% saponin (w/v). The reaction was run for 45 min at 4 °C in darkness, followed by two washes in HBSS-saponin and detachment with 0.25% trypsin. Detached cells were collected and centrifuged at 1000 \times g rpm at 4 °C for 10 min, washed twice with cold PBS, and finally diluted in PBS. A 100 μ L sample was added to a 96-well black-walled plate in triplicate and read using a Tecan Infinite M200 plate reader at 488/535 nm. HUVECs incubated at the same conditions with an isotype mouse FITC-conjugated antibody (Merc Life Science, Darmstadt, Germany) served as a negative control.

MCP-1 protein was assessed in the culture media from HUVECs stimulated with CM25 and LPS and IS antigens for 5 h using the MCP-1 Human ELISA kit (ThermoFisher Science, Basel, Switzerland) performed according to the manufacturer's instruction. The level of MCP-1 was calculated from a standard curve.

2.7. Statistical Analysis

For alpha diversity analyses, reads were normalized to 5000 reads by subsampling without replacements. Alpha diversity was assessed using Chao1 and Fisher's alpha (richness), Bulla and Simpson indices (evenness), and dominance index. In addition, beta-diversity was assessed using principal coordinate analysis (PCoA) weighted UniFrac, unweighted UniFrac, and Bray–Curtis distances. Statistical significance was tested with PERMANOVA using 9999 permutations. All in vitro study data are presented as the mean \pm SEM from at least three independent experiments performed in triplicate unless otherwise indicated in the figure legend. Statistical significance of differences between means was determined by analysis of variance (one-way ANOVA with post hoc Tukey's honestly significant difference) and Wilcoxon signed-ranks test with $p \leq 0.05$ considered statistically significant. The differences in enterotypes distribution in study groups were analysed using the chi-square test with $p \leq 0.05$ considered statistically significant.

3. Results

Bacterial metabolites leaking from the gut into the bloodstream can affect the vascular endothelium directly or indirectly by factors released from white blood cells upon contact with bacterial antigens. To better understand the role of gut dysbiosis in the development of atherosclerosis, the study aimed to evaluate, first, the gut microbiome in CAD patients and healthy controls, second, the levels of LPS and IS in the sera of CAD patients and their direct and indirect effects on the vascular endothelium.

There are five core bacterial phyla within the gut microbiome. The most numerous *Firmicutes* make up 65%, followed by *Bacteroidota* accounting 30%, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobiota* constituting 2%, *Actinobacteria* comprising 1%, and other phyla contributing <1% [18]. In the study, the 16S rRNA analysis revealed noteworthy differences in gut microbiome composition at the phylum, class, order, family, and genus levels in CAD patients compared to a group of healthy subjects (Figures 1 and 2). At the phylum level, the most striking difference was *Bacteroidetes* depletion in CAD patients compared to HC ($p = 0.01$). In addition, upward trends in *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria* were observed in the CAD group compared to HC, although they were statistically insignificant (Figure 1). *Gammaproteobacteria* also trended upward in the CAD group at the class level compared to the HC group. Order-level microbiome analysis confirmed a significant reduction in *Bacteroidales* ($p = 0.03$), a significant increase in *Coriobacteriales* ($p = 0.04$), and an upward trend in *Enterobacteriales* in CAD patients to healthy subjects. The analysis at the family level indicated *Rickenellaceae*, *Tannerellaceae*, *Prevotellaceae* depletion, and *Ruminococcaceae* over-representation in CAD patients compared to the HC group. However, the differences were statistically insignificant, most probably due to the small size of the study. At the genus level, a significant depletion of *Alistipes* of the *Rickenellaceae* family was recorded in CAD compared to HC ($p = 0.01$) (Figure 2).

Three enterotypes have been distinguished in the human gut microbiome based on the abundance of key bacterial genera, i.e., high in *Bacteroides* enterotype I, high in *Prevotella* enterotype II, and enterotype III characterized by a high level of *Ruminococcaceae* [19,20]. In the study, enterotype II was under-represented in CAD patients ($p < 0.0001$) compared to HC. In contrast, enterotype III was over-represented in CAD ($p < 0.0001$), confirming the appreciable differences in the gut microbiome between CAD patients and healthy subjects (Figure 3).

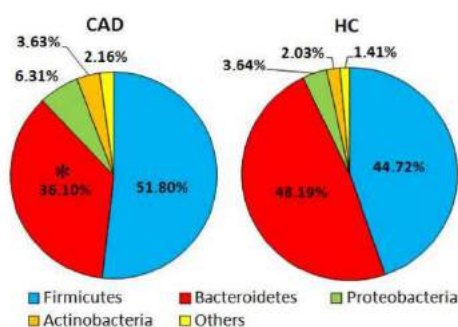


Figure 1. Community abundance (%) in gut microbiome of CAD patients and healthy controls (HC) at the phylum level. The asterisk indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) between CAD and HC groups.

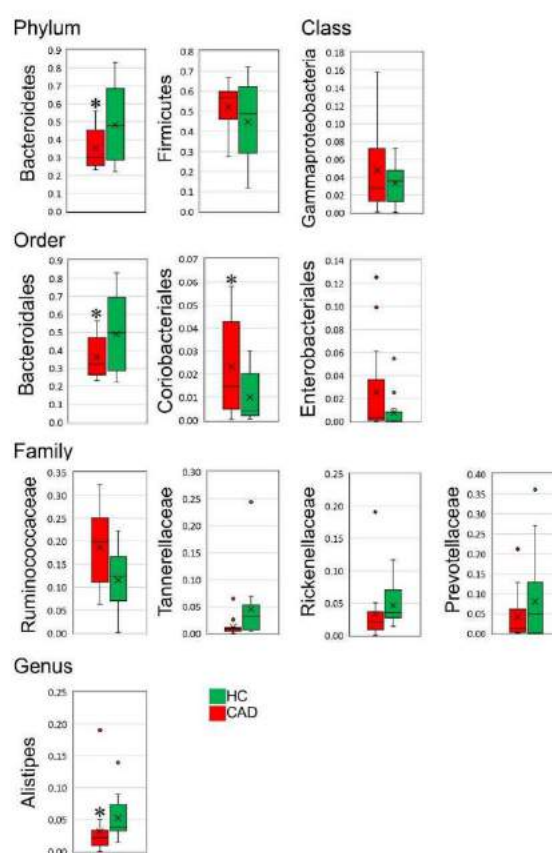


Figure 2. The most notable differences at the phylum, class, order, family and genus levels in the gut microbiome of CAD patients compared to healthy controls. The asterisks above bars indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between CAD and HC groups.

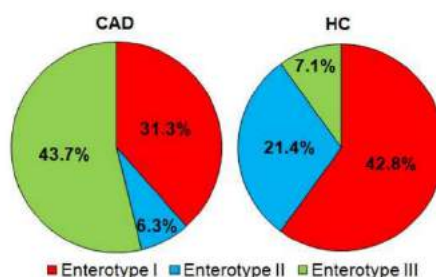


Figure 3. Enterotypes (%) distribution in CAD and HC groups. Enterotype I—Bacteroides prevalence; enterotype II—prevotella prevalence, and enterotype III Ruminococcus prevalence.

Further research focused on the association of gut dysbiosis in CAD patients with leakage of bacterial metabolites into the blood. The increasing trend in the number of *Gammaproteobacteria* in the CAD group has suggested that endotoxemia may directly play a role in atherogenesis, either in the induction of inflammation negatively affecting the vascular endothelium. An increase in Gram-negative bacterial species may affect intestinal epithelium tight junctions leading to increased intestinal permeability and LPS translocation from gut to circulation [21]. Over 85 bacterial species express tryptophanase enzyme degrading dietary tryptophan to indole [22]. Most of them are included within *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria* phyla [23]. These phyla showed an upward trend in patients with CAD in our study. Hence, we assumed that indole synthesis might be increased in the gut of the CAD patients.

The mean indoxyl level in CAD patients sera (13.3 μM), although twice as high as in healthy subjects (6.8 μM), did not reach statistical significance ($p = 0.41$). The most likely reason was the small size of the population studied. In contrast, the mean LPS level in CAD patients' sera (2800 pg/mL) was much higher than in sera from healthy subjects ($p < 0.0001$), confirming gut dysbiosis-induced endotoxemia in patients. The LPS levels in most control sera were below the LAL assay's threshold, i.e., 10 pg/mL (Table 1). Further, the direct and indirect impact of LPS and indoxyl at concentrations detected in patients sera on the thrombogenicity of endothelial cells was examined. The direct effect of both metabolites on HUVECs was investigated by applying LPS and indoxyl to cultured HUVECs. The indirect effect was analyzed with CM25 from MDMs stimulated with appropriate concentrations of LPS and indoxyl. Neither CM25 medium nor LPS and indoxyl or their combinations affected HUVECs viability (Figure 4a). Both metabolites at concentrations studied did not affect MDM viability except the highest ones used in the study (Figure 4b). The LPS at 30 ng/mL combined with indoxyl at 130 μM decreased MDM viability by >10% ($p = 0.04$). The morphology of HUVECs treated with LPS was unchanged compared to untreated cells (Figure 5a). In turn, HUVECs treated with CM25 appeared more elongated with distinct actin filaments (Figure 5b).

Increased reactive oxygen species (ROS) production in endothelial cells is a hallmark of cardiovascular diseases and endothelial damage [24]. The study investigated whether low indoxyl and LPS concentrations present in patients sera could induce ROS in HUVECs. The results showed that LPS either at low and high concentrations (3 ng/mL and 30 ng/mL) increased ROS production in HUVECs of 160-fold ($p < 0.00001$) and >200-fold ($p < 0.00001$), respectively, compared to untreated cells. Indoxyl at both concentrations (13 μM and 130 μM) further enhanced ROS production induced by LPS, i.e., by >240-fold ($p < 0.00001$) and >260-fold ($p = 0.00001$), respectively. However, indoxyl alone at both concentrations 13 μM and IS 130 μM induced similar ROS levels in HUVECs ($p = 0.25$) (Figure 6).

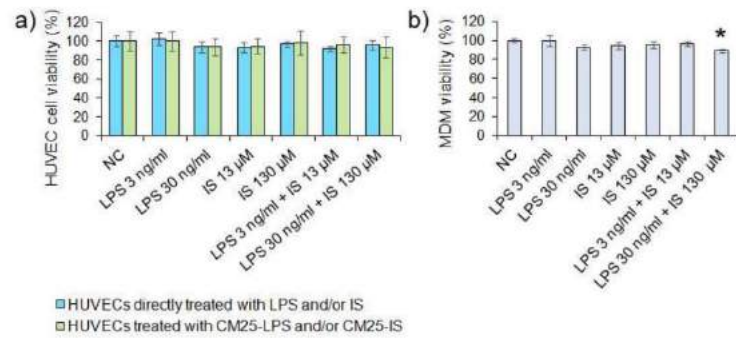


Figure 4. HUVECs and monocyte-derived macrophages (MDM) viability after stimulation with LPS and indoxyl sulfate (IS). (a) HUVECs and (b) MDM viability was assessed after 18 h with MTT. Data are means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. The asterisk above the bar indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$).

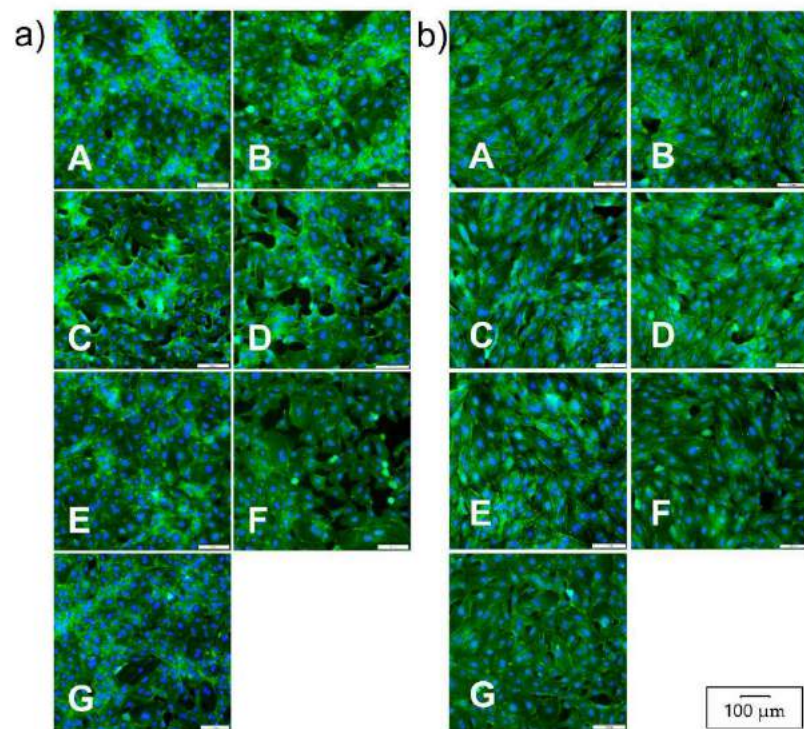


Figure 5. HUVECs morphology after stimulation with LPS and indoxyl. HUVECs were treated with LPS and IS or their combinations (a) or with conditioned medium from MDM (b) for 18 h. Fluorescence images present cells treated with LPS at 3 ng/mL and 30 ng/mL (Panels A,B); cells treated with indoxyl at 13 μM and 130 μM (Panels C,D); cells treated with LPS 3 ng/mL + IS 13 μM and LPS30 ng/mL + IS 130 μM (Panels E,F); and untreated cells (Panels G). Cells were stained with phalloidin-FITC and DAPI to visualize the cell's actin filaments and nuclei, respectively.

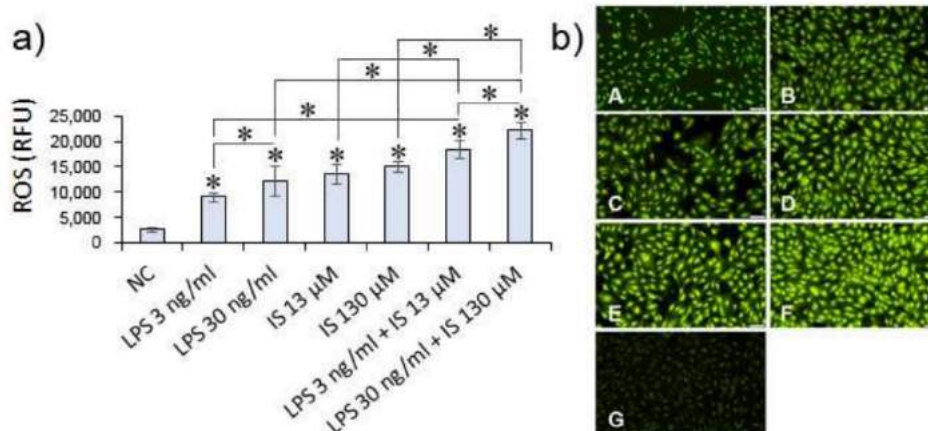


Figure 6. Reactive oxygen species (ROS) production. (a) HUVECs were treated for 5 h with LPS or IS or combined metabolites at appropriate concentrations. ROS was evaluated in HUVECs using a permeable probe H2DCF-DA compared to untreated cells (NC) as a negative control. Fluorescence intensity was read spectrophotometrically at Ex/EM = 488/525 nm. Data are presented as means \pm SEM from three independent assays performed in triplicate. The asterisks above bars indicate statistically significant differences between negative control and metabolites examined. (b) ROS production was visualized in a fluorescent microscope. The image shows HUVECs treated with metabolites at the following concentrations: LPS 3 ng/mL and 30 ng/mL (panels A,B); IS 13 μ M and 130 μ M (panels C,D); LPS 3 ng/mL + IS 13 μ M and LPS 30 ng/mL + IS 130 μ M (panels E,F); and negative control (panel G).

Endothelial dysfunction induced by bacterial toxins and cytokines results in leukocyte-endothelial interactions and procoagulant activities, ultimately leading to thrombosis and atherosclerosis [25]. To determine whether LPS and indoxyl at concentrations detected in patients sera could affect ECs thrombogenicity, E-selectin and MCP-1 levels, and monocyte adherence to HUVECs was assessed. The results demonstrated that LPS at both concentrations induced similar low E-selectin levels in HUVECs although significantly higher ($p > 0.05$) than that determined in the negative control. On the contrary, IS induced higher E-selectin levels, i.e., 2.2-fold higher levels at a concentration 13 μ M than LPS 3 ng/mL ($p = 0.00001$) and 1.7-fold higher levels at a concentration 130 μ M than LPS 30 ng/mL ($p = 0.00001$). Both combined metabolites at low and 10-times higher concentrations (LPS 3 ng/mL + IS 13 μ M and LPS 30 ng/mL + IS 130 μ M) induced similar E-selectin levels ($p = 0.08$ and $p = 0.22$, respectively). These results suggested that indoxyl alone enhances E-selectin in HUVEC to a higher degree than LPS or its combination with IS.

In contrast, CM25 exerted a much more significant effect on E-selectin levels in HUVECs, indicating that cytokines released by MDM stimulated with LPS and IS had a more pronounced impact on the endothelial expression of E-selectin (Figure 7a).

MCP-1 levels in CM25 used for HUVECs stimulation were significantly lower than in the culture media from HUVECs treated directly with LPS or indirectly stimulated with CM25 ($p < 0.05$) (Figure 7b). MDM treated for 18 h with indoxyl at 13 μ M and 130 μ M released significantly lower MCP-1 levels than cells treated with LPS ($p < 0.05$). Both metabolites combined at low concentrations (3 ng/mL LPS and 13 μ M IS) induced higher MCP-1 levels than a combination of LPS and indoxyl at higher concentrations (30 ng/mL LPS and 130 μ M IS) ($p < 0.05$). These results pointed out that indoxyl in a concentration-dependent manner inhibited MCP-1 secretion by MDM. Significantly higher MCP-1 levels in culture media from HUVECs directly stimulated with LPS and indoxyl than the levels

in CM25 from MDM ($p < 0.05$) signify de novo production of the chemokine by HUVECs in response to bacterial metabolites. Furthermore, MCP-1 levels secreted by HUVECs were not affected by the concentration of LPS and indoxyl. At low and 10-times higher concentrations, both metabolites induced the secretion of comparable MCP-1 levels, ca. 16 ng/mL ($p > 0.05$), although significantly higher than that released by untreated cells ($p < 0.05$). These results indicated that endothelial cells produced and secreted MCP-1 upon stimulation with LPS and IS.

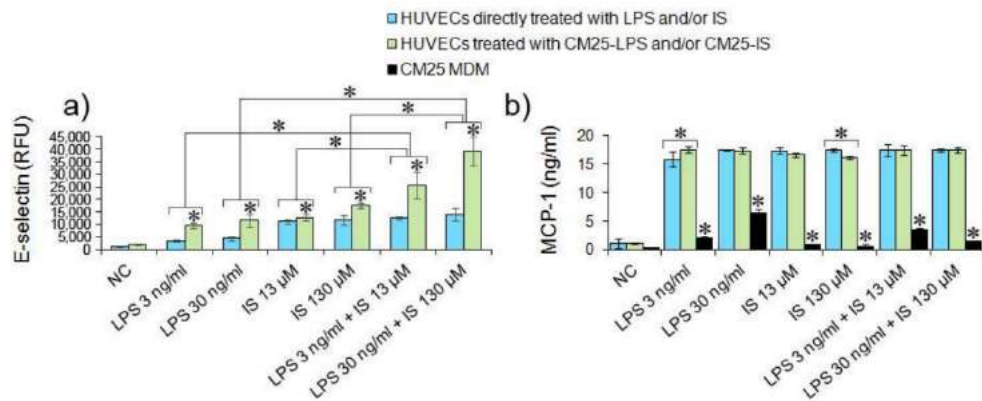


Figure 7. E-selectin and MCP-1 production in HUVECs stimulated with LPS and indoxyl. (a) E-selectin levels in HUVECs treated directly (blue bars) with LPS and IS or both metabolites and indirectly (green bars) with CM25-LPS/CM25-IS at appropriate concentrations. The asterisks above bars indicate the statistical differences in E-selectin levels between HUVECs stimulated directly with LPS/IS or indirectly with CM25. E-selectin was evaluated in HUVECs stimulated with LPS or IS or both bacterial metabolites for 18 h with FITC-conjugated mouse monoclonal anti-human E-selectin antibody. Data are presented as means \pm SEM from two independent assays performed in quadruplicate. (b) MCP-1 levels in CM25 from MDM (black bars) and a culture media from HUVECs stimulated for 18 h with CM25 (green bars) or with LPS/IS (blue bars). The asterisks above black bars represent statistically significant differences between MCP-1 levels in CM25 and a culture media from HUVECs stimulated with LPS and IS for 18 h. The asterisks above white and grey bars indicate differences between MCP-1 levels in a culture media from HUVECs stimulated with CM25 and LPS/IS. MCP-1 was evaluated using the MCP-1 Human ELISA kit. Data are the means \pm SEM from two independent assays performed in duplicate.

