

Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**„Rola mikrobioty jelitowej
u chorych na szpiczaka plazmocytozowego”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Lek Michał Bator

Promotor: prof. dr hab. Lidia Usnarska-Zubkiewicz

Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor: Prof dr hab. Marcin Nowak

Katedra Patologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Wrocław, 2023

Recenzenci

Prof. dr hab. n. med. Artur Jurczyszyn

Kierownik Ośrodka Leczenia Dyskrazji Plazmocytowych,
Katedra Hematologii UJ CM w Krakowie.

Prof. dr hab. n. med. Bogusław Machaliński,

Rektor Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie,
Kierownik Katedry Fizjopatologii i Zakładu Patologii Ogólnej Pomorskiego Uniwersytetu
Medycznego w Szczecinie, Ordynator Oddziału Transplantacji Szpiku Kliniki Hematologii i
Transplantologii SPSK1.

Prof. dr hab. n. med. Piotr Rzepecki

Kierownik Kliniki Chorób Wewnętrznych i Hematologii
Wojskowy Instytut Medyczny-Państwowy Instytut Badawczy
W Warszawie

Podziękowania

*Promotorowi, Pani Profesor dr hab. Lidii Usnarskiej-Zubkiewicz
za inspirację do pracy, opiekę merytoryczną od czasów realizacji studiów
w ramach Indywidualnego Toku Studiów, a przede wszystkim
doskonałego przykładu Lekarza klinicysty oraz rzetelnego Naukowca.*

*Promotorowi, Panu Profesorowi dr hab. Marcinowi Nowakowi,
za pomoc w części laboratoryjnej badania,
poświęcony czas i cenne wskazówki .*

*Kierownikowi Kliniki Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku
Panu Profesorowi dr hab. Tomaszowi Wróblowi
za szansę realizacji trudnego projektu badawczego,
cenne uwagi oraz umożliwienie indywidualnego rozwoju naukowego*

*Panu Profesorowi dr hab. Łukaszowi Łaczmańskiemu
za pomoc w części laboratoryjnej badań*

*Pani Doktor Annie Zubkiewicz-Zarębskiej
za cenne wskazówki w części teoretycznej badania i poświęcony czas*

*Pani Magister Paulinie Żebrowskiej
za pomoc w analizie wyników sekwencjonowania i analizie statystycznej*

Dedycja

*Dla Mamy Krystyny
Za wsparcie i wychowanie*

1. Spis treści

1. Spis treści

5

2.	Alfabetyczny wykaz skrótów używanych w tekście	8-11
3.	Wstęp	
3.1	Definicja i uwarunkowania genetyczne rozwoju choroby	12
3.2	Historia odkrycia choroby, pierwsze opisy pacjentów, wybrane badania będące podstawą do nowoczesnych terapii.	13
3.3	Epidemiologia szpiczaka plazmocytozowego.	14- 15
3.4	Kryteria diagnostyczne szpiczaka plazmocytozowego i innych gammopatii monoklonalnych	15- 17
3.4.1	Monoklonalna gammopatia o nieokreślonym znaczeniu (Monoclonal Gammopathy of undetermined significance, MGUS)	18
3.4.2	Szpiczak asymptotyczny	18
3.4.3	Szpiczak plazmocytozowy, objawy choroby	18- 20
3.4.4	Ocena zaawansowania choroby, Systemy prognozowania	20- 21
3.4.5	Ocena odpowiedzi na leczenie	22- 23
3.4.6	Podstawowe zasady leczenia szpiczaka plazmocytozowego	23- 24
3.5.	Mikrobiom	
3.5.1	Rys historyczny	25
3.5.2	Wpływ mikrobiomu na zdrowie i choroby człowieka ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych	26- 27
3.5.3	Zmiany składu mikrobioty a wiek człowieka	27- 28
3.5.4	Rola mikrobioty jelitowej w patogenezie chorób	28- 32
3.5.5	Badania nad mikrobiomem	32- 33

3.5.6	Nowe Techniki laboratoryjne w analizie mikrobiomu. Szczególna rola Sekwencjonowania Nowej Generacji (NGS).	33- 34
4.	Cel Pracy	35
5.	Pacjenci, materiał chorych i metody	
5.1.	Charakterystyka badanych grup	36- 37
5.2	Materiał Badań	37
5.3	Metoda Badania	38
5.3.1	Analiza laboratoryjna : sekwencjonowanie genu 16S rybosomalnego RNA	37- 38
5.3.2	Analiza bioinformatyczna mikrobiomów	38- 40
6.	Wyniki badań	
6.1	Charakterystyka badanej grupy	41
6.2	Analiza mikrobiomu w aspekcie beta- różnorodności	42- 47
6.3	Analiza mikrobiomu w aspekcie alfa – różnorodności	48- 50
6.4	Badanie mikrobiomu w oparciu o analizę ANCOM	51- 63
7.	Omówienie wyników i dyskusja.	64- 75
7.1	Różnice mikrobiomu pomiędzy osobami chorymi na NDMM a zdrowymi oceniane w oparciu o beta-różnorodność i ich możliwe znaczenie kliniczne	65- 66
7.1.1	Rodzina Peptostreptococcaceae	66- 67
7.1.2	Rodzina Lachnospiraceae.	67- 68
7.1.3	Rodzina Staphylococcaceae,	68- 69

7.1.4	Rodzaj Lachnospiraceae UCG-008	69- 70
7.1.5	Rodzaj Erysipelotrichaceae UCG-003	70- 71
7.1.6	Rodzaj Anaerostipes.	72- 73
7.2	Inne rodziny bakterii - na granicy istotności statystycznej	74
7.2.1	Rodzina Alcaligenaceae	74
7.2.2	Rodzina Ruminococcaceae	74- 75
7.2.3	Rodzina Streptococcaceae	75
8.	Podsumowanie	76- 77
9.	Wnioski i spostrzeżenia	78
10.	Streszczenie	79- 81
11.	Summary	81- 83
12.	Bibliografia	84- 100
13.	Wykaz tabel, rycin i rysunków	
13.1.	Wykaz tabel	101
13.2.	Wykaz rycin	102- 103
14.	Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badania	104

2. Alfabetyczny wykaz skrótów używanych w tekście

Abundance – obfitość

Alfa- diversity - różnorodność alfa

Allo-HSCT - allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych

ANCOM- Analysis of Compositions of Microbiome, Analiza Składu Mikrobiomu, narzędzie wykorzystywane w bioinformatyce do ustalania składu mikrobiomu

ASV - Amplicon Sequence Variant, Wariant Sekwencji Amplikonu

auto- HSCT - autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation, autologiczna transplantacja komórek krwiotwórczych

BCR (B-cell receptor) – receptor komórek B

Beta-diversity - różnorodność beta

Bray-Curtis dissimilarity - odmienność Braya-Curtisa

CAR-T (chimeric antigen receptors T-cells) – metoda leczenia genetycznie zmodyfikowanymi limfocytami T

Chimera filtering - Filtrowanie chimeric

Class - Klasa

Control - grupa kontrolna

COPD - Chronic Obstructive Pulmonary Disease, przewlekła obturacyjna choroba płuc

CR (complete response) – całkowita odpowiedź (na leczenie)

CRAB- akronim uszkodzenia narządowego, C-hiperkalcemia, R- uszkodzenie nerek, A- anemia, B- uszkodzenie kości

Denoising - Odszumianie

DNA - deoxyribonucleic acid, Kwas deoksyrybonukleinowy

DR - Diabetic Retinopathy, retinopatia cukrzycowa

FISH- Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

GALT - Gut-Associated Lymphoid Tissue, całość tkanki limfatycznej występującej w obrębie przewodu pokarmowego

GVHD- Graft-Versus-Host Disease, Choroba przeszczep przeciw gospodarzowi

HBV - Wirus zapalenia wątroby typu B

HBC- Wirus zapalenia wątroby typu C

HCC - Hepatocellular Carcinoma, Rak wątrobowokórkowy

HMP - Human Microbiome Project, Projekt Ludzkiego Mikrobiomu

IL – interleukina

Ig- Immunoglobulina

i.v. - dożylnie

IMWG - Międzynarodowa Grupa Robocza do spraw szpiczaka

ISS- Międzynarodowy Indeks Prognostyczny dla szpiczaka plazmocytozy

Jaccard distance - Odległość Jaccarda

KSHV - Wirus mięsaka Kaposiego

LDH (lactate dehydrogenase) – dehydrogenaza mleczanowa

Library preparation - przygotowanie biblioteki

MALT - Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, tkanka limfoidalna związana z błoną śluzową

MGCS- gammapatia monoklonalna o znaczeniu klinicznym

Matplotlib Libraries - Biblioteki Matplotlib

mIg – monoklonalna immunoglobulina

MGUS - Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu

MM - Multiple Myeloma, Szpiczak plazmocytozy

MRSA- Gronkowiec złocisty oporny na metycylinę

NAFLD - Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, niealkoholowa tłuszczeniowa choroba wątroby

NCBI - National Center for Biotechnology Information, Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej

NDMM - Newly Diagnosed Multiple Myeloma, Nowo rozpoznany szpiczak plazmocytowy

NGS - Next Generation Sequencing, Sekwencjonowanie Nowej Generacji

NIH - National Institutes of Health, Narodowy Instytut Zdrowia.

OF - Observed Features

Order - Rząd

OTU - Operational Taxonomic Units, operacyjne jednostki taksonomiczne

p-value -probability value; p-wartość, prawdopodobieństwo testowe

patient - próba badana

PCR- Polymerase Chain Reaction; Reakcja łańcuchowa polimerazy, łańcuchowa reakcja polimerazy

PD - Faith's Phylogenetic Diversity

PD-1 - Programmed Death Receptor 1, Receptor programowanej śmierci 1

PET CT- Pozytonowa Tomografia Emisyjna

Phylum – Typ

p.o. - doustnie

PR – Partial response, Odpowiedź częściowa

QIMME - Quantitative Insights Into Microbial Ecology, narzędzie bioinformatyczne przeznaczone do analizy społeczności drobnoustrojów

R-ISS- zmodyfikowany Międzynarodowy Indeks prognostyczny dla szpiczaka plazmocytoowego

Read - Odczyt

Region V3-V4 - hypervariable region V3-V4 of 16S rRNA gene, Hiperzmiennie regiony genu 16S rRNA

Region V7-V9 - hypervariable region V3-V4 of 16S rRNA gene, Hiperzmiennie regiony genu 16S rRNA

relative abundance - Obfitość względna

RNA- ribonucleic acid, Kwas rybonukleinowy

rRNA - Ribosomal RNA; rybosomalny, rybosomowy RNA

SCD - sickle cell disease; Niedokrwistość sierpowata, anemia sierpowata

SCFA - Short-Chain Fatty Acids, krótko łańcuchowe kwasy tłuszczowe

SD (stable disease) – stabilizacja choroby

Seaborn libraries - Biblioteki Seaborn

SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) – program amerykańskiego National Cancer Institute (Narodowego Instytutu Nowotworów) mający na celu zbieranie danych dotyczących diagnozy, leczenia i przeżycia chorych na nowotwory

sCR - rygorystyczna odpowiedź całkowita

sFLC- wolne łańcuchy lekkie w surowicy

SMM- szpiczak plazmocytowy tłący się

TK – badanie tomografii komputerowej

TNF (tumor necrosis factor) – czynnik martwicy guza

Trimming – Przycinanie

POEMS - Akronim określa współwystępowanie polineuropatii, organomegalii, endokrynopatii, gammapatii monoklonalnej oraz zmian skórnych

VGPR- Bardzo dobra odpowiedź częściowa

WBLDCT - niskodawkowa tomografia komputerowa całego ciała

Wykres PcoA - Principal Coordinates Analysis

3. Wstęp

3.1 Definicja i uwarunkowania genetyczne rozwoju choroby

Szpiczak mnogi (MM, ang. multiple myeloma, łac. myeloma multiplex) należy do gammopatii monoklonalnych, jest chorobą ogólnoustrojową wywołaną klonalnym rozrostem limfocytów B i plazmocytów. Są to komórki cytokinetycznie czynne, których geny uległy rekombinacji lub somatycznej hipermutacji. Idiotypowa rearanżacja genu immunoglobuliny poprzedza złośliwą transformację komórki prekursorowej plazmocyta. Gdy powstający klon komórkowy osiągnie wielkość co najmniej 5×10^9 komórek, jego produkt - immunoglobulina monoklonalna (mIg), określana również jako białko monoklonalne (białko M) staje się widoczny w postaci ostrego piku w elektroforezie białek. Złośliwe plazmocyty produkują immunoglobulinę tylko jednej klasy i jednego typu np. tylko IgG kappa lub tylko IgA lambda, czyli u chorego na szpiczaka cząsteczka mIg zbudowana jest z łańcuchów ciężkich tej samej klasy (np. tylko IgG) i łańcuchów lekkich tego samego rodzaju (np. tylko kappa). Niekiedy złośliwe plazmocyty tracą zdolność do produkowania pełnej cząsteczki Ig, co oznacza ekspedycje poza komórkę wyłącznie łańcuchów lekkich tego samego rodzaju lub, bardzo rzadko wyłącznie łańcuchów ciężkich tego samego typu.

Zmiany strukturalne i liczbowe chromosomów stwierdza się u większości chorych na MM. Zmiany liczbowe chromosomów najczęściej występują pod postacią trisomii 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21, lub ubytku chromosomu 13, 17, X i Y [1].

Translokacja obejmująca locus genu dla łańcucha ciężkiego $t(11;14)(q13;q32)$ oraz translokacja $t(14;20)(q32;q11)$ są uznanymi czynnikami złego rokowania. Delecja p53 (17p13.1) jest łączona z agresywnym przebiegiem choroby i występowaniem białaczki plazmocytovej [2].

Aberracje chromosomalne występują u 20 - 60% pacjentów z nowo rozpoznany MM i u 60 - 70% chorych z progresją choroby.

3.2. Historia odkrycia choroby, pierwsze opisy pacjentów, wybrane badania będące podstawą do nowoczesnych terapii.

W nawiązaniu do historii odkrycia szpiczaka plazmocytozy warto wspomnieć o pierwszym, udokumentowanym przypadku opisu choroby. Pierwszego opisu dokonał w 1844 roku Solly, a dotyczył on 39-letniej kobiety, Sary Newbury, pacjentka ta doświadczała uczucia zmęczenia oraz występowania uogólnionego bólu kości, wraz z występowaniem wielu złamań [3]. Wówczas zaproponowano pacjentce w leczeniu rabarbar oraz skórkę pomarańczową. Inny przypadek szpiczaka plazmocytozy, opisany w 1845 roku przez McIntyre'a dotyczył 45-letniego mężczyzny, kupca o imieniu Thomas Alexander McBean.

Warto jednak wspomnieć, że w październiku 1845 doszło do badania McBeana przez Doktora McIntyre'a, pobrano mocz pacjenta i zdecydowano o przesłaniu do szpitala, gdzie pracował znany patolog- Henry Bence Jones [4]. Pobrany mocz od McBeana poddano dokładnej analizie, wówczas Jones doszedł do wniosku, że znajduje się w nim patologiczne białko, które nazwano "uwodnionym dwutlenkiem albuminy", natomiast nazwa "białko Bence'a- Jonesa" została po raz pierwszy zastosowana w roku 1880 [5].

Warto również wspomnieć, że w 1873 roku została wprowadzona nazwa „szpiczak mnogi” przez Rustizky’ego [6]. W literaturze można spotkać się również z inną często stosowaną nazwą „choroba Kahlera”, odnoszącą się do Ottona Kahlera, austriackiego lekarza, który jako jeden z pierwszych dokonał opisów symptomatologii szpiczaka plazmocytozy. Do powszechnej nomenklatury określenie „komórki plazmatyczne” wprowadził w 1875 roku Heinrich Wilhelm Waldeyer.

Jednak zostały one prawdopodobnie opisane w 1890r przez hiszpańskiego pioniera neurobiologii - Santiago Ramon’y Cajal’a, ponieważ Waldeyer poczynił opis komórek tucznych, nie zaś plazmocytozy.

Nazwa "białko Bence'a- Jonesa" została po raz pierwszy zastosowana w roku 1880 przez Fleischer'a. Jednak dopiero w 1956 roku Korngold i Lipari zidentyfikowali różne klasy białek Beance'a- Jonesa. To właśnie od ich nazwisk łańcuchy lekkie immunoglobulin przybrały nazwy kappa i lambda [4,7]. W hołdzie dla ich odkrycia postanowiono upamiętnić dwie klasy białek Bence-Jonesa przy użyciu pierwszych liter nazwisk Korngold („kappa”) i Lipari („lambda”).

3.3. Epidemiologia szpiczaka plazmocytoowego.

W ostatnich latach obserwuje się wzrastającą liczbę rozpoznań nowych chorych na szpiczaka plazmocytoowego w związku ze starzeniem się społeczeństwa, zwiększeniem świadomości wśród lekarzy różnych specjalności oraz dostępem do nowoczesnych metod diagnostyki. Według przeglądu literatury MM stanowi około 1% wśród rozpoznań nowotworów u dorosłych oraz 10% spośród rozpoznań hematologicznych. Mediana wieku w chwili rozpoznania według różnych źródeł wynosi około 65-69 lat. Z danych SEER (The Surveillance, Epidemiology, and End Results - SEER) z lat 2016-2020 wynika, że odsetek nowych zachorowań według grup wiekowych wynosi:

w grupie wiekowej 20-34 lata: 0.4%, w grupie wiekowej 35-44: 2.7%, w grupie wiekowej 45-54: 9.7%, w grupie wiekowej 55-64: 22.7%, w grupie wiekowej 65-74: 31.9%, w grupie wiekowej 75-84: 23.8% oraz powyżej 84: 8.8%. Dodatkowo mediana wieku w chwili śmierci wynosi około 75 lat. Ryzyko zachorowania na nowotwór przed 30 rokiem życia jest niskie, a poniżej 18 roku życia opisywane są pojedyncze przypadki [8].

Według „Cancer Statistics, 2022” American Cancer Society, szacuje się, że w roku 2022 w Stanach Zjednoczonych zdiagnozowano 34 920 nowych chorych na szpiczaka plazmocytoowego, równocześnie w porównaniu do wyżej przedstawionych statystyk, stwierdza się, że liczba ta jest większa niż w 2021 roku.

Równocześnie American Cancer Society's estymuje liczbę zgonów w 2023 roku na około 12 590, z czego oczekiwana liczba zgonów wyniesie: 7000 w grupie mężczyzn i 5 590 w grupie kobiet. Szacuje się, że najwięcej nowych zachorowań będzie obserwowanych w Stanie Floryda, jednak największa liczba zgonów szacowana jest dla Stanu Kalifornia. Według szacowanej liczby nowych zachorowań w Stanach Zjednoczonych, MM plasuje się na 14 miejscu. Porównując do statystyk z lat 2015-2019 ryzyko zachorowania na szpiczaka plazmocytoowego w grupie mężczyzn wynosiło 8.6 / 100 000 osób i w grupie kobiet wynosiło 5.7 / 100 000 osób.

Biorąc pod uwagę dane pochodzące z rejestru amerykańskiego można zauważyć różnice etniczne w liczbie nowych zachorowań. Największe ryzyko rozwinięcia się szpiczaka plazmocytoowego występuje u osób czarnoskórych nie-latynosów, natomiast najmniejsze ryzyko wykazują osoby pochodzących z Azji. Równocześnie największa śmiertelność notowana była u osób czarnoskórych nie-latynosów, wynosiła ona 5.9/100 000 osób, a najmniejsza wśród mieszkańców Azji 1.5/ 100 000 osób. Dane te zwracają uwagę na fakt, że przynależność do różnych grup etnicznych, a więc równocześnie nabywanie i powielanie

pewnych charakterystycznych wzorców zachowań, również kulinarnych, może wpływać na gotowość pronowotworową, w tym rozwój MM.

Globalnie częstość występowania szpiczaka plazmocytoowego różni się w zależności od regionu, przy czym najwyższe wskaźniki obserwowane są w Australii, Nowej Zelandii, Ameryce Północnej i Europie Zachodniej, a najniższe w Azji [9]. Obecnie szacowany współczynnik zapadalności, wynoszący 7,0/100 000, oznacza wzrost o 143% w stosunku do roku 1975 r., kiedy zapadalność wynosiła 4,9/100 000. Rozwój wiedzy na temat patogenezы i stosowanie nowych ukierunkowanych molekularnie skutecznych leków znacząco zmienił rokowanie pacjentów. Aktualnie 5-letni względny wskaźnik przeżycia chorych na szpiczaka plazmocytoowego poprawił się w czasie, z 25,0% dla pacjentów zdiagnozowanych w latach 1975-1977 do 53,9% dla pacjentów zdiagnozowanych w latach 2009-2015 [8]. Ponadto dane pochodzące z National Cancer Institute dotyczące lat 2013-2019 ujawniają względne 5-letnie przeżycie sięgające 59.8%.

Badania przeprowadzone w Chinach wykazały, że częstość zachorowań na szpiczaka mnogiego zwiększała się w ciągu ostatniej dekady, szczególnie w obszarach miejskich i wśród mężczyzn. Częstość występowania szpiczaka plazmocytoowego w Chinach znacznie wzrosła w latach 2006-2016, a standaryzowany według wieku współczynnik zachorowalności w 2016 roku wynosił 1.03/ 100 000 osób [10].

W Polsce, w oparciu o dane pochodzące z Krajowego Rejestru Nowotworów, liczba nowych zachorowań w roku 2019 wynosiła 1713 przypadków (808 pacjentów w grupie mężczyzn i 905 pacjentów w grupie kobiet). Oznacza to mniejsza częstość zachorowań w porównaniu z populacją europejską, lub, co jest bardzo prawdopodobne, niedoszacowanie rejestru polskiego. Według danych z 2019 roku w Polsce, szpiczak plazmocytoowy odpowiadał za 683 zgony w grupie mężczyzn i 727 zgonów w grupie kobiet [11].

3.4. Kryteria diagnostyczne szpiczaka plazmocytoowego i innych gammapatii monoklonalnych

W 2014 roku Międzynarodowa Grupa Robocza Szpiczaka zaproponowała nowy podział dyskrazji plazmocytoowych [12].

Wyróżniono:

1. Monoklonalną gammapatię o nieokreślonym znaczeniu (MGUS), stan, który u części chorych może poprzedzać rozwój szpiczaka plazmocytoowego.

2. Szpiczaka asymptotycznego, będącego stanem pośrednim pomiędzy MGUS a szpiczakiem plazmocytowym.
3. Szpiczaka plazmocytoowego, postać choroby w której stwierdza się przynajmniej jeden z objawów uszkodzenia narządów lub tkanek, lub jeden biomarker choroby (cechy CRAB SLiM).

Kryteria rozpoznania MGUS, szpiczaka asymptotycznego i szpiczaka objawowego oraz cechy CRAB SLiM przedstawiono w tabeli 1,

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne MGUS, szpiczaka asymptotycznego, szpiczaka objawowego cechy CRAB SLiM (wg. IMWG, Rajkumar 2014) [12].

