

2. STRESZCZENIE

Wstęp: Etiologia astmy oskrzelowej nie została w pełni wyjaśniona. Wyniki badań naukowych ostatnich lat podkreślają znaczenie mikrobiomu w rozwoju i kontroli choroby. Nowe sposoby oznaczania drobnoustrojów przy pomocy metod genetycznych umożliwiły znaczny rozwój badań w tym zakresie, jednak wiedza na temat mikrobioty dolnych dróg oddechowych u dzieci jest bardzo mocno ograniczona.

Cele: Głównymi celami pracy doktorskiej były : 1) ocena różnic pomiędzy mikrobiotą bakteryjną dróg oddechowych dzieci chorujących na astmę oskrzelową w porównaniu do ich zdrowych rówieśników, 2) ocena różnicy składu mikrobioty pomiędzy górnymi a dolnymi drogami oddechowymi, 3) porównanie mikrobioty bakteryjnej dzieci z dotychczas uzyskanymi wynikami w grupie dorosłych, 4) próba oceny zmiany mikrobiomu w zależności od wieku pacjenta, 5) ocena czynników zewnętrznych i środowiskowych mogących wpływać na bakteryjną mikrobiotę dróg oddechowych

Materiał i metody: W badaniu wzięło udział 38 dzieci, 19 astmatyków i 19 zdrowych rówieśników, w wieku 6-17 lat. Do kryteriów wykluczających włączenie do badania należała jakakolwiek infekcja i/lub antybiotykoterapia na 30 dni przed rekrutacją oraz choroby przewlekłe poza astmą i chorobami alergicznymi w grupie astmatyków. Od każdego z pacjentów pobrano wymaz z jamy ustno-gardłowej oraz kondensat powietrza wydychanego, przy pomocy zestawów RTube. Z pobranych materiałów wyizolowano materiał genetyczny bakterii metodą ekstrakcji DNA, a następnie amplifikowano 16S rRNA bakteryjne przy pomocy metody PCR. Uzyskany materiał zostawał poddany sekwencjonowaniu nowej generacji.

Wyniki: Wymazy z jamy ustno-gardłowej charakteryzują się większą alfa-różnorodnością w stosunku do kondensatów powietrza wydychanego. Mikrobiota bakteryjna dolnych dróg oddechowych astmatyków cechuje się większą alfa-różnorodnością w porównaniu do zdrowych rówieśników. Wykazano ujemną korelację wieku z alfa-różnorodnością w materiale z kondensatów powietrza wydychanego. Do czynników wpływających na różnice w materiale dolnych dróg oddechowych astmatyków w kontekście beta-różnorodności należały narażenie na bierne palenie, dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób alergicznych, codzienne przyjmowanie leków przeciwastmatycznych oraz miejsce zamieszkania (miasto/wieś). W przypadku obu części układu oddechowego dominującymi typami bakterii były Firmicutes,

Proteobacteria i Actinobacteriota. W obrębie klas stężenie Gammaproteobacteria i Bacilli było większe w materiale z kondensatów w grupie dzieci zdrowych, niż u astmatyków.

Wnioski :

1. Mikrobiota bakteryjna górnych dróg oddechowych u astmatyków w populacji dziecięcej nie różni się istotnie w stosunku do dzieci zdrowych
2. Mikrobiota bakteryjna w uzyskanych próbkach z dolnych i górnych dróg oddechowych różni się między sobą
3. Bakteryjna mikrobiota dolnych dróg oddechowych astmatyków w populacji dziecięcej charakteryzuje się większą alfa-różnorodnością oraz beta-różnorodnością względem dzieci zdrowych
4. Mikrobiota bakteryjna dolnych dróg oddechowych dzieci urodzonych siłami natury cechuje się większą alfa-różnorodnością od urodzonych drogą cięcia cesarskiego
5. Astmatyków z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku chorób alergicznych cechuje większa alfa-różnorodność w obrębie kondensatów powietrza wydychanego w stosunku astmatyków bez takiego czynnika
6. Najliczniej prezentowanymi typami bakterii w materiale z górnych i dolnych dróg oddechowych były Firmicutes, Proteobacteria i Actinobacteriota
7. Liczebność klas Gammaproteobacteria i Bacilli była statystycznie niższa w kondensatach powietrza wydychanego u astmatyków w porównaniu do dzieci zdrowych
8. W obrębie kondensatów powietrza wydychanego astmatyków do czynników wpływających na wyodrębnienie różnic w zakresie beta-bioróżnorodności pomiędzy grupami należały ekspozycja na dym tytoniowy, obciążenie rodzinne chorobami alergicznymi, przyjmowanie leków przeciwastmatycznych oraz miejsce zamieszkania (miasto/wieś).
9. Kondensat powietrza wydychanego może stanowić alternatywę dla badań mikrobiomu dolnych dróg oddechowych u dzieci w stosunku do obecnie przyjętych metod inwazyjnych

3. SUMMARY

Introduction: Asthma etiology still remains uncertain. Recent studies have indicated the meaning of microbiome in disease development and control. The new methods of microorganisms detection with genetic methods allowed for a vast increase in microbial studies, however the knowledge about lower airways microbiota among children is very scarce.

Aims: The main aims of the study were: 1) assessment of differences between bacterial microbiota of asthmatic children's airways in comparison to healthy children, 2) assessment of microbiota composition differences between upper and lower airways, 3) comparison of children microbiota with data acquired from studies on adults, 4) assessment of microbiota changes depending on the age of children, 5) assessment of external and environmental factors that can influence bacterial microbiota of airways

Materials and methods: 38 children, 19 asthmatics and 19 healthy peers, aged 6-17 years were enrolled. The exclusion criteria were any infection or/and antibiotic therapy 30 days prior to enrollment and any chronic disease, except asthma and allergic diseases in the asthmatic group. From each participant, oropharyngeal swab and exhaled breath condensate, with use of RTube kit, were acquired. From samples bacterial DNA was extracted, followed by bacterial 16S rRNA PCR amplification. Acquired material has undergone new generation sequencing.

Results: Oropharyngeal swabs are characterized by higher alpha-diversity than exhaled breath condensates. The bacterial microbiota of asthmatics' lower airways has higher alpha-diversity than that of healthy peers. Age and alpha-diversity have been negatively correlated in exhaled breath condensates samples. Factors influencing differences in asthmatics' lower airways material were second-hand smoking, family burden of allergic diseases, asthma medications daily intake and place of living (village/town). In both airways samples dominant phyla were Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria. Class Gammaproteobacteria and Bacilli higher abundance were found among the healthy group, compared to asthmatics.

Conclusions :

1. Bacterial microbiota of pediatric asthmatics upper airways does not alter compared to healthy peers
2. Bacterial microbiota of upper and lower airways samples does differ
3. Bacterial microbiota of pediatric asthmatics lower airways is characterized by higher alpha-diversity and beta-diversity, compared to healthy group
4. Bacterial microbiota of children born naturally lower airways is characterized by higher alpha-diversity than those born by cesarean section
5. Asthmatics with a family burden of allergic diseases have higher alpha-diversity in exhaled breath condensates compared to asthmatics without such a burden
6. The most abundant phyla in both upper and lower airways were Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteriota
7. Class Gammaproteobacteria and Bacilli abundance was statistically lower in exhaled breath condensates of asthmatics compared to healthy children
8. Factors that allowed for distinguishing differences in beta-diversity of asthmatics exhaled breath condensates were second-hand smoking, the burden of allergic diseases, asthma medications intake and place of living (town/village)
9. Exhaled breath condensate can be an alternative to invasive methods of lower airways microbiome assessment