Direct and indirect HUVECs treatment with LPS and indoxyl significantly augmented monocyte adhesion to endothelial cells compared to untreated cells (Figure 8). However, indoxyl at both concentrations reduced monocyte adherence to HUVECs compared to LPS at concentrations 3 ng/mL and 30 ng/mL (0.7-fold decrease for IS at 13 μ M; $p = 0.002$ and 1.7-fold decrease for IS at 130 μ M; $p = 0.00001$, respectively). Indoxyl at 13 μ M combined with LPS 3 ng/mL increased monocyte adherence to HUVECs ($p = 0.04$), but when combined at 130 μ M with LPS 30 ng/mL had no significant effect on THP-1 adherence comparing to LPS 30 ng/mL alone ($p = 0.85$). CM25 had a more pronounced effect on monocyte adhesion, indicating that the cytokines released by MDM stimulated with both metabolites enhanced monocyte adherence to endothelial cells. CM25-IS 13 μ M reduced monocyte adherence to endothelial cells of 4.3-fold compared to LPS 3 ng/mL ($p = 0.00001$) whereas at 130 μ M IS of 6.1-fold compared to LPS 30 ng/mL ($p = 0.00001$). Combination of low IS and LPS concentrations (LPS 3 ng/mL + IS 13 μ M) increased monocyte adherence to HUVECs of 0.7-fold ($p = 0.003$) compared to LPS 3 ng/mL alone, but combination LPS 30 ng/mL + IS 130 μ M had no impact on the adherence of THP-1 ($p = 0.069$) comparing to LPS at 30 ng/mL. These results suggested that IS, depending on the concentration when

combined with LPS, enhances or reduces monocyte adherence to endothelial cells. Indoxyl combined with LPS at 3 ng/mL enhanced monocyte adherence, but combined with LPS at 30 ng/mL reduced adherence.

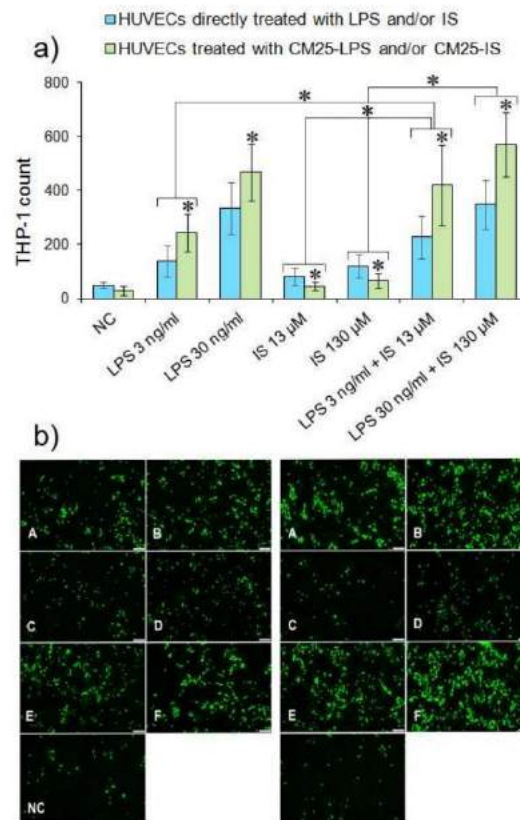


Figure 8. Monocyte adherence to HUVECs stimulated with LPS and indoxyl. **(a)** Quantitative THP-1 adherence to HUVECs treated directly (blue bars) with LPS/IS or indirectly (green bars) with CM25-LPS/CM25-IS at appropriate concentrations. The asterisks above bars indicate statistically significant differences between HUVECs treated directly and indirectly. The asterisks above white and grey bars indicate statistically significant differences between results for directly and indirectly treated cells. THP-1 cells stained with calcein-AM were incubated with HUVECs for 4 h and counted in a fluorescent microscope after washing out. **(b)** Fluorescence images of calcein-AM-stained monocytes adhering to HUVECs present HUVECs pretreated with LPS at 3 ng/mL and 30 ng/mL (**panels A,B**); cells treated with indoxyl at 13 μM and 130 μM (**Panels C,D**); cells treated with LPS 3 ng/mL + IS 13 μM and LPS 30 ng/mL + IS 130 μM (**Panels E,F**); and untreated cells (NC).

4. Discussion

An intact vascular endothelium displays an antithrombotic surface, preventing thrombosis and governing homeostasis. Endothelial dysfunction triggers a cascade of reactions shifting endothelial surface from antithrombotic to prothrombotic. As a result, endothelial activation promotes thrombus formation with two opposite implications for the host. First, the clot is digested and homeostasis restored; second, the thrombosis cascade progresses to CAD [26].

The gut microbiota plays a vital role in atherosclerosis, heart failure, diabetes, and obesity, acting as an independent risk factor [19]. A Western diet providing an excess of amino acids and proteins promotes the growth of proteolytic bacteria producing indole processed in the liver to indoxyl sulfate. Moreover, proteolytic gut microbiota metabolism favors gut dysbiosis [27]. Gut dysbiosis accompanies obesity. In the study, most CAD patients had a BMI close to 30, indicating obesity or at least prominent overweight. The gut microbiota of obese individuals contains a reduced proportion of *Bacteroidetes* and increased levels of *Firmicutes* [21], which was also confirmed in our study. Obesity leads to the dysregulation of the endocannabinoid tone system regulating gut permeability and plasma LPS levels. Muccini et al. [28] demonstrated that LPS acts as a master switch to control adipose tissue metabolism in vivo and ex vivo by blocking cannabinoid-driven adipogenesis. Obesity is associated with adipose tissue expansion and metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD), characterized by a reduced ability of the liver to detoxify the blood from potentially toxic bacterial metabolites, i.e., LPS, leaking from the gut into the circulation [29]. This implies that obesity-associated gut dysbiosis leads to a cascade of reactions that promote atherosclerosis development and/or progression.

The altered gut microbiota composition was confirmed in a metagenome study of patients with atherosclerosis and healthy individuals, strongly suggesting a correlation between CAD and dysbiosis [30–32].

Three enterotypes have been distinguished in gut microbiota based on key bacterial genera. The enterotypes are not related to age, weight, sex, or race but mostly depend on the long-term diet, allowing for better analysis of differences in the gut microbiome [19,20,33]. Enterotype I or *Bacteroides* enterotype is strongly associated with a Western diet rich in saturated fats and animal proteins. The *Bacteroides* enterotype comprises bacterial species that produce enzymes specialized in the degradation of animal proteins and characterizes increased saccharolytic and proteolytic capacity. Hence, the *Bacteroides* enterotype is more prevalent in industrialized countries.

In contrast, enterotype II or *Prevotella* enterotype is associated with bacteria producing hydrolases degrading plant fibers and of low lipophilic and proteolytic capacity. The *Prevotella* enterotype predominates in developing countries, in societies on agrarian diet [34,35]. The enterotype III or *Ruminococcus* enterotype, similarly to the *Bacteroides* enterotype, has been associated with protein- and fat-rich diet [36].

In the study *Prevotella* enterotype was under-represented, whereas *Ruminococcus* enterotype was over-represented in CAD patients compared to healthy subjects, supporting results of other studies [20,30,37,38].

The most striking difference in the gut microbiome composition was the significant depletion of *Bacteroidetes* in the CAD cohort, supporting previous observations [2,19,37]. *Bacteroidetes* play a pivotal role in maintaining a healthy gut ecosystem, stimulating immunity, providing short-chain fatty acids (SCFA), and facilitating the digestion of macronutrients [39]. *Bacteroidetes* depletion can result from a high-fat diet which changes the gut microbial profile and reduce its diversity. The depletion of *Bacteroidetes* combined with increased *Firmicutes* elevates circulating LPS levels leading to endotoxemia. Thus, *Bacteroidetes* may have the potential to regulate atherosclerosis progression [30]. Moreover, lipid A of LPS from *Bacteroides* is an antagonist of immune stimulation and inflammatory cytokine response [31,40]. Furthermore, the study demonstrated an increase in the prominent bacterial families producing indole, i.e., *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, and *Verrucomicrobiaceae* in CAD patients, which although statistically insignificant, was correlated with an increased indoxyl level which was twice as high as in healthy subjects.

Even though not reported in other studies, the prevalence of *Coriobacteriaceae* observed in the CAD cohort could play a role in the pathogenesis of atherosclerosis. In the animal model, the abundance of *Coriobacterium* correlated with higher cholesterol absorption from the gut [41]. At the genus level, in the CAD group, a marked decrease in *Alistipes* belonging to the family *Rikenellaceae* of *Bacteroidetes* was observed, supporting previous findings [41–43]. The *Alistipes* genus comprises species found primarily in the gut of

healthy humans and is a potent SCFA producer essential for maintaining balanced gut microbiota [41]. According to various studies, *Alistipes* play a protective role in cardiovascular diseases [32,42,43].

However, the gut microbiome analysis in our study could be biased by the different abundance of both sexes in the CAD and HC groups. According to Kim et al. [44], sex is one of the critical variables affecting the gut microbiota. However, the hormone production declining with age seems to be less critical in the elderly. Moreover, in a well-designed study of a large Nederland cohort, sex explained only 0.5% of the total variation in the gut microbiota after correction of all confounding factors like diet, body mass index, and others [45]. Altogether, the results of studies concerning the differences in microbial taxa between the sexes are inconsistent. According to Ragonnaud et al. [46], some bacterial taxa, including *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Ruminococcaceae*, do not correlate with sex, body mass index, and age. Hence, the diet seems to be a crucial factor shaping gut microbiota [44,45]. Considering that gut dysbiosis underlies the leakage of some bacterial metabolites into circulation, in the study, we analyzed levels of the endotoxin and indoxyl sulfate, a co-metabolite of indole in CAD patients sera, and the in vitro effects of these metabolites on vascular endothelium. The results showed that LPS and indoxyl combined at levels detected in CAD patients sera induced oxidative stress in cultured endothelial cells. Loffredo et al. [47] showed that LPS at a similar low concentration (3 ng/mL) induced oxidative stress in patients with peripheral arterial disease supporting our findings. Moreover, they found the correlation between LPS and zonulin of tight junctions, suggesting gut permeability as a trigger for LPS translocation. In turn, Lee et al. [48] demonstrated that indoxyl at low concentrations (50 µg/mL) induced significant ROS production in HUVECs. On the other hand, Dou et al. [49] demonstrated that indoxyl at concentrations from 25 µg/mL to 50 µg/mL increased ROS production in HUVECs only insignificantly, which contradicts our results. However, these discrepancies may have been due to methodological variations, e.g., different endothelial cell lines or different culture media.

Oxidative stress is a potent risk factor for atherogenesis. Pathological endothelial activation results in the secretion of factors attracting monocytes and induces the expression of monocyte-binding adhesion molecules [50]. E-selectin plays an essential role in priming and amplifying the innate immune response of endothelial cells, leukocyte rolling, and adhesion [51]. LPS directly increases the expression of E-selectin and integrin counterpart receptors in ECs [6]. In the study, LPS and indoxyl applied directly and indirectly in conditioned medium to endothelial cells increased E-selectin levels reaffirming earlier findings [52]. Higher E-selectin levels induced by CM25 in HUVECs indicated that cytokines and other factors released by MDM upon treatment with LPS and IS enhance the effects of these metabolites on E-selectin expression by endothelial cells. These results implied that inflammation increases endothelial thrombogenicity induced by bacterial metabolites leaking from the gut.

MCP-1 is a significant chemokine recruiting monocyte/macrophage to the injured vascular endothelial cells. LPS activates endothelial cells and monocyte/macrophage to secrete proinflammatory cytokines, i.e., IL-6 and IL-8, and MCP-1 among them [53,54]. In the study, LPS and indoxyl sulfate combined induced synthesis de novo and secretion of MCP-1 in HUVECs. On the contrary, indoxyl alone in a concentration-dependent manner inhibited MCP-1 secretion by macrophages but not by endothelial cells, which corroborates results from other studies. Ferreira et al. [55] demonstrated that indoxyl at a 53 µg/mL concentration decreased MCP-1 production by monocytes. In contrast, according to Tumor et al. [56], indoxyl increased MCP-1 expression in HUVECs but only at a concentration ≥ 500 µM. Despite methodological differences in the studies, these contradictory results point out the necessity for further study of the impact of indoxyl on MCP-1 production in endothelial cells.

Considering the deleterious effect of LPS and indoxyl on ROS production, MCP-1, and E-selectin levels in endothelial cells demonstrated in the study, the influence of both metabolites on monocyte adherence was further examined. Four hours of exposure of

endothelial cells to LPS or CM25 significantly increased monocyte adhesion. However, this effect diminished when HUVECs were stimulated with indoxyl or the combination of LPS and indoxyl at higher concentrations. According to Ito et al. [57], indoxyl at concentrations below 25 μ M generated insignificant adherence of THP-1 to HUVECs. However, the adherence of monocytes increased in the presence of tumor necrosis factor- α (TNF- α), which agrees with our results. In the study, conditioned medium containing cytokines released by MDM stimulated with LPS and indoxyl enhanced monocyte adhesion to HUVECS compared to these metabolites directly applied to endothelial cells. Altogether, these data suggest a cytokine- and exposure-time-dependent effect of indoxyl on monocyte adhesion to vascular endothelium.

It has long been known that LPS and indoxyl induce inflammation [58,59]. However, findings to date refer to high or even very high LPS and indoxyl concentrations accompanying sepsis or CKD, which rarely relate to the actual blood levels of both metabolites in CAD patients without kidney failure. Similarly, studies of indoxyl toxicity to endothelium are based on high concentrations of the metabolite detected in CKD patients sera. For the first time, the study attempted to evaluate the effects of a combination of low concentrations of endotoxin and indoxyl on vascular endothelium. The results obtained strongly suggest that both these metabolites, even in meager concentrations, exert a deleterious effect on endothelial cells' thrombogenicity. A significant limitation of the study is the small study cohort associated with strict recruitment criteria excluding patients with various chronic diseases often associated with CAD.

Nonetheless, the study indicated that bacterial metabolites leaking from the gut adversely affect vascular endothelium, promoting the development or progression of CAD. Moreover, the study demonstrated the co-toxicity of bacterial metabolites entering blood during gut dysbiosis and the impact of cytokines released by monocytes upon stimulation with endotoxin and indoxyl on the enhanced detrimental effect of these metabolites on the endothelium. Although the study hardly reflects the scenario *in vivo*, the results provide new insights into the role of gut dysbiosis in atherogenesis and the necessity for further study of the co-toxicity of bacterial metabolites, primarily upon inflammation.

5. Conclusions

16S rRNA sequencing analysis revealed gut dysbiosis in CAD patients that was further confirmed by elevated levels of bacterial metabolites, i.e., LPS and indoxyl sulfate in patients sera. Both metabolites demonstrated co-toxicity in meager concentrations to endothelial cells inducing ROS, E-selectin, and MCP-1 production and promoting thrombogenicity of endothelial cells confirmed by monocyte adherence.

Author Contributions: M.C. (Marcin Choroszyand): B.S., T.R., J.R. Conceptualization, Investigation, B.S., U.W., M.C. (Mateusz Chmielarz) Methodology, K.L., L.L., M.C. (Marcin Choroszyand). Software, Validation, Data Curation, M.C. (Marcin Choroszyand), B.S. Original Draft Preparation, Writing—Review and Editing, M.C. (Marcin Choroszyand), B.S., M.W. Writing—Review and Editing, Supervision, B.S. Project Administration, Visualization, M.C. (Marcin Choroszyand) Funding Acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was supported by a grant STM.A130.20.158 to M. C. from Wroclaw Medical University, Poland.

Institutional Review Board Statement: All study participants gave their written consents; the study followed the guidelines of the Helsinki Declaration and was approved by Wroclaw Medical University's Ethics Committee.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data supporting results will be made available by the authors upon request when warranted.

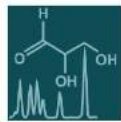
Conflicts of Interest: The authors declare no known competing financial interests or personal relationships that could influence the work reported in this paper.

References

1. Vasan, R.S.; Benjamin, E.J. The Future of Cardiovascular Epidemiology. *Circulation* **2016**, *133*, 2626–2633. [CrossRef] [PubMed]
2. Trøseid, M.; Andersen, G.Ø.; Broch, K.; Hov, J.R. The gut microbiome in coronary artery disease and heart failure: Current knowledge and future directions. *EBioMedicine* **2020**, *52*, 102649. [CrossRef] [PubMed]
3. Tang, W.H.; Kitai, T.; Hazen, S.L. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation Res.* **2017**, *120*, 1183–1196. [CrossRef] [PubMed]
4. Lobionda, S.; Sittipo, P.; Kwon, H.Y.; Lee, Y.K. The role of gut microbiota in intestinal inflammation with respect to diet and extrinsic stressors. *Microorganisms* **2019**, *7*, 271. [CrossRef]
5. Fujii, H.; Goto, S.; Fukagawa, M. Role of uremic toxins for kidney, cardiovascular, and bone dysfunction. *Toxins* **2018**, *10*, 202. [CrossRef]
6. Gosh, S.S.; Wang, J.; Yannie, P.J.; Gosh, S. Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development. *J. Endocr Soc.* **2020**, *4*, 2. [CrossRef]
7. Boren, J.; Chapman, M.J.; Krauss, R.M.; Packard, C.J.; Bentzon, J.F.; Binder, C.J.; Daemen, M.J.; Demer, L.L.; Hegele, R.A.; Nicholls, S.J.; et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: Pathological, genetic, and therapeutic insights: A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 2313–2330. [CrossRef] [PubMed]
8. Sanchez-Rodriguez, E.; Egea-Zorrilla, A.; Plaza-Diaz, J.; Aragon-Vela, J.; Munoz_quezada, S.; Tercedor-Sanchez, L.; Abadia-Molina, F. The gut microbiota and its implication in the development of atherosclerosis and related cardiovascular diseases. *Nutrients* **2020**, *12*, 605. [CrossRef] [PubMed]
9. Dauphinee, S.M.; Karsan, A. Lipopolysaccharide signalling in endothelial cells. *Lab. Invest.* **2006**, *86*, 9–22. [CrossRef]
10. Levels, J.H.M.; Marquart, J.A.; Abraham, P.R.; van den Ende, A.E.; Molhuizen, H.O.; van Deventer, S.J.; Meijers, J.C. Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 2321–2326. [CrossRef] [PubMed]
11. Köster, J.; Rahmann, S. Snakemake—A scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2520–2522. [CrossRef] [PubMed]
12. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **2011**, *17*, 10–12. [CrossRef]
13. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461. [CrossRef]
14. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef]
15. Murali, A.; Bhargava, A.; Wright, E.S. IDTAXA: A novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome* **2018**, *6*, 1–14. [CrossRef]
16. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glockner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D592. [CrossRef]
17. Gräßner, R.; Till, U.; Heller, R. Flow cytometry determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intracellular cell adhesion molecule-1 in formalin fixed endothelial cell monolayers. *Cytometry* **2000**, *40*, 238–244. [CrossRef]
18. Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.A.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet and diseases. *Microorganisms* **2019**, *7*, 14. [CrossRef]
19. da Luz, P.L.; Haas, E.A.; Favarato, D. Intestinal microbiota and cardiovascular diseases. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* **2020**, *33*, 462–471. [CrossRef]
20. Chen, J.; Guo, J.; Gui, Y.; Xu, D. Physical exercise, gut microbiota, and atherosclerotic cardiovascular diseases. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 17. [CrossRef] [PubMed]
21. Muscogiuri, G.; Cantone, E.; Cassarano, S.; Tuccinardi, D.; Barrea, L.; Savastano, S.; Colao, A. Gut microbiota: A new path to treat obesity. *Int. J. Obes. Suppl.* **2019**, *9*, 10–19. [CrossRef]
22. Wyatt, M.; Greathouse, K.L. Targeting dietary and microbial tryptophan-indole metabolism as therapeutic approaches to colon cancer. *Nutrients* **2021**, *13*, 1189. [CrossRef]
23. Gasaly, N.; de Vos, P.; Héros, M.A. A focus on bacterial metabolism and its relevance for intestinal inflammation. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 658354. [CrossRef]
24. Fan, L.M.; Douglas, G.; Bendal, J.K.; McNeill, E.; Crabtree, M.J.; Hale, A.B.; Mai, A.; Li, J.M.; McAteer, M.A.; Schneider, J.E.; et al. Endothelial cell specific reactive oxygen species production increases susceptibility to aortic dissection. *Circulation* **2014**, *129*, 2661–2672. [CrossRef]
25. Incalza, M.A.; D’Oria, R.; Natalicchio, A.; Perrini, S.; Laviola, L.; Giorgino, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacol.* **2018**, *100*, 1–19. [CrossRef] [PubMed]
26. Yau, J.W.; Teoh, H.; Verma, S. Endothelial cell control of thrombosis. *BCM Cardiovasc. Dis.* **2015**, *15*, 130. [CrossRef] [PubMed]
27. Yang, C.Y.; Tarrg, D.-C. Diet, gut microbiome and indoxyl sulphate in chronic kidney disease. *Patients. Nephrology* **2018**, *23*, 16–20. [CrossRef] [PubMed]
28. Muccioli, G.G.; Naslain, D.; Backhed, F.; Reigstad, C.S.; Lambert, D.M.; Delzenne, N.M.; Cani, P.D. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Bio.* **2010**, *6*, 39. [CrossRef] [PubMed]