	Definicja
Szpiczak plazmocytowy	<p>Obecność klonalnych plazmocytów w szpiku >10%, lub guz szpiczakowy w biopsji kości lub zewnątrzszpikowy oraz</p> <p>jedno lub więcej zdarzeń zależnych od szpiczaka</p> <p><u>Zdarzenia zależne od szpiczaka</u></p> <p>a. Uszkodzenie organów zależne od proliferacji plazmocytów</p> <p>(CRAB):</p> <ul style="list-style-type: none"> • C – (Calcium) Hiperkalcemia: Ca w surowicy >0.25mmol/l (>1mg/dl) powyżej prawidłowej wartości, lub > 2.75mmol/l (11mg/dl) • R- (Renal function) Niewydolność nerek: klirens kreatyniny <40ml/min lub kreatynina w surowicy > 177umol/l (>2mg/dl) • A - Anemia: Hb>2mg% poniżej dolnej granicy, lub Hb < 10g/dl • B -(Bone lesion)Uszkodzenie kości; jedno lub więcej ognisk osteolitycznych w rtg, CT, lub PET-CT <p>b. Jeden lub więcej biomarkerów rozrostu (SLiM):</p> <ul style="list-style-type: none"> • S (Sixty) Odsetek klonalnych plazmocytów >60% • Li (Light Chains) stosunek stężenia klonalnych do nieklonalnych łańcuchów lekkich kappa/lambda ≥ 100 • M Magnetic Resonance:> 1 ogniska osteolizy w badaniu kośćca metodą MRI (Whole body STIR) o wymiarze co najmniej 5mm każdy
Szpiczak tłący się (asymptotyczny)	Obydwa kryteria muszą być spełnione:

)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Białko monoklonalne w surowicy (IgG lub IgA) $\geq 30\text{g/l}$, lub białko monoklonalne w moczu $\geq 500\text{mg}/24$ godz. i/lub klonalne plazmocyty w szpiku 10-60% 2. Brak uszkodzenia narządów lub tkanek zależnych od szpiczaka, nieobecna amyloidoza.
MGUS nie IgM	<ol style="list-style-type: none"> 1. Białko monoklonalne w surowicy (nie-IgM) $< 30\text{g/l}$ 2. Klonalne plazmocyty w szpiku $< 10\%$ 3. Nieobecność zależnych od szpiczaka objawów uszkodzenia organów takich jak: hiperkalcemia, niewydolność nerek, anemia, ogniska osteolizy (CRAB) lub amyloidozy, która może być atrybutem choroby rozrostowej plazmocytów.
MGUS IgM	<ol style="list-style-type: none"> 1. Białko monoklonalne IgM w surowicy $< 30\text{g/l}$ 2. Naciek limfo plazmocytów w szpiku $< 10\%$ 3. Brak anemii, brak objawów zespołu nadlepkkości, brak powiększenia węzłów, hepatosplanomegalii, lub uszkodzenia organów zależnego od choroby limfoproliferacyjnej.
MGUS łańcuchów lekkich	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nieprawidłowy wskaźnik kappa/lambda (< 0.26 lub > 1.65) 2. Zwiększenie stężenia jednej klasy łańcuchów lekkich: sFLC kappa u chorych ze wskaźnikiem > 1.65 lub zwiększenie sFLC lambda u chorych ze wskaźnikiem < 0.26 3. Nieobecność łańcuchów ciężkich w immunofiksacji 4. Nieobecność zależnych od szpiczaka objawów uszkodzenia organów takich jak: hiperkalcemia, niewydolność nerek, anemia, ogniska osteolizy (CRAB) lub amyloidozy, która może być atrybutem choroby rozrostowej plazmocytów. 5. Klonalne plazmocyty w szpiku $< 10\%$ 6. Białko monoklonalne w moczu $< 500\text{mg}/24$ godz.

Wyróżniono inne nowotwory powstałe w wyniku rozrostu klonalnych plazmocytów lub ich złośliwych prekursorów w tym;

1. Izolowany guz plazmatyczno komórkowy zlokalizowany w kości lub w tkankach miękkich
2. Choroby powstałe w wyniku odkładania się patologicznych immunoglobulin w tkankach: amyloidoza, zespół POEMS, choroba depozytowa łańcuchów lekkich

3.4.1.. Monoklonalna gammopatia o nieokreślonym znaczeniu (Monoclonal Gammopathy of undetermined significance, MGUS)

Gammopatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (MGUS) charakteryzuje się obecnością mIg, bez objawów wynikających z uszkadzającego działania na narządy lub tkanki. Liczba klonalnych plazmocytołów i stężenie mIg nie zmieniają się przez wiele lat. Szacuje się, że u 2% pacjentów z MGUS rocznie rozwija się szpiczak plazmocytołowy, makroglobulinemia Waldenströma, przewlekła białaczka limfocytołowa, chłoniak złośliwy lub amyloidoza. W MGUS występują podobne nieprzypadkowe aberracje genetyczne jak w szpiczaku plazmocytołowym.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na osoby, u których stwierdzano obecność mIg i byli rozpoznawani jako MGUS, ale jednocześnie występowało u nich uszkodzenie nerek, nerwów obwodowych, skóry, lub innych narządów spowodowane przez mIg. Zaburzenia te nie spełniały kryteriów szpiczaka tłęcego (SMM) lub szpiczaka plazmocytołowego (MM), a chorzy ci byli początkowo określani jako MGUS-like. W 2018 roku dla tej grupy pacjentów został wprowadzony termin „Gammopatia monoklonalna o znaczeniu klinicznym” (Monoclonal Gammopathy of Clinical Significance, MGCS) [13]. Uszkodzenia narządów w MGCS są spowodowane toksycznym działaniem mIg wytwarzanej przez, małe klony plazmocytołów. Oznacza to, że termin MGUS odnosi się do tych chorych, u których nie można wykazać korelacji pomiędzy mIg a uszkodzeniem narządów lub tkanek. Termin MGCS natomiast ma zastosowanie dla pacjentów, u których białko monoklonalne powoduje uszkodzenie zwłaszcza nerek, skóry i układu nerwowego.

3.4.2.. Szpiczak asymptomatyczny

W tej postaci choroby klon nowotworowych plazmocytołów stanowi co najmniej 10% komórek szpiku, obecne jest białko monoklonalne mIgG \geq 3g/dl w surowicy, ale nie występują objawy choroby CRAB SLIM.

3.4.3.Szpiczak plazmocytołowy, objawy choroby

Do klasycznej triady objawów szpiczaka plazmocytołowego zalicza się: a) rozrost klonalnych plazmocytołów w szpiku, b) obecność monoklonalnej immunoglobuliny w surowicy

i/lub w moczu, c) ogniska osteolizy powstające w wyniku pobudzenia osteoklastów przez cytokiny wydzielane przez plazmocyty i komórki podścieliska.

Plazmocyty i/lub plazmoblasty mogą stanowić od 10 do 95% komórek jądrzastych szpiku. W wyniku nacieczenia przez komórki klonalne, wyparci ulegają inne linie krwiotwórcze, najwcześniej erytropoeza. Do wyparcia granulopoezy i trombocytopeny dochodzi zwykle w zaawansowanych stadiach choroby. Niedokrwistość stwierdza się u około 70% chorych ze świeżo rozpoznaną chorobą i u prawie 99% pacjentów w nawrocie choroby. W wyniku upośledzonej odporności swoistej i nieswoistej występują ciężkie, nawracające infekcje, które często są przyczyną zgonów chorych na szpiczaka.

Obecność białka monoklonalnego i uszkodzenia narządów i tkanek przez to białko jest zdefiniowane przez cechy CRAB. U 60% chorych występują szpiczaki IgG, u 20% IgA, bardzo rzadko występuje szpiczak IgD lub IgE. U 10% chorych złośliwe plazmocyty produkują jedynie łańcuchy lekkie (wariant Bence'a-Jonesa, tzw. Choroba lekkich łańcuchów). Wolne łańcuchy lekkie (sFLCs kappa lub lambda) powodują białkomocz, z powodu którego pacjent zgłasza się do lekarza, często nefrologa. U 1-5% chorych nie stwierdza się białka M w surowicy i w moczu. U części tych chorych mIg występuje w plazmocytach (płomieniocytach) (szpiczak prawdziwie niewydzielający). Stężenie prawidłowych Ig w surowicy jest zmniejszone (tzw immunopareza).

Łańcuchy lekkie, w zależności od posiadanej konstelacji aminokwasów wykazują różną nefrotoksyczność. Niewydolność nerek występuje u 20-25% chorych ze świeżym rozpoznaniem, 2-3% pacjentów wymaga leczenia nerkozastępczego, W szpiczaku nawrotowym/opornym nawet 50% chorych prezentuje dysfunkcję nerek. Uszkodzenie nerek u chorych na szpiczaka może wystąpić jako ostra lub przewlekła niewydolność, zespół nerczycowy, nie nerczycowa proteinuria lub dysfunkcja kanalików nerkowych.

Zmiany właściwości reologicznych krwi związane z obecnością dużych stężeń białka M prowadzą do wystąpienia zespołu nadlepkości, który najczęściej występuje w gammapatii IgM i IgA., (ze względu na budowę cząsteczki Ig). Kliniczne objawy zespołu nadlepkości mogą ujawnić się w postaci bólów, zawrotów głowy aż do terminalnej śpiączki paraproteinemicznej. Innymi objawami nadlepkości są zaburzenia widzenia aż do całkowitej utraty wzroku, krwawienia do siatkówki, krwawienia z nosa, błon śluzowych jamy ustnej, przewodu pokarmowego lub układu nerwowego, (mimo prawidłowej liczby płytek). Polineuropatia obwodowa najczęściej występuje u osób z białkiem IgM, które może

wykazywać aktywność anty MAG (Myelin Associated Glycoprotein) co prowadzi do degeneracji i demielinizacji aksonów.

Cytokiny, najczęściej Interleukina 8 i interleukina 1 β , powodują zwiększenie aktywności osteoklastów i resorpcji kości, hiperkalcemię i jednocześnie zahamowania odbudowy kości. Prowadzi to do powstania pojedynczych lub mnogich ogniska osteolizy, złamań patologicznych w tym złamań trzonów kręgowych. Ogniska osteolityczne obecne są najczęściej w zakresie kręgosłupa (49% chorych), w kościach miednicy – 34% osób, czaszki – 35%, żeber – 33%, kości ramieniowych – 22% i kości udowych – 13% . Tylko 10% chorych na świeżo rozpoznanego MM nie wykazuje zmian osteolitycznych w badaniach radiologicznych.

Hiperkalcemia, należy do cech CRAB, występuje u 30-40% chorych, i wiąże się z rozległymi zmianami kostnymi, Objawy hiperkalcemii mogą wystąpić nagle i szybko się nasilać. Chorzy skarżą się na jadłowstręt, nudności, wymioty, poliurię, polidypsji, zaparcia, zaburzenia świadomości, aż do śpiączki hiperkalcemicznej. Objawy hiperkalcemii mogą być maskowane przez hipoalbuminemię.

3.4.4. Ocena zaawansowania choroby, Systemy prognozowania

IMWG w wytycznych z 2019 roku zaleca u nowo zdiagnozowanych chorych badanie aberracji cytogenetycznych w szpiku przy pomocy FISH, ocenę zmian kostnych przy pomocy niskodawkowej tomografii komputerowej całego ciała (Whole Body Low Dose CT, WBLD CT) lub pozytonowej tomografii emisyjnej (PET CT) [14] . U chorych, którzy osiągnęli remisję całkowitą rekomenduje się ocenę minimalnej choroby resztkowej (Minimal Residual Disease, MRD) za pomocą cystometrii przepływowej nowej generacji (next generation flow cytometry) lub sekwencjonowania nowej generacji (NGS, Next Generation Sequencing) [15,16].

System prognozowania zalecany przez IMWG (International Staging System, ISS) został oparty o stężenie albuminy i β -2 mikroglobuliny i uaktualniony ze względu na stężenie LDH i obecność zmian cytogenetycznych wysokiego ryzyka (t(4;14), t(14;16), lub del(17p) (Zmodyfikowana międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna, Revised - ISS, R-ISS) [17].

Według międzynarodowej klasyfikacji prognostycznej (ISS International Staging System) wyróżnia się III stadia zaawansowania klinicznego szpiczaka plazmocytowego (tabl 2)

Tabl.2 Międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna szpiczaka plazmocytowego (International Staging System, ISS)

Stadium ISS	Kryterium
I stadium :	stężenie albuminy w surowicy >3,5g/dl + β -2m < 3,5mg/l
II stadium:	pośrednie pomiędzy I i III
III stadium:	β -2-m > 5,5mg/l

W zrewidowanym systemie prognostycznym do analizy włączono stężenie LDH i stopień ryzyka cytogenetycznego (tabl.2a) [17].

Tabela 2a. Zrewidowany system prognostyczny R-ISS (Revised International Staging System) [wg 17].

Stadium R-ISS	Kryteria
I stadium	ISS I, standardowe ryzyko cytogenetyczne, prawidłowe stężenie LDH
II stadium	Pośrednie pomiędzy I i III
III Stadium	ISS III i wysokie ryzyko cytogenetyczne lub wysokie stężenie LDH

3.4.5. Ocena odpowiedzi na leczenie

W 2016r IMWG przedstawiła kryteria oceny odpowiedzi na leczenie u chorych na MM [18]. Definicje odpowiedzi na leczenie wg zaleceń IMWG przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Definicje odpowiedzi na leczenie wg ujednoczonych kryteriów IMWG [18]

<p>Postępująca choroba (progressive disease, P)</p> <p>25% zwiększenie stężenia białka M w surowicy (bezwzględny wzrost $\geq 0,5$ g / dl) i / lub białka M w moczu (bezwzględny wzrost ≥ 200 mg / 24 godz.) Od najniższej wartości odpowiedzi</p>
<p>Stabilna choroba (stable disease, SD)</p> <p>niespełniająca kryteriów sCR, CR, VGPR, PR, MR lub PD</p>
<p>Odpowiedź minimalna (minimal response, MR)</p> <p>:25–49% redukcja białka M w surowicy, 50–89% redukcja białka M w moczu po 24 godzinach, 25–49% redukcja wielkości plazmocytozy tkanek miękkich, jeśli były obecne na początku badania</p>
<p>Odpowiedź częściowa (partial response, PR)</p> <p>$\geq 50\%$ zmniejszenie stężenia białka M w surowicy, $\geq 90\%$ zmniejszenie stężenia białka M w moczu w ciągu 24 godzin (lub do < 200 mg / 24 godziny), $\geq 50\%$ zmniejszenie wielkości guzów plazmocytozy tkanek miękkich, jeśli są obecne na początku badania Jeśli jest niemierzalne białko M: $\geq 50\%$ zmniejszenie różnicy między zaangażowanymi i niezaangażowanymi stężeniami FLC lub, jeśli FLC również nie jest mierzalne, $\geq 50\%$ zmniejszenie liczby plazmocytozy w BM, pod warunkiem, że wyjściowy odsetek komórek plazmatycznych BM wynosił $\geq 30\%$</p>
<p>Bardzo dobra odpowiedź częściowa (very good partial response, VGPR)</p> <p>białko M w surowicy i moczu wykrywalne metodą immunofiksacji, ale nie w czasie elektroforezy lub $\geq 90\%$ zmniejszenie stężenia białka M w surowicy przy białku M w moczu < 100 mg / 24 godz.</p>
<p>Odpowiedź całkowita (complete response, CR)</p> <p>Ujemna immunofiksacja surowicy i moczu, zanik guzów plazmocytozy tkanek miękkich, $< 5\%$ komórek plazmatycznych w BM</p>

Rygorystyczna odpowiedź całkowita (stringent complete response, sCR)

Odpowiedź CR plus prawidłowy stosunek FLC i nieobecność klonalnych komórek plazmatycznych potwierdzona w badaniu immunohistochemicznym lub w 2- do 4-kolorowej cytometrii przepływowej.

Immunofenotypowa CR

Odpowiedź sCR z nieobecnością fenotypowo odmiennych klonalnych komórek plazmatycznych w BM z co najmniej 1 milionem komórek BM analizowanych \geq 4-kolorową wieloparametrową cytometrią przepływową.

Molekularna CR

Odpowiedź CR oraz ujemny wynik reakcji łańcuchowej polimerazy z użyciem oligonukleotydów swoistych dla poszczególnych alleli; czułość 10^{-5} .

Legenda: BM bone marrow, FLC free light chain

3.4.6. Podstawowe zasady leczenia szpiczaka plazmocytowego

Leczenie chorych na MM obejmuje terapię przeciwnowotworową (chemioterapia i mega chemioterapia, wspomagana przeszczepianiem komórek macierzystych) oraz leczenie objawowe. Wybór opcji terapeutycznej zależy od wieku chorego i możliwości przeprowadzenia mega chemioterapii i przeszczepienia komórek macierzystych. Pod uwagę należy wziąć również preferencje pacjenta. Zasadniczym celem leczenia jest uzyskanie remisji choroby. Odpowiedź terapeutyczna może spełniać kryteria remisji molekularnej, rygorystycznej remisji całkowitej, remisji całkowitej, bardzo dobrej remisji częściowej i remisji częściowej

Do leczenia indukującego remisję choroby są kierowani chorzy, u których występuje przynajmniej jeden objaw CRAB SLIM. Osoby poniżej 70 roku życia, bez istotnych chorób współistniejących, którzy osiągnęli remisję mogą być poddani megachemioterapii wspomaganej autologicznym przeszczepieniem komórek krwiotwórczych. W tej grupie chorych zaleca się leczenie oparte na przeciwciałach przeciw CD 38 (daratumumab), inhibitorach proteasomu (np. bortezomibie), lekach immunomodulujących (talidomid, lenalidomid) i dużych dawkach glikokortykosteroidów.

U chorych nie zakwalifikowanych do megachemioterapii, oprócz wymienionych leków można zastosować leki alkilujące np. melfalan. W przypadku nietolerancji bortezomibu, w obu grupach pacjentów stosuje się cyklofosfamid, talidomid i deksametazon.

U pacjentów, którzy osiągnęli remisję choroby rekomendowane jest leczenie podtrzymujące, w celu jak najdłuższego utrzymania remisji. Jest to leczenie stosowane przewlekłe o małej intensywności np. z zastosowaniem lenalidomidu.

Chorym na szpiczaka opornego lub ze wznową w pierwszej kolejności proponuje się udział w badaniu klinicznym. Jeżeli remisja trwała powyżej 12 miesięcy można rozważyć powtórzenie leczenia indukującego, jeżeli remisja była krótka proponuje się zastosowanie leków nie stosowanych w pierwszej linii.

Aktualnie zatwierdzone leki stosowane w leczeniu chorych na MM przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Leki zatwierdzone do leczenia szpiczaka plazmocytowego

Leki immunomodulujące (IMiD)	talidomid (p.o), lenalidomid (p.o), pomalidomid (p.o)
Inhibitory proteasomu (PI)	bortezomib (s.c), karfilzomib (i.v) ixazomib (p.o)
przeciwciała monoklonalne	daratumumab (i.v, s.c) isatuximab (i.v), elotuzumab (i.v)
Inhibitor deacetylazy histonowej	panabinostat (p.o)
Inhibitor of exportin1 (XPO-1)	selinexor (p.o)
Leki alkilujące	cyklofosfamid (p.o, i.v), bendamustyna (i.v), melfalan (p.o, i.v),
Steroidy	deksametazon (p.o, i.v), prednizon (p.o)

3.5. Mikrobiom

3.5.1 Rys historyczny

W latach osiemdziesiątych XVII wieku, holender, Antoni van Leeuwenhoek, badał próbki śliny i kału pod mikroskopem opisując różne kształty i liczbę organizmów, natomiast nie nazywał ich jeszcze bakteriami. Leeuwenhoek podczas swoich badań sprawdzał wpływ różnych substancji, między innymi octu, na obserwowane próbki [19]. Również to Leeuwenhoek poczynił obserwację, że konsystencja kału zmienia się wraz ze zmianą diety, a obserwowane obiekty mają inne kształty [20]. To właśnie zapoczątkowało badania nad mikrobiomem. Podwalinami nowoczesnej wiedzy o mikrobiocie są badania Pasteura, Kocha czy Eschericha. Pasteur uważał, że niepatogenne mikroorganizmy mogą odgrywać ważną rolę w normalnej fizjologii człowieka, z kolei Escherich twierdził, że zrozumienie endogennej flory jest niezbędne do zrozumienia fizjologii trawienia oraz patologii i terapii chorób jelit [21].

W 1901 r. dr Metchinkoff z Instytutu Pasteura wygłosił w Manchesterze wykład dotyczący obecności i wpływu mikrobioty na procesy zachodzące w przewodzie pokarmowym. Metchinkoff zakładał, że bakterie bytujące w jamie ustnej sprzyjają procesom gojenia ran, natomiast mikrobiota jelitowa wpływa na procesy trawienia pokarmów [22]. W 1909 r. Kendall opublikował pracę dotyczącą znaczenia obecności bakterii w przewodzie pokarmowym, w której podkreślał ich różnorodność i dużą liczbę [23]. W latach 50. i 60. XX wieku postęp w mikrobiologii pozwolił na lepsze zrozumienie taksonomii mikrobioty jelitowej. Jednocześnie rozpoczęły się badania nad wpływem mikrobiomu, na rozwój chorób i ich leczenie, czy wreszcie jego wpływu na zdrowie psychiczne człowieka. W następnych latach badacze zaczęli poszukiwać między innymi roli bakterii jelitowych w trawieniu, metabolizmie i funkcjach odpornościowych organizmu, roli mikrobioty jelitowej w rozwoju czy progresji różnych typów nowotworów. Już w 1986 roku ukazała się publikacja Lindy Hegstrand i Roberta Hine w której wykazano wpływ mikrobiomu jelitowego na aktywność chemiczną mózgu (zaobserwowano różnicę w poziomie histaminy histaminy powzgórzowej pomiędzy myszami hodowanymi w sterylnych warunkach i konwencjonalnie) [24].

3.5.2. Wpływ mikrobiomu na zdrowie i choroby człowieka ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych

W ostatnich latach obserwuje się znaczące zwiększenie zainteresowania badaczy mikrobiomem. Zgodnie z danymi dostępnymi w bazie PubMed od początku XXI w. opublikowano około 120 tysięcy prac dotyczących mikrobiomu i jego wpływu na zdrowie i chorobę. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=microbiota>).

Mikrobiom składa się z różnych bakterii, archeonów, grzybów, pierwotniaków, a nawet wirusów. Co najmniej 800 różnych gatunków bakterii można wyizolować z jelit zdrowych ludzi [25]. Niedawno zidentyfikowano również pulę wirusów bytujących w jelitach (wiriom). Wirom składa się głównie z bakteriofagów, wirusów pochodzenia roślinnego i innych dużych wirusów. W przeciwieństwie do bakterii wirusów nie została wcześniej rozpoznana z powodu trudności technicznych w ich wykrywaniu, identyfikacji i izolacji. Szacuje się, że średnio jeden gram kału zawiera co najmniej 10^9 cząstek wirusopodobnych (VLP) i 10^9 komórek bakteryjnych [26]. Skład mikrobioty jest jednak dynamiczny i ulega ciągłym zmianom w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, w tym stan odżywienia, czynniki środowiskowe, styl życia, stan zdrowia i choroby, leki, takie jak antybiotyki [27,28].

Wpływ mikrobioty na nasze zdrowie i stan chorobowy jest wielokierunkowy. Może ona indukować/modyfikować choroby metaboliczne, autoimmunologiczne i neurodegeneracyjne. Ponadto może regulować odpowiedź immunologiczną gospodarza i wpływać na interakcje z lekami [29]. Wpływ mikrobiomu na nasze zdrowie można zrozumieć tylko wtedy, gdy uświadomimy sobie, że komórki pochodzenia ludzkiego stanowią zaledwie 10% całkowitej liczby żywych komórek w ludzkim ciele, a mikrobiota stanowi pozostałe 90% komórek. Podobnie, tylko 1% wszystkich unikalnych genów w naszych ciałach ma ludzkie pochodzenie, a pozostałe 99% należy do mikrobioty jelit i jamy ustnej. Dlatego też ludzki mikrobiom jest uważany za nasz drugi genom [27,29,30].

Oprócz jelit, mikrobiota mogą również kolonizować jamę ustną, nozdrza, pochwę, piersi i skórę. Mikrobiota jamy ustnej składa się głównie z paciorkowców i w mniejszym stopniu z innych gatunków, takich jak *Veillonella*, *Gamella*, *Rothia*, *Fusobacterium* i *Neisseria*. Chociaż mikrobiota jamy ustnej jest niezbędna do utrzymania zdrowia jamy ustnej, może ona wywoływać różne choroby, takie jak próchnica (*Streptococcus mutans*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Propionibacterium*) i zapalenie przyzębia (*Porphyromonas*

gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Treponema denticola i Tannerella forsythia) [31]. Warto wspomnieć, że szkodliwe działanie mikrobioty jamy ustnej wykracza poza indukcję chorób zębów i obejmuje również choroby ogólnoustrojowe. Jednym z najlepszych przykładów jest związek między zapaleniem przyzębia a cukrzycą i chorobami sercowo-naczyniowymi (w tym miażdżycą i udarem mózgu), w których część cholesterolu zwięzająca ściany tętnic jest syntetyzowana przez mikrobiotę jamy ustnej i nie ma pochodzenia dietetycznego, jak sądzono wcześniej [32,33,34].

Konkurencja między różnymi gatunkami bakterii była tradycyjnie wykorzystywana do przeciwdziałania szkodliwym skutkom obecności patogenów inwazyjnych. To podejście terapeutyczne jest najczęściej stosowane w leczeniu chorób żołądkowo-jelitowych, np. stosowanie Saccharomyces boulardii w leczeniu biegunki poantybiotykowej [35]. Lactobacillus GG w leczeniu biegunki wywołanej przez salmonellę [36], Weissella Cibaria JW15 (JW15) w celu hamowania patogenów, takich jak Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, S. enteritidis i Escherichia coli [37]. Szczep E. coli A0 34/86 może być również stosowany do zapobiegania kolonizacji patogennych E. coli w jelitach niemowląt [38]. Podobnie, bakteriofagi były również stosowane w leczeniu opornych na antybiotyki szczepów MRSA [39] i infekcji wywołanych przez Mycobacterium abscessus [40].

