

10. Streszczenie

Wstęp.

W ostatnim czasie pojawiła się spora liczba doniesień dotyczących mikrobioty jelitowej w patogenezie otyłości i cukrzycy oraz między innymi wpływie na rozwój raka jelita grubego czy zaburzenia zachowania. Dziś znanym faktem jest, że fenotyp człowieka nie stanowi prostej sumy ekspresji genetycznej zapisanej w ludzkim genomie jądrowym, ponieważ na całościowy obraz nakreśla się w w stopniu co najmniej znacznym metabolizm mikroorganizmów go zasiedlających. Fenotyp człowieka jest więc wypadkową ludzkiego genotypu i oddziałujących na niego ze wszystkich stron środowiska. Według różnych analiz w jelicie człowieka znajduje się ponad 3 000 000 różnych genów, dodatkowo liczba bakterii stanowi około 10 razy więcej komórek niż całe ciało zdrowego dorosłego człowieka. W ostatnich latach poświęca się sporo uwagi analizie różnorodności mikrobiomów obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka, podkreślając że zaraz po jądrowym i oddziedziczonym po matce (genomie mitochondrialnym) na trzecim miejscu znajdują się właśnie genom jelitowy. Niestety do dziś nie jest znana dokładna rola flory bakteryjnej. Realizacja projektu, który opisywałby oddziaływanie mikroflory na rozwój szpiczaka plazmocytoowego stanowiłoby kluczową rolę w wypełnieniu luki do ustalenia jej roli, a prezentowane badanie jest pierwszym takim przeprowadzonym na populacji polskiej.

Cel Pracy.

Głównym celem mojej pracy było badanie mikrobiomu w populacji polskich pacjentów ze świeżo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytoowym (Newly diagnosed multiple myeloma, NDMM) w odniesieniu do składu mikrobiomu zdrowych Polaków.

W pracy postawiono następujące pytania:

1. Czy występują różnice w składzie mikrobiomu pomiędzy polską populacją chorych na NDMM i osób zdrowych?
2. Czy występujące różnice w składzie mikrobiomu pomiędzy chorymi na NDMM a zdrowymi osobami mogą przyczynić się do rozwoju choroby?
3. Czy istnieją różnice w obfitości względnej pomiędzy badanymi grupami wśród bakterii powiązanych z metabolizmem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych?

Dodatkowym celem pracy było bankowanie informacji na temat mikrobiomu osób populacji polskiej, z możliwością wykorzystania do dalszych analiz.

Material i Metody:

Do badania pobrano próbki od 39 osób. Grupa kontrolna stanowiła 20 osób zdrowych, które oddały do badania kał. Grupa badana składała się z 19 osób ze zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytowy, jeszcze przed rozpoczęciem leczenia hematologicznego.

W prezentowanym badaniu przeprowadzono sekwencjonowanie genu 16S rybosomalnego RNA (rRNA) w celu profilowania społeczności drobnoustrojów. Odpowiednio wyizolowany DNA stanowił podstawę do przygotowania biblioteki do sekwencjonowania NGS (Sekwencjonowanie Nowej Generacji). Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania obejmowała dwa główne etapy. W pierwszym etapie przygotowano zestawy amplikonów regionów hiperzmiennych genu 16S rRNA, w prezentowanym badaniu były to regiony V3-V4 i V7-V9, regiony te pozwalają na identyfikację bakterii i archeonów. Następnie zamplifikowane fragmenty oczyszczono na kulkach magnetycznych.

Następnie po odpowiednim przygotowaniu materiału próbki poddano sekwencjonowaniu.

Sekwencjonowanie sparowanych końców (2x276) 10 pM biblioteki DNA przeprowadzono na sekwenatorze MiSeq (Illumina) przy użyciu zestawu MiSeq Reagent Kit v3 (600 cykli- 600 cycles) (Illumina), uzyskując dane w formacie FASTQ (FASTQ format). Analiza bioinformatyczna mikrobiomów została przeprowadzona za pomocą programu QIIME2 2021.8

Wykonana analiza w badaniu została przeprowadzona poprzez połączenie regionów V3-V4 (V3-V4 regions) z V7-V9 (V7-V9 regions) przy użyciu metody SMURF w implementacji q2-sidle (q2-sidle implementation). W analizie bioinformatycznej postanowiono zmierzyć wskaźniki alfa- różnorodności, beta- różnorodności oraz wykorzystać metodę ANCOM.