29. Godoy-Matos, A.F.; Silva Junior, W.S.; Valerio, C.M. NAFLD as a continuum: From obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2020**, *12*, 60. [\[CrossRef\]](#)
30. Yoshida, N.; Yamashita, T.; Hirata, K. Gut microbiome and cardiovascular diseases. *Diseases* **2018**, *6*, 56. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Jie, Z.; Xia, H.; Zhong, S.-L.; Feng, Q.; Li, S.; Liang, S.; Zhong, H.; Liu, Z.; Gao, Y.; Zhao, H.; et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 845. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Parker, B.J.; Wearsch, P.A.; Veloo, A.C.; Rodriguez-Palacios, A. The genus *Alistipes*: Gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer and mental health. *Front. Immunol.* **2010**, *11*, 906. [\[CrossRef\]](#)
33. Yamashita, T. Intestinal immunity and gut microbiota in atherogenesis. *J. Atheroscler. Thromb.* **2017**, *24*, 110–119. [\[CrossRef\]](#)
34. Christensen, L.; Roager, H.M.; Astrup, A.; Hjorth, M. Microbial enterotypes in personalized nutrition and obesity management. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *108*, 645–651. [\[CrossRef\]](#)
35. Wu, G.D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y.-Y.; Keilbaugh, S.A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W.A.; Knight, R.; et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **2011**, *334*, 105–108. [\[CrossRef\]](#)
36. Martinez-Medina, J.N.; Flores-Lopez, R.; Lopez-Contreras, B.E.; Villami-Ramirez, H.; Guzman-Munoz, D.; Macieas-Kaufer, L.R.; Leon-Mimila, P.; Granados-Portillo, O.; Del-Rio-Navarro, B.E.; Gomez-Perez, J.F.; et al. Effect of gut microbial enterotypes on the association between habitual dietary fiber intake and insulin resistance markers in Mexican children and adults. *Nutrients* **2021**, *13*, 3892. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Emoto, T.; Yamashita, T.; Sasaki, N.; Hirota, Y.; Hayashi, T.; So, A.; Kasahara, K.; Yodoi, K.; Matsumoto, T.; Mizoguchi, T.; et al. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: A possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **2016**, *23*, 908–921. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Xu, D.J.; Wang, K.C.; Yuan, L.B.; Li, H.F.; Wei, L.Y.; Chen, L.; Jin, K.K.; Lin, Q.Q. Compositional and functional alterations of gut microbiota in patients with stroke. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2021**, *12*, 3434–3448. [\[CrossRef\]](#)
39. Wexler, A.G.; Goodman, A.L. An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. *Nat. Rev.* **2017**, *2*, 17026. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. He, L. Alterations of gut microbiome by overnutrition impact gluconeogenic gene expression and insulin signalling. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2121. [\[CrossRef\]](#)
41. Martinez, I.; Perdicaro, D.J.; Brown, A.W.; Hammons, S.; Carden, T.J.; Carr, T.P.; Eskridge, K.M.; Walter, J. Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 516–524. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Zuo, K.; Li, J.; Li, K.; Hu, C.; Gao, Y.; Chen, M.; Hu, R.; Liu, Y.; Chi, H.; Wang, H.; et al. Disordered gut microbiota and alterations in metabolic patterns are associated with atrial fibrillation. *GigaScience* **2019**, *8*, giz058. [\[CrossRef\]](#)
43. Zhou, W.; Cheng, Y.; Zhu, P.; Nasser, M.I.; Zhang, X.; Zhao, M. Implication of gut microbiota in cardiovascular diseases. *Oxi. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 5394096. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Kim, Y.S.; Unno, T.; Kim, B.-Y.; Park, M.-S. Sex differences in gut microbiota. *World J. Mens. Health* **2020**, *38*, 48–60. [\[CrossRef\]](#)
45. Sinha, T.; Vila, A.V.; Garmeaeva, S.; Jankipersadsing, S.A.; Imhann, F.; Collij, V.; Bonder, M.J.; Jiang, X.; Gurry, T.; Alm, E.J.; et al. Analysis of 1135 gut metagenomes identifies sex-specific resistome profiles. *Gut Microbes* **2019**, *10*, 358–366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Ragonnaud, E.; Biragyn, A. Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. *Immun. Ageing* **2021**, *18*, 2. [\[CrossRef\]](#)
47. Loffredo, L.; Ettore, E.; Zicari, A.M.; Inghilleri, M.; Nocella, C.; Perri, L.; Spalice, A.; Fossati, C.; De Lucia, M.C.; Pigozzi, F.; et al. Oxidative stress and gut-derived lipopolysaccharides in neurodegenerative disease: Role of NOX-2. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, *2020*, 8630275. [\[CrossRef\]](#)
48. Lee, W.-C.; Li, L.-C.; Chen, J.-B.; Chang, H.-W. Indoxyl sulfate-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impaired biogenesis are partly protected by vitamin C and N-acetylcysteine. *Scientific World J.* **2015**, *2015*, 620826. [\[CrossRef\]](#)
49. Dou, L.; Jourde-Chiche, N.; Faure, V.; Cerini, C.; Berland, Y.; Dignat-George, F.; Brunet, P. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 1302–1308. [\[CrossRef\]](#)
50. Fernandez, A.Z.; Siebiel, L.S.; El-Osta, A. Atherogenic factors and their epigenetic relationship. *Int. J. Vascular Med.* **2010**, *2010*, 437809. [\[CrossRef\]](#)
51. Harrington, E.O.; Stefanec, T.; Newton, J.; Rounds, S. Release of soluble E-selectin from activated endothelial cells upon apoptosis. *Lung* **2006**, *184*, 259–266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Sun, J.; Li, Y.; Graziani, G.M.; Filion, L.; Allan, D. E-selectin mediated adhesion and migration of endothelial colony forming cells is enhanced by SDFG-1 α /CXCR4. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60890. [\[CrossRef\]](#)
53. Zeuke, S.; Ulmer, A.J.; Kusumoto, S.; Katus, H.A.; Heine, H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc. Res.* **2002**, *56*, 126–143. [\[CrossRef\]](#)
54. Tucureanu, M.M.; Rebleanu, D.; Constantinescu, C.A.; Deleanu, M.; Voicu, G.; Butoi, E.; Calin, M.; Manduteanu, I. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 63–76. [\[CrossRef\]](#)
55. Ferreira da Cruz, E.; Cendoroglo, M.; Manfredi, S.R.; Canziani, M.E.; Reduble Quinto, B.M.; Grabulosa, C.C.; Guimaraes-Souza, N.K.; Peres, A.T.; de Carvalho, J.T.; Batista, M.C.; et al. Effect of indoxyl sulfate on oxidative stress, apoptosis, and monocyte chemoattractant protein-1 in leukocytes. *ISRN Oxidative Medicine* **2014**, *2014*, 412389. [\[CrossRef\]](#)

56. Tumor, Z.; Shimizu, H.; Enomoto, A.; Miyazaki, H.; Niwa, T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF- κ B activation. *Am. J. Nephrol.* **2010**, *31*, 435–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ito, S.; Osaka, M.; Higuchi, Y.; Niskijima, F.; Ishii, H.; Yoshida, M. Indoxyl sulfate induces leukocyte-endothelial interactions through up-regulation of E-selectin. *J. Bio. Chem.* **2010**, *285*, 38869–38875. [[CrossRef](#)]
58. Mako, V.; Czucz, J.; Weiszhar, Z.; Herczenik, E.; Matko, J.; Prohaszka, Z.; Cervenak, L. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF α , and LPS. *Cytometry* **2010**, *77A*, 962–970. [[CrossRef](#)]
59. Liu, F.; Fan, C.; Zhang, L.; Li, Y.; Hou, H.; Ma, Y.; Fan, J.; Tan, Y.; Wu, T.; Jia, S.; et al. Alterations of gut microbiome in Tibetan patients with coronary heart disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 373. [[CrossRef](#)]



metabolites

IMPACT
FACTOR
5.581

Indexed in:
PubMed

Systematic Review

Human Gut Microbiota in Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis

Marcin Choroszy, Kamil Litwinowicz, Robert Bednarz, Tomasz Roleder, Amir Lerman, Takumi Toya, Karol Kamiński, Emilia Sawicka-Śmiarowska, Magdalena Niemira and Beata Sobieszcańska

Special Issue

Metabolic Profiling of Cardiovascular Disease Volume 2

Edited by

Prof. Dr. Christian Cadeddu Dessalvi, Prof. Dr. Ernesto D'Aloja and Prof. Dr. Vassilios Fanos



<https://doi.org/10.3390/metabo12121165>

Systematic Review

Human Gut Microbiota in Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis [†]

Marcin Choroszy ^{1,*}, Kamil Litwinowicz ², Robert Bednarz ³, Tomasz Roleder ⁴, Amir Lerman ⁵, Takumi Toya ^{5,6}, Karol Kamiński ⁷, Emilia Sawicka-Śmiarowska ^{7,8}, Magdalena Niemira ⁹ and Beata Sobieszkańska ¹

¹ Department of Microbiology, Wrocław Medical University, 50-367 Wrocław, Poland

² Department of Biochemistry and Immunochemistry, Wrocław Medical University, 50-367 Wrocław, Poland

³ Ninewells Hospital and Medical School, James Arrott Drive, Dundee DD1 9SY, UK

⁴ Research and Development Centre, Regional Specialist Hospital, 51-124 Wrocław, Poland

⁵ Department of Cardiovascular Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA

⁶ Division of Cardiology, National Defense Medical College, Tokorozawa 359-8513, Japan

⁷ Department of Population Medicine and Lifestyle Diseases Prevention, Medical University of Białystok, 15-269 Białystok, Poland

⁸ Department of Cardiology, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland

⁹ Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, 15-089 Białystok, Poland

* Correspondence: marcin.choroszy@student.umw.edu.pl; Tel.: +48-71-7840-065; Fax: +71-784-0117

[†] The work was performed at Wrocław Medical University.



Citation: Choroszy, M.; Litwinowicz, K.; Bednarz, R.; Roleder, T.; Lerman, A.; Toya, T.; Kamiński, K.; Sawicka-Śmiarowska, E.; Niemira, M.; Sobieszkańska, B. Human Gut Microbiota in Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolites* **2022**, *12*, 1165. <https://doi.org/10.3390/metabo12121165>

Academic Editors: Christian Cadeddu Dessalvi, Ernesto D'Aloja and Vassilios Fanos

Received: 19 October 2022

Accepted: 18 November 2022

Published: 23 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In recent years, the importance of the gut microbiome in human health and disease has increased. Growing evidence suggests that gut dysbiosis might be a crucial risk factor for coronary artery disease (CAD). Therefore, we conducted a systematic review and meta-analysis to determine whether or not CAD is associated with specific changes in the gut microbiome. The V3–V4 regions of the 16S rDNA from fecal samples were analyzed to compare the gut microbiome composition between CAD patients and controls. Our search yielded 1181 articles, of which 21 met inclusion criteria for systematic review and 7 for meta-analysis. The alpha-diversity, including observed OTUs, Shannon and Simpson indices, was significantly decreased in CAD, indicating the reduced richness of the gut microbiome. The most consistent results in a systematic review and meta-analysis pointed out the reduced abundance of *Bacteroidetes* and *Lachnospiraceae* in CAD patients. Moreover, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus* taxa demonstrated an increased trend in CAD patients. The alterations in the gut microbiota composition are associated with qualitative and quantitative changes in bacterial metabolites, many of which have pro-atherogenic effects on endothelial cells, increasing the risk of developing and progressing CAD.

Keywords: coronary artery disease; atherosclerosis; gut microbiome; dysbiosis; SCEFA; LPS

1. Introduction

Various studies on coronary atherosclerosis have revealed that chronic vascular inflammation, which begins with a coronary endothelial injury, is an essential process in the development of coronary artery disease (CAD) [1]. Despite advances in various drug therapies and interventions, CAD remains one of the most common causes of death worldwide [2]. In recent years, data from rigorous preclinical studies and epidemiological studies linking changes in the gut microbiome to vascular endothelial dysfunction and vascular inflammation have accumulated [3].

The gut microbiome comprises over 2000 species, most of which fall into the four main phyla: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria* [4]. A diverse, well-balanced gut microbiota is crucial to human health. Gut microbiota consisting of a 100,000,000,000,000 microbes living in a symbiotic host relationship regulate host

metabolism, insulin sensitivity, intestinal endocrine, and neurological function. Gut bacteria produce neurotransmitters, influence the maturation and training of the host immune system, neutralize exogenous toxins, and protect against overgrowth pathogens [5–7]. Active microbial metabolites, such as short-chain fatty acids, vitamins, autoinducers, indole derivatives, bile acid metabolites, microbial amino acids, and polyamines, directly regulate human physiology [8].

Disruption of the diversity and abundance of the gut microbiota, termed gut dysbiosis, underlies many diseases, including metabolic syndrome associated with obesity and diabetes. Gut dysbiosis underlies inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel disease (IBS), colon cancer, asthma, autism, Parkinson’s disease, Alzheimer’s disease, schizophrenia, depression and cardiovascular diseases [5,9–12]. An imbalance in the abundance of specific bacterial taxa in the gut microbiota correlates with a deficiency or excess of bacterial metabolites that fundamentally affect the physiological status of the host cells, including endothelial cells. To exemplify, specific tryptophan-derived gut microbiota metabolites, such as indole metabolites and butyrate, serve as regulators of the intestinal barrier, increasing the expression of tight junction proteins that ensure the tightness of the epithelial barrier [13–15]. Hence, the depletion of butyrate-producing bacterial taxa, e.g., *Lachnospiraceae*, may compromise intestinal barrier integrity and leakage of bacterial metabolites into the bloodstream [16]. One of the most critical consequences of intestinal barrier dysfunction in gut dysbiosis is endotoxemia and the activation of immune processes leading to chronic subacute inflammation [17,18]. Apart from immune cells, low-grade endotoxemia affects endothelial cells, contributing to the initiation and progression of atherosclerosis [19,20]. Many studies have shown alterations in the composition and diversity of the gut microbiota in CAD [21].

Nevertheless, it is still uncertain which bacterial taxa are altered in CAD and whether these alterations are consistent across different study populations. Studies of gut microbiota composition are always affected by factors related to the study population, such as age, diet, chronic diseases, medications, and physical activity [22]. In addition, gut microbiota studies are complicated by the choice of sequencing methods and bioinformatic pipelines, which significantly influence the results [23].

A recent study on simulated microbiome datasets highlights the importance of using consistent analytical pipelines. Nearing et al. [24] have shown that the appropriate tools for the differential abundance of microbial taxa testing impact the result. Therefore, this meta-analysis and systematic review aimed to provide an overview of the literature linking changes in gut microbiota with CAD using consistent analytical tools across all the datasets.

2. Materials and Methods

2.1. Systematic Review

This systematic review is registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews “PROSPERO” ID CRD42020187549. The study was conducted following the Preferred Reporting Items of Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines.

2.1.1. Search Strategy

A comprehensive literature search was performed. The search terms were “(Human Microbiomes OR Human Microbiome OR Human Microflora OR Microbial Community Structure OR Human Flora OR Composition, Microbial Community) AND (atherosclerosis or atherogenesis or Coronary atherosclerosis or Coronary Artery Disease or Coronary Atherosclerosis) AND ischemic heart disease NOT Review” for Medline on PubMed. The search terms were appropriately modified for other databases and are included in the Supplementary Materials (Supplementary S1). The search strategy was applied to the following databases: PubMed, Scopus, Web of Science, Embase, CINAHL, and Cochrane. We used Google Scholar to search for grey literature; the last search was conducted on 14 December 2021. Before proceeding with the selection of eligible studies, all duplicates were removed.

2.1.2. Inclusion and Exclusion Criteria

We have included studies that analyzed the differences in the profile of the intestinal microbiome between patients with CAD (both stable and unstable) and healthy controls. Only human studies were included, and neither publication status nor language restrictions were imposed. The primary outcome measure was a comparison of relative abundances of bacterial phyla, families, and genera of human gut microflora. We excluded papers in which CAD was diagnosed by clinical symptoms or ECG only, without coronary imaging methods. Articles in which the control group included subjects with coronary artery disease, or the study group consisted of cadavers, were also excluded.

2.1.3. Assessment of Eligibility and Data Extraction

After removing the duplicates, two authors (MC and RB) independently screened obtained studies by titles and abstracts for relevance to the topic of our systematic review. The studies obtained by screening were read in full text, and eligibility was determined based on inclusion and exclusion criteria. The records that did not fulfill the criteria were removed without using automatic tools. Discrepancies were discussed, and a third author (KL) arbitrated if disagreement was not resolved. We have included peer-reviewed papers and those still awaiting review (grey literature). The eligibility assessment of studies is summarized in Figure 1. The study quality was assessed using a modified Newcastle Ottawa Scale (Supplementary).

PRISMA 2020 flow diagram for new systematic reviews which included searches of databases, registers and other sources

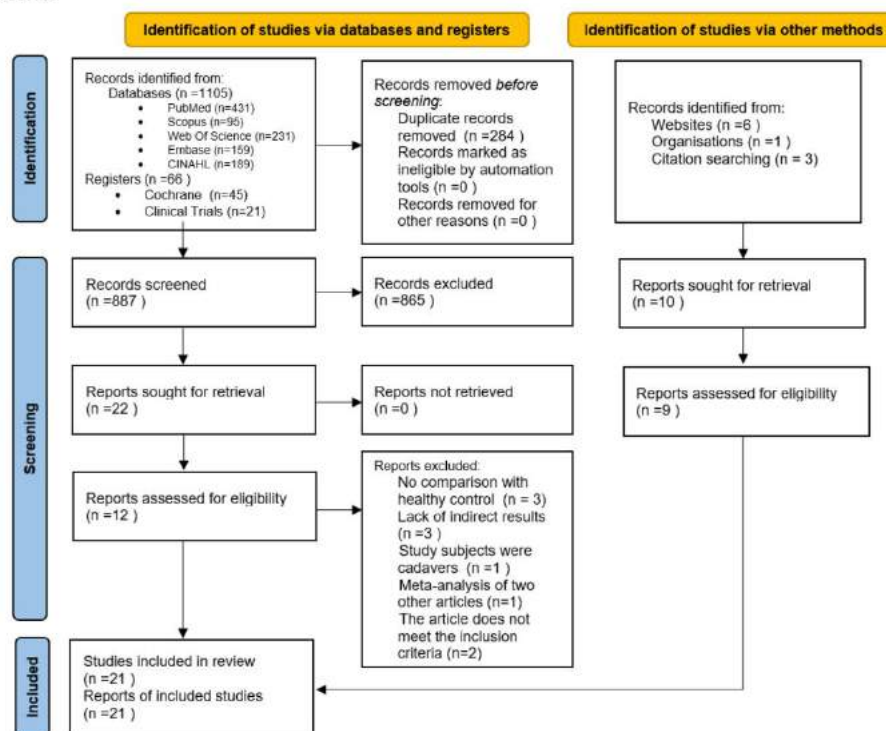


Figure 1. Flowchart of literature search according to Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses guidelines.