3.5.3. Zmiany składu mikrobioty a wiek człowieka

Mikrobiom przewodu pokarmowego niemowląt ma prosty skład zdominowany przez Bifidobakterie. Na skład i częstość występowania różnych gatunków bakterii ma wpływ wiele czynników, takich jak pokarm matki w czasie ciąży, sposób porodu (poród normalny vs. cięcie cesarskie) oraz rodzaj karmienia (karmienie piersią vs. mieszanki mlekozastępcze). Skład mikrobiomu zmienia się jednak stale wraz z wiekiem. Porównanie składu mikrobiomu u niemowląt i 4-letnich dzieci ujawniło zmniejszenie populacji rodzajów Proteobacteria i Actinobacteria, któremu towarzyszył wzrost liczby rodzajów Firmicutes i Bacteroidetes w jelitach starszych dzieci [41].

Uogólniając można stwierdzić, że ponieważ funkcjonalność mikrobiomu różni się między niemowlętami i dorosłymi, profile drobnoustrojów są odpowiednio dostosowywane, np. podczas gdy mikrobiota zaangażowana w metabolizm aminokwasów i witamin dominuje w jelitach niemowląt, drobnoustroje te będą powoli zastępowane przez mikrobiotę uczestniczącą w metabolizmie tłuszczów wraz z wiekiem [41].

Struktura drobnoustrojów różni się nawet w populacjach osób starszych z różnych krajów w zależności od ich wieku, diety, stylu życia, chorób metabolicznych, takich jak otyłość, oraz czynniki środowiskowe [42]. Dlatego wraz z wiekiem populacja patogenów związanych z chorobami i fakultatywnych beztlenowców (Clostridia i Bacteroides, Betaproteobacteria i Deltaproteobacteria) powiększa się w połączeniu ze zmniejszeniem liczby korzystnych bakterii komensalnych (takich jak Actinobacteria, bifidobacterial, Firmicutes, lactobacilli i bifidobacterial), co prowadzi do zaburzenia stosunku Bacteroidetes: Firmicutes [43]. Chociaż podstawowy profil mikrobiologiczny osób starszych wyraźnie różni się od profilu młodszych osób dorosłych, nie ma ustalonego uniwersalnego składu mikrobioty w populacji osób starszych [44]. Zmiany te w dużym stopniu współwystępują ze związanymi z wiekiem zmianami fizjologiczno-patologicznymi prowadzącymi do stanu zapalnego, a także do zmniejszenia zarówno odpowiedzi immunologicznej jelit, jak i funkcjonalności bariery nabłonkowej jelit [45]. Zmiany w składzie mikrobiomu jelitowego i wynikające z nich zmiany fizjologiczno-patologiczne wraz z wiekiem zostały zaproponowane jako możliwe wyjaśnienie różnic w podatności na COVID-19 między młodymi i starszymi populacjami [46].

3.5.4 Rola mikrobioty jelitowej w patogenezie chorób

Błona śluzowa jelit stanowi jedną z głównych barier obronnych organizmu. W skład tej bariery wchodzi zarówno elementy fizyczne, chemiczne, mikrobiologiczne jak i immunologiczne. Wspomniana bariera chroni organizm przed inwazją bakterii, przenikaniem obcych antygenów i toksyn do krążenia oraz przed utratą wody i składników odżywczych. Dodatkowo reguluje wymianę molekularną i współistnienie/kolonizację mikrobioty jelitowej. Nawet minimalne zmiany w składzie mikrobioty jelitowej mogą mieć wpływ na przyszły rozwój poważnych chorób, takich jak nowotwory, choroby zapalne jelit, choroby metaboliczne, czy choroby układu sercowo-naczyniowego [47].

Nowotwory

Skład i pochodzenie spożywanych pokarmów są głównymi czynnikami wpływającymi na witalność i skład mikrobioty. Ogólnoświatowy wzrost spożycia słodczy, napojów bezalkoholowych i fast foodów prowadzi do zmian w składzie mikrobioty jelitowej. Spożywanie wysoko węglowodanowej diety o niskiej zawartości aminokwasów prowadzi do zaburzenia stosunku Firmicutes do Bacteroidetes. Spożywanie diety o niskiej zawartości błonnika / wysokiej zawartości czerwonego mięsa zmienia mikrobiotę jelitową, sprzyjając

powstawaniu nowotworów; dieta bogata w polisacharydy nie skrobiowe zwiększa fermentację bakteryjną / wykorzystanie spożytych włókien i produkcję krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych (Short Chain Fatty Acids, SCFA), takich jak maślan, octan i propionian. SCFA są wykorzystywane do produkcji energii przez nabłonek jelita grubego; wykazują silne działanie przeciwzapalne, wymagane do regeneracji komórek i utrzymania zdrowej bariery jelitowej [48, 49, 50, 51]

Spożycie czerwonego mięsa zwiększa populację gatunków bakterii zaangażowanych w metabolizm aminokwasów, takich jak *Fusobacteria* i *Alistipes*, przy jednoczesnym zmniejszeniu częstości występowania tych, które ograniczają indukcję nowotworów (gatunki wytwarzające SCFA). Dostarczanie pacjentom gatunków *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* poprawia właściwości przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [52].

Oprócz czerwonego mięsa, spożywanie przetworzonego mięsa, zwłaszcza smażonego w bardzo wysokich temperaturach, zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów z powodu produkcji różnych mutagennych rakotwórczych heterocyklicznych amin, związków N-nitrozowych, heterocyklicznych amin i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [53]. Spożywanie białego mięsa okazało się mniej szkodliwe niż konsumpcja mięsa czerwonego. Na powyższe może wskazywać obecność większej liczby bakterii korzystnego rodzaju *Lactobacillus* u konsumentów białego mięsa niż osób spożywających czerwone mięso. [54].

Oprócz czerwonego mięsa, spożycie tłuszczów, zwłaszcza nienasyconych kwasów tłuszczowych (wielonienasyconych kwasów tłuszczowych), odgrywa kluczową rolę w karcynogenezie raka żołądka i jelita grubego. Spożyty tłuszcz wpływa na florę jelitową, która metabolizuje nienasycone kwasy tłuszczowe do rakotwórczych produktów ubocznych [55].

Wpływ spożycia tłuszczu na stan zdrowia zależy jednak od rodzaju spożywanego tłuszczu, ponieważ spożycie dobrych tłuszczów, takich jak oleje rybne i wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3, może chronić przed rakiem jelita grubego [56]. Oprócz oleju rybnego stwierdzono, że inne składniki odżywcze, takie jak błonnik i witamina D, również chronią przed rozwojem rakiem jelita grubego [57].

Opisany powyżej styl życia, znany jako zachodni styl życia (spożywanie dużej ilości mięsa, wysokoenergetycznej, wysokotłuszczowej i ubogiej w błonnik diety), oprócz palenia

tytoniu i spożywania alkoholu, są odpowiedzialne za wysoką częstość występowania nowotworów w świecie zachodnim [58].

Oprócz roli diety w rozwoju nowotworów, wiele typów nowotworów może powstać w następstwie infekcji lub w wyniku bezpośredniego zaburzenia mikrobioty (np. w następstwie zakażenia *Fusobacterium H. pylori*, *Leptotrichia* i gatunkami *Campylobacter*) [59] lub infekcji wirusowej (np, wirus brodawczaka ludzkiego (HPV), wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) i wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), herpeswirus związany z mięsakiem Kaposiego (KSHV), poliomawirus komórek Merckela (MCV) [60].

Karcynogeneza może być również wywołana zaburzeniami w występowaniu/konstytucji flory jelitowej. Dlatego też częstość występowania raka jelita grubego jest znacznie wyższa w jelicie grubym niż w jelicie cienkim. Przypisuje się to większej populacji drobnoustrojów w jelicie grubym, zwłaszcza wirusom jelitowym i bakteriofagom [61]. Przykładem związku między obecną mikroflorą a rodzajem powstałego raka są infekcje *Streptococcus bovis* (SB), które obejmują *Strep. gallolyticus* (SB typu I i II/2) oraz *Strep. infantarius* (SB typu II/1). Podczas gdy *Strep. gallolyticus* jest powiązany z rakiem jelita grubego, *Strep. infantarius* okazał się być powiązany z innymi rodzajami raka, takimi jak nowotwory trzustki i dróg żółciowych [62].

Mikrobiota a choroby hematologiczne

Oddziaływania pomiędzy układem odpornościowym człowieka a mikrobiomem jelitowym są przedmiotem licznych badań, a rola mikroflory jelitowej w hematologii była przedmiotem wielu publikacji naukowych [63,64,64,66,67].

Wykazano, że mikrobiom jelitowa odgrywa znaczącą rolę w wynikach leczenia pacjentów z nowotworami hematologicznymi, takimi jak białaczki, chłoniaki i zespoły mielodysplastyczne. Inne badanie dowiodły, że dysbioza, czyli niekorzystna zmiana składu flory jelitowej, może prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu układu odpornościowego, zwiększonej podatności na infekcje i upośledzonej odpowiedzi na chemioterapię lub immunoterapię [68,69,70,71]. Nadal jednak niewiele jest badań dotyczących roli mikrobiomu jelitowego w patogenezie i przebiegu szpiczaka mnogiego.

Mikrobiota jelitowa osób zdrowych jest odpowiedzialna między innymi za produkcję witaminy K, witaminy B2, B12, folianów i biotyny oraz zapewnia ochronę przed kolonizacją przez bakterie oportunistyczne, jest również niezbędna do rozwoju humoralnego i

komórkowego układu odpornościowego [72,73,74]. Wiadomo, że mikrobiom jelitowy odgrywa znaczącą rolę w rozwoju i funkcji tkanki limfatycznej związanej z jelitami (GALT, Gut Associated Lymphoid Tissues), która jest częścią tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową (MALT) [75]. Około 70% limfocytów obwodowych zlokalizowanych jest w obrębie błony śluzowej jelita, stąd ogromna liczba interakcji między komórkami jelita a komórkami układu odpornościowego.

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiło się coraz więcej dowodów na to, że drobnoustroje jelitowe odgrywają również ważną rolę w nowotworzeniu, progresji i immunoterapii wielu nowotworów [76,77], szczególnie poprzez interakcje z mikrośrodowiskiem guza (Tumor Micro Environment). Mikrobiota jelitowa moduluje mikrośrodowisko immunologiczne guza, jest zaangażowana w inicjację i rozwój MM jako istotny czynnik przyczyniający się, a także jest związana z regeneracją komórek odpornościowych i wynikami leczenia po przeszczepie hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) u pacjentów ze szpiczakiem. Niedawno badania wykazały, że mikrobiota może również wpływać na odpowiedź immunologiczną na szczepienia przeciwnowotworowe [78,79]. Zatem ukierunkowanie mikrobów jelitowych i szczepionek przeciwnowotworowych na przebudowę i modulację TME może zwiększyć swoistość antygenową i immunogenność guza, a tym samym wzmocnić odporność przeciwnowotworową. W 2022r. Wang i wsp. opublikowali badanie, które wykazało, że zapalenie płuc u pacjentów chorujących na szpiczaka plazmocytozy związane jest z zmianą w składzie mikrobiomu jelitowego [80].

Praca autorstwa Khana i współpracowników wykazała, że zarówno u pacjentów poddawanych autoHSCT jak i alloHSCT występują podobne zaburzenia mikroflory jelitowej [81]. W badaniach kału pacjentów ze szpiczakiem plazmocytozy przeprowadzonym w Chinach stwierdzono, że liczebność Proteobacteria była zwiększona, natomiast liczebność Actinobacteria była mniejsza. Ponadto, Streptococcus, Klebsiella, Clostridium leptum i Pseudomonas aeruginosa, a także bakterie z rodzaju Odoribacter i Lactobacillus wykazywały zwiększoną liczebność w próbkach kału od pacjentów z MM. Te zaburzenia bakteryjne mogą prowadzić do zmian w metabolitach pochodzących z mikrobioty, które działają jako cząsteczki sygnałowe i substraty dla odpowiedzi immunologicznej i metabolicznej, a tym samym mogą przyczyniać się do progresji MM. Dysbioza mikrobioty jelitowej prowadzi do zmniejszenia ilości SCFA wytwarzanych przez bakterie, prowadząc do zwiększonej aktywacji mediatorów stanu zapalnego, takich jak IL-6 i szlaki NF- κ B, co, jak wykazano we wspomnianych badaniach, może dodatkowo przyspieszać progresję szpiczaka [82]. Ponadto selektywny wzrost mikrobioty odzyskującej azot w świetle jelita może promować syntezę

glutaminy i również prowadzić do progresji szpiczaka. Jak wykazano na modelu mysim specyficzne bakterie, takie jak *Prevotella heparinolytica*, promują kolonizację nabłonka jelitowego i migrację komórek Th 17 do szpiku, co może prowadzić do produkcji IL-17 przez komórki Th 17 w szpiku i dalszej aktywacji eozynofiliów oraz uwalniania IL-6, przyczyniając się w ten sposób do progresji nowotworu, w której pośredniczy stan zapalny [82].

W ostatnim czasie szczególną uwagę badaczy zwróciła rola mikrobiomu u pacjentów poddawanych procedurze transplantologicznej, zwłaszcza w kontekście GVHD. W swoim badaniu Taur i wsp. udowodnili związek pomiędzy zmianami mikrobiomu jelitowego a ryzykiem nawrotu GVHD [83,84].

3.5.5. Badania nad mikrobiomem

Pojęcie "mikrobiom" zostało zastosowane po raz pierwszy w 2001 roku, przez Lederberg i McCray [85]. Zdefiniowali oni ludzki "mikrobiom" jako "ekologiczną społeczność komensalnych, symbiotycznych i patogennych mikroorganizmów, które dosłownie dzielą przestrzeń naszego ciała" [85]. W tym samym czasie Relman i Falkow opublikowali swój "drugi projekt ludzkiego genomu", który miał za zadanie kompleksowo zbadać i opisać geny i genom drobnoustrojów bytujących w ustach, jelitach, pochwie i na skórze człowieka [86]. Human Microbiome Project (HMP), był realizowany w latach 2007-2016. Realizacja projektu podzielona była na kilka etapów.

Pierwsza faza HMP1 miała miejsce w latach 2007- 2014. HMP1 był interdyscyplinarnym przedsięwzięciem obejmującym cztery centra sekwencjonowania (były to : Baylor College of Medicine, Broad Institute, Washington University School of Medicine i J. Craig Venter Institute), Centrum Analizy i Koordynacji Danych (DACC, Data Analysis and Coordination Center). W fazie początkowej HMP1 scharakteryzowano próbki pochodzące od 300 zdrowych osobników. Próbki pochodziły z przewodów nosowych, jamy ustnej, skóry, przewodu pokarmowego i układu moczowo- płciowego. HMP1 miał za zadanie:

- opracowanie referencyjności zestawu sekwencji genomu drobnoustrojów pobranych z próbek z różnej okolicy ciała i przeprowadzenie wstępnej charakterystyki ludzkiego mikrobiomu,
- opracowanie nowych technologii i narzędzi do dokładnej analizy danych pod kątem mikrobiologicznym,
- analiza danych, szukanie związku między zmianami w składzie ludzkiego mikrobiomu, a występowaniem różnych chorób,

- zbadanie etycznych, prawnych i społecznych implikacji badań nad ludzkim mikrobiomem,
- utworzenie danych zasobów w postaci plików danych wykorzystywanych do dalszych analiz.

W 2014 roku National Institutes of Health (NIH) zainicjował Integrative Human Microbiome Project (iHMP), jako drugą fazę projektu Human Microbiome Project. Projekt iHMP miał na celu pełniejsze zrozumie wpływu mikrobiomu na zdrowie i choroby człowieka. Projekt Integrative Human Microbiome Project (iHMP) obejmował badania nad szeregiem zaburzeń związanych z mikrobiomem, takich jak cukrzyca typu 2 i nieswoiste zapalenie jelit, w celu rozpoznania biomarkerów i potencjalnych celów terapeutycznych dla tych dolegliwości. ["NIH Human Microbiome Project - About the Human Microbiome". hmpdacc.org]. Dzięki HMP opracowano nowe narzędzia i techniki analizy danych dotyczących mikrobiomu.

3.5.6. Nowe Techniki laboratoryjne w analizie mikrobiomu. Szczególna rola Sekwencjonowania Nowej Generacji (NGS).

Wykorzystanie nowych technik laboratoryjnych ułatwiło badania nad mikrobiomem. Jeszcze około 30 lat temu Sekwencjonowanie Amlikonów genów było podstawową techniką badania taksonomii i filogenezy mikrobiomów. W przypadku bakterii, prątków i grzybów zidentyfikowano kilka specyficznych genów markerowych/celowych (specific marker/ target genes), które są obecnie powszechnie stosowane w technikach laboratoryjnych. Według badań większość markerowych genów (target gene) wykorzystywanych w analizie jest wysoce konserwatywna między różnymi gatunkami bakterii i archeonów, co stanowi podstawę analizy mikrobiologicznej. Jednym z powszechnie stosowanych genów docelowych do identyfikacji bakterii jest 16S rRNA (lub 16S rDNA) [87,88,89]. Carl Richard Woese, amerykański mikrobiolog i fizyk, opisał i sklasyfikował archeony oraz był również pionierem w wykorzystaniu 16S rRNA do identyfikacji drobnoustrojów, technikę tę wprowadził w 1977 roku. Od tego czasu sekwencjonowanie 16S rRNA stało się powszechnie akceptowanym standardem taksonomii i filogenezy prokariotów.

Gen 16S rRNA jest składnikiem podjednostki 30S rybosomu prokariotycznego 70S. [90] Gen 16S występujący u bakterii ma długość około 1500 par zasad , składa się z 10 regionów zmiennych (V1–V10) i 10 regionów konserwatywnych (C1–C10), dodatkowo zaangażowany jest w strukturę drugorzędową małej podjednostki 30S [91]. Bardziej

konserwatywne regiony w genie 16S rRNA są przydatne do określania taksonów wyższego rzędu, takich jak gromada lub klasa, podczas gdy mniej konserwatywne regiony są wykorzystywane do identyfikacji rodzaju lub gatunku. Sekwencjonowanie pełnego genu 16S rRNA, który ma długość około 1542 par zasad, jest kosztowne, poszukiwano zatem nowszych, mniej kosztownych i bardziej wydajnych metod badawczych. Pojawienie się technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS) zrewolucjonizowało analizę mikrobiomu i jest obecnie szeroko stosowane.

Molekularne techniki diagnostyczne, takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), czy sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) zmieniły zasady badań mikrobiologicznych. Techniki te stały się coraz szybsze, bardziej czułe i opłacalne. W przypadku NGS genu 16S rRNA, DNA jest najpierw ekstrahowane, następnie określony region genu 16S rRNA jest amplifikowany, sekwencjonowany, a następnie identyfikacja bioinformatyczna wygenerowanych sekwencji opiera się na podobieństwie do referencyjnych sekwencji genu 16S rRNA dostępnych w publicznych bazach danych. Głównymi zaletami sekwencjonowania NGS genu 16S rRNA jest to, że metoda ta nie opiera się na metodach hodowli komórkowej, pozwala również określić względną liczebność wszystkich bakterii w próbce i umożliwia równoległe sekwencjonowanie wielu próbek jednocześnie [92]. Ze względu na wzrost liczby dostępnych urządzeń do PCR i sekwencjonowania DNA, wykorzystanie sekwencjonowania genu 16S rRNA nie ogranicza się do celów badawczych, ale może wkrótce zostać wykorzystane przez laboratoria kliniczne [93]. Jednak sekwencjonowanie amplikonu genu 16S rRNA ma również ograniczenia: startery użyte do amplifikacji mogą wprowadzić błąd, ponieważ wiążą się z regionami, które nie są w 100% konserwatywne we wszystkich bakteriach, a w większości przypadków bakterie można zidentyfikować tylko do poziomu rodzaju ze względu na wysokie podobieństwo między genem 16S rRNA z blisko spokrewnionych gatunków, ponadto metoda ta nie dostarcza informacji na temat wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Sekwencjonowanie Nowej Generacji (NGS) jest coraz powszechniej wykorzystywane w medycynie. Służy nie tylko analizie mikrobiomu jelitowego, ma również ogromne znaczenie w analizie mutacji badanego materiału pochodzącego np. z krwi obwodowej czy szpiku pacjentów chorujących na określone choroby np. ostrą białaczkę szpikową. W powszechnym przekonaniu analiza i badania te zrewolucjonizowały spojrzenie na diagnostykę, rozwój i leczenie różnych typów nowotworów oraz budzą nadzieję, na terapię „szytą na miarę” spersonalizowaną dla każdego pacjenta.

4. Cel pracy

Głównym celem mojej pracy było badanie mikrobiomu w populacji polskich pacjentów ze świeżo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym (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 krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych

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

5. Pacjenci, materiał chorych i metody

5. 1. Charakterystyka badanych grup

Do badania włączono 19 chorych zdiagnozowanych w latach 2021-2022, w Klinice Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu . Grupę badaną stanowili pacjenci ze świeżo rozpoznanym szpiczakiem plazmocytowym (Newly diagnosed multiple myeloma, NDMM)

Badania przeprowadzono w ramach realizacji projektu, tytuł projektu: „ProHum - Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska - planowanie badań eksperymentalnych, tworzenie i optymalizacja zwierzęcych modeli doświadczalnych z umiejętnościami transferowania ich do badań klinicznych w medycynie człowieka” (POWR.03.02.00-00-I008/17-0 i numer projektu SIMPLE: POWR.F008.19.002.), Kierownik Projektu- Prof . Marcin Nowak. Środki niezbędne do realizacji wyżej wymienionego projektu pochodziły z Projektu ProHUM oraz z wsparcia finansowego Rektora ds. Nauki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Wrocławiu (KB - 415/2021, w załączeniu). Każdemu choremu przedstawiono projekt badania, jego cele oraz prośbę o dobrowolne podpisanie świadomej zgody na udział w badaniu.

Badania zostały przeprowadzone w Laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu, Pracowni Cytometrii Przepływowej Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu, Pracowni Cytochemii i Cytomorfologii Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku we Wrocławiu, Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu .

U wszystkich pacjentów przeprowadzono diagnostykę zgodnie z obowiązującymi zaleceniami i postawiono rozpoznanie zgodnie z kryteriami IMWG. W oparciu o przeprowadzone badania chorych zakwalifikowano do leczenia indukującego remisję choroby w oparciu o obowiązujące standardy.

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych osób: 8 kobiet i 12 mężczyzn w średnim wieku 60 lat, zakres [45 lat- 78 lat].

Dobór osób grupy kontrolnej pod względem płci i wieku odpowiadał grupie badanej.

Do badania kwalifikowani byli zdrowi ochotnicy, nie obciążeni nowotworem jelita grubego, niespecyficznym zapaleniem jelit, którzy zadeklarowali, że co najmniej 90 dni przed oddaniem próbki stolca do badania nie przyjmowali antybiotyków.

Osoby zakwalifikowane do badania podpisały świadomą zgodę na włączenie do grupy kontrolnej w w/w badaniu

5. 2. Materiał badań

Do badań pobierano próbki kału do jałowych pojemników na stolec.

Następnie oddane próbki kolekcjonowano i mrożono w specjalnie do tego przygotowanej zamrażarce.

Wszystkie próbki w grupie badanej zostały uzyskane przed rozpoczęciem leczenia przyczynowego

5. 3. Metoda badania

5.3.1. Analiza laboratoryjna : sekwencjonowanie genu 16S rybosomalnego RNA

W prezentowanym badaniu przeprowadzono sekwencjonowanie genu 16S rybosomalnego RNA (rRNA) w celu profilowania społeczności drobnoustrojów (microbial communities).

Pierwszym etapem badania była izolacja materiału genetycznego. DNA drobnoustrojów ekstrahowano z próbek kału poddanych badaniu, przy użyciu zestawu QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie ze standardową procedurą.

Biblioteki DNA przygotowano przy użyciu zestawu QIAseq 16S/ITS Region Panel (Qiagen, Hilden, Niemcy).

Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania obejmowało dwa główne etapy. W pierwszym etapie przygotowano zestawy ampliconów regionów hiper zmiennych genu 16S

rRNA. W moim badaniu były to regiony V3-V4 i V7-V9, czyli regionów pozwalających na identyfikację bakterii i archeonów.

Następnie zamplifikowane fragmenty oczyszczono na kulkach magnetycznych (magnetic beads). Proces ten umożliwia w drugim etapie sekwencyjnie dodawać adaptory sekwencjonowania (sequencing adapters) zawierające indeksy (indexes), co pozwala na identyfikację sekwencji z danej próbki biologicznej.