Wyniki

W kontekście alfa- różnorodności nie uzyskano istotności statystycznej ($p > 0.05$). Jednak w aspekcie beta- różnorodności w wykonanej analizie różnice istotnie statystycznie otrzymano we wszystkich 4 metrykach. W wykonanej analizie uzyskano istotność statystyczną w metrykach Jaccard ($p = 0.001$), Bray-Curtis ($p = 0.001$), Unweighted-unifrac ($p = 0.011$),

Weighted-unifrac ($p=0.029$). Dodatkowo za pomocą metody ANCOM wykazano różnice względne wśród bakterii zaliczanych do rodzin:

-Peptostreptococcaceae ($p<0.016$)

-Lachnospiraceae ($p<0.016$)

-Staphylococcaceae ($p <0.012$)

Najwyżej w taksonomii za pomocą analizy ANCOM uzyskano informację na temat różnic w taksonach zaliczanych do rodzaju: Lachnospiraceae UCG-008 ($p \ll 0.001$), Erysipelotrichaceae UCG-003 ($p<0.0015$) oraz Anaerostipes ($p<<0.001$). W zaprezentowanej analizie wykazano różnice w obfitości względnej wśród bakterii uczestniczących w metabolizmie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych

11. Summary

Introduction.

Recently, there have been a large number of reports on the intestinal microbiota in the pathogenesis of obesity and diabetes and, among others, the impact on the development of colorectal cancer or behavioral disorders. Today it is known fact that the human phenotype is not a simple sum of the genetic expression recorded in the human nuclear genome, because the overall picture is outlined at least to a significant degree by the metabolism of microorganisms inhabiting it. The human phenotype is therefore the resultant of the human genotype and the environment affecting it from all sides. According to various analyzes, there are over 3,000,000 different genes in the human intestine, in addition, the number of bacteria is about 10 times more cells than the entire body of a healthy adult human. In recent years, much attention has been paid to the analysis of the diversity of microbiomes present in the human digestive tract, emphasizing that the intestinal genome is in third place after the nuclear and maternally inherited (mitochondrial) genomes. Unfortunately, the exact role of the bacterial flora is still unknown. Implementation of a project that would describe the impact of microflora on the development of multiple myeloma would be a key role in filling the gap to determine gut role, and the presented study is the first such study conducted on the Polish population.

Aim of the work.

The main aim of my work was to study the microbiome in the population of Polish patients with newly diagnosed multiple myeloma (NDMM) in relation to the composition of the microbiome of healthy Poles.

The following questions were posed in the work:

1. Are there differences in the composition of the microbiome between the Polish population of NDMM patients and healthy people?
2. Can differences in the composition of the microbiome between NDMM patients and healthy people contribute to the development of the disease?
3. Are there differences in relative abundance between the study groups among bacteria involved in short-chain fatty acid metabolism?

An additional aim of the work was to bank information on the microbiome of people from the Polish population, with the possibility of using it for further analysis.

Material and Methods:

Samples from 39 people were collected for the study. The control group consisted of 20 healthy people who gave their stool samples for examination. The study group consisted of 19 people diagnosed with multiple myeloma before hematological treatment.

In the present study, the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene was sequenced to profile the microbial community. Properly isolated DNA was the basis for the preparation of the NGS sequencing library (Next Generation Sequencing). The preparation of the libraries for sequencing involved two main steps. In the first stage, sets of amplicons of the hypervariable regions of the 16S rRNA gene were prepared, in the presented study they were V3-V4 and V7-V9 regions, these regions allow the identification of bacteria and archaea. The amplified fragments were then purified on magnetic beads.

Then, after proper preparation of the material, the samples were sequenced.

Paired-end sequencing (2x276) of the 10 pM DNA library was performed on a MiSeq sequencer (Illumina) using the MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles-600 cycles) (Illumina), yielding data in

FASTQ format (FASTQ format). Bioinformatics analysis of microbiomes was carried out using the QIIME2 2021.8 program

The analysis performed in the study was carried out by combining the V3-V4 regions (V3-V4 regions) with V7-V9 (V7-V9 regions) using the SMURF method in the q2-side implementation (q2-side implementation). In the bioinformatics analysis, it was decided to measure alpha-diversity and beta-diversity and use the ANCOM method

Results

In the context of alpha-diversity, no statistical significance was obtained ($p > 0.05$). However, in the aspect of beta-diversity in the analysis, statistically significant differences were obtained in all 4 metrics. In the performed analysis, statistical significance was obtained in the Jaccard ($p = 0.001$), Bray-Curtis ($p = 0.001$), Unweighted-unifrac ($p = 0.011$), Weighted-unifrac ($p = 0.029$) metrics. In addition, the ANCOM method showed differences in relative abundance among bacteria belonging to the following families:

-Peptostreptococcaceae ($p < 0.016$)

-Lachnospiraceae ($p < 0.016$)

-Staphylococcaceae ($p < 0.012$)

The highest in the taxonomy, the ANCOM analysis obtained information on the differences in the taxa included in the genus: Lachnospiraceae UCG-008 ($p \ll 0.001$), Erysipelotrichaceae UCG-003 ($p < 0.0015$) and Anaerostipes ($p \ll 0.001$). The presented analysis showed differences in relative abundance among bacteria involved in the metabolism of short-chain fatty acids.