2.2. Meta-Analysis

The meta-analytical pipeline has been run using Snakemake version 6.6.1. [25]. The characteristics of the studies included in the meta-analysis and systematic review are provided in Table 1. Only studies that provided raw sequences from 16S rRNA sequencing were included in the meta-analysis. The results were obtained by analyzing the samples using two approaches. First, all datasets were analyzed separately, and their results were combined in the random-effects meta-analysis (single study approach). In the second approach, all the samples were analyzed as one combined dataset (combined studies approach).

2.2.1. Readings Preparation and zOTU Picking

We have removed primers using cutadapt [26]. Primers used for the single study approach are provided in the table available in the supplementary. For the combined study approach, we have used 338F (5'-CTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') primers, except the Mayo dataset where 926R (5'-CCGTCAATTCM TTTRAGT-3') was used. Sawicka-Smiarowska dataset [27] was excluded from the combined study approach due to the choice of primers in the study, which did not allow for obtaining sequences that were globally aligned with other studies. Next, all of the readings were truncated to 250 bps leaving us with globally trimmed data (e.g., all reads starting and ending at the same position). Furthermore, reading preparation and zOTU picking have been performed using usearch v11.0.667 and UNOISE. zOTU refers to correct biological sequences with a 100% identity threshold [28,29]. The taxonomy was resolved using DECIPHER IDTAXA [30] with Genome Taxonomy Database (version 06-RS202) [31] as a reference. For downstream analyses, the data have been imported into the phyloseq object [32] and filtered to leave only zOTUs present in at least 20% of the samples and with at least five counts.

2.2.2. Differential Abundance Testing

Differential abundance (DA) testing was performed using three approaches: (1) DESeq2, which models the data using the negative binomial distribution, (2) MetagenomeSeq, which uses a zero-inflated Gaussian model, and (3) ANCOM-BC, which uses an offset-based log-linear model and currently appears to be the best method for controlling the false-discovery ratio without losing statistical power. Only bacteria detected as statistically significant metagenomeSeq, Ancom-BC, or DESeq2 in at least three of 7 studies were included. A comprehensive discussion of the DA testing approaches is out of the scope of our manuscript, and we refer the reader to the large body of research already published on the topic [33]. For all the approaches, we have assumed a significance level of $p < 0.05$. We have used the Benjamini and Hochberg method to adjust for multiple testing.

2.2.3. Statistical Analysis

Alpha diversity indices (observed zOTUs, Fischer, Chao1, Shannon, ACE, and Simpson indices) were calculated on data rarefied to the depth of 5000. Beta diversity was assessed using Unweighted UniFrac. The statistical significance was determined using the Wilcoxon test for the alpha diversity and PERMANOVA with 999 permutations for the beta diversity. PERMANOVA was run with the vegan R package [34]. The single study approach calculated relative abundances using the mean difference in centered log ratios (CLR). The obtained relative abundances were used to estimate odds ratios using Agresti's generalized odd ratios [35] as implemented in the genodds package [36]. Next, odd ratios were summarized in a random-effects meta-analysis performed using the meta R package [37].

3. Results

Our search has yielded 1181 articles. After removing the duplicates, 897 unique studies were identified, out of which 21 met inclusion criteria for systematic review. Among these 21 articles, 7 had raw data available and could be used to conduct a meta-analysis. (Figure 1).

In the systematic review, the relative abundance of gut microbiota from all 21 eligible papers were compared. Bacterial taxa detected as significant in at least four studies are included in Figure 2. In the meta-analysis, only bacteria detected as significant in at least three of the seven eligible articles were reported. The complete results of the systematic review are provided in Table 1, and the characteristics of studies included in the meta-analysis are available in the Supplement.

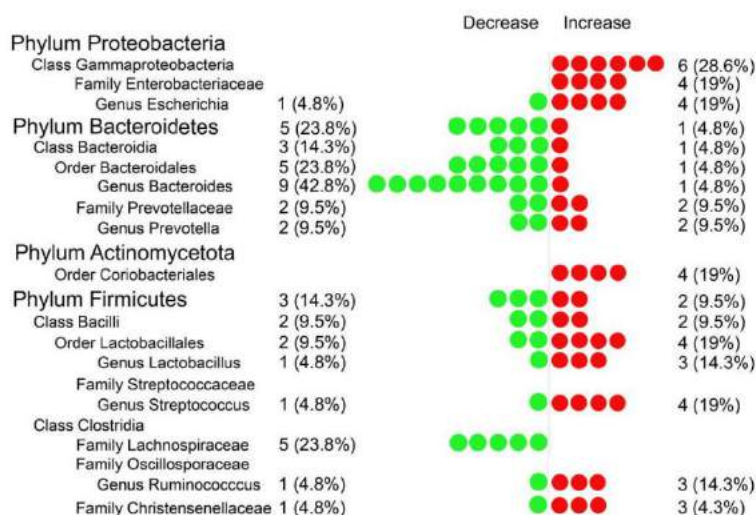


Figure 2. The results of a systematic review. The red circles describe the percentage of articles with increased bacterial relative abundance in CAD patients. Oppositely, green circles describe the percentage of articles with decreased bacterial relative abundance in CAD patients. One circle represents one study analyzed.

3.1. Characteristics of Included Studies

Many factors may affect the gut microbiome composition. We compared all eligible studies by the following: age, gender, BMI, and diabetes mellitus. The complete results are provided in the Supplement.

The average age of participants was between the sixth and seventh decade of life. In five articles, differences in age between groups were significant; in 13 other articles were insignificant, and there were no available data for comparison in three articles.

In the majority of studies, participants were male. In five articles, differences in gender between groups were significant, ten others were insignificant, and six articles had no available data for comparison. The BMI of participants generally had values typical for overweight (BMI = 25–30). In four articles, differences in BMI were significant, in ten the differences were insignificant, and in seven, there were no available data for comparison. There were relatively limited data on the prevalence of diabetes in participants. In four articles, differences in diabetes were significant, in five the differences were insignificant, and in 12, there were no available data for comparison.

3.2. Systematic Review Results

A comprehensive comparison between CAD patients and controls regarding the relative abundance at the phylum level demonstrated changes related to four phyla, i.e., Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinomycetota, and Firmicutes. The increase of Gammaproteobacteria has been reported in six (28.6%) studies and the rise of the Enterobacteriaceae family within the Proteobacteria phylum in four (19%) studies in CAD patients. Moreover,

four (19%) studies recorded the rise of the *Escherichia* genus of the *Enterobacteriaceae* family. Overall, seven (33.3%) articles reported an increased abundance of Gammaproteobacteria taxa (Figure 2, Table 1).

Bacteroidetes phylum decline in CAD was reported in five (23.8%) studies (Table 1; Figure 2). On the contrary, one cross-sectional study reported an increased abundance of *Bacteroidetes* in CAD compared to the control group. Remarkably, at the genus level, a decrease in the relative abundance of *Bacteroides* in CAD has been recorded in nine (42.8%) studies. Overall, a decline in the relative abundance of the *Bacteroidetes* taxa was recorded in 16 (76.2%) of all 21 articles analyzed, making the decrease in these taxa strikingly CAD-related. Furthermore, conflicting results regarding the Prevotellaceae family and Prevotella genus within the Bacteroidales order were associated with CAD, where the relative abundance of these taxa were decreased in two (9.5%) studies and increased in two other studies.

The results regarding the Firmicutes phylum were conflicting. In two (9.5%) studies, the relative abundance of Firmicutes was increased, whereas in three other (14.3%) decreased in CAD compared to the control group. Within the Firmicutes phylum, there were conflicting results concerning the Bacilli class. In two (9.5%) studies, the taxon was increased, whereas in two others decreased in CAD compared to the control group. However, within the Bacilli taxon, the increased relative abundance of the *Lactobacillales* order was associated with CAD patients in four (19%) studies and the *Lactobacillus* genus in three (14.3%) studies in contrast to the control group. Moreover, within the Firmicutes phylum, the decrease in the relative abundance of the *Lachnospiraceae* family of class Clostridia in CAD patients versus the control group was demonstrated in five (23.8%) studies. On the contrary, within the Firmicutes phylum, the Christensenellaceae family abundance was increased in CAD in three (14.3%) studies. The systematic review analysis also demonstrated the increased relative abundance within the Streptococcaceae family and the *Streptococcus* genus among CAD patients in four (19%) studies compared to the control group. These results indicate a quantitative disturbance within the Firmicutes, mainly concerning an increase in the abundance of *Lactobacillus* and *Streptococcus*, as well as bacteria from the Christensenellaceae family, with a concomitant decrease in the abundance of bacteria from the *Lachnospiraceae* family.

The less prominent changes in the gut microbiota of CAD patients concerned the Coriobacteriales order of the phylum Actinobacteria, which was decreased in four (19%) studies in CAD patients. Changes in the abundance of other bacterial groups, i.e., *Desulfovibrio*, *Parabacteroides*, and *Fusobacterium* in CAD, were recorded in only a few articles (Table 1).

Table 1. Key characteristics of included studies. Legend: RoB—the risk of bias, NOS—Newcastle-Ottawa Scale, “+” significant difference in diversity, “−” no significant difference in diversity, PCI—percutaneous coronary intervention, CABG—coronary artery bypass graft, IBD—inflammatory bowel disease, GIT—gastrointestinal tract, ACS—acute coronary syndrome, UA—unstable angina, SA—stable angina, CAD—coronary artery disease, Ctrl—control, “▲” increased relative abundance in CAD patients, “▼” decreased relative abundance in CAD patients.

First author/ year	Study design	Technique	Sample size	Major inclusion criteria CAD Control	Major exclusion criteria	Major outcome-CAD relative abundance	Diversity α β	RoB NOS
Alhmod T., et al. [38] 2019	Case-control	16S rRNA Illumina MiSeq	CAD19 Ctrl 19	acute coronary syndrome (STEMI or NSTEMI)	No prior heart attacks or strokes, and no antibiotic use within three months before enrollment	<i>Bacteroidetes</i> \uparrow <i>Gammaproteobacteria</i> \uparrow <i>Enterobacteriaceae</i> \uparrow <i>Prevotella</i> \uparrow	- -	7
Emoto T., et al. [27] 2016	Cross-sectional	T-RFLP	CAD 39 Ctrl 30	-stable-angina pectoris, old myocardial infarction, PCI or CABG for min. 6 months interval	-coronary risk factors: hypertension, diabetes, and/or dyslipidemia	<i>Lactobacillales</i> \uparrow <i>Bacteroides</i> \downarrow	No data	No data
Kwon J., et al. [40] 2020	Case-control	16S rRNA V3-V4 Illumina MiSeq	CAD 22 Ctrl 20	ECG criteria of STEMI, angiographically proven coronary thrombolytic	no previous history of cardiovascular disease, no evidence of active infection	<i>Gammaproteobacteria</i> \uparrow <i>Firmicutes</i> \downarrow <i>Lactobacillales</i> \downarrow <i>Enterobacteriaceae</i> \downarrow <i>Lachnospiraceae</i> \downarrow <i>Prevotella</i> \downarrow <i>Bacilli</i> \downarrow <i>Christensenellaceae</i> \downarrow <i>Prevotellaceae</i> \downarrow	- +	7
Zheng Y., et al. [41] 2020	Cross-sectional	16S rRNA V3-V4 Illumina MiSeq	CAD 186 Ctrl 123	$\geq 50\%$ stenosis in at least one main coronary artery	coronary arteries without stenosis	<i>Bacteroidetes</i> \uparrow <i>Firmicutes</i> \downarrow <i>Bacteroides</i> \downarrow <i>Coriobacteriales</i> \downarrow <i>Christensenellaceae</i> \downarrow <i>Prevotellaceae</i> \downarrow	+ +	10
Ivashkin, V., et al. [42] 2019	Cross-sectional	16S rRNA V3-V4 Illumina MiSeq	CAD 29 Ctrl 30	CAD confirmed by anamnestic data, results of daily ECG and acute or acute exacerbations of chronic coronary angiography.	over 50 years, without cardiovascular disease and acute or acute exacerbations of chronic diseases	<i>Enterobacteriaceae</i> \uparrow <i>Escherichia/Shigella</i> \uparrow	No data	No data

First author/ year	Study design	Technique	Sample size	Major inclusion criteria	Major exclusion criteria	Major outcome- CAD relative abun- dance	Diversity	RoB
				CAD	Control		α β	NO δ
Emoto T, et al. [43] 2016	Case- control	T-RFLP	CAD 39 Ctrl 50	stable angina, old myo- cardial infarction, PCI or CABG at least 6 months interval, 75% stenosis of coronary ar- tery	acute coronary syndrome systemic disease, includ- ing hepatic, renal, colla- gen disease and malig- nancy, antibiotic treat- ment	<i>Bacteroides</i> ∇ <i>Lactobacillales</i> \blacktriangle	No data No data	No data 7
Jie Z., et al. [44] 2017	Cross- sectional	Shotgun sequen- cing	CAD 218 Ctrl 187	confirmed by coro- nary angiography, PCI and $\geq 50\%$ stenosis in single or multiple vessels	ongoing infectious dis- eases, cancer, renal, or hepatic failure, stroke, use of antibiotics within 1 month of sample collec- tion.	<i>Escherichia coli</i> \blacktriangle <i>K. gairus</i> \blacktriangle <i>Bacteroides</i> ∇ <i>Streptococcus</i> \blacktriangle	- No data	No data 9
Liu Z., et al. [45] 2019	Cross- sectional	16S rRNA V4-V5 Il- lumina MiSeq	CAD 67 Ctrl 17	coronary angi- ography or coronary computed tomogra- phy angioplasty	kidney dialysis acute in- fection, gastrointestinal diseases cancer, treat- ments with antibiotics or probiotics within one month	<i>Enterococcus</i> \blacktriangle <i>Lactobacillus</i> \blacktriangle <i>Bacteroides</i> ∇ <i>Fusobacterium</i> ∇ <i>Dorea</i> ∇ <i>Streptococcus</i> ∇	- +	No data 8
Yoshida N. et al. [46] 2018	Cross- sectional	16S rRNA V3-V4 Il- lumina MiSeq	CAD 30 Ctrl 30	stable angina, old myocardial infarc- tion, PCI or CABG ≥ 6 months before the present study. $>75\%$ stenosis.	Patients with: acute coro- nary syndrome, with systemic disease: including he- patic, renal, collagen dis- ease and malignancy, an- tibiotics	<i>Bacteroides vulgatus</i> ∇ <i>Bacteroides dorei</i> ∇ <i>Facalibacterium</i> \blacktriangle <i>transnitrat</i> <i>Prevotella copri</i> \blacktriangle	- No data	No data 9
Yoshida N., et al. [47] 2019	Cross- sectional	16S rRNA V3-V4 Il- lumina MiSeq	CAD 11 Ctrl 10	CAD confirmed by a coronary angi- ography	heart failure, renal and hepatic disease, malig- nancies, inflammatory disease	<i>Bacteroides</i> ∇	No data	No data 7

First author/ year	Study design	Technique	Sample size	Major inclusion criteria	Major exclusion criteria	Major outcome- CAD relative abundance	Diversity α β	RoB NOS
Dong Ch., et al. 2021 pre-print [48]	Cross-sectional	16S rRNA Illumina HiSeq	CAD 141 Ctrl 49	SA and AMI criteria. The coronary angiography was performed on all patients.	Without significant stenosis in coronary arteries	<i>Bacteroides</i> <i>Escherichia</i> <i>Desulfotribrio</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Streptococcus</i> <i>Lactobacillus</i>	+ +	10
Gao J., et al. [49] 2020	Cross-sectional	Phusion High-Fidelity PCR Master Mix	CAD 60 Ctrl 30	coronary angiography, ECG changes	history of CIT surgery or organic disease, history of stroke, hypertension, diabetes, kidney disease infection within one month of the study or the use of a probiotic, anti-acid, antibiotic	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Prevotellaceae</i> <i>Escherichia-Shigella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Streptococcus</i> <i>Bacilli</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Coriobacteriales</i>	+ +	10
Toyá T., et al. [50] 2021	Cross-sectional	16S rDNA TM-TOR- NADO	CAD 88 Ctrl 114	history of FCI or CABG, coronary arteries diagnosed by coronary angiography or computed tomography coronary angiography	abnormal peripheral endothelial dysfunction without CAD based on clinical history, non-invasive stress testing, and coronary imaging studies	<i>Ruminococcus Giarous</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Ruminococcus Gaurerutii</i> group	+ No data	7
Sawicka-Śmiarowska et al. [27] 2021	Cross-sectional	16S rRNA	CAD 169 Ctrl 166	aged 30-79, hospitalization 12-18 months before the evaluation for elective FCI ACS; STEMi, NSTEMI, UA	randomly selected, sex and age-matched to CAD group, without CAD	<i>Bacteroidetes</i> <i>Bacteroidia</i> <i>Bacilli</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Bacteroidales</i> <i>Lactobacillales</i>	+ +	9

First author/year	Study design	Technique	Sample size	Major inclusion criteria	Major exclusion criteria	Major outcome-CAD relative abundance	Diversity α β	RoB NOS
				CAD	Control			
Hu JI, et al. [51] 2021	Cross-sectional	16S rRNA V4 Ion Torrent	CAD 45 Ctrl 19	coronary angiography; >50% stenosis in the coronary artery	IBD, hepatitis B or cirrhosis, cancer, organ failure, exposure to probiotics or prebiotics within one month, receiving treatment with antibiotics.	<i>Prevotellaceae</i> ▲ <i>Fusobacterium</i> ▼ <i>Bacteroides</i> ▼ <i>Parabacteroides</i> ▲	- +	10
Toyra T, et al. [52] 2020	Cross-sectional	16S rDNA V3-V5 Illumina-MiSeq	CAD 53 Ctrl 53	≥50% stenosis in at least one main coronary artery, patients with ACS	gastrointestinal surgery, current administration of antibiotics and a probiotic, history of IBD and auto-immune diseases	<i>Lachnospiraceae</i> ▼ <i>R. garrinis</i> ▲	+ No data	10
Cui L, et al. [53] 2017	Cross-sectional	16S rRNA V3-V5 Illumina MiSeq	CAD 29 Ctrl 34	CAD confirmed by coronary angiography and CABG or PCI, residents of southern China, 50–85 years.	probiotics, antibiotics within a month before sample	<i>Firmicutes</i> ▲ <i>Bacteroides</i> ▼ <i>Bacteroidetes</i> ▼ <i>Bacteroidia</i> ▲	+ +	10
Zhu Q, et al. [54] 2018	Cross-sectional	16S rRNA V4 Illumina MiSeq	CAD 70 Ctrl 98	CAD confirmed by a coronary angiography	probiotics, antibiotics within a month before sample cancer, infectious diseases; IBD, antibiotic or probiotic consumption within 1 month before sample collection	<i>Bacteroides</i> ▼ <i>Bactifli</i> ▲ <i>Firmicutes</i> ▼ <i>Gammaproteobacteria</i> ▲ <i>Lachnospiraceae</i> ▼ <i>Escherichia-Shigella</i> ▲ <i>Lactobacillus</i> ▲ <i>Bacteroidia</i> ▼ <i>Lactobacillales</i> ▲ <i>Bacteroidales</i> ▲ <i>Coriobacteriales</i> ▲ <i>Christensenellaceae</i> ▼ <i>Streptococcus</i> ▲	+ +	10

First author/year	Study design	Technique	Sample size	Major inclusion criteria	Major exclusion criteria	Major outcome-CAD relative abundance	Diversity α β	RoB NOS
Liu F. et al. [55] 2020	Cross-sectional	16S rRNA regions Illumina HiSeq	CAD 18 Ctrl 23	Tibetan native residents coronary artery stenosis >50% ages 40-70 years	antibiotics, probiotics, or prebiotics for at least 3 months before sampling, acute and chronic inflammatory diseases, tumors	<i>Firmicutes</i> ▲ <i>Bacteroides</i> ▲ <i>Bacteroidetes</i> ▼ <i>Gammaproteobacteria</i> ▲ <i>Bacteroidia</i> ▼ <i>Desulfotribrio</i> ▲ <i>Prevotella</i> ▼ <i>Bacteroidales</i> ▼ <i>Christensenellaceae</i> ▲	+ +	9
Chiu et al. [56] 2022	Case-control study	16S rRNA V3-V4 Illumina Miseq	CAD 19 Ctrl 25	Without CAD based on clinical history, non-invasive stress testing, and coronary imaging studies	Prior gastrointestinal surgery, the current administration of antibiotics, IBD, malignancy, auto-immune disease	<i>Lactinospiraceae</i> ▼	+ No data	7
Choroszy et al. [57] 2022	Cross-sectional	16S rRNA V3-V4 Illumina Miseq	CAD 15 Ctrl 15	CAD confirmed by coronary angiography, and patients with $\geq 50\%$ stenosis in single or multiple vessels	renal disease, malignancy, ongoing infectious disease, hepatic disease, use of antibiotics within four weeks before sample collection.	<i>Bacteroidetes</i> ▼ <i>Bacteroidales</i> ▼ <i>Coriobacteriales</i> ▲	No data	7

3.3. Meta-Analysis Results

The gut microbiome profile in CAD patients and controls was compared using 16S rDNA gene sequencing in fecal samples. Although 16S rDNA can deliver the resolution required for taxonomic classification at species and strain levels, it generally involves sequencing the entire 16S rRNA gene. Since the study focused only on the V3-V4 region, the meta-analysis of species or lower taxonomic groups was not performed.