Następnie uzyskane fragmenty DNA ponownie oczyszczono, w wyniku czego powstały biblioteki sekwencjonowania, które poddano ocenie jakościowej i ilościowej (qualitative and quantitative evaluation). Kolejnym krokiem była normalizacja stężenia.

Biblioteki DNA w tym etapie znormalizowano do tego samego stężenia i połączono ewimolarnie (pooled evimolarly). Następnie tak przygotowane 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).

Po zakończeniu części laboratoryjnej nastąpiła analiza bioinformatyczna uzyskanych danych w celu uzyskania informacji na temat składu mikrobiomów badanych próbek poddanych badaniu.

5.3.2. Analiza bioinformatyczna mikrobiomów

Analiza bioinformatyczna mikrobiomów została przeprowadzona za pomocą programu QIIME2 2021.8 [94]. W pierwszym etapie przeprowadzono demultipleksację (demultiplexing). Fazowane startery (phased primers) dla V3-V4 i V7-V9 zostały usunięte z surowych danych przy użyciu kustomowego skryptu (custom script), który wykorzystuje cutadapt [95]. Aby ocenić jakość odczytów, artefakty powstałe w QIIME2 skonstruowane z demultipleksowanych danych zostały ocenione przy użyciu metody sumarycznej (summary method) z wtyczki demultipleksera (plugin demux). Następnie tak uzyskane dane poddano dalszym etapom analizy i kontroli.

W kolejnych etapach analizy zastosowano: Trimming (przycinanie), denoising (odszumianie), dereplication (usuwanie replikacji) i chimera filtering (filtrowanie chimery),

przeprowadzono je za pomocą programu DADA2 dla odczytów sparowanych końców (paired-end reads) [96]. Aby zmniejszyć ryzyko artefaktów, odfiltrowano ASV (Amplicon Sequence Variants) odpowiadające sekwencjom należącym do Eukaryota.

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) [97,98]. Dodatkowo podczas analizy wykorzystano bazę danych Silva 128 [99,100,101], ponieważ ta wersja jest kompatybilna z q2-sidle. Próbkę zostały rozcieńczone (podpróbki bez zastępowania) do 14 622 sekwencji na próbkę.

W analizie bioinformatycznej postanowiono zmierzyć wskaźniki alfa- różnorodności, beta- różnorodności oraz wykorzystać metodę ANCOM.

Aby zmierzyć różnorodność alfa (alpha- diversity), obliczono cztery wskaźniki, były to: wskaźnik różnorodności Shannona (Shannon's diversity index) [102], Observed Features (zaobserwowane cechy), Faith's Phylogenetic Diversity (różnorodność filogenetyczną Faith) [103] i Pielou's Evenness (równość Pielou) [104]. Opis wyżej wymienionych wskaźników znajduje się w odpowiednich miejscach prezentujących wyniki tych metryk.

Następnie przeprowadzono test Kruskala-Wallisa w celu testowania grup (osoby z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytowym vs. osoby zdrowe).

Do obliczenia różnorodności beta (beta-diversity) zastosowano obliczenie następujących metryk: Jaccard distance (odległość Jaccarda) [105], Bray-Curtis dissimilarity (odmienność Braya-Curtisa) [106], unweighted UniFrac [107] i weighted UniFrac [108] (opis metryk znajduje się w odpowiednich miejscach podczas prezentacji wyników). Macierze danych z tych metryk wykorzystano do przeprowadzenia analizy głównych współrzędnych (PCoA, Principal Coordinate Analysis) [109]. Aby sprawdzić, czy istnieją znaczące statystyczne różnice między pacjentami w chwili rozpoznania szpiczaka plazmocytozowego a osobami z grupy kontrolnej w różnorodności beta, przeprowadzono test PERMANOVA z 999 permutacjami (PERMANOVA test with 999 permutations). Wszystkie obliczenia różnorodności alfa i beta, a także wykres PCoA, przeprowadzono za pomocą q2-diversity plugin. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną statystycznie. Narzędzie ANCOM (Analiza składu mikrobiomów, Analysis of Composition of Microbiomes) zostało wykorzystane do określenia, które taksony różnią się względną liczebnością (relative abundance), zgodnie z

integracją wtyczki q2-composition (q2- composition plugin) przy użyciu ustawień domyślnych. [110] Do wygenerowania wykresów użyto bibliotek Matplotlib i Seaborn (Matplotlib and Seaborn libraries) [111,112].

6. Wyniki badań

6.1. Charakterystyka badanej grupy

Do badania włączono 19 chorych w wieku średnio 64,6 lat, [zakres 42-79lat].

Było to 6 kobiet w wieku średnio 64.5 lat [zakres 51-74 lat] oraz 13 mężczyzn średnio w wieku $x = 64.6$ lat [zakres 46-79 lat].

Wybrane dane kliniczne chorych włączonych do badania przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 5. Charakterystyka grupy badanej (NDMM)

Liczba badanych	19
Płeć K/M	6 / 13
Wiek (lata) zakres, średnia	[zakres 42- 79 lat], średnia 64,6 lat
Rodzaj białka monoklonalnego: IgG/IgA/IgM/LCD	11 / 0 / 5 / 3
Łańcuch lekki kappa/lambda	14 / 5
Stadium kliniczne wg ISS I/II/III	4 / 4 / 11
Wydolność nerek Tak/Nie (w momencie rozpoznania)	3 / 16
Stężenie β -2-m w surowicy (mg/l)	Stężenie średnie= 9.6 [1.5-35]
Stężenie LDH w surowicy (U/l)	Stężenie średnie= 228 [111-673]
Liczba płytek (tys/mikrolitr)	Stężenie średnie= 195 [57-500]
Stężenie hemoglobiny (g/dl)	Stężenie średnie= 9.95 g/dL [5.9-12.8]

Legenda: MM – szpiczak plazmocytowy; LCD - choroba łańcuchów lekkich; K – kobiety; M – mężczyźni; ISS – międzynarodowy indeks prognostyczny; β -2-m - β -2-mikroglobulina; A - nerki wydolne; B- niewydolność nerek; LDH – dehydrogenaza mleczanowa

6.2. Analiza mikrobiomu w aspekcie beta –różnorodności

Analiza próbek mierzona była między innymi za pomocą różnorodności beta (beta-diversity), którą definiuje się jako różnicę w składzie gatunków między różnymi próbkami (lub w ujęciu ogólnym- ekosystemami). Beta- różnorodność w swojej interpretacji pokazuje, jak bardzo skład mikrobiomu różni się między badanymi próbkami, grupami lub w ujęciu ogólnym środowiskami.

W dostępnych badaniach beta różnorodność jest analizowana na podstawie tylko jednej z metryk. (na przykład Jaccard, Bray-Curtis, Unweighted UniFrac, Weighted Unifrac). W mojej pracy zostały zaprezentowane wyniki pochodzące z 4 metryk. Każda z przytoczonych metryk reprezentuje inny aspekt . W wykonanej analizie we wszystkich 4 metrykach wykazane różnice były istotne statystycznie.

Zawarte w doświadczeniu metryki to: Jaccard, Bray-Curtis, Unweighted-unifrac, Weighted-unifrac. Ich krótka charakterystyka jest następująca:

Jaccard: Miara oparta na indeksie Jaccarda, która porównuje wspólne gatunki między dwoma próbkami mikrobiomów. Liczona jest jako iloraz liczby wspólnych gatunków i sumy gatunków, bez uwzględnienia ich obfitości.

Bray-Curtis: Miara odległości, uwzględniająca różnice w obfitości gatunków między dwoma próbkami mikrobiomów. Liczona jest jako stosunek sumy różnic w obfitości gatunków do sumy ich obfitości.

Unweighted-UniFrac: Miara oparta na odległości filogenetycznej, która porównuje wspólną ewolucyjną historię gatunków między dwoma próbkami mikrobiomów, ale nie uwzględnia ich obfitości.

Weighted-UniFrac: Miara oparta na odległości filogenetycznej, która porównuje wspólną ewolucyjną historię gatunków między dwoma próbkami mikrobiomów, uwzględniając jednocześnie ich obfitości.

Tabela 6. Wyniki beta-różnorodności. Porównywano próbki pochodzące od osób zdrowych i osób z rozpoznaniem MM. Uzyskano istotność statystyczną w każdej z metryk ($p < 0.05$).

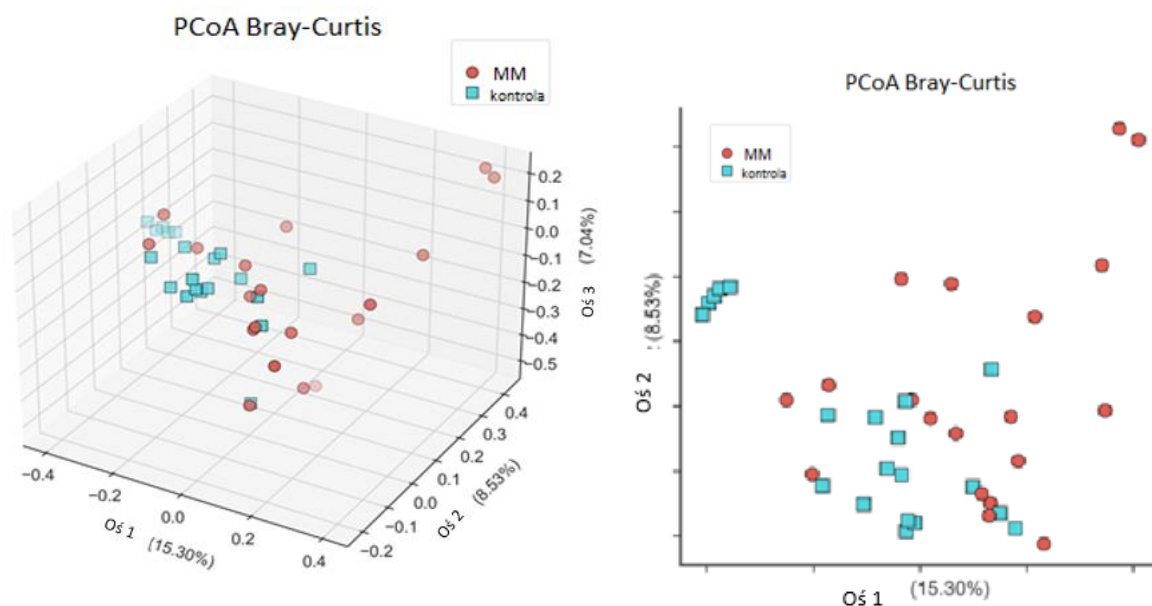
Metoda testu	test statisti c name	sample size	numbe r of groups	Wartość statystyk i	p-value	number of permuta tions	Metryka
PERMANOVA	pseudo -F	39	2	2.507367 30587398 9	0.001	999	Braycurtis
PERMANOVA	pseudo -F	39	2	2.009426 01570243 1	0.001	999	Jaccard
PERMANOVA	pseudo -F	39	2	1.987384 61970640 98	0.011	999	unweighted_unifrac
PERMANOVA	pseudo -F	39	2	2.176702 71263558 53	0.029	999	weighted_unifrac

Legenda: number of groups-2 (w badaniu badano różnice pomiędzy dwoma grupami- osobami zdrowymi i osobami z ropoznanym MM). Sample size- ilość próbek (39 próbek użytych w badaniu). Metryka- charakterystyka opisana powyżej. Przyjęto wartość graniczą dla istotności statystycznej $p < 0.05$.

Narzędziem do wizualizacji różnorodności mikrobiomów między próbkami na podstawie macierzy odległości jest wykres PCoA (Principal Coordinates Analysis).

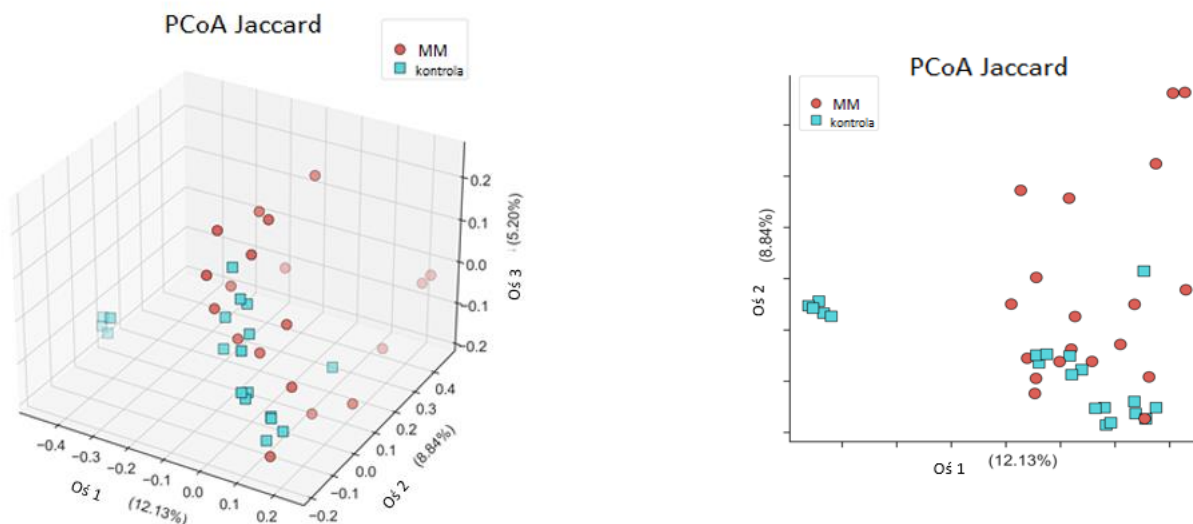
PcoA pozwala na zredukowanie wielowymiarowej przestrzeni danych do 2 lub 3 głównych osi (koordynat), które wyjaśniają większość zmienności w danych (ryciny 2D i 3D). Celem jest przedstawienie próbek w sposób, który odzwierciedla ich wzajemne podobieństwa i różnice.

Poniżej znajdują się wykresy 2D i 3D, które obrazują różnorodność mikrobiomów między próbkami.



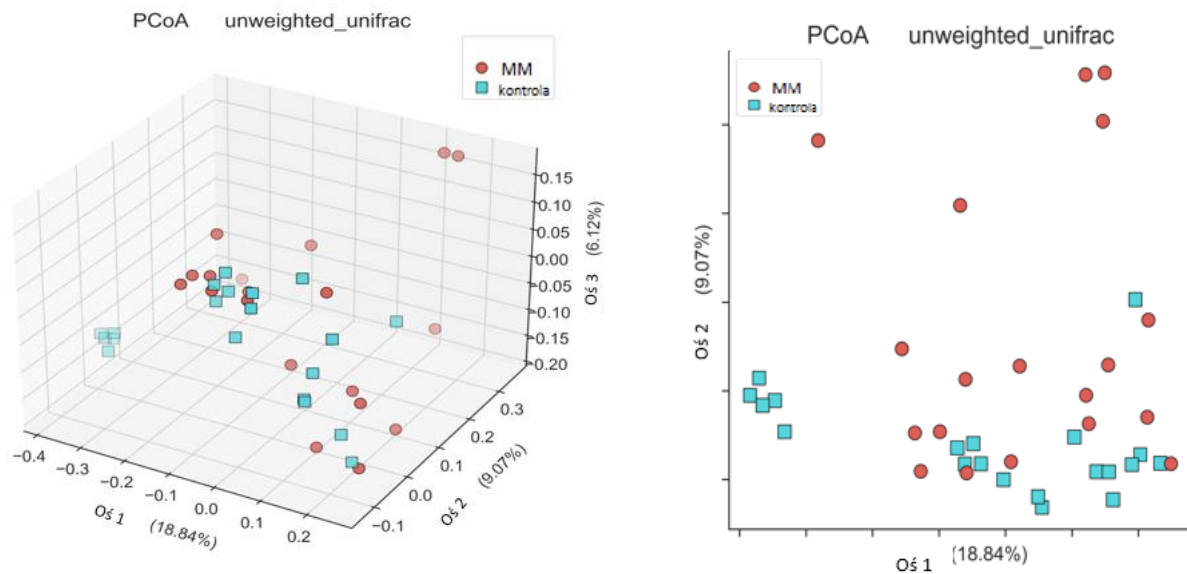
Rycina 1a i 1b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Braya-Curtisa

Oś X i Oś Y (lub Z, jeśli analiza jest trójwymiarowa) reprezentują główne osie zmienności (koordynaty), które zostały wyodrębnione z macierzy odległości, której wartości są obliczane na podstawie konkretnych miar różnorodności, w prezentowanym rysunku dla metryki: Bray-Curtis. Każdy punkt na wykresie reprezentuje próbkę mikrobiomu. Odległość między punktami na wykresie odzwierciedla wzajemne podobieństwo (lub różnice) między próbkami mikrobiomów - im bliżej siebie znajdują się punkty, tym bardziej podobne są próbki, a im dalej od siebie, tym się bardziej różnią. Procent wyjaśnionej zmienności dla każdej osi pokazuje, jak dobrze dana oś oddaje podobieństwa i różnice między próbkami. Grupowanie próbek na wykresie może sugerować wspólne wzorce.



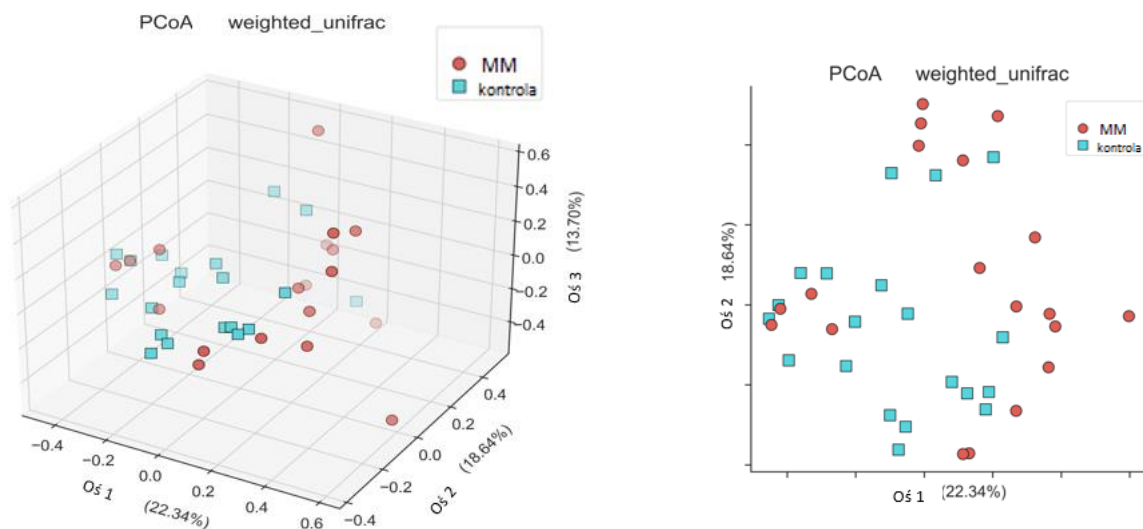
Rycina 2a i 2b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Jaccard.

Oś X i Oś Y (lub Z, jeśli analiza jest trójwymiarowa) reprezentują główne osie zmienności (koordynaty), które zostały wyodrębnione z macierzy odległości, której wartości są obliczane na podstawie konkretnych miar różnorodności, w prezentowanym rysunku dla metryki: Jaccard . Każdy punkt na wykresie reprezentuje próbkę mikrobiomu. Odległość między punktami na wykresie odzwierciedla wzajemne podobieństwo (lub różnice) między próbkami mikrobiomów - im bliżej siebie znajdują się punkty, tym bardziej podobne są próbki, a im dalej od siebie, tym się bardziej różnią. Procent wyjaśnionej zmienności dla każdej osi pokazuje, jak dobrze dana oś oddaje podobieństwa i różnice między próbkami. Grupowanie próbek na wykresie może sugerować wspólne wzorce.



Rycina 3a i 3b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Unweighted-UniFrac.

Oś X i Oś Y (lub Z, jeśli analiza jest trójwymiarowa) reprezentują główne osie zmienności (koordynaty), które zostały wyodrębnione z macierzy odległości, której wartości są obliczane na podstawie konkretnych miar różnorodności, w prezentowanym rysunku dla metryki: Unweighted-UniFrac. Każdy punkt na wykresie reprezentuje próbkę mikrobiomu. Odległość między punktami na wykresie odzwierciedla wzajemne podobieństwo (lub różnice) między próbkami mikrobiomów - im bliżej siebie znajdują się punkty, tym bardziej podobne są próbki, a im dalej od siebie, tym się bardziej różnią. Procent wyjaśnionej zmienności dla każdej osi pokazuje, jak dobrze dana oś oddaje podobieństwa i różnice między próbkami. Grupowanie próbek na wykresie może sugerować wspólne wzorce.



Rycina 4a i 4b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Weighted-UniFrac

Oś X i Oś Y (lub Z, jeśli analiza jest trójwymiarowa) reprezentują główne osie zmienności (koordynaty), które zostały wyodrębnione z macierzy odległości, której wartości są obliczane na podstawie konkretnych miar różnorodności, w prezentowanym rysunku dla metryki:

Weighted-UniFrac. Każdy punkt na wykresie reprezentuje próbkę mikrobiomu. Odległość między punktami na wykresie odzwierciedla wzajemne podobieństwo (lub różnice) między próbkami mikrobiomów - im bliżej siebie znajdują się punkty, tym bardziej podobne są próbki, a im dalej od siebie, tym się bardziej różnią. Procent wyjaśnionej zmienności dla każdej osi pokazuje, jak dobrze dana oś oddaje podobieństwa i różnice między próbkami. Grupowanie próbek na wykresie może sugerować wspólne wzorce.

6.3. Analiza mikrobiomu w aspekcie alfa - różnorodności

Różnorodność alfa jest miarą różnorodności gatunków w obrębie jednej próbki (lub ekosystemu). W kontekście mikrobiomów, różnorodność alfa może odnosić się do liczby różnych gatunków mikroorganizmów (różnorodność gatunkowa) lub do równomierności ich obfitości (równomierność) w jednej próbce mikrobiomu. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie różnorodności alfa pomiędzy grupą pacjentów (n=19) a grupą kontrolną (n=20).

Tabela 7. Podsumowanie wartości alfa- różnorodności. W badaniu porównywano grupę badaną (pacjentów z rozpoznaniem MM) do grupy kontrolnej (osoby zdrowe)

H_kruskal_wallis, test statystyczny, wartość	p-value	Metryka
1.1400000000000148	0.28565232751781844	shannon_entropy
2.892012763371156	0.08901964881670787	observed_features
0.0031578947368444688	0.955186345838418	pielou_evenness
1.598684210526315	0.20608977698513573	faith_pd

Legenda: Za wartość istotnie statystyczną przyjęto wartość $p < 0.05$. W żadnej z 4 metryk nie uzyskano istotności statystycznej. W tabeli zawarte jest podsumowanie wyników analizy statystycznej badanych grup. W badaniu wykorzystano materiał od 39 osób (20 osób zdrowych i 19 pacjentów z rozpoznaniem MM).

W mojej pracy do analizy mikrobiomu w aspekcie alfa - różnorodności zostały zastosowane następujące miary: Indeks Shannon, Pielou's Evenness, Observed Features (OF), Faith's Phylogenetic Diversity (PD).

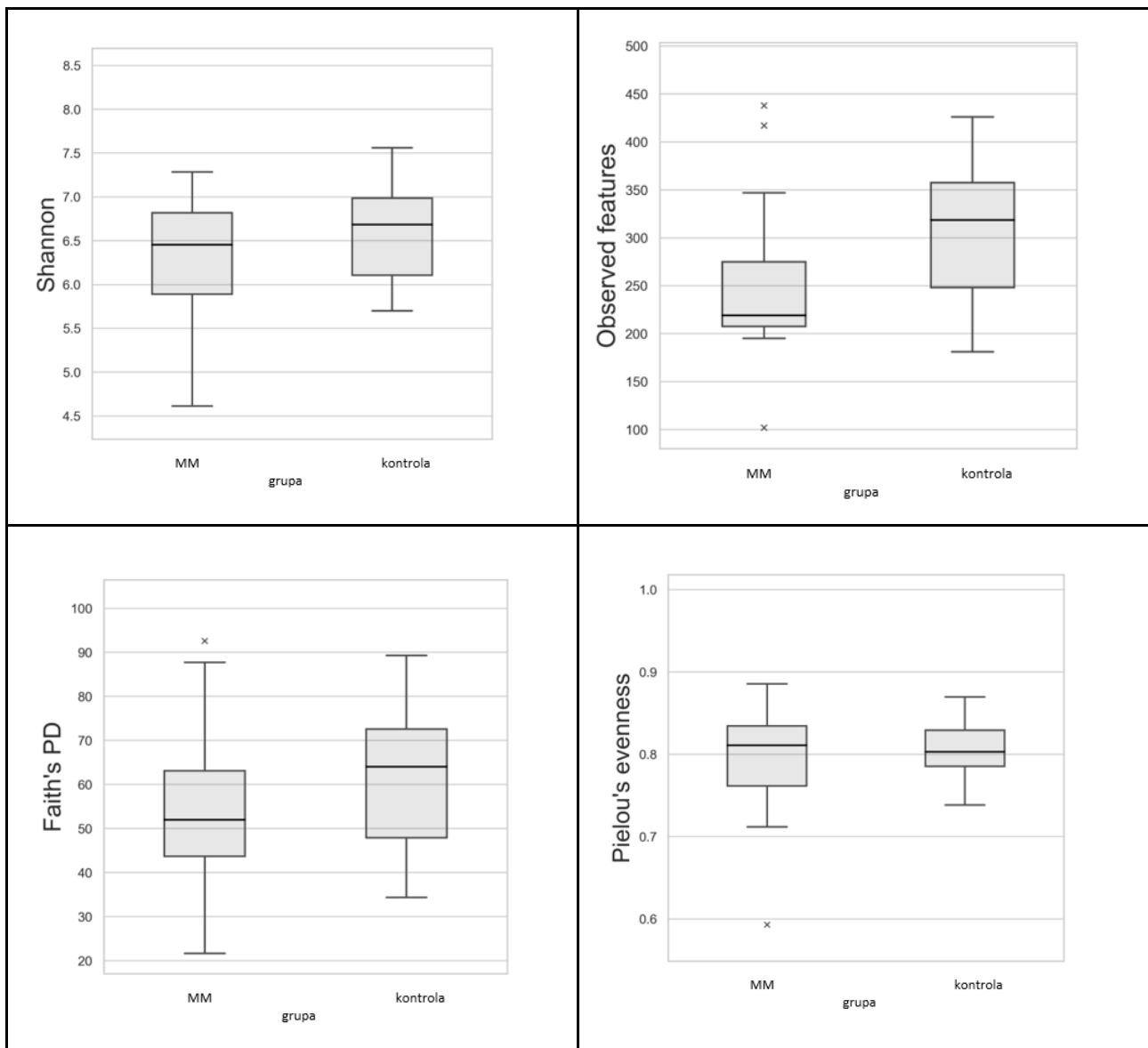
Ich krótka charakterystyka jest następująca:

Indeks Shannon: Jest to miara różnorodności alfa, która uwzględnia zarówno liczbę gatunków (różnorodność gatunkową), jak i ich obfitość (równomierność) w próbce. Wyższe wartości indeksu Shannona oznaczają większą różnorodność, ponieważ sugerują, że w próbce jest więcej różnych gatunków i/lub że są one bardziej równomiernie rozłożone. Brak istotnych różnic w indeksie Shannona między próbkami sugeruje, że mają one podobną strukturę różnorodności gatunkowej i równomierności.

Pielou's Evenness: Jest to miara równomierności w rozkładzie gatunków. Wyższa wartość oznacza, że gatunki są bardziej równomiernie rozłożone w próbce.

Observed Features (OF): OF jest prostą miarą różnorodności, która reprezentuje liczbę unikatowych gatunków (lub taksonów) obecnych w próbce. Brak istotnych różnic w OF między próbkami sugeruje, że liczba obserwowanych gatunków jest podobna.

Faith's Phylogenetic Diversity (PD): Brak istotnych różnic we wskaźniku Faith's PD między próbkami oznacza, że próbki mają porównywalną różnorodność filogenetyczną, co sugeruje, że zawierają mikroorganizmy o podobnym stopniu pokrewieństwa ewolucyjnego.



Rycina 5. Na zaprezentowanych rycinach przedstawiono wykres pudełkowy (box-and-whisker) dla badanych metryk w alfa- różnorodności: Indeks Shannon, Pielou's Evenness, Observed Features (OF), Faith's Phylogenetic Diversity (PD).

Nie znaleziono statystycznej istotności pomiędzy materiałem badanym a kontrolnym.

Brak różnic istotnych statystycznie w alfa- różnorodności w analizowanych grupach.

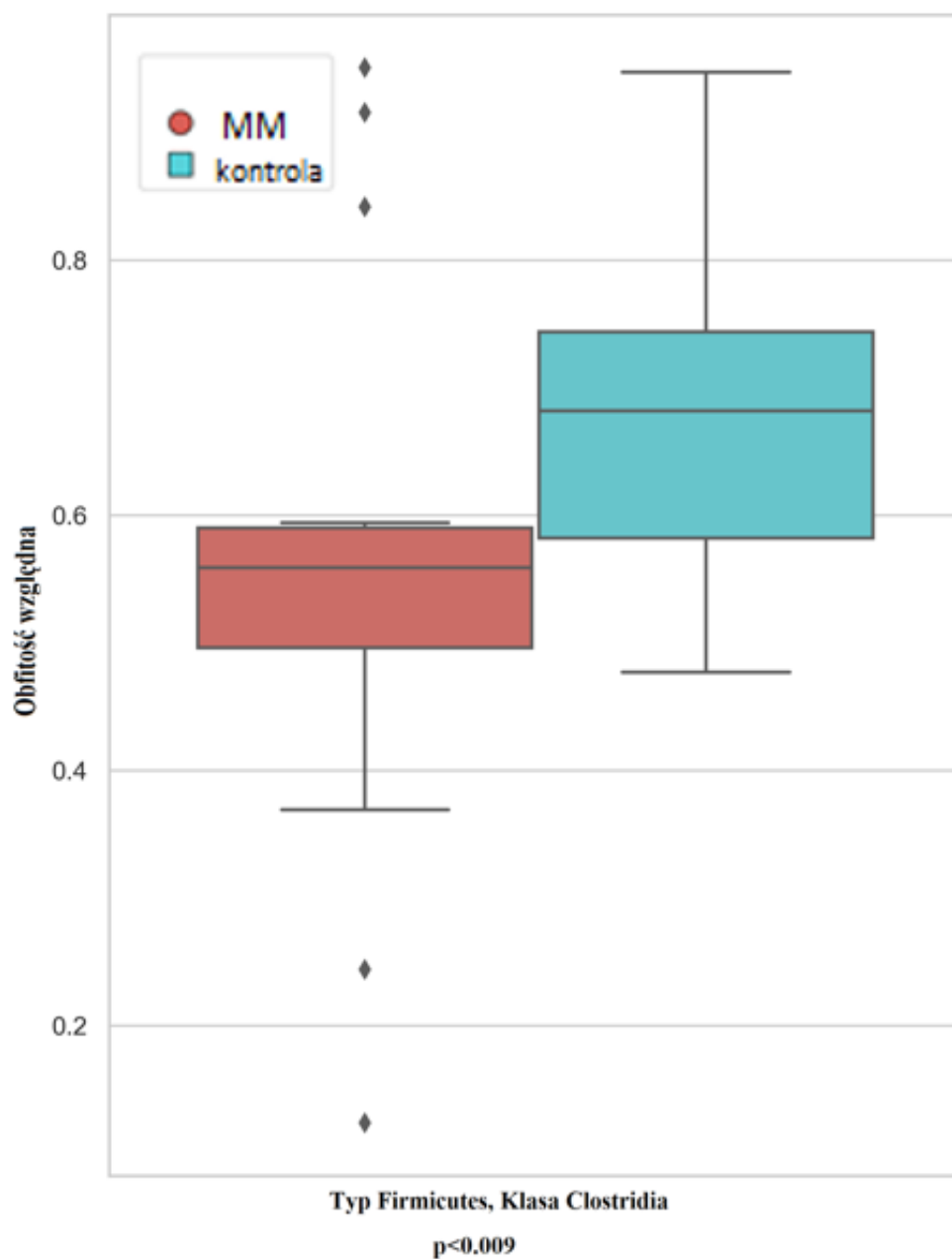
W przygotowanym rysunku zastosowano powszechnie stosowane modele graficzne- pudełko (box): pudełko obejmuje kwartyle Q1 (kwartył dolny), Q2 (kwartył środkowy = mediana) i Q3 (kwartył górny). Wysokość pudełka, znana jako rozstęp międzykwartyłowy (IQR), pokazuje gdzie leży środkowe 50% danych.

6.4. Badanie mikrobiomu w oparciu o analizę ANCOM

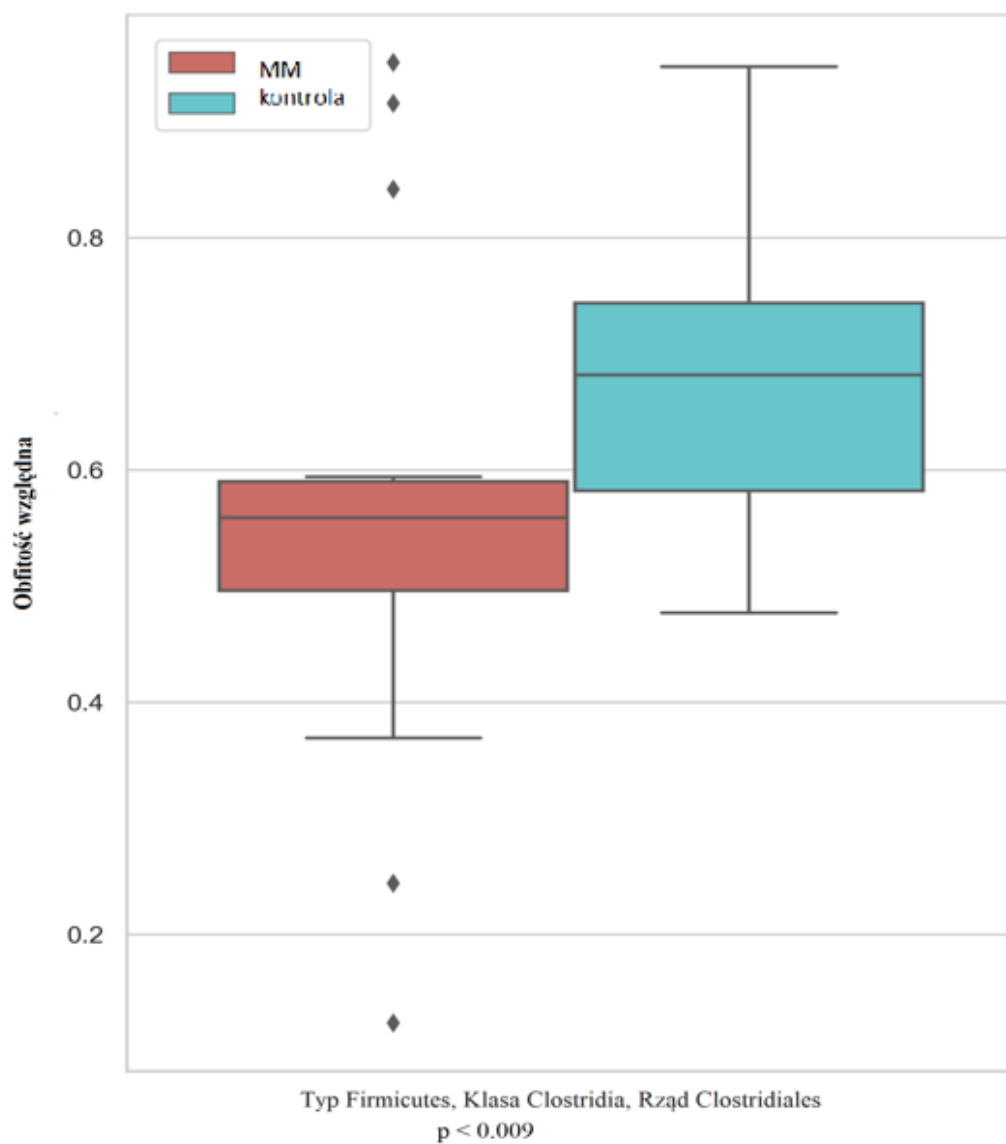
Wykazane różnice statystyczne w beta-różnorodności stanowiły podstawę do przeprowadzenia analizy ANCOM. Ponieważ analiza beta-różnorodności wykazała istotne statystycznie różnice składu mikrobiomu pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na NDMM, powstało pytanie jakie taksony są odpowiedzialne za wykazane różnice. Odpowiedź na tak postawione pytanie możliwa była dzięki analizie ANCOM.

Analiza ta pozwala na ustalenie, które taksony odpowiadały za odrzucenie hipotezy zerowej i wykazanie statystycznych różnic.

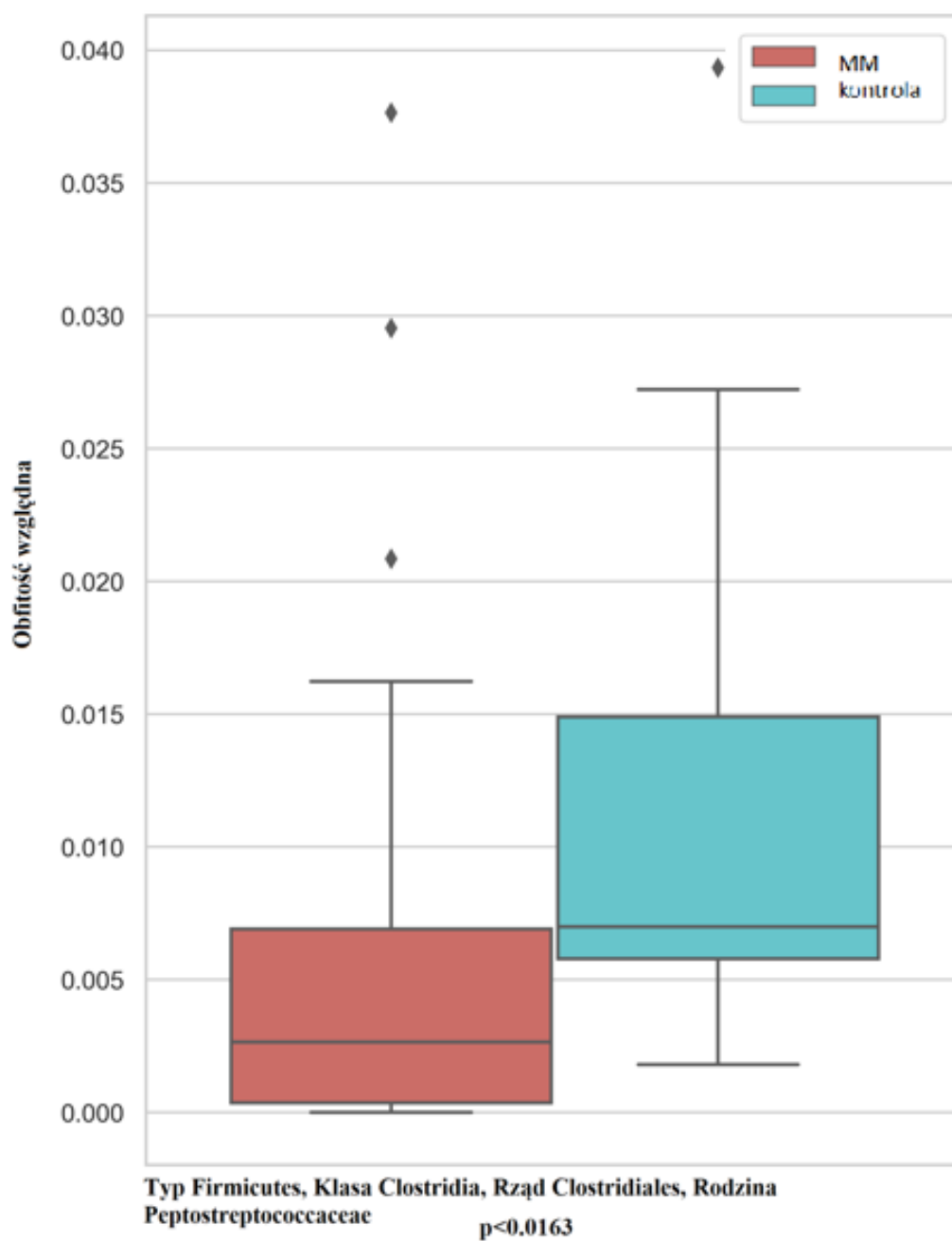
Poniżej zaprezentowano wyniki przedstawiające istotną statystycznie różnicę w obfitości względnej występującą między badanymi grupami (osoby zdrowe vs NDMM).



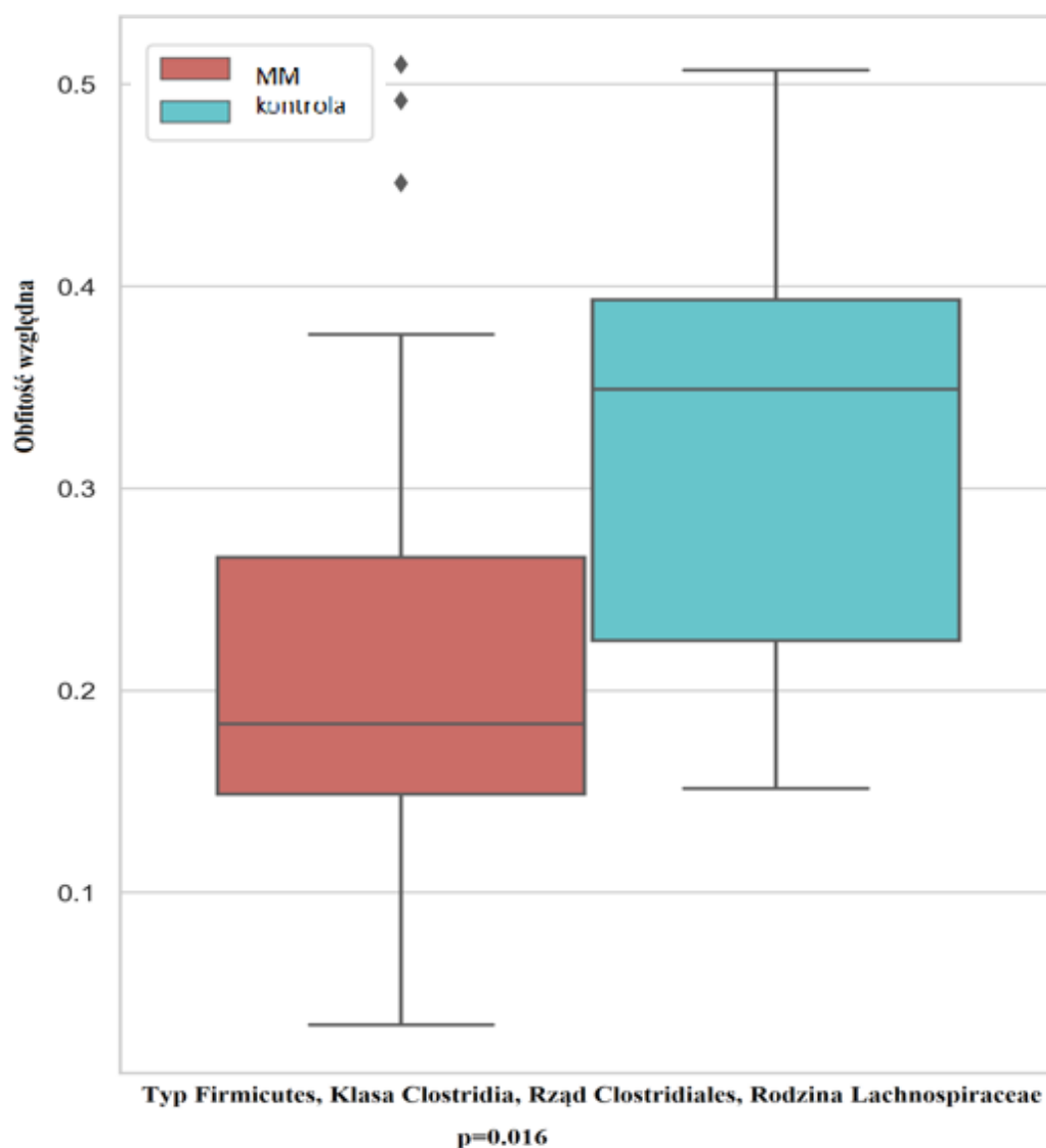
Rycina 6. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe), wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Clostridia.



Rycina 7. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia, Rzędu Clostridiales pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe), wśród osób z NDMM zauważalna jest mniejsza obfitość względna taksonu Clostridiales.

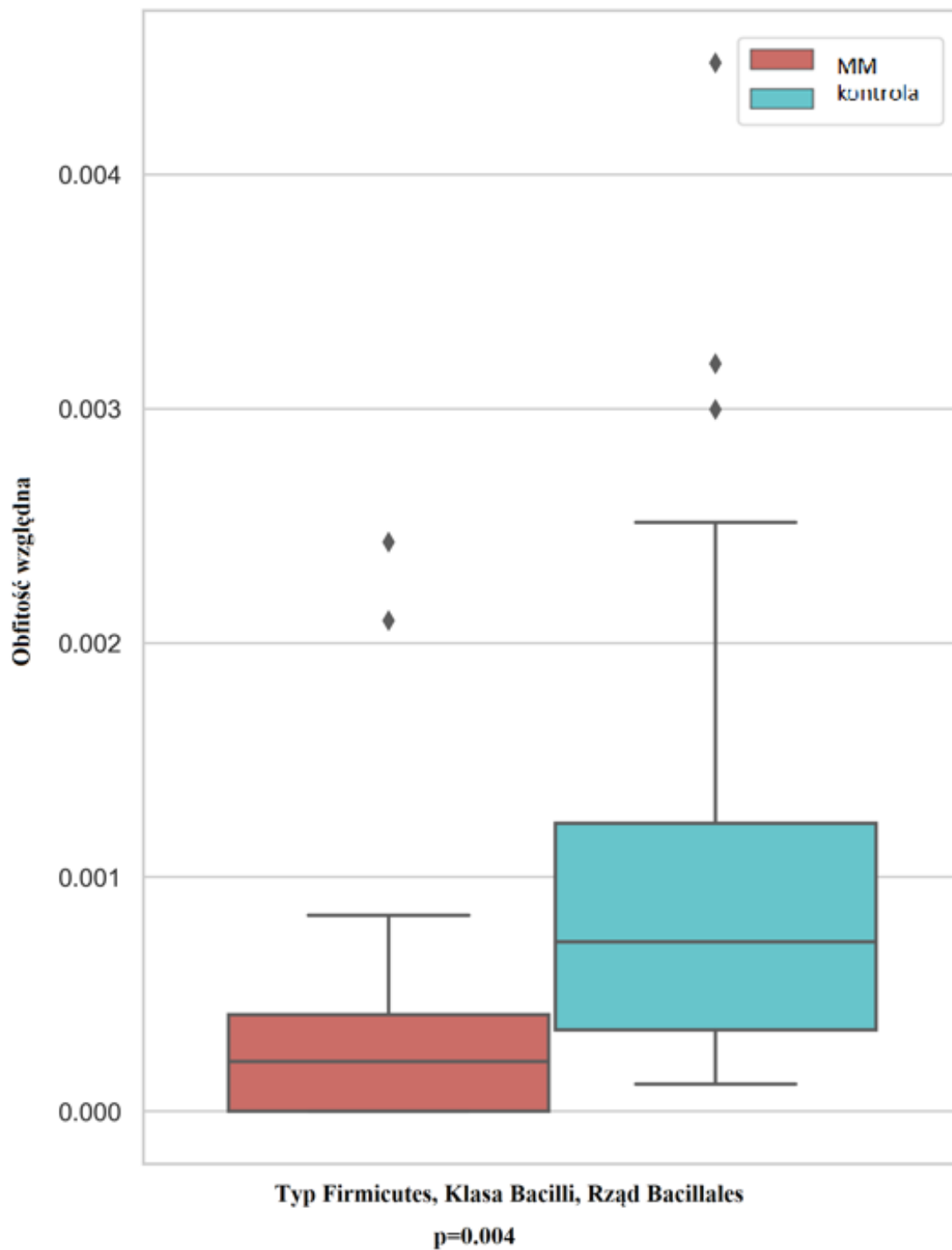


Rycina 8. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia, Rzędu Clostridiales, Rodziny Peptostreptococcaceae (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe) wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Rodziny Peptostreptococcaceae.