Three of the evaluated alpha-diversity measures were decreased in CAD patients. These included Shannon ($p = 0.00025$) and Simpson indices ($p < 0.0001$), both of which measure evenness and observed OTUs ($p = 0.0015$), indicating richness. Other measures (Chao1, ACE, and Fisher indices) evaluated in this study did not significantly differ between groups (Figures 3 and 4). All (except Toya et al. [50]) datasets showed significant differences in beta-diversity (measured with UniFrac) between controls and patients with CAD. However, PCoA plots (Figure 5) showed notable overlap between patients with CAD and healthy controls, without a clear boundary between samples.

The meta-analysis combined CAD with three phyla, i.e., *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, and *Verrucomicrobiota* (Figures 6–8). The relative abundance of *Bacteroidetes* was decreased, whereas *Actinobacteria* and *Verrucomicrobiota* were increased in CAD compared to the control group. The *Bacteroidetes* depletion in CAD was also confirmed at the class, order, and genus levels (Figure 2) supporting the systematic review results. The *Actinobacteria* overrepresentation in CAD was further confirmed by the increased relative abundance of the order *Actinomycetales* and the family *Bifidobacteriaceae*.

Increased *Verrucomicrobiota* phylum in CAD versus the control group was also associated with increased *Verrucomicrobiales* order and *Akkermansia* genus. However, the confidence interval for *Akkermansia* significantly overlapped between the increase and decrease of abundance, indicating the low reliability of this result (Figure 6).

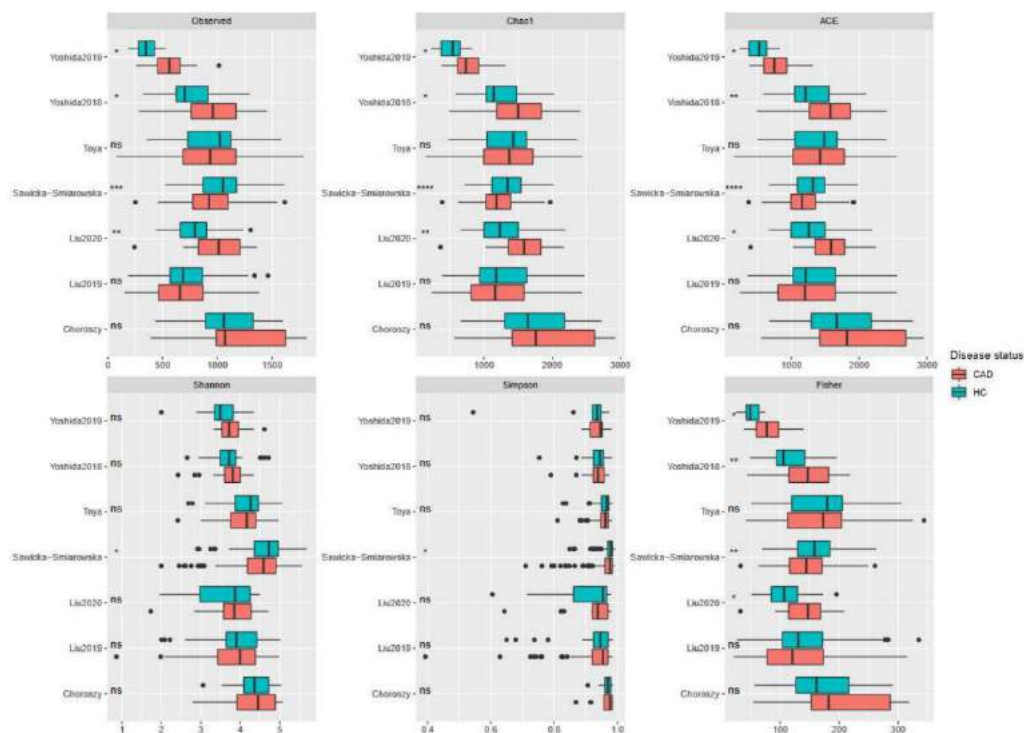


Figure 3. Alpha diversity results for individual studies. Asterix describe statistically significant results: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns-non-significant; dots denote outlier values.

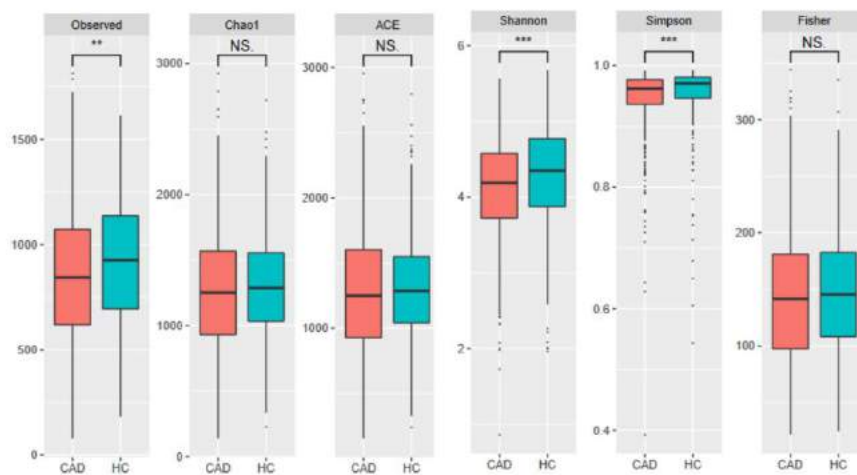


Figure 4. Alpha-diversity results for combined dataset. Asterix describe statistically significant results: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ns-non-significant; dots denote outlier values.

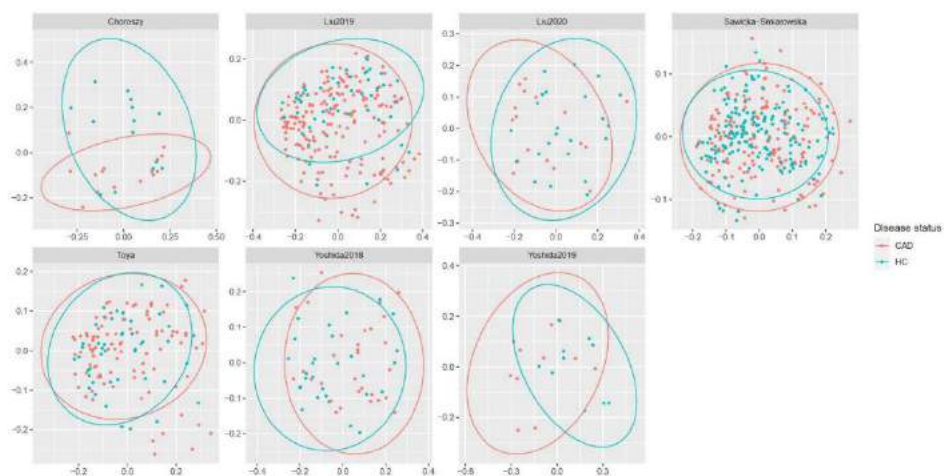


Figure 5. Beta-diversity measured by UniFrac.

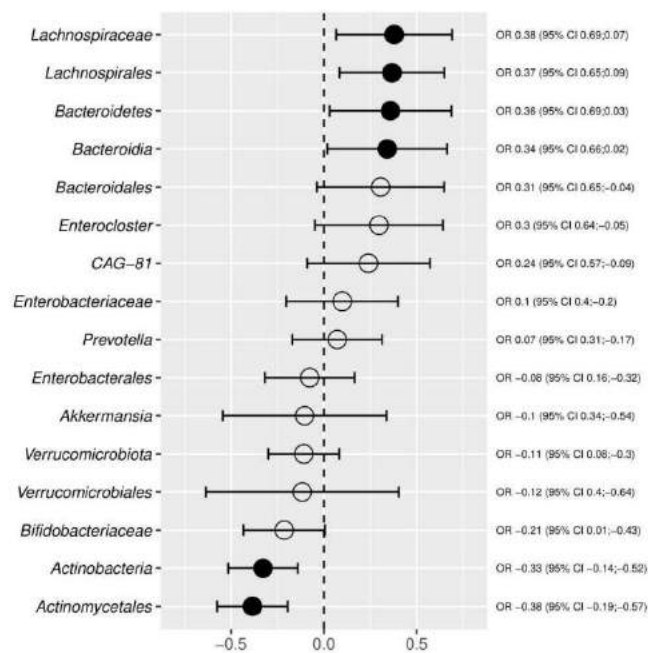


Figure 6. The results of random-effects meta-analysis for effect sizes based on the mean differences in centered log ratios. The left side of the graph describes bacteria with increased relative abundance in CAD, and the right side of the chart represents bacteria with decreased relative abundance in CAD. The filled dot denotes a statistically significant result of the random-effects meta-analysis.

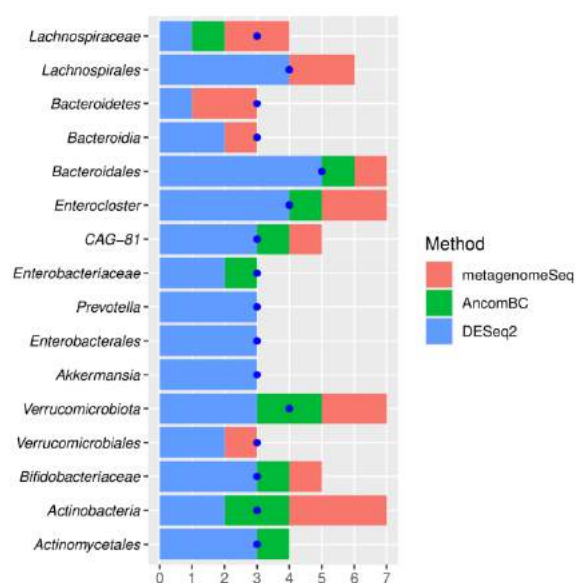


Figure 7. The results of a meta-analysis. Statistical significance testing for single datasets using metagenomeSeq, AncomBC, and DESeq2. The number of studies in which a given taxon was detected as significant by at least one method is denoted by a blue dot. Stacked bar charts show how many studies given differential abundance testing methods reported substantial results.

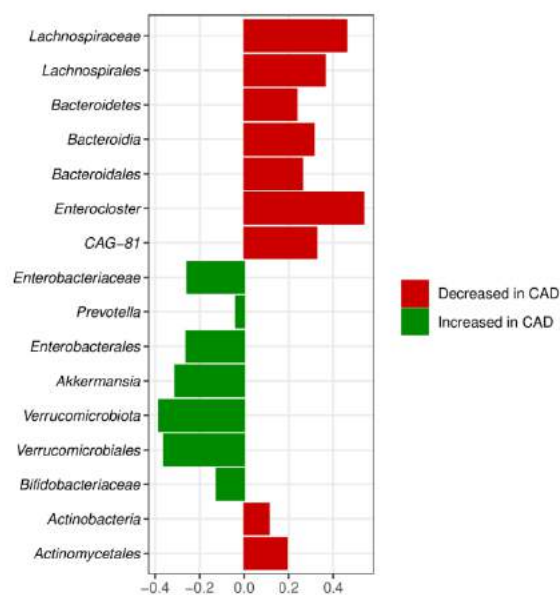


Figure 8. The results of a meta-analysis. Only bacteria detected as statistically significant metagenomeSeq, Ancom-BC, or DESeq2 in at least three of seven studies were included. Relative abundances (reported as log-fold change) for the pooled dataset.

Additionally, the meta-analysis showed an increase in Proteobacteria at the level of Enterobacteriales and *Enterobacteriaceae* family. The alterations within the Firmicutes phylum concerned the *Lachnospiraceae* family and Enterocloster genus, which were decreased in CAD versus the control group. Additionally, the reduced abundance of the CAG-81 genus from a class of Clostridia was observed in CAD patients. Overall, the meta-analysis combined gut microbiota in CAD patients with main bacterial phyla, i.e., Proteobacteria, *Bacteroidetes*, Actinobacteria, Firmicutes, and Verrucomicrobiota, at different taxonomic ranks. The convergent results of systematic review and meta-analysis concerned *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidetes*, and *Lachnospiraceae*. In contrast with the systematic review, the meta-analysis showed differences within the Verrucomicrobiota phylum in CAD patients versus the control group.

4. Discussion

The growing evidence indicates that altered gut microbiota plays a crucial role in coronary CAD as a risk factor for the disease's outcome [58]. The gut microbiota in healthy individuals claims gut homeostasis, imparts resistance to the colonization of new species, and maintains a symbiotic relationship with the host. On the contrary, the shift in the diversity and abundance of gut microbiota facilitates the overgrowth of potentially pathogenic bacteria causing inflammatory processes and the evolution of various diseases [59]. An imbalance in the quantity of specific bacterial taxa in the gut microbiota correlates with a deficiency or excess of bacterial metabolites that fundamentally affect the physiological status of the host cells, including endothelial cells. Depending on the concentration, bacterial metabolites, e.g., trimethylamine-N-oxide (TMAO), lipopolysaccharide (LPS), or indoxyl sulfate, may yield direct toxic effects on the endothelium or indirect toxicity through their modulatory effects on hormones and biologically active compounds of the host organism [60].

The gut microbiota is dominated by five bacterial phyla, namely *Bacteroidetes*, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobiota, with Firmicutes and *Bacteroidetes* accounting for more than 90% of the overall gut microbiome [61]. Interestingly, the most common alterations reported in CAD are related to decreased *Bacteroidetes* and increased Firmicutes abundance [52].

The systematic review and meta-analysis performed in the study confirmed a significant decrease in the *Bacteroidetes* taxa in CAD. The decrease of *Bacteroidetes* in the gut microbiota carries profound health implications. These Gram-negative obligate anaerobic bacteria have several beneficial effects on the human body and play an essential role in maintaining a healthy gut ecosystem [52]. First, *Bacteroidetes* is involved in the degradation of non-digestible dietary carbohydrates and host-derived carbohydrates from gastrointestinal tract secretions yielding butyrate and acetate, which can lower serum lipid levels by blocking cholesterol synthesis [62,63]. Moreover, the *Bacteroidetes* taxa esterify absorbable cholesterol to coprostanol, a nonabsorbable sterol excreted in feces, thus lowering the blood level of cholesterol [62]. Notably, the high efficiency of cholesterol to coprostanol metabolism is suggested to reduce the risk of CAD [64]. Second, the *Bacteroidetes* capsular polysaccharide antigen (PSA) is vital in activating the T-cell-dependent immune response that can affect the development and homeostasis of the host immune system [65,66]. PSA of *Bacteroides* promotes CD4+ T cell differentiation, the balance of Th1 and Th2 populations, and the differentiation of regulatory T cells (Treg) [67,68]. On an atherosclerotic-prone mice model, Yoshida et al. [46] demonstrated that mice supplementation with *Bacteroides* ameliorated endotoxemia, reduced TLR4 expression and activation, and lowered plasma levels of pro-atherogenic cytokines such as IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, INF- γ , and TNF- α . Third, some *Bacteroides* species directly impact microbial LPS synthesis in the human gut, lowering systemic endotoxemia involved in the onset and progression of atherosclerosis. Penta- and tetra-acylated lipids A in LPS of *Bacteroides* are structurally distinct from the hexa-acylated LPS of *E. coli* and, in contrast with *E. coli* LPS, elicit reduced TLR4 response. TLR4 expression increases after LPS exposure in a dose-dependent manner, and

TLR-mediated dendritic cell activation and maturation upregulates the histocompatibility complex, costimulatory molecules, cytokine production, and T cell activation. The quantity of *Bacteroides* tends to be negatively correlated with fecal LPS levels [46,68]. Arumugam et al. [69] demonstrated a higher incidence of symptomatic atherosclerosis in individuals with decreased *Bacteroides* abundance. Hence, reduced *Bacteroides* in the gut microbiome seem to be an important factor predisposing to CAD.

The current meta-analysis demonstrated decreased relative abundance of the *Lachnospiraceae* family of Firmicutes phylum in CAD versus the control group, which is in concordance with other studies [50,54]. *Lachnospiraceae*, similarly to *Bacteroidetes* taxa, produce butyrate and reduce cholesterol to coprostanol, lowering blood cholesterol levels [70]. Therefore, the *Lachnospiraceae* decrease in CAD may amplify the adverse effects of *Bacteroides* depletion of the gut microbiota. Toya et al. demonstrated that advanced CAD patients had a reduced relative abundance of *Lachnospiraceae* NK4B4 and other *Lachnospiraceae* family members, which may suggest a possibility that butyrate depletion could lead to an increase in inflammation. Moreover, the meta-analysis demonstrated in CAD patients decreased *Enterocloster* genus, comprising re-classified *Clostridium* species.

According to the systematic review, CAD was associated with an increased abundance of Enterobacteria, *Lactobacillus*, and *Coriobacterium* taxa. *Lactobacillus* is a well-known lactic acid producer with beneficial effects on human health, as demonstrated in several studies [71,72]. However, none of these studies evaluated current *Lactobacillus* levels before supplementation with these probiotics. Hence, there is a possibility that the overgrowth of specific *Lactobacillus* strains in gut microbiota may have adverse effects on human health. According to Ferrarese et al. [73], some probiotic strains such as *L.acidophilus*, *L.ingluviei*, *L. fermentum*, and *L. delbrueckii* are linked to a paradoxical significant weight-gain effect both in animal and human studies. According to Quiapo-Ortuno's [74] study on an animal model, leptin and ghrelin, energy metabolism hormones, seem to be regulated by lactic acid-producing bacteria. Their study demonstrated a positive correlation between the abundance of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and serum leptin levels and a significant negative correlation between the number of *Clostridium*, *Bacteroides*, and *Prevotella* and serum leptin levels.

Leptin is a hormone produced primarily by adipose cells and enterocytes that helps regulate energy balance by inhibiting hunger, which diminishes fat storage in adipocytes. However, obesity promotes insulin resistance and increases serum insulin levels, and high insulin levels increase leptin levels, eventually leading to leptin resistance in the nervous system and adipose tissue. This causes leptin to not reduce food intake and body weight in obese individuals [75]. Therefore, an increased abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and a decreased abundance of *Bacteroides* taxa in obese individuals may result in leptin resistance that fuels obesity, a well-known risk factor of CAD. Whether the increase in *Lactobacillus* is related to leptin levels in humans needs to be determined.

Moreover, it has been shown that the therapeutic effects of statins are attenuated by the abundance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which renders these drugs relatively ineffective in decreasing LDL, confirming the putative role of lactic acid bacteria in leptin resistance [76]. Puurunen et al. [77] demonstrated that high plasma leptin levels predict the short-term occurrence of congestive heart failure, cardiac death, and acute coronary syndrome in patients with CAD independently of established risk factors.

On the contrary, ghrelin is a hormone produced by enteroendocrine cells in the gastrointestinal tract that stimulates food intake, fat deposition, and growth hormone release. Moreover, ghrelin and its receptor GHS-R1a have a cardioprotective effect on the cardiovascular system via the modulation of sympathetic activity and hypertension, enhancement of vascular activity and angiogenesis, inhibition of arrhythmias, reduction in heart failure, and inhibition of cardiac remodeling after myocardial infarction [78]. Interestingly, a meta-analysis aimed to summarize the available data regarding the circulating levels of ghrelin in patients with CAD published by Niknam et al. [79] also combined significantly lower circulating ghrelin levels with CAD. According to Torres-Fuentes et al. [80], lac-

tate produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* attenuates ghrelin-mediated signaling through the GHSR-1a. On an animal model, Queipo-Ortuño et al. [74] demonstrated that serum ghrelin levels were negatively correlated with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and positively correlated with *Bacteroides* and *Prevotella*. These data strongly suggest that an overabundance of lactic acid bacteria in the gut microbiome of patients with CAD may negatively impact patients' energy metabolism leading to weight gain and obesity. Notably, the abundance of *Lactobacillus* in the gut microbiome is regulated by proatherogenic TMAO, a well-known predictor of cardiovascular disease. Hoyles et al. [81] demonstrated that TMAO stimulates the growth of lactic acid bacteria and lactate production. The level of TMAO, in turn, depends on the abundance of bacterial taxa producing TMAO precursor, i.e., trimethylamine (TMA) from dietary choline, mainly Gamma- and Betaproteobacteria, and some Firmicutes [82]. Interestingly, TMAO also stimulates the growth of *Enterobacteriaceae* and may account for the increased abundance of *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillus* taxa in CAD [81]. Additionally, increased *Enterobacteria* correlates with increased fecal indole and serum indoxyl sulfate, a cardiotoxic uremic toxin [83]. The increase in the plasma levels of these uremic toxins is reported to accelerate the development of atherosclerotic plaque [21]. Moreover, an increased abundance of Gram-negative *Enterobacteriaceae* taxa may be an essential source of endotoxin. In gut dysbiosis, the endotoxin leaks into the circulation, inducing inflammation and accelerating CAD progression [57].

Jie et al. [44] performed a metagenomic shotgun-sequencing on stool samples from 218 patients with atherosclerotic CVDs and 187 healthy controls and identified, apart from *Enterobacteriaceae*, an increased abundance of *Streptococcus* spp. in atherosclerotic cardiovascular disease which is in concordance with the current study. The link between the gut *Streptococcus* species with atherosclerosis has been demonstrated in the current study and is well-established in other studies [44,84,85]. Hashizume-Takizawa et al. [84] on the hyperlipidemic mouse model demonstrated that atherosclerotic plaque formation increased significantly in the *S. sanguis*-challenged mice compared to the control group. Moreover, challenged mice showed increased expression levels of mRNAs of proinflammatory cytokines in the aorta and atherosclerosis-related mediators in the blood. The role of 73 *Streptococcus* species in aortic inflammation and atherosclerosis progression has been confirmed recently by computed tomography-derived coronary artery calcium score in a large cohort of middle-aged Swedes and validated in a geographically separate case-control study of symptomatic atherosclerotic disease. The study supported that gut *Streptococcus* spp. were independently associated with endogenous and exogenous atherogenic plasma metabolites, inflammatory and infection markers, and bacterial homologs in the oral cavity, which were associated with worse oral health [86].

The Coriobacteriales order, which according to the systematic review, was more abundant in CAD patients than controls, includes pathobionts of human gut microbiota. With *Collinsella* as its dominant taxon, these bacteria can affect host metabolism by altering intestinal cholesterol absorption, decreasing glycogenesis in the liver, and increasing triglyceride synthesis. Karlsson et al. [86], using shotgun sequencing of the gut metagenome, demonstrated increased *Collinsella* genus in patients with stenotic atherosclerotic plaques in the carotid artery. According to a study on an animal model, the presence of *Coriobacteriaceae* in the mouse gut correlated with decreased hepatic glycogen and glucose levels, enhanced triglyceride synthesis, and the activity of *Cyp3a11*, a hepatic detoxification enzyme [87]. Lahti et al. [88] identified a positive correlation between the abundance of human serum cholesterol and the genus *Collinsella*. According to biochemical lipid analysis, the *Collinsella* genus explicitly correlates with total cholesterol and LDL but not HDL, supporting data generated in studies on animal models [86,89].

There are several limitations to our study. First, most studies included in our systematic review were based on 16S rRNA sequencing focused on the V3-V4 regions, which can barely classify microbiota to the strain level. Specific metabolites of bacterial strains may exert pronounced effects on gut homeostasis. Hence, accurate characterization of the gut

microbiota at the species level may be of great importance concerning preventing CAD by regulating the abundance of bacterial taxa.

Another limitation is the difference in characteristics of the studied populations in the included studies. Several studies have shown significant differences in age, gender distribution, BMI, and diabetes mellitus frequency, which are also risk factors for CAD. All these factors are also associated with changes in the gut microbiome [90–93]. Hence, it can be hypothesized that these factors, but not CAD itself, cause the microbiome alterations detected in our study. However, since most of the included studies did not show significant differences in the frequency of these risk factors, we consider this hypothesis unlikely.

The meta-analysis and systematic review pointed out differences in the gut microbiota composition in CAD patients compared to healthy controls. One of the most striking differences was the decrease in the beneficial *Bacteroides* and *Lachnospira* combined with the increase in enterobacteria, Actinobacteria, and Verrucomicrobiota in CAD patients. These alterations in the gut microbiota composition are associated with quantitative changes in atherogenic bacterial metabolites, e.g., LPS, TMAO, and uremic toxins, that increase the risk of developing or progressing CAD.

The gut microbiota composition, however, can be modulated by an appropriate diet. Therefore, knowledge and understanding of the role of the gut microbiota in CAD pathomechanism are crucial in preventing the coronary artery disease and slowing its progression. Targeting personalized medicine with dietary selection or supplementation with beneficial bacterial species could help reduce cardiovascular morbidity and mortality. However, before this can happen, an in-depth understanding of how the gut microflora changes under the diet and impacts mutual interactions with the host organism is imperative.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo12121165/s1>. S1: Search strategy; Table S2: PRISMA 2020 for Abstracts Checklist; S3: PRISMA 2020 Checklist; S4: The Newcastle-Ottawa Assessment Quality Scale; Table S5: Characteristics of studies included in the meta-analysis; Table S6: Characteristics of participants included studies.

Author Contributions: Conceptualization, M.C. and B.S.; methodology, M.C. and K.L.; software, K.L.; validation, R.B. and B.S.; formal analysis, K.L.; investigation, M.C., K.L., R.B. and B.S.; resources, T.R.; data curation, A.L., T.T., K.K., E.S.-S. and M.N.; writing—original draft preparation, M.C., K.L. and B.S.; writing—review and editing, R.B., A.L. and T.T.; visualization, M.C. and K.L.; supervision, B.S. and T.R.; project administration, B.S.; funding acquisition, M.C. and K.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The publication was prepared under the project financed from the funds granted by the Ministry of Education and Science in the “Regional Initiative of Excellence” program for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19 (individual project number RID Z501.20.009). The part of the data was funded by National Science Centre, Poland project no.: 2017/25/N/NZ5/02765.

Data Availability Statement: The part of data that support the findings of this study are openly available under the accession numbers: PRJDB7456, PRJDB6472, PRJNA550301, PRJNA503710.

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interest to declare. All co-authors have seen and agree with the manuscript’s contents, and there is no financial interest to report. We certify that the submission is original work and is not under review at any other publication. The authors have no competing interests to declare.

References

1. Medina-Leyte, D.J.; Zepeda-García, O.; Domínguez-Pérez, M.; González-Garrido, A.; Villarreal-Molina, T.; Jacobo-Albavera, L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3850. [CrossRef] [PubMed]
2. Khan, M.A.; Hashim, M.J.; Mustafa, H.; Baniyas, M.Y.; Al Suwaidi, S.K.B.M.; AlKatheeri, R.; Alblooshi, F.M.K.; Almatrooshi, M.E.A.H.; Alzaabi, M.E.H.; Al Darmaki, R.S.; et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus* **2020**, *12*, e9349. [CrossRef] [PubMed]

3. Maiuolo, J.; Carresi, C.; Gliozzi, M.; Mollace, R.; Scarano, F.; Scicchitano, M.; Macrì, R.; Nucera, S.; Bosco, F.; Oppedisano, F.; et al. The Contribution of Gut Microbiota and Endothelial Dysfunction in the Development of Arterial Hypertension in Animal Models and in Humans. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1823–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lynch, S.V.; Pedersen, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 2369–2379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Afzaal, M.; Saeed, F.; Shah, Y.A.; Hussain, M.; Rabail, R.; Socol, C.T.; Hassoun, A.; Pateiro, M.; Lorenzo, J.M.; Rusu, A.V.; et al. Human Gut Microbiota in Health and Disease: Unveiling the Relationship. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 999001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fan, Y.; Pedersen, O. Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 55–71. [[CrossRef](#)]
8. Ghosh, S.; Whitley, C.S.; Haribabu, B.; Jala, V.R. Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cmgh* **2021**, *11*, 1463–1482. [[CrossRef](#)]
9. Yoo, J.Y.; Sniffen, S.; McGill Percy, K.C.; Pallaval, V.B.; Chidipi, B. Gut Dysbiosis and Immune System in Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ACVD). *Microorganisms* **2022**, *10*, 108. [[CrossRef](#)]
10. Baizabal-Carvallo, J.F.; Alonso-Juarez, M. The Link between Gut Dysbiosis and Neuroinflammation in Parkinson’s Disease. *Neuroscience* **2020**, *432*, 160–173. [[CrossRef](#)]
11. Janeiro, M.H.; Ramírez, M.J.; Solas, M. Dysbiosis and Alzheimer’s Disease: Cause or Treatment Opportunity? *Cell Mol. Neurobiol.* **2022**, *42*, 377–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Halverson, T.; Alagiakrishnan, K. Gut Microbes in Neurocognitive and Mental Health Disorders. *Ann. Med.* **2020**, *52*, 423–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhou, A.; Yuan, Y.; Yang, M.; Huang, Y.; Li, X.; Li, S.; Yang, S.; Tang, B. Crosstalk Between the Gut Microbiota and Epithelial Cells Under Physiological and Infectious Conditions. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 832672. [[CrossRef](#)]
14. Fachi, J.L.; Felipe, J.d.S.; Pral, L.P.; da Silva, B.K.; Corrêa, R.O.; de Andrade, M.C.P.; da Fonseca, D.M.; Basso, P.J.; Câmara, N.O.S.; de Sales e Souza, É.L.; et al. Butyrate Protects Mice from Clostridium Difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 750–761.e7. [[CrossRef](#)]
15. Venkatesh, M.; Mukherjee, S.; Wang, H.; Li, H.; Sun, K.; Benechet, A.P.; Qiu, Z.; Maher, L.; Redinbo, M.R.; Phillips, R.S.; et al. Symbiotic Bacterial Metabolites Regulate Gastrointestinal Barrier Function via the Xenobiotic Sensor PXR and Toll-like Receptor 4. *Immunity* **2014**, *41*, 296–310. [[CrossRef](#)]
16. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of Propionate and Butyrate by the Human Colonic Microbiota. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 29–41. [[CrossRef](#)]
17. Ghosh, T.S.; Das, M.; Jeffery, I.B.; O’Toole, P.W. Adjusting for Age Improves Identification of Gut Microbiome Alterations in Multiple Diseases. *Elife* **2020**, *9*, e50240. [[CrossRef](#)]
18. Chelakkot, C.; Ghim, J.; Ryu, S.H. Mechanisms Regulating Intestinal Barrier Integrity and Its Pathological Implications. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 1–9. [[CrossRef](#)]
19. Violi, F.; Cammisotto, V.; Bartimoccia, S.; Pignatelli, P.; Carnevale, R.; Nocella, C. Gut-Derived Low-Grade Endotoxaemia, Atherothrombosis and Cardiovascular Disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, 0123456789. [[CrossRef](#)]
20. Akash, M.S.H.; Fiyyaz, F.; Rehman, K.; Sabir, S.; Rasool, M.H. Gut Microbiota and Metabolic Disorders: Advances in Therapeutic Interventions. *Crit. Rev. Immunol.* **2019**, *39*, 223–237. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, B.; Wang, X.; Xia, R.; Li, C. Gut Microbiota in Coronary Artery Disease: A Friend or Foe? *Biosci. Rep* **2020**, *40*, BSR20200454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hasan, N.; Yang, H. Factors Affecting the Composition of the Gut Microbiota, and Its Modulation. *PeerJ* **2019**, *7*, e7502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Boers, S.A.; Jansen, R.; Hays, J.P. Understanding and Overcoming the Pitfalls and Biases of Next-Generation Sequencing (NGS) Methods for Use in the Routine Clinical Microbiological Diagnostic Laboratory. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2019**, *38*, 1059–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nearing, J.T.; Douglas, G.M.; Hayes, M.G.; MacDonald, J.; Desai, D.K.; Allward, N.; Jones, C.M.A.; Wright, R.J.; Dhanani, A.S.; Comeau, A.M.; et al. Microbiome Differential Abundance Methods Produce Different Results across 38 Datasets. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 342. [[CrossRef](#)]
25. Köster, J.; Rahmann, S. Snakemake—a Scalable Bioinformatics Workflow Engine. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2520–2522. [[CrossRef](#)]
26. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet. J.* **2011**, *17*, 10–12. [[CrossRef](#)]
27. Sawicka-Śmiarowska, E.; Bondarczuk, K.; Bauer, W.; Niemira, M.; Szalkowska, A.; Raczowska, J.; Kwasniewski, M.; Tarasiuk, E.; Dubatowka, M.; Lapinska, M.; et al. Gut Microbiome in Chronic Coronary Syndrome Patients. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5074. [[CrossRef](#)]
28. RC, E. Search and Clustering Orders of Magnitude Faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461. [[CrossRef](#)]
29. Edgar, R. UNOISE2: Improved Error-Correction for Illumina 16S and ITS Amplicon Sequencing. *bioRxiv* **2016**, 081257. [[CrossRef](#)]
30. Murali, A.; Bhargava, A.; Wright, E.S. IDTAXA: A Novel Approach for Accurate Taxonomic Classification of Microbiome Sequences. *Microbiome* **2018**, *6*, 140. [[CrossRef](#)]

31. Chaumeil, P.A.; Mussig, A.J.; Hugenholtz, P.; Parks, D.H. GTDB-Tk: A Toolkit to Classify Genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 1925–1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lin, H.; Peddada, S. Das Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Oksanen, A.J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; Mcglinn, D.; Minchin, P.R.; Hara, R.B.O.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; et al. Vegan. *Encycl. Food Agric. Ethics* **2019**, *2*, 2395–2396. [[CrossRef](#)]
35. Agresti, A. Generalized Odds Ratios for Ordinal Data. *Biometrics* **1980**, *36*, 59. [[CrossRef](#)]
36. Package, T.; Generalized, T.; Ratios, O.; Rcpp, L. Package ‘Genodds’. 2021. [software].
37. Balduzzi, S.; Rücker, G.; Schwarzer, G. How to Perform a Meta-Analysis with R: A Practical Tutorial. *Evid. Based. Ment. Health* **2019**, *22*, 153–160. [[CrossRef](#)]
38. Alhmod, T.; Kumar, A.; Lo, C.-C.; Al-Sadi, R.; Clegg, S.; Alomari, I.; Zmeili, T.; Gleasne, C.D.; Mcmurry, K.; Dichosa, A.E.K.; et al. Investigating Intestinal Permeability and Gut Microbiota Roles in Acute Coronary Syndrome Patients. *Hum. Microbiome J.* **2019**, *13*, 100059. [[CrossRef](#)]
39. Emoto, T.; Yamashita, T.; Kobayashi, T.; Sasaki, N.; Hirota, Y.; Hayashi, T.; So, A.; Kasahara, K.; Yodoi, K.; Matsumoto, T.; et al. Characterization of Gut Microbiota Profiles in Coronary Artery Disease Patients Using Data Mining Analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: Gut Microbiota Could Be a Diagnostic Marker of Coronary Artery Disease. *Heart. Vessel.* **2016**, *32*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kwun, J.S.; Kang, S.H.; Lee, H.J.; Park, H.K.; Lee, W.J.; Yoon, C.H.; Suh, J.W.; Cho, Y.S.; Youn, T.J.; Chae, I.H. Comparison of Thrombus, Gut, and Oral Microbiomes in Korean Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction: A Case–Control Study. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 2069–2079. [[CrossRef](#)]
41. Zheng, Y.Y.; Wu, T.T.; Liu, Z.Q.; Li, A.; Guo, Q.Q.; Ma, Y.Y.; Zhang, Z.L.; Xun, Y.L.; Zhang, J.C.; Wang, W.R.; et al. Gut Microbiome-Based Diagnostic Model to Predict Coronary Artery Disease. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 3548–3557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ivashkin, V.T.; Kashukh, Y.A. Impact of L-Carnitine and Phosphatidylcholine Containing Products on the Proatherogenic Metabolite TMAO Production and Gut Microbiome Changes in Patients with Coronary Artery Disease. *Vopr. Pitam.* **2019**, *88*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Emoto, T.; Yamashita, T.; Sasaki, N.; Hirota, Y.; Hayashi, T.; So, A.; Kasahara, K.; Yodoi, K.; Matsumoto, T.; Mizoguchi, T.; et al. Analysis of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease Patients: A Possible Link between Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **2016**, *23*, 908–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jie, Z.; Xia, H.; Zhong, S.-L.; Feng, Q.; Li, S.; Liang, S.; Zhong, H.; Liu, Z.; Gao, Y.; Zhao, H.; et al. The Gut Microbiome in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Liu, Z.; Li, J.; Liu, H.; Tang, Y.; Zhan, Q.; Lai, W.; Ao, L.; Meng, X.; Ren, H.; Xu, D.; et al. The Intestinal Microbiota Associated with Cardiac Valve Calcification Differs from That of Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* **2019**, *284*, 121–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yoshida, N.; Emoto, T.; Yamashita, T.; Watanabe, H.; Hayashi, T.; Tabata, T.; Hoshi, N.; Hatano, N.; Ozawa, G.; Sasaki, N.; et al. *Bacteroides Vulgatus* and *Bacteroides Dorei* Reduce Gut Microbial Lipopolysaccharide Production and Inhibit Atherosclerosis. *Circulation* **2018**, *138*, 2486–2498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yoshida, N.; Sasaki, K.; Sasaki, D.; Yamashita, T.; Fukuda, H.; Hayashi, T.; Tabata, T.; Osawa, R.; Hirata, K.I.; Kondo, A. Effect of Resistant Starch on the Gut Microbiota and Its Metabolites in Patients with Coronary Artery Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **2019**, *26*, 705–719. [[CrossRef](#)]
48. Dong, C.; He, Z.; Zhu, Q.; Liu, J.; Gao, F.; Li, K.; Sun, S.; Liu, Q.; Wang, Y.; Tang, Y.; et al. Correlation Network Analyses Based on Metagenomics and Multi-Type Metabolomic Data Identified Biomarkers of Coronary Artery Disease. *Res. Sq.* **2020**, preprint. [[CrossRef](#)]
49. Gao, J.; Yan, K.T.; Wang, J.X.; Dou, J.; Wang, J.; Ren, M.; Ma, J.; Zhang, X.; Liu, Y. Gut Microbial Taxa as Potential Predictive Biomarkers for Acute Coronary Syndrome and Post-STEMI Cardiovascular Events. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2639. [[CrossRef](#)]
50. Toya, T.; Ozcan, I.; Corban, M.T.; Sara, J.D.; Marietta, E.V.; Ahmad, A.; Horwath, I.E.; Loeffler, D.L.; Murray, J.A.; Lerman, L.O.; et al. Compositional Change of Gut Microbiome and Osteocalcin Expressing Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hu, J.L.; Yao, Z.F.; Tang, M.N.; Tang, C.; Zhao, X.F.; Su, X.; Lu, D.B.; Li, Q.R.; Wang, Z.S.; Yan, Y.; et al. Gut Microbiota Community Shift with Severity of Coronary Artery Disease. *Engineering* **2021**, *7*, 1715–1724. [[CrossRef](#)]
52. Toya, T.; Corban, M.T.; Marrietta, E.; Horwath, I.E.; Lerman, L.O.; Murray, J.A.; Lerman, A. Coronary Artery Disease Is Associated with an Altered Gut Microbiome Composition. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227147. [[CrossRef](#)]
53. Cui, L.; Zhao, T.; Hu, H.; Zhang, W.; Hua, X. Association Study of Gut Flora in Coronary Heart Disease through High-Throughput Sequencing. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 3796359. [[CrossRef](#)]
54. Zhu, Q.; Gao, R.; Zhang, Y.; Pan, D.; Zhu, Y.; Zhang, X.; Yang, R.; Jiang, R.; Xu, Y.; Qin, H. Dysbiosis Signatures of Gut Microbiota in Coronary Artery Disease. *Physiol. Genomics.* **2018**, *50*, 893–903. [[CrossRef](#)]
55. Liu, F.; Fan, C.; Zhang, L.; Li, Y.; Hou, H.; Ma, Y.; Fan, J.; Tan, Y.; Wu, T.; Jia, S.; et al. Alterations of Gut Microbiome in Tibetan Patients With Coronary Heart Disease. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 373. [[CrossRef](#)]