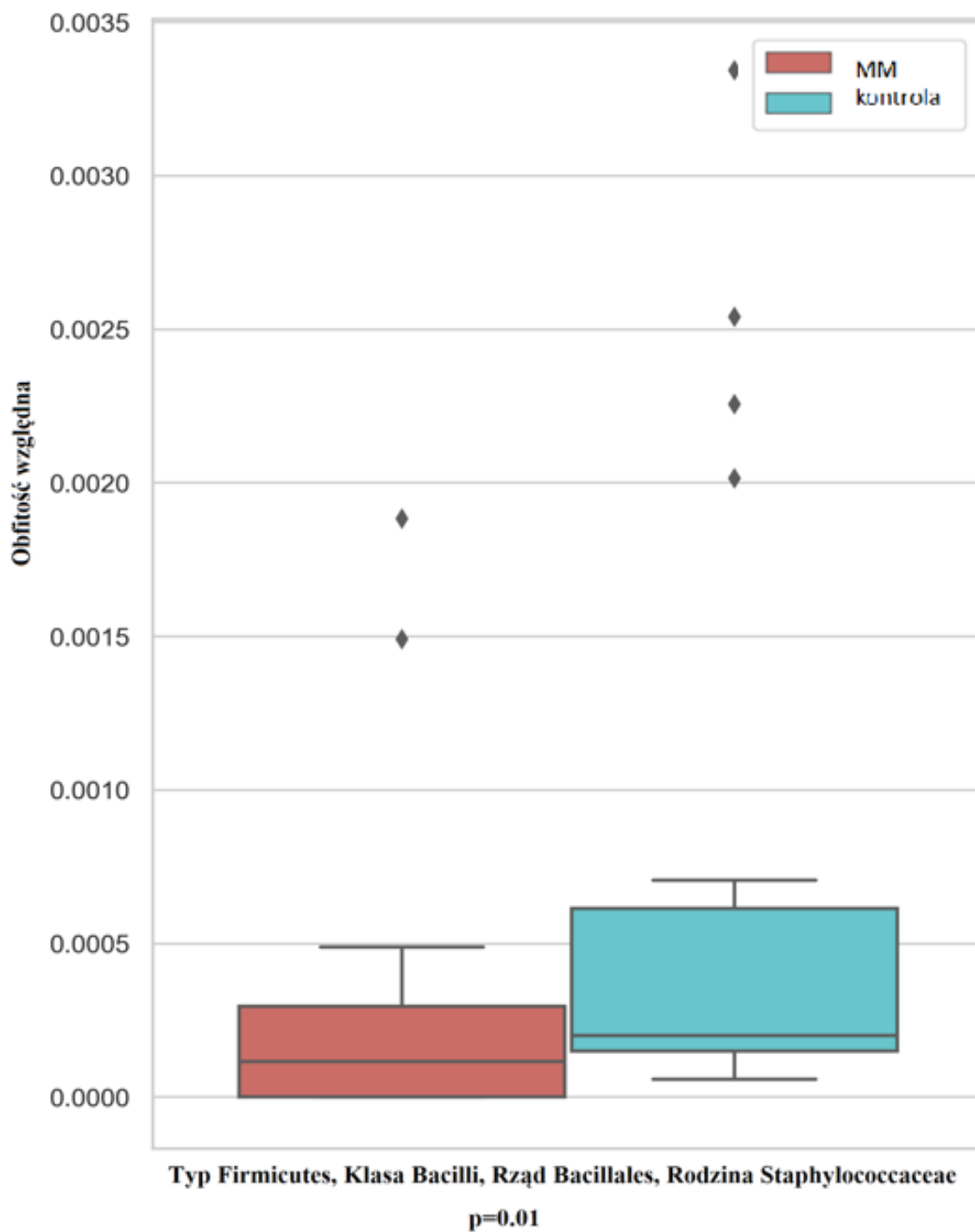


Rycina 9. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia, Rządu Clostridiales, Rodziny Lachnospiraceae pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Lachnospiraceae

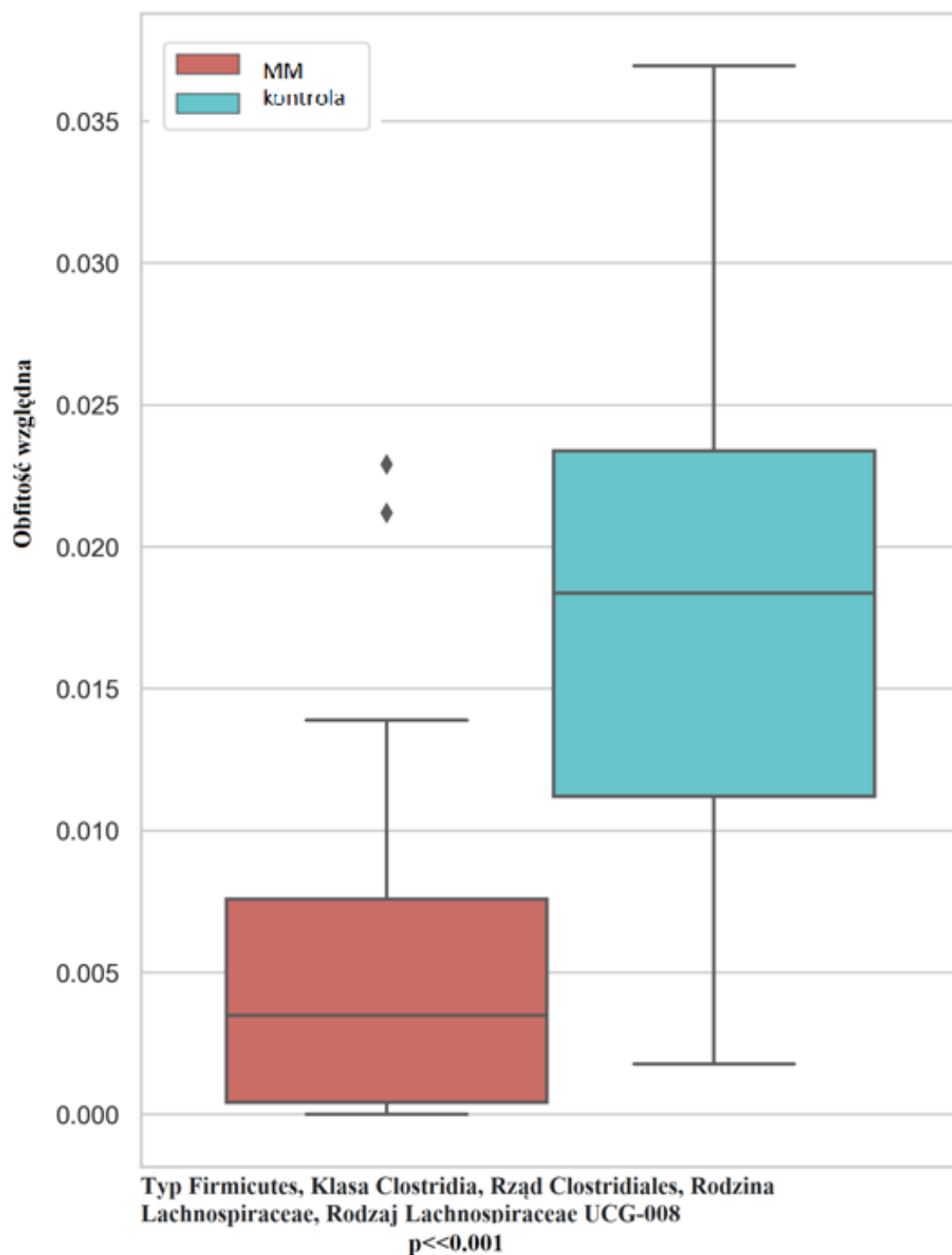


Rycina 10. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Bacilli, Rządu Bacillales pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe), wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Bacillales.



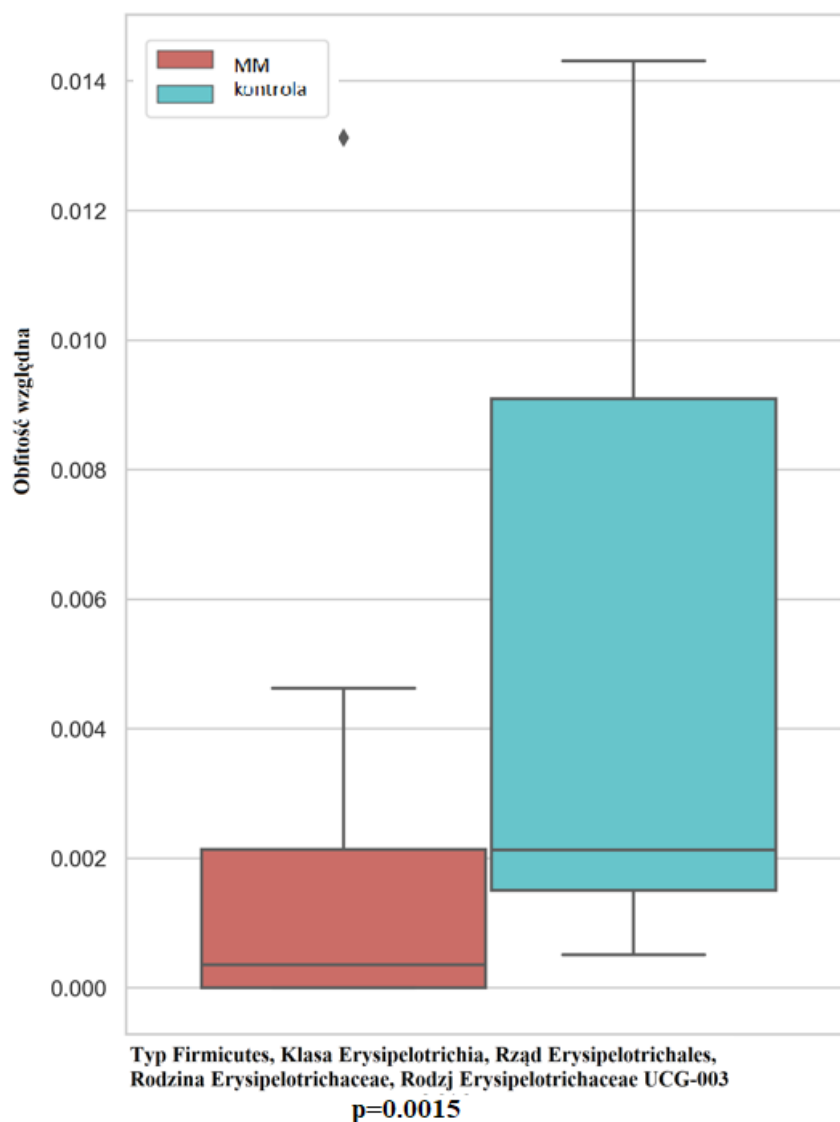
Rycina 11. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Bacilli, Rządu Bacillales, Rodziny Staphylococcaceae pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Staphylococcaceae.



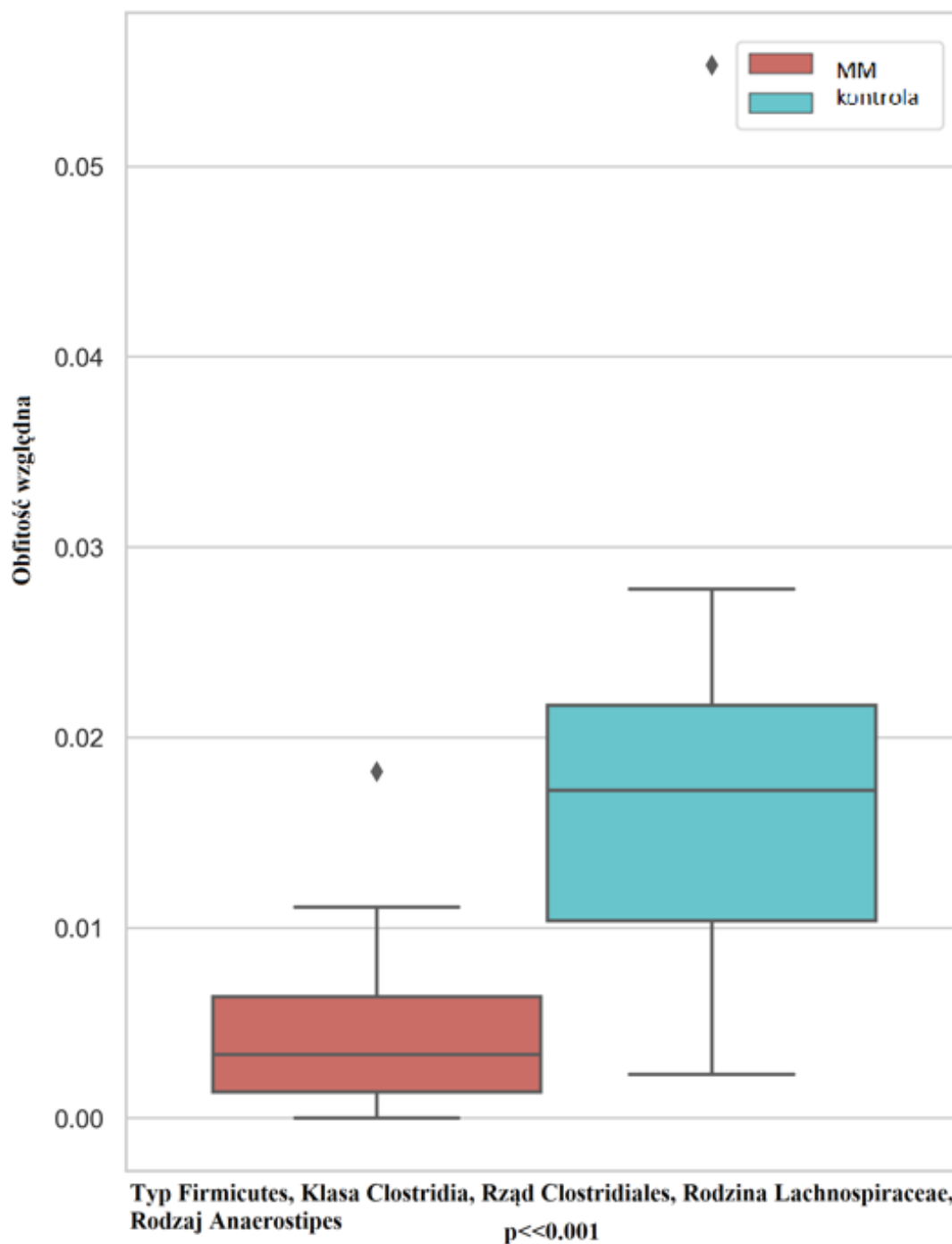
Rycina 12. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasa Clostridia, Rząd Clostridiales, Rodzina Lachnospiraceae, Rodzaj Lachnospiraceae UCG- 008 pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do rodzaju Lachnospiraceae UCG- 008.



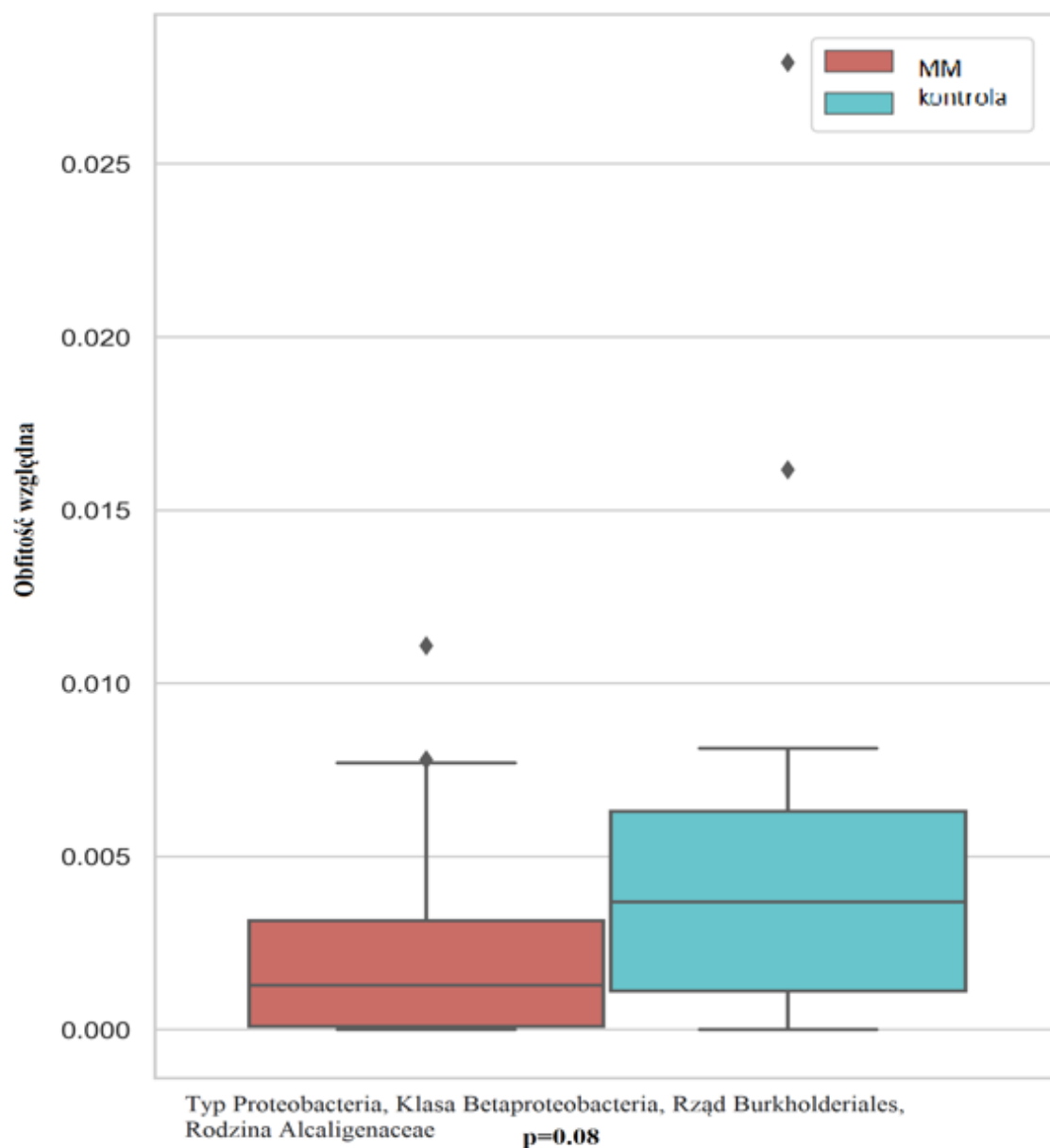
Rycina 13. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Erysipelotrichia, Rząd Erysipelotrichales, Rodzina Erysipelotrichaceae, Rodzaj Erysipelotrichaceae UCG-003 pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Erysipelotrichaceae UCG-003.



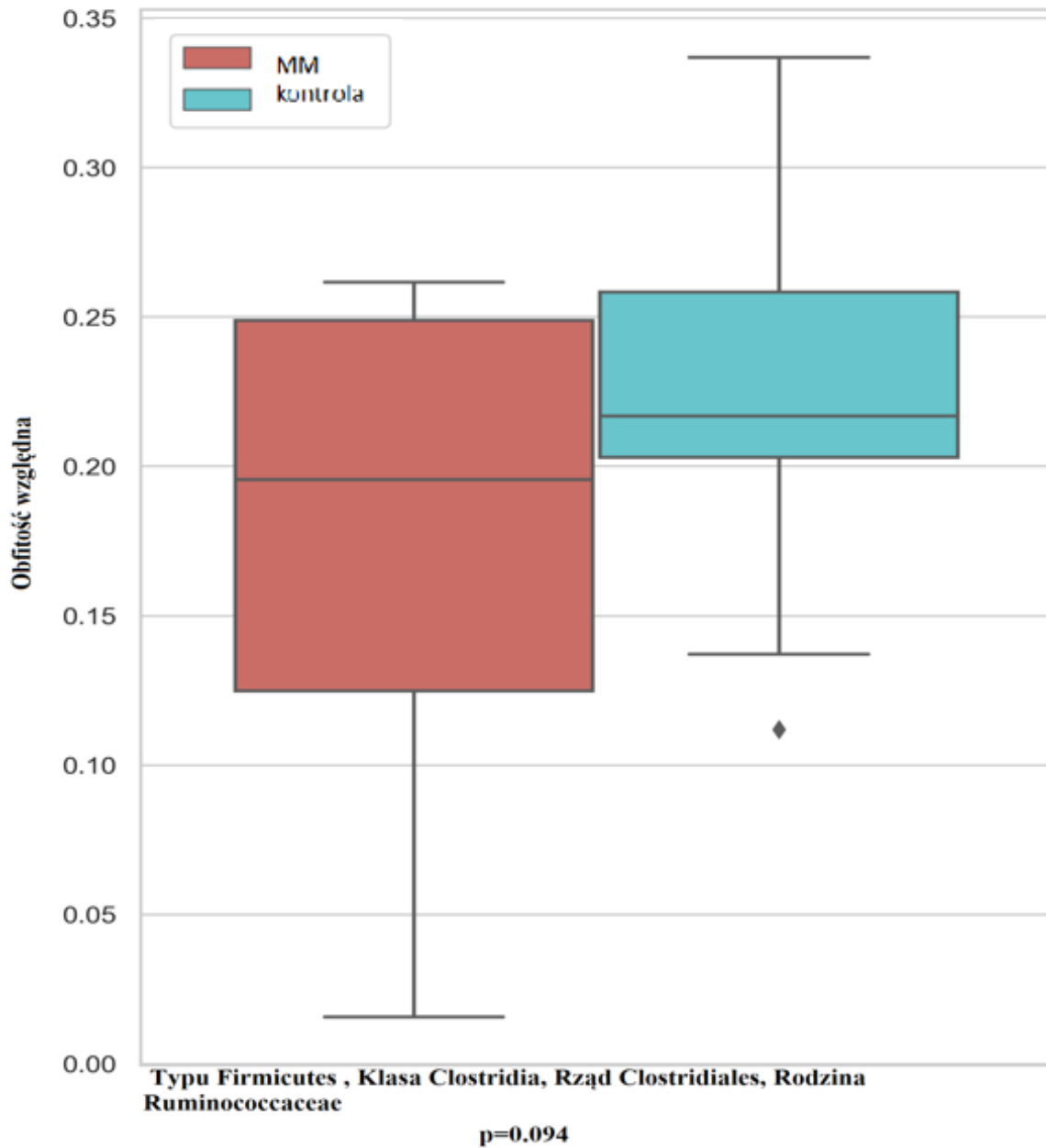
Rycina 14. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasa Clostridia, Rząd Clostridiales, Rodzina Lachnospiraceae, Rodzaj Anaerostipes (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Anaerostipes.



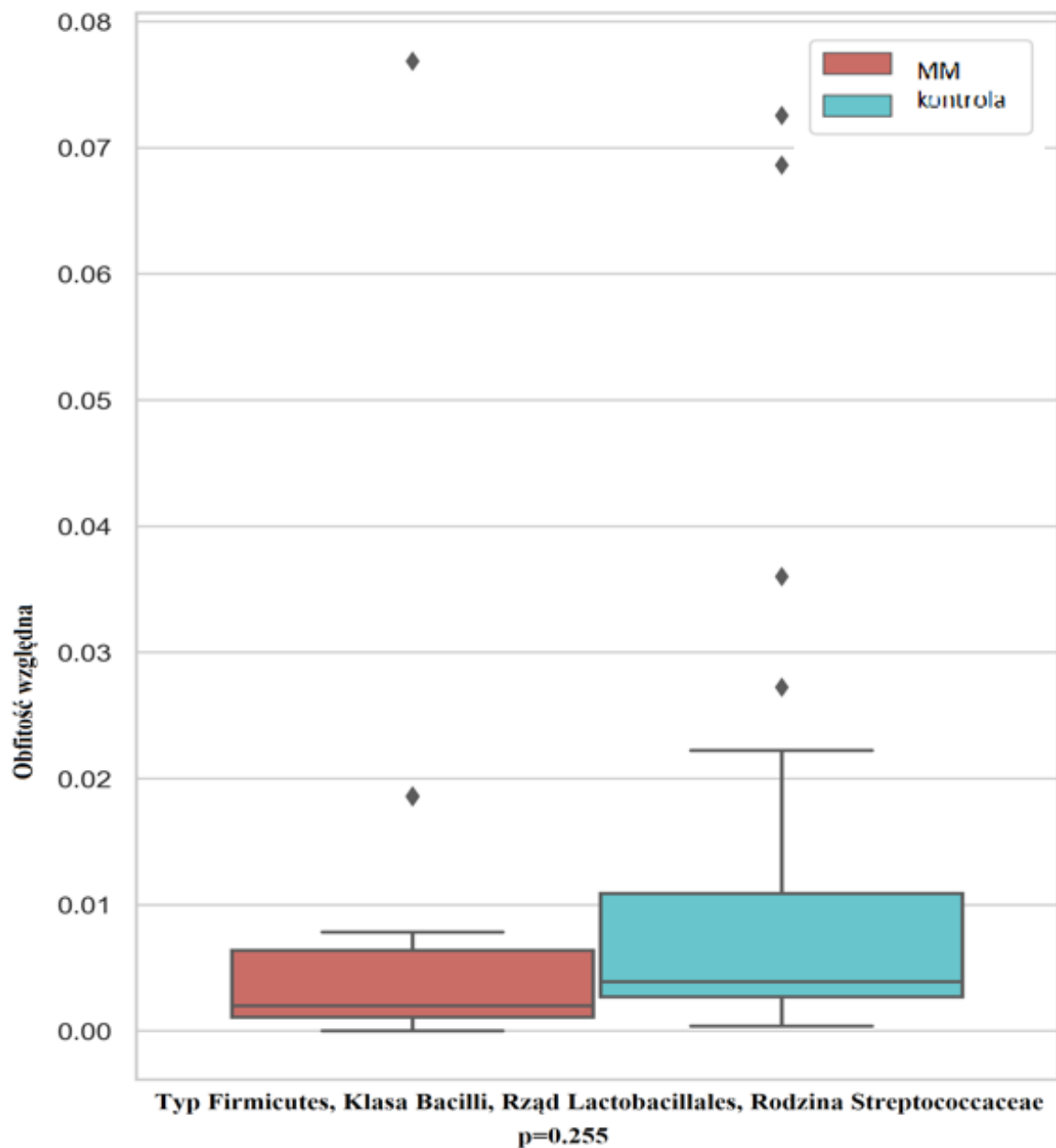
Rycina 15. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Proteobacteria, Klasa Betaproteobacteria, Rząd Burkholderiales, Rodzina Alicaligenaceae (MM- NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Alcaligenaceae, jednak zmiana w obfitości okazała się nieistotna statystycznie ($p>0.05$).