56. Chiu, F.-C.; Tsai, C.-F.; Huang, P.-S.; Shih, C.-Y.; Tsai, M.-H.; Hwang, J.-J.; Wang, Y.-C.; Chuang, E.Y.; Tsai, C.-T.; Chang, S.-N. The Gut Microbiome, Seleno-Compounds, and Acute Myocardial Infarction. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 1462. [[CrossRef](#)]
57. Choroszy, M.; Litwinowicz, K.; Laczanski, L.; Roleder, T.; Sobieszczanska, B. Co-Toxicity of Bacterial Metabolites, to Vascular Endothelial Cells in Coronary Arterial Disease Accompanied by Gut Dysbiosis. *Nutrients* **2022**, *14*, 424. [[CrossRef](#)]
58. Xu, J.; Yang, Y.J. Implications of Gut Microbiome on Coronary Artery Disease. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* **2020**, *10*, 869–880. [[CrossRef](#)]
59. Olvera-Rosales, L.-B.; Cruz-Guerrero, A.-E.; Ramirez-Moreno, E.; Quintero-Lira, A.; Contreras-López, E.; Jaimez-Ordaz, J.; Castañeda-Ovando, A.; Añorve-Morga, J.; Calderón-Ramos, Z.-G.; Arias-Rico, J.; et al. Impact of the Gut Microbiota Balance on the Health-Disease Relationship: The Importance of Consuming Probiotics and Prebiotics. *Foods* **2021**, *10*, 1261. [[CrossRef](#)]
60. Liu, J.; Tan, Y.; Cheng, H.; Zhang, D.; Feng, W.; Peng, C. Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives. *Aging Dis.* **2022**, *13*, 1106–1126. [[CrossRef](#)]
61. Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.A.D.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **2019**, *7*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kazemian, N.; Mahmoudi, M.; Halperin, F.; Wu, J.C.; Pakpour, S. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease: Opportunities and Challenges. *Microbiome* **2020**, *8*, 36. [[CrossRef](#)]
63. Thomas, F.; Hehemann, J.H.; Rebuffet, E.; Czejek, M.; Michel, G. Environmental and Gut *Bacteroidetes*: The Food Connection. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 93. [[CrossRef](#)]
64. Kriaa, A.; Bourgin, M.; Potiron, A.; Mkaouer, H.; Jablaoui, A.; Gerard, P.; Maguin, E.; Rhimi, M. Microbial Impact on Cholesterol and Bile Acid Metabolism: Current Status and Future Prospects. *J. Lipid Res.* **2019**, *60*, 323–332. [[CrossRef](#)]
65. Troy, E.B.; Kasper, D.L. Beneficial Effects of *Bacteroides Fragilis* Polysaccharides on the Immune System. *Front. Biosci.* **2010**, *15*, 25–34. [[CrossRef](#)]
66. Wexler, A.G.; Goodman, A.L. An Insider’s Perspective: *Bacteroides* as a Window into the Microbiome. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17026. [[CrossRef](#)]
67. Zheng, D.; Liwinski, T.; Elinav, E. Interaction between Microbiota and Immunity in Health and Disease. *Cell Res.* **2020**, *30*, 492–506. [[CrossRef](#)]
68. Yoshida, N.; Yamashita, T.; Kishino, S.; Watanabe, H.; Sasaki, K.; Sasaki, D.; Tabata, T.; Sugiyama, Y.; Kitamura, N.; Saito, Y.; et al. A Possible Beneficial Effect of *Bacteroides* on Faecal Lipopolysaccharide Activity and Cardiovascular Diseases. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13009. [[CrossRef](#)]
69. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.-M.; et al. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180. [[CrossRef](#)]
70. Vacca, M.; Celano, G.; Calabrese, F.M.; Portincasa, P.; Gobetti, M.; Angelis, M. De The Controversial Role of Human Gut *Lachnospiraceae*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 573. [[CrossRef](#)]
71. Heeney, D.D.; Gareau, M.G.; Marco, M.L. Intestinal *Lactobacillus* in Health and Disease, a Driver or Just along for the Ride? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 140–147. [[CrossRef](#)]
72. Kechagia, M.; Basoulis, D.; Konstantopoulou, S.; Dimitriadi, D.; Gyftopoulou, K.; Skarmoutsou, N.; Fakiri, E.M. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISSN Nutr.* **2013**, *2013*, 481651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Ferrarese, R.; Ceresola, E.R.; Preti, A.; Canducci, F. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Weight Loss and Metabolic Syndrome in the Microbiome Era. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 7588–7605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Queipo-Ortuño, M.I.; Seoane, L.M.; Murri, M.; Pardo, M.; Gomez-Zumaquero, J.M.; Cardona, F.; Casanueva, F.; Tinahones, F.J. Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e65465. [[CrossRef](#)]
75. Grigor’eva, I.N. Gallstone Disease, Obesity and the Firmicutes/*Bacteroidetes* Ratio as a Possible Biomarker of Gut Dysbiosis. *J. Pers. Med.* **2020**, *11*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Sun, B.; Li, L.; Zhou, X. Comparative Analysis of the Gut Microbiota in Distinct Statin Response Patients in East China. *J. Microbiol.* **2018**, *56*, 886–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Puurunen, V.-P.; Kiviniemi, A.; Lepojärvi, S.; Piira, O.-P.; Hedberg, P.; Junttila, J.; Ukkola, O.; Huikuri, H. Leptin Predicts Short-Term Major Adverse Cardiac Events in Patients with Coronary Artery Disease. *Ann. Med.* **2017**, *49*, 448–454. [[CrossRef](#)]
78. Yuan, M.-J.; Li, W.; Zhong, P. Research Progress of Ghrelin on Cardiovascular Disease. *Biosci. Rep.* **2021**, *41*, BSR20203387. [[CrossRef](#)]
79. Niknam, M.; Liaghat, T.; Zarghami, M.; Akrami, M.; Shahnematollahi, S.M.; Ahmadipour, A.; Moazzen, F.; Soltanabadi, S. Ghrelin and Ghrelin/Total Cholesterol Ratio as Independent Predictors for Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Investig. Med.* **2022**, *70*, 759–765. [[CrossRef](#)]
80. Torres-Fuentes, C.; Golubeva, A.V.; Zhdanov, A.V.; Wallace, S.; Arbolea, S.; Papkovsky, D.B.; Aidy, S.E.; Ross, P.; Roy, B.L.; Stanton, C.; et al. Short-Chain Fatty Acids and Microbiota Metabolites Attenuate Ghrelin Receptor Signaling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2019**, *33*, 13546–13559. [[CrossRef](#)]
81. Hoyles, L.; Jiménez-Pranteda, M.L.; Chilloux, J.; Briat, F.; Myridakis, A.; Aránias, T.; Magnan, C.; Gibson, G.R.; Sanderson, J.D.; Nicholson, J.K.; et al. Metabolic Retroconversion of Trimethylamine N-Oxide and the Gut Microbiota. *Microbiome* **2018**, *6*, 73. [[CrossRef](#)]

82. Dalla Via, A.; Gargari, G.; Taverniti, V.; Rondini, G.; Velardi, I.; Gambaro, V.; Visconti, G.L.; De Vitis, V.; Gardana, C.; Ragg, E.; et al. Urinary TMAO Levels Are Associated with the Taxonomic Composition of the Gut Microbiota and with the Choline TMA-Lyase Gene (CutC) Harbored by *Enterobacteriaceae*. *Nutrients* **2019**, *12*, 62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Cosola, C.; Rocchetti, M.T.; Cupisti, A.; Gesualdo, L. Microbiota Metabolites: Pivotal Players of Cardiovascular Damage in Chronic Kidney Disease. *Pharmacol. Res.* **2018**, *130*, 132–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hashizume-Takizawa, T.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, R.; Shinozaki-Kuwahara, N.; Saito, M.; Kurita-Ochiai, T. Oral Challenge with *Streptococcus Sanguinis* Induces Aortic Inflammation and Accelerates Atherosclerosis in Spontaneously Hyperlipidemic Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *520*, 507–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Sayols-Baixeras, S.; Dekkers, K.F.; Hammar, U.; Baldanzi, G.; Lin, Y.-T.; Ahmad, S.; Nguyen, D.; Varotsis, G.; Pita, S.; Nielsen, N.; et al. *Streptococcus* Species Abundance in the Gut Is Linked to Subclinical Coronary Atherosclerosis in 8,973 Participants from the SCAPIS Cohort. *medRxiv* **2022**. [[CrossRef](#)]
86. Karlsson, F.H.; Fåk, F.; Nookaew, I.; Tremaroli, V.; Fagerberg, B.; Petranovic, D.; Bäckhed, F.; Nielsen, J. Symptomatic Atherosclerosis Is Associated with an Altered Gut Metagenome. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Claus, S.P.; Ellero, S.L.; Berger, B.; Krause, L.; Bruttin, A.; Molina, J.; Paris, A.; Want, E.J.; de Waziers, I.; Cloarec, O.; et al. Colonization-Induced Host-Gut Microbial Metabolic Interaction. *MBio* **2011**, *2*, e00271-10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Lahti, L.; Salonen, A.; Kekkonen, R.A.; Salojärvi, J.; Jalanka-Tuovinen, J.; Palva, A.; Orešič, M.; de Vos, W.M. Associations between the Human Intestinal Microbiota, *Lactobacillus Rhamnosus* GG and Serum Lipids Indicated by Integrated Analysis of High-Throughput Profiling Data. *PeerJ* **2013**, *1*, e32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Martínez, I.; Wallace, G.; Zhang, C.; Legge, R.; Benson, A.K.; Carr, T.P.; Moriyama, E.N.; Walter, J. Diet-Induced Metabolic Improvements in a Hamster Model of Hypercholesterolemia Are Strongly Linked to Alterations of the Gut Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 4175–4184. [[CrossRef](#)]
90. Bosco, N.; Noti, M. The Aging Gut Microbiome and Its Impact on Host Immunity. *Genes Immun.* **2021**, *22*, 289–303. [[CrossRef](#)]
91. Kim, Y.S.; Unno, T.; Kim, B.Y.; Park, M.S. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J. Mens. Health* **2020**, *38*, 48–60. [[CrossRef](#)]
92. Gao, X.; Zhang, M.; Xue, J.; Huang, J.; Zhuang, R.; Zhou, X.; Zhang, H.; Fu, Q.; Hao, Y. Body Mass Index Differences in the Gut Microbiota Are Gender Specific. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Han, J.-L.; Lin, H.-L. Intestinal Microbiota and Type 2 Diabetes: From Mechanism Insights to Therapeutic Perspective. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 17737–17745. [[CrossRef](#)]

8. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ

Porównanie mikroflory jelit osób z chorobą niedokrwienną serca i osób zdrowych wykazało:

- 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.
- Znaczący wzrost liczebności bakterii z rzędu *Coriobacteriales* i *Enterobacteriales*, oraz wzrost liczebności bakterii z rodziny *Ruminococcaceae*, a więc grup drobnoustrojów tzw. kardiotoksycznych, o ustalonej roli w rozwoju miażdżycy tętnic.
- Znaczący spadek bakterii z rodzin *Tannerellaceae*, *Rickenellaceae* i *Prevotellaceae* oraz bakterii z rodzaju *Alistipes* o korzystnym wpływie na organizm człowieka, dzięki produkowanym SCFA.
- Wykonane meta-analiza i przegląd statystyczny wskazują na silną korelację między dysbiozą jelita a rozwojem zmian miażdżycowych w tętnicach osób z chorobami sercowo-naczyniowymi. U osób z chorobą niedokrwienną serca obserwowany jest spadek liczebności *Bacteroidetes*.
- Poziom endotoksyny w osoczu chorych był znacząco podwyższony w porównaniu do osób zdrowych (choć stężenie LPS u chorych nie przekroczyło 10 ng/ml), co w połączeniu z poziomem lipidów w surowicy chorych, wskazuje na metaboliczną endotoksemię.
- Poziom indoksyłu w surowicy badanych chorych, choć był dwukrotnie wyższy niż u osób zdrowych, nie wskazywał na zaburzenia czynności nerek, co było zgodne z faktem wykluczenia pacjentów cierpiących na schorzenia nerek.
- Metabolity bakteryjne w stężeniach zastosowanych w badaniach nie wpływały na żywotność i proliferację komórek śródbłonna, ani na ich morfologię.
- Bezpośrednie i znaczące zwiększenie stresu oksydacyjnego oraz trombogenności komórek śródbłonna występowało przy stężeniach endotoksyny i indoksyłu stwierdzonych w surowicy chorych, szczególnie po połączeniu obu metabolitów, co wskazuje na ich współtoksyczność.

- Badane metabolity znacząco zwiększały stres oksydacyjny i trombogenność śródbłonna także pośrednio, co wskazuje, że ich obecność w krążeniu, nawet w minimalnych stężeniach, aktywuje makrofagi i potęguje ich toksyczność.

9. WNIOSKI

1. Chorobie niedokrwiennej serca towarzyszy dysbioza jelit, która promuje zmiany trombogenne śródbłonna naczyniowego.
2. U chorych z chorobą niedokrwinną serca znamienne jest spadek liczebności *Bacteroidetes* oraz wzrost liczebności *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.

10. PIŚMIENICTWO

1. Singh, R.B.; Mengi, S.A.; Xu, Y.-J.; Arneja, A.S.; Dhalla, N.S. Pathogenesis of Atherosclerosis: A Multifactorial Process. *Exp. Clin. Cardiol.* **2002**, *7*, 40–53.
2. Jebari-Benslaiman, S.; Galicia-García, U.; Larrea-Sebal, A.; Olaetxea, J.R.; Alloza, I.; Vandebroek, K.; Benito-Vicente, A.; Martín, C. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1–38, doi:10.3390/ijms23063346.
3. Amersfoort, J.; Eelen, G.; Carmeliet, P. Immunomodulation by Endothelial Cells—Partnering up with the Immune System? *Nat. Rev. Immunol.* **2022**, *22*, 576–588, doi:10.1038/s41577-022-00694-4.
4. Shafi, O. Switching of Vascular Cells towards Atherogenesis, and Other Factors Contributing to Atherosclerosis: A Systematic Review. *Thromb. J.* **2020**, *18*, 1–18, doi:10.1186/s12959-020-00240-z.
5. Tyrrell, D.J.; Goldstein, D.R. Ageing and Atherosclerosis: Vascular Intrinsic and Extrinsic Factors and Potential Role of IL-6. *Nat. Rev. Cardiol.* **2021**, *18*, 58–68, doi:10.1038/s41569-020-0431-7.
6. Laberge, M.A.; Moore, K.J.; Freeman, M.W. Atherosclerosis and Innate Immune Signaling. *Ann. Med.* **2005**, *37*, 130–140, doi:10.1080/07853890510007304.
7. Rafieian-Kopaei, M.; Setorki, M.; Doudi, M.; Baradaran, A.; Nasri, H. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes, International Journal of Preventive Medicine. *Int. J. Prev. Med.* **2014**, *5*, 927–946.
8. Herrero-Fernandez, B.; Gomez-Bris, R.; Somovilla-Crespo, B.; Gonzalez-Granado, J.M. Immunobiology of Atherosclerosis: A Complex Net of Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20215293.
9. Malakar, A.K.; Choudhury, D.; Halder, B.; Paul, P.; Uddin, A.; Chakraborty, S. A Review on Coronary Artery Disease, Its Risk Factors, and Therapeutics. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 16812–16823, doi:10.1002/jcp.28350.
10. Vicentini, F.A.; Keenan, C.M.; Wallace, L.E.; Woods, C.; Cavin, J.-B.; Flockton, A.R.; Macklin, W.B.; Belkind-Gerson, J.; Hirota, S.A.; Sharkey, K.A. Intestinal Microbiota Shapes Gut Physiology and Regulates Enteric Neurons and Glia. *Microbiome* **2021**, *9*, 210, doi:10.1186/s40168-021-01165-z.
11. Fan, Y.; Pedersen, O. Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 55–71, doi:10.1038/s41579-020-0433-9.
12. Cerdá, B.; Pérez, M.; Pérez-Santiago, J.D.; Tornero-Aguilera, J.F.; González-Soltero,

- R.; Larrosa, M. Gut Microbiota Modification: Another Piece in the Puzzle of the Benefits of Physical Exercise in Health? *Front. Physiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fphys.2016.00051.
13. Baothman, O.A.; Zamzami, M.A.; Taher, I.; Abubaker, J.; Abu-Farha, M. The Role of Gut Microbiota in the Development of Obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 1–9, doi:10.1186/s12944-016-0278-4.
 14. Hou, K.; Wu, Z.-X.; Chen, X.-Y.; Wang, J.-Q.; Zhang, D.; Xiao, C.; Zhu, D.; Koya, J.B.; Wei, L.; Li, J.; et al. Microbiota in Health and Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 135, doi:10.1038/s41392-022-00974-4.
 15. Varesi, A.; Pierella, E.; Romeo, M.; Piccini, G.B.; Alfano, C.; Bjørklund, G.; Opong, A.; Ricevuti, G.; Esposito, C.; Chirumbolo, S.; et al. The Potential Role of Gut Microbiota in Alzheimer’s Disease: From Diagnosis to Treatment. *Nutrients* **2022**, *14*, 1–27, doi:10.3390/nu14030668.
 16. Kim, J.; Lee, H.; An, J.; Song, Y.; Lee, C.; Kim, K.; Kong, H.; Paola, M. Di Alterations in Gut Microbiota by Statin Therapy and Possible Intermediate Effects on Hyperglycemia and Hyperlipidemia. **2019**, *10*, 1–10, doi:10.3389/fmicb.2019.01947.
 17. Kim, Y.S.; Unno, T.; Kim, B.Y.; Park, M.S. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J. Mens. Health* **2020**, *38*, 48–60, doi:10.5534/wjmh.190009.
 18. Guo, F.; Qiu, X.; Tan, Z.; Li, Z.; Ouyang, D. Plasma Trimethylamine N-Oxide Is Associated with Renal Function in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2020**, *20*, 1–9, doi:10.1186/s12872-020-01669-w.
 19. Hung, S.C.; Kuo, K.L.; Wu, C.C.; Tarng, D.C. Indoxyl Sulfate: A Novel Cardiovascular Risk Factor in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, 1–8, doi:10.1161/JAHA.116.005022.
 20. Morris, M.C.; Gilliam, E.A.; Li, L. Innate Immune Programming by Endotoxin and Its Pathological Consequences. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 680, doi:10.3389/fimmu.2014.00680.
 21. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.-M.; et al. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180, doi:10.1038/nature09944.
 22. Moludi, J.; Maleki, V.; Jafari-Vayghyan, H.; Vaghef-Mehrabany, E.; Alizadeh,

- M. Metabolic Endotoxemia and Cardiovascular Disease: A Systematic Review about Potential Roles of Prebiotics and Probiotics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2020**, *47*, 927–939, doi:10.1111/1440-1681.13250.
23. Martínez, I.; Lattimer, J.M.; Hubach, K.L.; Case, J.A.; Yang, J.; Weber, C.G.; Louk, J.A.; Rose, D.J.; Kyureghian, G.; Peterson, D.A.; et al. Gut Microbiome Composition Is Linked to Whole Grain-Induced Immunological Improvements. *ISME J.* **2013**, *7*, 269–280, doi:10.1038/ismej.2012.104.
 24. Muscogiuri, G.; Cantone, E.; Cassarano, S.; Tuccinardi, D.; Barrea, L.; Savastano, S.; Colao, A. Gut Microbiota: A New Path to Treat Obesity. *Int. J. Obes. Suppl.* **2019**, *9*, 10–19, doi:10.1038/s41367-019-0011-7.
 25. Violi, F.; Cammisotto, V.; Bartimoccia, S.; Pignatelli, P.; Carnevale, R.; Nocella, C. Gut-Derived Low-Grade Endotoxaemia, Atherothrombosis and Cardiovascular Disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2023**, *20*, 24–37, doi:10.1038/s41569-022-00737-2.
 26. Cani, P.D.; Amar, J.; Iglesias, M.A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A.M.; Fava, F.; Tuohy, K.M.; Chabo, C.; et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1761–1772, doi:10.2337/db06-1491.
 27. Mohammad, S.; Thiernemann, C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 1–16, doi:10.3389/fimmu.2020.594150.
 28. Brown, B.I. Endotoxemia : A Clinical Review. **2017**.
 29. André, P.; Laugerette, F.; Féart, C. Metabolic Endotoxemia: A Potential Underlying Mechanism of the Relationship between Dietary Fat Intake and Risk for Cognitive Impairments in Humans? *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11081887.
 30. Ghoshal, S.; Witta, J.; Zhong, J.; de Villiers, W.; Eckhardt, E. Chylomicrons Promote Intestinal Absorption of Lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 90–97, doi:10.1194/jlr.M800156-JLR200.
 31. Neves, A.L.; Coelho, J.; Couto, L.; Leite-Moreira, A.; Roncon-Albuquerque, R. Metabolic Endotoxemia: A Molecular Link between Obesity and Cardiovascular Risk. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *51*, doi:10.1530/JME-13-0079.
 32. Vors, C.; Pineau, G.; Draï, J.; Meugnier, E.; Pesenti, S.; Laville, M.; Laugerette, F.; Malpuech-Brugère, C.; Vidal, H.; Michalski, M.C. Postprandial Endotoxemia Linked with Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 3427–3435,

doi:10.1210/jc.2015-2518.

33. Van Deventer, S.J.H.; Ten Cate, J.W.; Tytgat, G.N.J. Intestinal Endotoxemia. *Gastroenterology* **1988**, *94*, 825–831, doi:10.1016/0016-5085(88)90261-2.
34. Ghoshal, S.; Witta, J.; Zhong, J.; de Villiers, W.; Eckhardt, E. Chylomicrons Promote Intestinal Absorption of Lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 90–97, doi:10.1194/jlr.M800156-JLR200.
35. Fasano, A. Gut Permeability, Obesity, and Metabolic Disorders: Who Is the Chicken and Who Is the Egg? *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *105*, 3–4, doi:10.3945/ajcn.116.148338.
36. Giambelluca, S.; Ochs, M.; Lopez-Rodriguez, E. Resting Time after Phorbol 12-Myristate 13-Acetate in THP-1 Derived Macrophages Provides a Non-Biased Model for the Study of NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 958098, doi:10.3389/fimmu.2022.958098.
37. Pinto, S.M.; Kim, H.; Subbannayya, Y.; Giambelluca, M.; Bösl, K.; Kandasamy, R.K. Dose-Dependent Phorbol 12-Myristate-13-Acetate-Mediated Monocyte-to-Macrophage Differentiation Induces Unique Proteomic Signatures in THP-1 Cells. *bioRxiv* **2020**, 2020.02.27.968016, doi:10.1101/2020.02.27.968016.
38. Gräbner, R.; Till, U.; Heller, R. Flow Cytometric Determination of E-Selectin, Vascular Cell Adhesion Molecule-1, and Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 in Formaldehyde-Fixed Endothelial Cell Monolayers. **2000**, doi:10.1002/1097-0320.

11. NOTA BIOGRAFICZNA

Marcin Choroszy

E-mail: marcin.choroszy@student.umw.edu.pl

Data urodzenia: 18.03.1992r

Miejsce urodzenia: Oleśnica

- **Wykształcenie i praca zawodowa:**

2020-obecnie Rezydentura w dziedzinie Kardiologii w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu

2018-obecnie Studia Doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

2018-2019 Staż Podyplomowy w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu

2012-2018 Studia na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Kierunek Lekarski, ukończone z wyróżnieniem

- **Przynależność do towarzystw naukowych:**

2021-obecnie Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

2021-obecnie European Society of Cardiology

- **Granty:**

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 w ramach realizacji projektu pt. „Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu jako Regionalny Ośrodek Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu” realizowanego w ramach środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Programie „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019-2022, nr projektu 016/RID/2018/19. Decyzją Prorektora ds. Nauki UMW w dniu 10.07.2020r. przyznano środki finansowe w wysokości 50000 zł na realizację projektu badawczego pt. *‘The heart-gut axis: role of bacterial metabolites in the atherogenesis.’* Okres finansowania: 2020 – 2022.

13. DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA

1. **Choroszy Marcin**, Sobieszcańska Beata, Litwinowicz Kamil, Łaczmanski Łukasz, Chmielarz Mateusz, Walczuk Urszula, Roleder Tomasz, Radziejewska Jadwiga, Wawrzyńska Magdalena: *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, vol. 14, nr 3, art.424 [17 s.], DOI:10.3390/nu14030424, 140 punktów, IF (6,706)
2. **Choroszy Marcin**, Litwinowicz Kamil, Bednarz Robert, Roleder Tomasz, Lerman Amir, Toya Takumi, Kamiński Karol, Sawicka-Śmiarowska Emilia, Niemira Magdalena, Sobieszcańska Beata: *Human gut microbiota in coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis*, *Metabolites*, 2022, vol. 12, nr 12, art.1165 [23 s.], DOI:10.3390/metabo12121165, 100 punktów, IF (5,581)
3. Litwinowicz Kamil, **Choroszy Marcin**, Ornat Maciej, Wróbel Anna, Waszczuk Ewa: *Bayesian network meta-analysis of face masks' impact on human physiology*, *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, art.5823 [11 s.], DOI:10.1038/s41598-022-09747-z, 140 punktów, IF (4,997)
4. **Choroszy Marcin**, Litwinowicz Kamil, Sobieszcańska Beata: *Antybiotykoterapia w zapaleniu płuc a biofilm bakteryjny*, *Medycyna po Dyplomie*, 2021, vol. 30, nr 2, 89-90, 93-96, [Publikacja w czasopiśmie spoza listy MNiSW], 5 punktów
5. Litwinowicz Kamil, **Choroszy Marcin**, Wróbel Anna: *Strategies for reducing the impact of cycling on the perineum in healthy males: systematic review and meta-analysis*, *Sports Medicine*, 2021, vol. 51, nr 2, s. 275-287, DOI:10.1007/s40279-020-01363-z, 200 punktów, IF (11,928)
6. Sobieszcańska Beata, Turniak Michał, Olbromski Mateusz, Walczuk Urszula, **Choroszy Marcin**, Tukiendorf Andrzej, Dzięgiel Piotr: *Norepinephrine affects the interaction of adherent-invasive Escherichia coli with intestinal epithelial cells*, *Virulence*, 2021, vol. 12, nr 1, s. 630-637, DOI:10.1080/21505594.2021.1882780, 100 punktów, IF (5,428)
7. Litwinowicz Kamil, **Choroszy Marcin**, Waszczuk Ewa: *Changes in the composition of the human intestinal microbiome in alcohol use disorder: a systematic review*, *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 2020, vol. 46, nr 1, s. 4-12, DOI:10.1080/00952990.2019.1669629, 70 punktów, IF (3,829)
8. Domagała Zygmunt, Pona Adrian, Ornat Maciej, Rusiecki Lesław, Litwinowicz Kamil, **Choroszy Marcin**, Woźniak Sławomir, Syrycki Marek, Dąbrowski Paweł, Trzaska

Mirosław: *Health and wellness: Zika and swine flu awareness amongst foreign medicine students in Wrocław - the preliminary study*, W: Wellness and education, (red.) Henryk Duda, Tomasz Wójcik, Lublin 2016, NeuroCentrum, s. 11-24, ISBN 978-83-61495-99-4, 5 punktów

9. Domagała Zygmunt, Rusiecki Lesław, Ornat Maciej, **Choroszy Marcin**, Litwinowicz Kamil, Kaczmarek-Wdowiak Beata, Dąbrowski Paweł, Kacała Ryszard Rafał, Porwolik Michał, Gworys Bohdan: *Welfare and society - measured versus self-reported body height and body mass in medicine students of Wrocław Medical University*, W: Wellness and society, (red.) Monika Szpringer, Roman Starz, Lublin 2014, NeuroCentrum, s. 61-76, (Health and wellness; nr 4/2014), ISBN 978-83-61495-43-7, 5 punktów

Sumaryczny IF: 38,469

Sumaryczna punktacja MEiN: 765 pkt

14. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Prof. dr hab. Beata Sobieszcańska
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. T. Chałubińskiego 4
50-368 Wrocław

Wrocław 27.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Choroszy M, Sobieszcańska B, Litwinowicz K, Łaczmanski Ł, Chmielarz M, Waleczuk 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na zaplanowaniu metodologii, przeprowadzaniu badań laboratoryjnych, opracowaniu wersji ostatecznej manuskryptu i nadzorze merytorycznym pracy.

Oświadczam, że w pracy: 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 Nov 23;12(12):1165 mój udział polegał na opracowaniu wersji ostatecznej manuskryptu i nadzorze merytorycznym pracy.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

prof. dr hab. Beata Sobieszcańska

Lek. Kamil Litwinowicz
Katedra Biochemii i Immunochemii
Zakład Biochemii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Tytusa Chałubińskiego 10
50-368 Wrocław

Wrocław 20.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na analizie statystycznej wyników.

Oświadczam, że w pracy: 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 Nov 23;12(12):1165 mój udział polegał na przeglądzie piśmiennictwa, analizie statystycznej wyników, oraz przygotowywaniu manuskryptu.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis



Prof. dr hab. Tomasz Roleder
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny
Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
ul. H. Kamińskiego 73a
51-124 Wrocław

Wrocław 20.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Choroszy M, Sobieszcańska B, Litwinowicz K, Łacmański 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na przeprowadzaniu badań inwazyjnych u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca oraz nadzorze merytorycznym pracy.

Oświadczam, że w pracy: Oświadczam, że w pracy: 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 Nov 23;12(12):1165 mój udział polegał na opracowaniu ostatecznej wersji artykułu, oraz nadzorze merytorycznym pracy.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

LEKARZ KIERUJĄCY
ODDZIAŁEM KARDIOLOGICZNYM
z Pododdziałem Intensywnego Medycyny Kardio- i
i Pododdziałem Leczenia Zaburzeń Rytmu Serca
Podepis
Prof. dr hab. n. med. Tomasz Roleder

Lek. Robert Bednarz
Ninewells Hospital and Medical School
James Arrott Drive
Dundee DD1 9SY
Wielka Brytania

Dundee 20.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: 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 Nov 23;12(12):1165 mój udział polegał na przeglądzie piśmiennictwa, przygotowywaniu pierwotnej wersji manuskryptu, oraz korekcie językowej.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Robert Bednarz 28/02/23
Podpis
GMC# 7737423

Dr hab. Łukasz Łaczmański
Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk
ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Wrocław 27.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na zbieraniu i sekwencjonowaniu danych.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis



Prof. dr hab. Karol Kamiński
Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok 28.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: 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 Nov 23;12(12):1165 mój udział polegał na udostępnieniu zebranych danych, oraz nadzorze merytorycznym.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis

Signed by /
Podpisano przez:



Karol Kamiński

Date / Data:
2023-02-28
09:36

Dr n. med. Emilia Sawicka- Śmiarowska
Zakład Medycyny Populacyjnej i Prewencji Chorób Cywilizacyjnych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok 20.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: 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 Nov 23;12(12):1165 mój udział polegał na udostępnieniu zebranych danych, oraz nadzorze merytorycznym.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis

Emilia
Sawicka-Śmiarowska

Dr Magdalena Niemira
Centrum Badań Klinicznych
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Białystok 27.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: 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 Nov 23;12(12):1165 mój udział polegał na udostępnieniu zebranych danych, oraz nadzorze merytorycznym pracy.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis

Magdalena
Niemira

Prof. Amir Lerman
Department of Cardiovascular Medicine
Mayo Clinic, Rochester
MN 55905, USA

Rochester 09.03.2023r.

STATEMENT

I declare that my participation in the article: 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 Nov 23;12(12):1165 consists of contributing data and providing substantive supervision to the study.

I consent to the use of the above publication in Dr Marcin Choroszy's doctoral dissertation entitled "The heart-gut axis: the role of intestinal dysbiosis and its metabolites in coronary atherosclerosis."

Amir Lerman

Assoc Prof. Takumi Toya, MD
Division of Cardiology
National Defense Medical College, Tokorozawa
Saitama, Japan

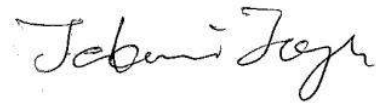
02. Mar.2023

STATEMENT

I declare that my participation in the article: 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 Nov 23;12(12):1165 consists of contributing data and providing substantive supervision to the study.

I consent to the use of the above publication in Dr Marcin Choroszy's doctoral dissertation entitled "The heart-gut axis: the role of intestinal dysbiosis and its metabolites in coronary atherosclerosis".

Signature



Dr inż. Urszula Walczuk
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. T. Chałubińskiego 4
50-368 Wrocław

Wrocław 27.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Choroszy M, Sobieszcańska B, Litwinowicz K, Łączmański 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na przeprowadzaniu badań laboratoryjnych.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszego pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis

Urszula Walczuk
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
Asystent
adiunkt

Dr inż. Urszula Walczuk

Mgr Mateusz Chmielarz
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. T. Chałubińskiego 4
50-368 Wrocław

Wrocław 27.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na przeprowadzaniu badań laboratoryjnych.

Wyrażam zgodę na użycie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszcgo pt. „Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”

Podpis

Mateusz Chmielarz

Dr hab. Magdalena Wawrzyńska
Centrum Badań Przedklinicznych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
wyb. Ludwika Pasteura 1
50-367 Wrocław

Wrocław 20.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Choroszy M, Sobieszcańska B, Litwinowicz K, Łączmański 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na zbieraniu danych, oraz nadzorze merytorycznym pracy.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszy

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

Podpis



Dr n. med. Jadwiga Radziejewska
Szpital Powiatowy w Kłodzku
ul. Szpitalna 1a
57-300 Kłodzko

Wrocław 20.02.2023r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Choroszy M, Sobieszczarska 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 Jan 18;14(3):424 mój udział polegał na analizie statystycznej i ocenie parametrów badań analitycznych w próbkach surowicy badanych osób chorych i zdrowych.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w rozprawie doktorskiej lek. Marcina Choroszy pt. *„Oś serce-jelito: rola dysbiozy jelitowej i jej metabolitów w rozwoju miażdżycy naczyń wieńcowych.”*

Podpis



14. ZAŁĄCZNIKI

- ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

1

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
Uniwersytecie Medycznym
we Wrocławiu
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 209/2020

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami) w składzie:

prof. dr hab. Jacek Daroszewski (choroby wewnętrzne, endokrynologia, diabetologia)
prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)
dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)
mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)
prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)
ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)
mgr Luiza Müller (prawo)
dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)
prof. dr hab. Leszek Szenborn, (pediatria, choroby zakaźne)
Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)
dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel
Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem
prof. dr hab. Jana Kornafela (ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej,
po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.

„Wpływ indykanu na stres oksydacyjny komórek śródbłonna u osób z chorobami sercowo-
naczyniowymi”

zgłoszonym przez **lek. Marcina Choroszego** uczestnika studiów doktoranckich w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła wyrazić zgodę na przeprowadzenie badania w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz w Oddziale Kardiologicznym Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu pod nadzorem prof. dr hab. Beaty Sobieszkańskiej **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych.**

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności:

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu

Opinia powyższa dotyczy: projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej

Wrocław, dnia 8 kwietnia 2020 r.

BW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KOMISJA BIOETYCZNA
przewodniczący
prof. dr hab. Jan Kornafel

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
Uniwersytecie Medycznym
we Wrocławiu
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 191/2021

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 278/XVI R/2020 z dnia 21 grudnia 2020 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 514 z 2020 r.) w składzie:

dr Joanna Birecka (psychiatria)
dr Beata Freier (onkologia)
dr hab. Tomasz Fuchs (ginekologia, położnictwo)
prof. dr hab. Dariusz Janczak (chirurgia naczyniowa, transplantologia)
dr hab. Krzysztof Kaliszewski (chirurgia endokrynologiczna)
dr prawa Andrzej Malicki (prawo)
dr hab. Marcin Mączyński (farmacja)
Urszula Olechowska (pielęgniarstwo)
prof. dr hab. Leszek Szenborn (pediatria, choroby zakaźne)
prof. dr hab. Andrzej Szuba (choroby wewnętrzne, angiologia)
ks. prof. Andrzej Tomko (duchowny)
prof. dr hab. Mieszko Więckiewicz (stomatologia)
dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel
Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem
prof. dr hab. Jerzego Rudnickiego (chirurgia, proktologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej, po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.

„The heart-gut axis: role of bacterial metabolites in the atherogenesis”

zgłoszonym przez **lek. Marcina Choroszy** uczestnika studiów doktoranckich w Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła **wyrazić zgodę** na

przeprowadzenie badania w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod nadzorem prof. dr hab. Małgorzaty Sobieszcańskiej **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych.**

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności.

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu.

Opinia powyższa dotyczy projektu badawczego realizowanego poza działalnością statutową

Opinia jest ważna do dnia 31 grudnia 2022 r.

Przewodniczący Komisji Bioetycznej
przy Uniwersytecie Medycznym

prof. dr hab. Jerzy Rudnicki

Wrocław, dnia 11 marca 2021r.

15. WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

- BSA- surowicza albumina wołowa
- CM- podłoże kondycjonowane
- HUVEC- Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej
- ICAM-1- cząsteczka adhezji wewnątrzkomórkowa-1
- IL- interleukina
- IS- siarczan indoksyli
- LBP- białko wiążące LPS
- LDL- lipoproteina o niskiej gęstości
- LPS- lipopolisacharyd, endotoksyna
- MCP-1- białko chemotaktyczne monocytów
- NGS- sekwencjonowanie nowej generacji
- Oxy-LDL- utleniona lipoproteina o niskiej gęstości
- PAMP- wzorce molekularne związane z patogenami
- PDGF- płytkopochodny czynnik wzrostu
- PRR- receptory rozpoznające wzorce
- ROS- wolne rodniki tlenowe
- SCFA- krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe
- TLR- receptory toll-podobne
- TMAO- N tlenek trimetyloaminy
- TNF- α - czynnik martwicy nowotworów alpha
- VCAM-1- cząsteczka adhezyjna śródbłonna naczyniowego-1