Rycina 16. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes , Klasa Clostridia, Rząd Clostridiales, Rodzina Ruminococcaceae (patient- NDMM, control- osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Ruminococcaceae, jednak zmiana w obfitości okazała się nieistotna statystycznie ($p > 0.05$).



Rycina 17. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes , Klasa Bacilli, Rząd Lactobacillales, Rodzina Streptococcaceae (MM- NDMM, kontrola- osoby zdrowe).

Wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Streptococcaceae, jednak zmiana w obfitości okazała się nieistotna statystycznie ($p > 0.05$).

7. Omówienie wyników i dyskusja.

W ciągu ostatniego dziesięciolecia uwaga badaczy została skierowana na badanie mikrobiomu jelitowego, zwłaszcza w aspekcie jego udziału w patogenezie licznych schorzeń, na przykład: otyłości, cukrzycy, raka jelita grubego czy zaburzeń zachowania[113]. Drobnoustroje jelitowe modulują ludzką odporność i metabolizm poprzez produkcję różnorodnych metabolitów, które działają jak cząsteczki sygnałowe i substraty reakcji metabolicznych. Coraz większe jest zainteresowanie znaczeniem immunometabolicznych mechanizmów interakcji gospodarz-mikrobiota jelitowa, szczególnie poprzez interakcje z guzem mikrośrodowiska, w procesie transformacji nowotworów złośliwych, (TME)[114,115]. Pojawiające się badania dowodzą, że mikrobiota jelitowa może przyczyniać się również do rozwoju i progresji szpiczaka plazmocytozy[116].

Według różnych analiz w jelicie człowieka znajduje się ponad 3 000 000 różnych genów. Ponadto liczba bakterii zasiedlających ciało zdrowego człowieka (większość z nich zasiedla przewód pokarmowy) wynosi około 10^{13} - 10^{14} , czyli liczba bakterii stanowi około 10 razy więcej komórek niż całe ciało zdrowego dorosłego człowieka. Dodatkowo, sugeruje się, że 1 gram kału zawiera około 10^{12} bakterii, a według licznych ustaleń liczba różnych bakterii występujących w jelicie człowieka szacowana jest na ponad 1000 gatunków. Dane z licznych analiz wykonywanych na ludzkiej mikroflorze pokazują, że ludzka mikroflora składa się z 12 różnych typów, wśród których około 93,5% należy do typu Firmicutes, typu Bacteroidetes, typu Proteobacteria i typu Actinobacteria, a spośród wymienionych typów Firmicutes i Bacteroidetes dominują w mikroflorze jelitowej u zdrowych osób [117].

Szczególne zainteresowanie badaczy, obok wielkości genomu jelitowego, jest zwrócone na analizę różnorodności mikrobiomu obecnego w przewodzie pokarmowym człowieka. Podkreślić należy, że zaraz po jądrowym i odziedziczonym po matce genomie mitochondrialnym na trzecim miejscu znajdują się właśnie genom jelitowy.

Do 2018 roku odkryto 43 162 ludzkich genów w DNA jądrowym. Fenotyp człowieka nie stanowi prostej sumy ekspresji genetycznej zapisanej w ludzkim genomie jądrowym. Na całościowy obraz genetyczny nakłada się w stopniu co najmniej znacznym metabolizm mikroorganizmów zasiedlających organizm człowieka. Oznacza to, że fenotyp człowieka jest wypadkową ludzkiego genotypu i oddziałujących na niego genotypów mikrośrodowiska. Można więc założyć, że człowiek jest przykładem znakomitej symbiozy między oddziaływaniem własnych komórek, a zasiedlających go bakterii.

Prowadzone aktualnie na świecie badania analizują wpływ diety na ilościowy i jakościowy skład mikrobiomu. W jednym z badań opublikowanych w 2020 roku, dotyczących wyników leczenia i czasu przeżycia 423 pacjentów z MM wykazano, że mniejszą śmiertelność i dłuższy całkowity czas przeżycia obserwowano w grupie chorych z wzorcem żywieniowym opartym na roślinach [118]. Diety oparte na pokarmach roślinnych są bogate w rozpuszczalny błonnik, dodatkowo wykazują większy poziom bakterii zaliczanych do Bacteroidetes, Lactobacilli, Bifidobacteria i Clostridium clusters XIVa i 4. Wymienione grupy bakterii obejmują Eubacterium, Roseburia, Faecalibacterium. Bakterie te mają zdolność rozkładania błonnika oraz uczestniczą w wytwarzaniu krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) propionianu, maślanu i octanu, które wykazują w jelitach silne działanie przeciwzapalne [119].

Styl odżywiania i skład pożywienia osób zamieszkujących kraje Europy Zachodniej i Stany Zjednoczone są uboższe w błonnik, co wpływa na ilość SCFA. Być może również dieta modyfikując skład mikrobiomu, wpływa na różnice w ilości zachorowań na szpiczaka plazmocytozowego w różnych częściach świata.

Rola flory bakteryjnej pacjentów chorujących na różne nowotwory, w tym na szpiczaka plazmocytozowego, nie jest dokładnie poznana, nie są znane różnice w składzie mikroflory jelitowej pomiędzy osobami zdrowymi a chorymi na świeżo rozpoznanego szpiczaka plazmocytozowego. Wykazanie takich różnic może być impulsem do dalszych badań wpływu mikrobiomu jelitowego na rozwój szpiczaka.

Na uwagę zasługuje fakt, że prezentowane przeze mnie doświadczenie jest badaniem pionierskim. Jest to pierwsza analiza obejmująca tak dużą polską populację pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytozowym i porównującą mikrobiom osób zdrowych i chorych, jeszcze przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego.

7.1. Różnice mikrobiomu pomiędzy osobami chorymi na NDMM a zdrowymi oceniane w oparciu o beta-różnorodność i ich możliwe znaczenie kliniczne

Uzyskane przeze mnie wyniki wykazują różnice we względnej obfitości występowania określonych taksonów w mikrobiomie jelitowym osób zdrowych i z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytozowym, i różnice te są istotne statystyczne. We wszystkich zaprezentowanych rodzinach i rodzajach bakterii obserwowano mniejszą względną obfitość w grupie chorych w porównaniu do grupy zdrowych

Wykazano różnice wśród bakterii zaliczanych do rodzin:

1. Peptostreptococcaceae ($p < 0.0163$)
2. Lachnospiraceae ($p = 0.016$)

3. Staphylococcaceae ($p= 0.01$)

Ponadto wykazano istotne statystycznie różnice w zakresie obfitości względnej w następujących rodzajach bakterii (wg taksonomii są to najbardziej dokładnie scharakteryzowane bakterie)

1. Lachnospiraceae UCG-008 ($p < 0.001$)
2. Erysipelotrichaceae UCG-003 ($p = 0.0015$)
3. Anaerostipes ($p < 0.001$)

Różnice w obfitości względnej będące na granicy istotności statystycznej znaleziono dla następujących taksonów

1. Alcaligenaceae,
2. Ruminococcaceae,
3. Streptococcaceae,

Prezentowane wyniki są pierwszymi opracowaniami zmian we względnej obfitości bakterii, przeprowadzonych na populacji polskiej

7.1.1. Rodzina Peptostreptococcaceae

Peptostreptococcaceae to rodzina bakterii Gram-dodatnich zaliczanych do klasy Clostridia. Według dostępnej literatury rodzina Peptostreptococcaceae jest uważana za bakterie komensalne, a jej udział w mikroflorze zdrowych organizmów jest wyższy niż u pacjentów z dysbiozą mikroflory jelitowej. Jako bakterie komensalne Peptostreptococcaceae biorą udział w utrzymaniu homeostazy jelitowej [120].

W przeprowadzonych badaniach wykazano istotnie statystyczną różnicę w obfitości względnej wśród rodziny Peptostreptococcaceae ($p < 0.0163$) wśród pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytowym, była ona mniejsza w porównaniu do osób zdrowych.

Podobne obserwacje dotyczą pacjentów z chorobą Leśniewskiego-Crohna [121] Co ciekawe w badaniach dotyczących chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego obserwowano znacznie liczniej występujące populacje bakterii z rodziny Peptostreptococcaceae [122]. Qin i wsp. w swoim badaniu klinicznym (NCT03244605) stwierdzili, że ilość Peptostreptococcaceae była znacznie mniejsza u pacjentów z gruczolakorakiem płuc w porównaniu do osób zdrowych. Nie wykazali jednak różnic w zawartości tej bakterii między różnymi stadiami gruczolakoraka: hiperplazja/rak in situ, minimalnie inwazyjny gruczolakorak i rak inwazyjny [123].

W badaniach dotyczących wpływu mikrobioty na występowanie nowotworu wymienia się m.in. Peptostreptococcus anaerobius jako bakterię sprzyjającą powstawaniu nowotworu przez zwiększanie produkcji wolnych rodników tlenowych w jelicie [124].

Ciekawe badanie przeprowadzono wśród pacjentów poddawanych procedurze CAR-T. Pacjenci byli dorosłymi biorcami komórek CAR T, którzy różnili się pod względem schematu kondycjonowania, konstrukcji CAR i podstawowej diagnozy, która obejmowała hematologiczne i lite nowotwory złośliwe. Badanie wykazało zwiększoną reprezentację taksonów bakterii w mikrobiomie pacjentów, którzy osiągnęli całkowitą remisję w porównaniu z tymi, którzy jej nie osiągnęli. Oscillospiraceae, Ruminococcaceae i Lachnospiraceae były wzbogacone u pacjentów z całkowitą remisją, a Peptostreptococcaceae były bardziej obfite u pacjentów, którzy nie osiągnęli całkowitej remisji [63].

W badaniu z 2021 roku obserwowano zaburzenia w składzie mikrobiomu dotyczące pacjentów z rozpoznaną SCD (Sickle Cell Disease, niedokrwistość sierpowatokrwinkowa) w porównaniu do próby kontrolnej (osoby zdrowe), obfitość Peptostreptococcaceae była większa u chorych z SCD.

Biorąc pod uwagę powyższe nie można jednoznacznie określić jaką rolę pełnią Peptostreptococcaceae w patogenezie nowotworów, w tym w patogenezie szpiczaka plazmocytozy i konieczne są dalsze badania w tym kierunku.

7.1.2. Rodzina Lachnospiraceae.

Lachnospiraceae to rodzina bakterii bezwzględnie beztlenowych, które uczestniczą w powstawaniu krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych. Bakterie zaliczane do Lachnospiraceae hydrolizują skrobię i inne cukry w celu wytworzenia maślanu i innych SCFA [125].

Lachnospiraceae są bakteriami izolowanymi z materiału pochodzącego od niemowląt, ich występowanie można potwierdzić nawet w smółce [126].

Jak wynika z danych z piśmiennictwa zaburzenia występujące między innymi w taksonie Lachnospiraceae wykazano u pacjentów z niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (NAFLD, non-alcoholic liver disease) i u chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc [127].

Pleiotropowy wpływ metabolizmu bakterii zaliczanych do taksonu Lachnospiraceae na organizm ludzki nie jest do końca znany. Istnieją doniesienia na temat roli Lachnospiraceae u osób z chorobą Parkinsona [128]. W przedstawionej publikacji wykazano redukcję taksonów bakteryjnych, które są powiązane z działaniem przeciwzapalnym/neuroprotektoryjnym, w tym szczególnie w rodzinie Lachnospiraceae.

W dostępnym piśmiennictwie przedstawiono wpływ mikrobiomu jelitowego a szczególnie bakterii z rodziny Lachnospiraceae na aGVHD (Acute graft-versus-host disease, ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi) [129]. W pracy opublikowanej w Blood Advances w 2020r

udowodniono związek niektórych bakterii (w tym bakterii z rodziny Lachnospiraceae) z klinicznym przebiegiem aGVHD [130].

Ponadto u pacjentów z aGvHD wykazano krytyczne zmniejszenie stężenia głównych SFCA: octanu (75,8%), propionianu (95,8%) i maślanu (94,6%). Tak więc bakterie zaangażowane w metabolizm krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych mogą mieć potencjalny związek z rozwojem aGvHD.

Znaczenie Lachnospiraceae podnoszone była również w kontekście rozrostów hematologicznych. Ich rola w patogenezie szpiczaka plazmocytoowego jest w trakcie intensywnych badań. Dowiedziono, że SCFA odgrywają kluczową rolę w regulacji i modulacji immunologicznej poprzez szlaki sygnałowe, molekuly hamujące produkcję prozapalnych cytokin np. TNF-a [131]. W moich badaniach względna obfitość rodziny Lachnospiraceae była również istotnie mniejsza w porównaniu z oznaczeniami w grupie osób zdrowych ($p=0.016$)

7.1.3.Rodzina Staphylococcaceae,

W przeprowadzonej analizie bioinformatycznej uzyskano różnicę w obfitości względnej pomiędzy osobami zdrowymi, a osobami z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytoowym również wśród bakterii zaliczanych do rodziny Staphylococcaceae, uzyskując istotność statystyczną na poziomie $p = 0.01$. U pacjentów z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytoowym obserwowano mniejszą obfitość względną wśród bakterii należących do rodziny Staphylococcaceae w stosunku do osób zdrowych.

Staphylococcaceae to rodzina bakterii Gram-dodatnich. Swoim kształtem bakterie te przypominają formy kuliste (inne powszechnie spotykane określenia to ziarniniaki, ziarenkowe). Rodzina ta zawiera w sobie klinicznie istotny rodzaj - Staphylococcus (gronkowiec), który stanowi zarówno część flory bakteryjnej organizmu ludzkiego, ale równocześnie stanowi trudny klinicznie problem między innymi jest przyczyną zakażeń szpitalnych [132,133].

Bakterie należące do rodziny Staphylococcaceae są często powodem infekcji o trudnym klinicznie przebiegu [134]. Bakterie należące do Staphylococcaceae stanowią również problem kliniczny spotykany wśród pacjentów hospitalizowanych na oddziałach hematologicznych [134].

Podczas procedury allo-HSCT obserwowana jest dysbioza mikroflory u pacjentów poddanych procedurze przeszczepowej, objawiająca się zmianą składu mikroflory. Istnieją doniesienia, że Rodzina Staphylococcaceae jest bardziej powszechna wśród osób z rozpoznaniem aGVHD [135]. Dodatkowo sugerowano wzrost obfitości występowania Rodziny Staphylococcaceae u pacjentów z wczesnymi objawami aGVHD, co być może stanowić marker występowania tej choroby [136].

Jednak rola *Staphylococcaceae* w rozwoju szpiczaka plazmocytoowego jest jeszcze słabo poznana i wymaga dalszych badań populacyjnych.

7.1.4 Rodzaj *Lachnospiraceae* UCG-008

Lachnospiraceae należą do podstawowych bakterii mikrobioty jelitowej, kolonizują światło jelita od urodzenia, a ich różnorodność gatunkowa zwiększa się wraz z wiekiem gospodarza. Chociaż bakterie z rodzaju *Lachnospiraceae* są jednymi z głównych producentów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, różne gatunki *Lachnospiraceae* są również związane z różnymi chorobami wewnątrz- i pozajelitowymi. Biorąc pod uwagę dotychczasowe doniesienia wpływ *Lachnospiraceae* na fizjologię gospodarza nie jest do końca jasny [137].

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotną statystycznie różnicę obfitości względnej bakterii należących do Rodzaju *Lachnospiraceae* UCG-008 u pacjentów z MM w porównaniu do grupy kontrolnej, wśród pacjentów z MM względna obfitość *Lachnospiraceae* była mniejsza niż w grupie kontrolnej. W przeglądzie literatury dane na temat rodzaju *Lachnospiraceae* UCG-008 są skąpe.

W badaniu przeprowadzonym wśród pacjentów z Chin z rozpoznaną marskością wątroby wykazano, że względna obfitość *Lachnospiraceae* UCG-008 była mniejsza u chorych z marskością wątroby w porównaniu do grupy kontrolnej składającej się ze zdrowych ochotników. Dodatkowo we wspomnianym badaniu oceniano mikrobiom osób z marskością wątroby i rakiem wątrobowokomórkowym, obserwacje dotyczące tej grupy chorych były podobne, co nie wydaje się być zaskakujące, biorąc pod uwagę historię naturalną marskości wątroby [138].

W 2023 roku opublikowano pilotażowe badanie dotyczące zmęczenia jako objawu u pacjentów poddawanych chemioterapii z powodu raka płuc. W badaniu tym wykazano, że wśród pacjentów z łagodną postacią zmęczenia związanego z rakiem obfitość *Lachnospiraceae* UCG-008 była większa niż w grupie osób z ciężką postacią tego schorzenia [139].

W innym z doniesień przebadano próbki kału pochodzące od 20 pacjentów chorujących na zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK, choroba Bechterewa, ankylosing spondylitis) oraz od osób zdrowych [140]. Badano zmienność składu, obfitość i różnorodność mikrobiomu w próbkach poddanych analizie. Omawiane badanie miało na celu wykazanie związku między paleniem tytoniu, terapią inhibitorami TNF- α (anty-tumor necrosis factor α) i dynamicznymi zmianami mikroflory jelitowej u pacjentów z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa. W badaniu zaobserwowano zwiększoną względną obfitość mikrobiomu u osób palących z

rozpoznanym zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa dotyczącą między innymi rodzaju Lachnospiraceae UCG-008 niż u osób z rozpoznanym zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa niepalących.

W jednym z badań przeprowadzonych na modelu krowim, który polegało na ingerencji w ich dietę i karmieniu ich specjalnie przygotowaną do tego mieszanką, wykazano, że odpowiednie mieszanki zwiększyły bogactwo i różnorodność bakterii, w tym względną obfitość bakterii celulolitycznych, do których zaliczyć można Lachnospiraceae UCG-008 [141].

Powyżej omówione doniesienia oraz wyniki przeprowadzonych badań mogą dowodzić, że wśród pacjentów z chorobami nowotworowymi względna obfitość Lachnospiraceae UCG-008 jest mniejsza. Wśród SCFA produkowanych przez Lachnospiraceae, maślan jest związany z utrzymaniem integralności nabłonka jelitowego. Rodziny Firmicutes należące do Lachnospiraceae i Ruminococcaceae są kluczowymi taksonami bakterii produkujących maślan. Ponadto maślan może indukować różnicowanie komórek regulatorowych T i kontrolować stan zapalny jelit, co może zmniejszać ryzyko wystąpienia nieswoistego zapalenia jelit lub raka jelita grubego. Nie można wykluczyć podobnych interakcji zachodzących w innym nowotworach, np. MM.

Brakuje jednak dokładnych danych na temat rodzaju Lachnospiraceae UCG-008. Dalsze badania tego rodzaju w kontekście chorych na szpiczaka plazmocytozy są konieczne.

7.1.5. Rodzaj Erysipelotrichaceae UCG-003

Bakterie należące do rodzaju Erysipelotrichaceae są powszechne w jelitach człowieka. Erysipelotrichaceae to rodzina bakterii Gram-dodatnich.

Liu i wsp. wykazali, że Erysipelotrichaceae UCG-003 jest jedną z głównych bakterii produkujących maślan [142].

W dostępnym piśmiennictwie szerzej opisywany jest takson umieszczony wyżej w rankingu taksonomicznym, czyli rodzina Erysipelotrichaceae, brak jest natomiast opracowań dotyczących rodzaju Erysipelotrichaceae UCG-003, w szczególności udziału bakterii rodzaju Erysipelotrichaceae UCG-003 w rozrostach hematologicznych.

Dinh, D. M i wsp. doniósł, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy względną obfitością bakterii z rodziny Erysipelotrichaceae, a stężeniem interleukiny 1- β (która jest uznanym markerem stanu zapalnego) u osób zakażonych HIV [143]. Labbé wykazał zmiany w składzie mikroflory jelitowej obejmujące między innymi bakterie należących do rodziny Erysipelotrichaceae u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit (inflammatory bowel disease, IBD) lub zwierzęcych

modelach IBD, jednak rola Erysipelotrichaceae w mikrobiomie jelitowym nadal pozostaje niejasna, a wnioski pozostają niespójne [144].

W pracy dotyczącej porównania składu mikrobiomu opublikowanej w 2021 roku wykazano, że obfitość między innymi rodzaju Erysipelotrichaceae UCG-003 była znacznie większa w grupie osób zdrowych w porównaniu do grupy z rozpoznaniem nowotworem płuc [145]. Dodatkowo obserwowano większą obfitość omawianego rodzaju Erysipelotrichaceae-UCG003 wśród osób z rozpoznaniem nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do osób zdrowych [146]. W pracy opublikowanej w Scientific Reports w 2022 roku przedstawiono różnorodność i skład mikroflory jelitowej wyizolowanej od pacjentów z chorobą Alzheimera (AD, Alzheimer Disease) oraz od zdrowych seniorów, próbki pochodziły z miasta Nur-Sultan (Kazachstan). Badania wykazały istotną statystycznie mniejszą pulę bakterii rodzaju Erysipelotrichaceae UCG – 003 w populacji chorych w porównaniu do zdrowych, a różnica była statystycznie istotna [147].

Znaczenie bakterii Erysipelotrichaceae UCG- 003 było oceniane w kontekście potencjalnego udziału w zwyrodnieniowych chorobach ośrodkowego układu nerwowego. Badania wykazały mniejszą obfitość względną bakterii należących do bakterii zaangażowanych w produkcję krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych, takich jak: Butyricoccus, Fusicatenibacter, Lachnospiraceae ND3007 oraz omawianego taksonu Erysipelotrichaceae UCG-003 w grupie osób z chorobą Parkinsona w porównaniu do grupy kontrolnej [148]. W przeglądzie literatury brakuje informacji na temat roli Erysipelotrichaceae UCG- 003 w rozwoju szpiczaka plazmocytozy, oraz badań oceniających wpływ tego taksonu na wyniki leczenia przeciwnowotworowego. W moich badaniach wykazałem że w grupie chorych względna obfitość bakterii zaliczanych do rodzaju Erysipelotrichaceae UCG-003 była istotnie mniejsza w porównaniu do osób zdrowych ($p= 0.0015$). Biorąc pod uwagę fakt, że istotne różnice we względnej obfitości bakterii dotyczą taksonu zaangażowanego w wytwarzanie krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych, uzyskane przeze mnie wyniki badań mogą się przekładać na ważną informację kliniczną.

7.1.6. Rodzaj *Anaerostipes*.

Rodzaj *Anaerostipes* należy do gram dodatnich i beztlenowych bakterii z rodziny Lachnospiraceae (rodzinnie Lachnospiraceae została omówiona w pkt 7.1.1.) . Bakterie zaliczane do *Anaerostipes* wytwarzają propionian i maślan. *Anaerostipes* stanowią około 2% całego mikrobiomu jelitowego , rodzaj *Anaerostipes* jest zaliczany do piętnastu najliczniej występujących rodzajów w ludzkim mikrobiomie jelitowym. Oznacza to, że zaburzenia w ilości tych mikroorganizmów mogą być kluczowe w metabolizmie krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych i ich plejotropowego działania na ludzki organizm [149,150] . Wykazano ponadto, że bakterie z rodzaju *Anaerostipes* są zdolne do interakcji z innymi drobnoustrojami o różnych zdolnościach katabolicznych, które wytwarzają mleczan [151].

Znaczenie bakterii z rodzaju *Anaerostipes* było oceniane w różnych aspektach zdrowia i funkcjonowania mikrobiomu jelitowego. Badania wykazały między innymi zaburzenia w składzie mikrobiomu dotyczące *Anaerostipes* u dzieci z otyłością, u osób cierpiących na chorobę Crohna, chorych na nowo zdiagnozowaną cukrzycę typu 1 (Type 1 diabetes mellitus, T1DM) [152,153,154].

W ostatnim czasie pojawiły się publikacje informujące, że liczebność *Anaerostipes* była znacznie zmniejszona u pacjentów pochodzenia afrykańskiego i europejskiego z cukrzycą typu 2 [155, 156].

Autorzy chińscy przedstawili badania w których dowiedli, że bakterie z rodzaju *Anaerostipes* poprzez wytwarzanie kwasu masłowego mogą chronić przed rozwojem między innymi nowotworu okrężnicy u ludzi [157].

W moich badaniach wykazałem zaburzenia w obfitości względnej w taksonie *Anaerostipes* między osobami chorymi i zdrowymi. U pacjentów z nowo rozpoznany szpiczakiem plazmocytowym stwierdziłem istotnie mniejszą obfitość względną *Anaerostipes* ($p < 0.001$) .

Wykazane różnice w składzie mikrobiomu osób zdrowych i chorych mogą być pochodną różnych modeli odżywiania, różnych rodzajów diety oraz preferencji kulinarnych. Istnieją prace w których sugeruje się, że dieta wegetariańska, prawdopodobnie z uwagi na jej skład i specyficzne składniki, może wpływać na mikrobiom jelitowy i przyczyniać się do zwiększenia populacji *Anaerostipes* [158].

W innym opracowaniu doniesiono, że zawarte szczególnie obficie w diecie wegetariańskiej fitinyiany mogą zwiększać liczebność bakterii z Rodzaju *Anaerostipes* [158].

Wykazano również pozytywny związek wytwarzania proponianu w kale ludzi po zastosowaniu 3- miesięcznej diety śródziemnomorskiej [158].

W świetle przedstawionych badań należy podkreślić, że właściwa dieta może niwelować zaburzenia mikrobiomu jelitowego, a tym samym mieć hamujący wpływ na rozwój wielu chorób w tym chorób nowotworowych. Dieta, wpływając na promowanie pewnych określonych taksonów bakterii zaburza zapewne w sposób zarówno jakościowy, jak i ilościowy inne taksony występujące w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Metabolizm organizmów zasiedlających przewód pokarmowy ma wpływ na stężenia niektórych hormonów w organizmie, może również za pomocą metabolitów generowanych przez mikrobiom wpływać na nastrój (w tym na zaburzenia nastroju), zaburzenia funkcji poznawczych i na odczuwanie bólu lub lęku, a także jest notowany w anoreksji czy autyzmie [159, 160].

7.2. Inne Rodziny bakterii - na granicy istotności statystycznej

7.2.1. Rodzina Alcaligenaceae

W pracy opublikowanej w 2018 roku w *Hypertension Research (Nature)* wykazano zmiany w mikrobiomie jelitowym, w zakresie obfitości względnej dotyczące bakterii z rodziny Alcaligenaceae. Badania wykazały, że była ona zmniejszona u osób z obniżoną wydolnością wysiłkową [161].

W pracy opublikowanej w 2019 roku dotyczącej badania przeprowadzonego na modelu zwierzęcym (model myszy C57BL/6J) wykazano korelację pomiędzy liczebnością bakterii z rodziny Alcaligenaceae w kale, a stosowaną dietą i rozwojem niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) [162].

W zaprezentowanych przykładach opisywano związek między występowaniem Alcaligenaceae a określonymi stanami klinicznymi w kardiologii czy gastroenterologii, dostępne są też badania pokazujące potencjalny wpływ tego taksonu na choroby nerek. W pracy z 2021 roku przedstawiono potencjalny związek między występowaniem bakterii Alcaligenaceae u dorosłych pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym względem określonych parametrów klinicznych [163]. Dodatkowo zmiany w składzie mikrobiomu jelitowego dotyczące rodziny bakterii Alcaligenaceae opisywane były również w encefalopatii wątrobowej [164].

W dostępnym piśmiennictwie brak jest odniesienia do udziału bakterii Alcaligenaceae w rozwoju chorób nowotworowych, w szczególności dyskrazji plazmocytowych. Wyniki prezentowanej przeze mnie pracy są pierwszymi opracowaniami tego taksonu u chorych na MM i wskazują na zmniejszoną obfitość względną tych bakterii w grupie chorych ($p=0.08$).

7.2.2 Rodzina Ruminococcaceae.

Potencjalne zaburzenia w obfitości względnej dotyczą kolejnej rodziny bakterii-Ruminococcaceae które w jelicie człowieka uczestniczą w produkcji krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych.. Trzeba podkreślić, że bakterie z rodziny Lachnospiraceae oraz bakterie z rodziny Ruminococcaceae są bakteriami głównie wytwarzającymi maślan w ludzkiej okrężnicy.

Badania przeprowadzone na modelu kocim wykazują, różnice między kałem kotów zdrowych a kotów z przewlekłą enteropatią (chronic enteropathy CE) [165].

W przeglądzie literatury dostępna jest informacja dotycząca potencjalnego wykorzystania omawianego taksonu wśród pacjentów zmagających się z chorobą nowotworową. W pracy opublikowanej w 2018 roku w Science postuluje się, że względna obfitość bakterii z rodziny Ruminococcaceae miała wpływ na zastosowaną immunoterapię cząsteczkami skierowanymi przeciwko receptorom programowanej śmierci komórki- 1 (PD-1, programmed death-ligand 1) wśród pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem (melanoma) [166].

Doniesienia opublikowane w 2022 roku w Nature Medicine potwierdzają wpływ składu mikrobiomu z uwzględnieniem rodziny Ruminococcaceae na odpowiedź na zastosowane leczenie u pacjentów z czerniakiem leczonych anty-PD-1. Metaanaliza i inne analizy bioinformatyczne połączonych danych pokazują, że bakterie związane z korzystną odpowiedzią na zastosowane leczenie są związane z bakteriami należącymi do taksonu Actinobacteria i rodzin Lachnospiraceae / Ruminococcaceae [167].

Moje badania wykazały, że występują różnice w obfitości względnej w taksonie Ruminococcaceae i są to różnice na granicy istotności statystycznej ($p=0.094$). Tak więc jest to kolejny takson, odpowiedzialny za produkcję krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych, którego występowanie jest ograniczone.

Rola krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych u pacjentów chorujących na szpiczaka plazmocytoowego pozostaje niejasna, lecz prezentowane badanie pokazuje, że dalsza analiza jest potrzebna do ustalenia ich wpływu na odpowiedź immunologiczną.

7.2.3. Rodzina Streptococcaceae

W prezentowanych wynikach dotyczących polskiej populacji wykazano również różnicę w obfitości względnej wśród bakterii gram dodatnich z rodziny Streptococcaceae. Prezentowana rodzina bakterii może mieć wpływ na wyniki leczenia pacjentów chorujących na czerniaka, z zastosowaniem leków należących do anty-PD-1 [167].

Dodatkowo rola bakterii z tego taksonu była poruszana w kontekście chorób gastroenterologicznych [168]. Dyskutuje się rolę bakterii z rodziny Streptococcaceae u chorych na dyskrazje plazmocytoowe [169].

8. Podsumowanie

Mikroflora jelitowa ma kluczowe znaczenie w regulowaniu funkcji układu odpornościowego i może mieć znaczącą rolę w patogenezie i progresji szpiczaka plazmocytozy, poprzez wpływ na stan zapalny, szlaki sygnałowe i metabolizm gospodarza. Metabolity drobnoustrojów jelitowych, w tym najlepiej poznane SCFA modyfikują odporność gospodarza i mogą mieć wpływ na wyniki leczenia chorych na MM. Mimo ważnej roli mikroflory jelitowej w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, różnice w składzie jakościowym i ilościowym mikrobiomu jelitowego pomiędzy chorymi a zdrowymi, osobami stosującymi różne diety i wywodzącymi się z różnych regionów kulturowych, wymagają dalszych szeroko zakrojonych analiz. W nurt tych badań wpisuje się obecna praca w której wykazano różnicę w beta- różnorodności w składzie mikrobiomu osób zdrowych i chorujących na szpiczaka plazmocytozy

W analizie danych wykazano różnice istotne statystycznie wśród bakterii zaliczanych do rodzin:

- Peptostreptococcaceae ($p < 0.0163$)
- Lachnospiraceae ($p = 0.016$)
- Staphylococcaceae ($p = 0.01$)

Dodatkowo wykazano różnice w obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do rodzaju:

- Lachnospiraceae UCG-008 ($p << 0.001$)
- Erysipelotrichaceae UCG-003 ($p = 0.0015$).
- Anaerostipes ($p << 0.001$).

Obfitość względna wymienionych bakterii była istotnie mniejsza w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych. Wymienione Rodziny i grupy bakterii uczestniczą między innymi w metabolizmie krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych i przez to wpływają na układ immunologiczny gospodarza.

Zaprezentowano po raz pierwszy badanie mikrobiomu jelitowego estymowanego na populacji polskiej chorych na szpiczaka plazmocytozy. Wykazane różnice w porównaniu do polskiej populacji osób zdrowych mogą mieć potencjalne znaczenie dla rozwoju i leczenia chorych na szpiczaka plazmocytozy.

9. Wnioski i spostrzeżenia

Wnioski

1. Mikrobiom chorych na świeżo zdiagnozowanego szpiczaka plazmocytoowego i mikrobiom osób zdrowych różnią się w aspekcie różnorodności beta
2. Różnice pomiędzy mikrobiomami chorych na NDMM i zdrowych występują w każdej z 4 podstawowych metryk: Jaccard, Bray-Curtis, Unweighted-unifrac, Weighted-unifrac
3. Określone taksony występują w różnej obfitości w mikrobiomie jelitowym osób zdrowych i chorych z rozpoznaniem szpiczakiem plazmocytoowym . Różnice w obfitości względnej występują na różnych poziomach taksonomicznych.
4. Rodziny bakterii które wykazują różnice względnej obfitości pomiędzy chorymi i zdrowymi są następujące: Peptostreptococcaceae, Lachnospiraceae, Staphylococcaceae. Rodzaje bakterii wykazujące różnice we względnej obfitości wykazano wśród bakterii należących do : Lachnospiraceae UCG-008, Erysipelotrichaceae UCG-003 , Anaerostipes
5. W mikrobiomie osób chorych i zdrowych występują różnice w obfitości względnej pomiędzy bakteriami uczestniczącymi w metabolizmie krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych .
6. Mikrobiom chorych na świeżo zdiagnozowanego szpiczaka plazmocytoowego i mikrobiom osób zdrowych nie różnią się w aspekcie różnorodności alfa , w żadnej z czterech podstawowych miar: Indeks Shannon, Pielou's Evenness, Observed Features (OF), Faith's Phylogenetic Diversity (PD).

Spostrzeżenia

1. Jest to pierwsza analiza populacji polskiej porównującą mikrobiom osób zdrowych i chorych na NDMM, jeszcze przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego. Prezentowane wyniki są pierwszym opracowaniem zmian we względnej obfitości bakterii w polskiej populacji.
2. Zmiany względnej obfitości wśród bakterii Gatunku Erysipelotrichaceae UCG-003 mogą mieć znaczenie w rozwoju stanów zapalnych jelit chorych na MM.

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 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 istotne 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 ($p < 0.0163$)

-Lachnospiraceae ($p = 0.016$)

-Staphylococcaceae ($p = 0.01$)

Za pomocą analizy ANCOM uzyskano informację na temat różnic w obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do rodzaju: Lachnospiraceae UCG-008 ($p \ll 0.001$) , Erysipelotrichaceae UCG-003 ($p = 0.0015$) oraz Anaerostipes ($p \ll 0.001$). 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 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 in 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 comparison 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 ($p < 0.0163$)

-Lachnospiraceae ($p < 0.016$)

-Staphylococcaceae ($p = 0.01$)

The ANCOM analysis obtained information on the differences in the taxa included in the genus: Lachnospiraceae UCG-008 ($p < 0.001$), 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.

12. Bibliografia:

1. Schmidt-Wolf, I. G. H., Glasmacher, A., Hahn-Ast, C., et al. (2006). Chromosomal aberrations in 130 patients with multiple myeloma studied by interphase FISH: diagnostic and prognostic relevance. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 167(1), 20–25. doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.10.016
2. Schilling, G., Dierlamm, J., Hossfeld, D. K. (2005). Prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of unknown significance. *Hematological Oncology*, 23(3–4), 102–107.
3. Solly, S. (1844). Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Medico-Chirurgical Transactions*, 27, 435-498.8.
4. Kyle, R. A. (2000). Multiple myeloma: an odyssey of discovery. *British Journal of Haematology*, 111(4), 1035–1044. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02318.x
5. Fleischer R. (1880), Ueber das Vorkommen des sogenannten Bence Jones'schen Eiweisskörpers im normalen Knochenmark. *Arch Pathol Anatom Physiol Klin Med*; 80: 842-849
6. Rustizky, J. (1873). Multiples Myelom. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie*, 3(1–2), 162–172. doi:10.1007/bf02911073
7. Korngold, L., Lipari, R. (1956). Multiple-myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gammaglobulin and multiple-myeloma serum proteins. *Cancer*, 9(2), 262–272.
8. SEER cancer statistics review, 1975-2016. (n.d.). Retrieved May 20, 2023, from SEER website: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/
9. Ludwig, H., Novis Durie, S., Meckl, A., et al. . (2020). Multiple myeloma incidence and mortality around the globe; interrelations between health access and quality, economic resources, and patient empowerment. *The oncologist*, 25(9), e1406-e1413.

10. Liu, J., Liu, W., Mi, L., et al. . (2019). Incidence and mortality of multiple myeloma in China, 2006–2016: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2016. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 1-7.
11. Giannopoulos, K. , Jamroziak, K., Usnarska-Zubkiewicz, L., et al. A. Zalecenia Polskiej Grupy Szpiczakowej dotyczące rozpoznawania i leczenia szpiczaka plazmocytoowego oraz innych dyskrazji plazmocytoowych na rok 2022/23.
12. Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A.,et al. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 15(12), e538-48.
13. Femand, J.-P., Bridoux, F., Dispenzieri, A., et al. (2018). Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel concept with therapeutic implications. *Blood*, 132(14), 1478–1485. doi:10.1182/blood-2018-04-839480
14. Hillengass, J., Usmani, S., Rajkumar, S. V., et al. (2019). International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *The Lancet Oncology*, 20(6), e302–e312.
15. Flores-Montero, J., Sanoja-Flores, L., Paiva, B., et al. (2017). Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, 31(10), 2094–2103.
16. Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J. J., Pepin, F., et al. (2014). Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*, 123(20), 3073–3079.
17. Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., et al. (2015). Revised International Staging System for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(26), 2863–2869.
18. Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K. C., et al. (2016). International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 17(8), e328–e346.

19. Porter, J. R. (1976). Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(2), 260–269.
20. Dobell, C. (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 13(sect_hist_med), 1–15.
21. Savage, D. C. (2001). Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2(1), 1–15.
22. Metchnikoff E (1901) *The Wilde Medal and Lecture of the Manchester Literary and Philosophical Society*. *Br Med J* 1:1027–1028.
23. Kendall, A. I. (1909). Some observations on the study of the intestinal bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 6(6), 499–507.
24. Hegstrand, L. R., Hine, R. J. (1986). Variations of brain histamine levels in germ-free and nephrectomized rats. *Neurochemical Research*, 11(2), 185–191.
25. Muniesa, M., Jofre, J. (2014). Identifying and analyzing bacteriophages in human fecal samples: what could we discover? *Future Microbiology*, 9(7), 879–886.
26. Kim, M.-S., Park, E.-J., Roh, S. W., et al. (2011). Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8062–8070.
27. Scarpellini, E., Ianiro, G., Attili, F., et al. (2015). The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 47(12), 1007–1012.
28. El-Sayed, A., Aleya, L., Kamel, M. (2021). The link among microbiota, epigenetics, and disease development. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(23), 28926–28964.
29. Grice, E. A., Segre, J. A. (2012). The human microbiome: Our second genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 13(1), 151–170.

30. Tremlett, H., Bauer, K. C., Appel-Cresswell, S., et al. (2017). The gut microbiome in human neurological disease: A review: Gut Microbiome. *Annals of Neurology*, 81(3), 369–382.
31. Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera-Rubio, R., et al. (2012). The oral metagenome in health and disease. *The ISME Journal*, 6(1), 46–56.
32. Koren, O., Spor, A., Felin, J., et al. (2011). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(supplement_1), 4592–4598.
33. Leishman, S. J., Do, H. L., Ford, P. J. (2010). Cardiovascular disease and the role of oral bacteria. *Journal of Oral Microbiology*, 2(1), 5781.
34. Patrakka, O., Pienimäki, J.-P., Tuomisto, S., et al. (2019). Oral bacterial signatures in cerebral thrombi of patients with acute ischemic stroke treated with thrombectomy. *Journal of the American Heart Association*, 8(11), e012330.
35. Dinleyici, E. C., Eren, M., Ozen, M., et al. (2012). Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(4), 395–410.
36. Aggarwal, S., Upadhyay, A., Shah, D., et al. (2014). Lactobacillus GG for treatment of acute childhood diarrhoea: an open labelled, randomized controlled trial. *The Indian Journal of Medical Research*, 139(3), 379–385.
37. Yu, H.-S., Lee, N.-K., Choi, A.-J., et al. (2019). Antagonistic and antioxidant effect of probiotic *Weissella cibaria* JW15. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 851–855.
38. Micenková, L., Bosák, J., Smatana, S., et al. (2020). Administration of the probiotic *Escherichia coli* strain A0 34/86 resulted in a stable colonization of the human intestine during the first year of life. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2), 343–350.
39. Botka, T., Pantůček, R., Mašlaňová, I., et al. (2019). Lytic and genomic properties of spontaneous host-range Kayvirus mutants prove their suitability for upgrading phage therapeutics against staphylococci. *Scientific Reports*, 9(1), 5475.

40. Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., et al. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*, *25*(5), 730–733.
41. Guo, M., Miao, M., Wang, Y., et al. (2020). Developmental differences in the intestinal microbiota of Chinese 1-year-old infants and 4-year-old children. *Scientific Reports*, *10*(1), 19470.
42. Claesson, M. J., Cusack, S., O’Sullivan, O., et al. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108 Suppl 1*(supplement_1), 4586–4591.
43. Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., et al. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology*, *16*(1), 90.
44. Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., et al. (2006). Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(2), 1027–1033.
45. Walton, G. E., Gibson, G. R., Hunter, K. A. (2021). Mechanisms linking the human gut microbiome to prophylactic and treatment strategies for COVID-19. *The British Journal of Nutrition*, *126*(2), 219–227.
46. Zimmermann, P., Curtis, N. (2020). Why is COVID-19 less severe in children? A review of the proposed mechanisms underlying the age-related difference in severity of SARS-CoV-2 infections. *Archives of Disease in Childhood*, *106*(5), 429–439.
47. Bongers, G., Pacer, M. E., Geraldino, T. H., et al. (2014). Interplay of host microbiota, genetic perturbations, and inflammation promotes local development of intestinal neoplasms in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(3), 457–472.
48. Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., et al. (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *302*(9), G966-78.

49. David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563.
50. Kim, M.-S., Hwang, S.-S., Park, E.-J., et al. (2013). Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation: Diet therapy, gut microbiota and metabolic diseases. *Environmental Microbiology Reports*, 5(5), 765–775.
51. Suzuki, T., Yoshida, S., Hara, H. (2008). Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *The British Journal of Nutrition*, 100(2), 297–305.
52. Borges-Canha, M., Portela-Cidade, J. P., Dinis-Ribeiro, M., et al. (2015). Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas: Organo Oficial de La Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, 107(11), 659–671.
53. Wu, K., Giovannucci, E., Byrne, C., et al. (2006). Meat mutagens and risk of distal colon adenoma in a cohort of U.S. men. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(6), 1120–1125.
54. Zhu, Y., Lin, X., Zhao, F., et al. (2015). Meat, dairy and plant proteins alter bacterial composition of rat gut bacteria. *Scientific Reports*, 5(1), 15220.
55. Lee, S., Lee, J., Choi, I. J., et al. (2018). Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids, the FADS gene, and the risk of gastric cancer in a Korean population. *Scientific Reports*, 8(1), 3823.
56. Volpato, M., Hull, M. A. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 37(2–3), 545–555.
57. Thun, M. J., Linet, M. S., Cerhan, J. R., et al. (2018). *Schottenfeld and Fraumeni cancer epidemiology and prevention* (M. Thun, M. S. Linet, J. R. Cerhan, C. A. Haiman, & D. Schottenfeld, Eds.). New York, NY: Oxford University Press.
58. Harris, R. E. (2016). *Global epidemiology of cancer* (Bartlett Learning, Ed.). Burlington, MA

59. Warren, R. L., Freeman, D. J., Pleasance, S., et al. (2013). Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*, 1(1), 16.
60. Lunn, R. M., Jahnke, G. D., Rabkin, C. S. (2017). Tumour virus epidemiology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1732).
61. Renuka, Dahiya, D. K. (2017). The gut virome: a neglected actor in colon cancer pathogenesis. *Future Microbiology*, 12(15), 1345–1348.
62. Corredoira, J., Alonso, M. P., Coira, A., et al. (2008). Characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis and its differences with *Streptococcus viridans* endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 27(4), 285–291.
63. Uribe-Herranz, M., Klein-González, N., Rodríguez-Lobato, L. G., et al. (2021). Gut Microbiota influence in hematological malignancies: From genesis to cure. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1026.
64. Hu, Y., Li, J., Ni, F., et al. (2022). CAR-T cell therapy-related cytokine release syndrome and therapeutic response is modulated by the gut microbiome in hematologic malignancies. *Nature Communications*, 13(1), 5313.
65. Asokan, S., Cullin, N., Stein-Thoeringer, C. K., et al. (2023). CAR-T cell therapy and the gut Microbiota. *Cancers*, 15(3), 794.
66. Kaźmierczak-Siedlecka, K., Skonieczna-Żydecka, K., Biliński, J., et al. (2021). Gut microbiome modulation and faecal Microbiota transplantation following allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancers*, 13(18), 4665.
67. D'Amico, F., Decembrino, N., Muratore, E., et al. (2022). Oral lactoferrin supplementation during induction chemotherapy promotes gut microbiome eubiosis in pediatric patients with hematologic malignancies. *Pharmaceutics*, 14(8).
68. Galloway-Peña, J. R., Shi, Y., Peterson, C. B., et al. (2020). Gut microbiome signatures are predictive of infectious risk following induction therapy for acute myeloid leukemia. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(1), 63–71.

69. Smith, M., Dai, A., Ghilardi, G., et al. (2022). Gut microbiome correlates of response and toxicity following anti-CD19 CAR T cell therapy. *Nature Medicine*, 28(4), 713–723.
70. Ternák, G., Berényi, K., Németh, B., et al. (2022). Association of antibiotic-consumption patterns with the prevalence of hematological malignancies in European countries. *Scientific Reports*, 12(1), 7821.
71. Rashidi, A., Kaiser, T., Graiziger, C., et al. (2020). Gut dysbiosis during antileukemia chemotherapy versus allogeneic hematopoietic cell transplantation: Dysbiosis in acute leukemia and HCT. *Cancer*, 126(7), 1434–1447.
72. Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., et al. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7493–7519.
73. Brown, E. M., Clardy, J., Xavier, R. J. (2023). Gut microbiome lipid metabolism and its impact on host physiology. *Cell Host & Microbe*, 31(2), 173–186.
74. Hossain, K. S., Amarasena, S., Mayengbam, S. (2022). B vitamins and their roles in gut health. *Microorganisms*, 10(6), 1168.
75. Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., et al. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, 14(4), 793–802.
76. Ponziani, F. R., Bhoori, S., Castelli, C., et al. (2019). Hepatocellular carcinoma is associated with gut Microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 69(1), 107–120.
77. Vitali, F., Colucci, R., Di Paola, M., et al. (2022). Early melanoma invasivity correlates with gut fungal and bacterial profiles. *The British Journal of Dermatology*, 186(1), 106–116.
78. Lione, L., Salvatori, E., Petrazzuolo, A., et al. (2021). Antitumor efficacy of a neoantigen cancer vaccine delivered by electroporation is influenced by microbiota composition. *Oncoimmunology*, 10(1), 1898832.
79. Ciabattini, A., Olivieri, R., Lazzeri, E., et al. (2019). Role of the Microbiota in the modulation of vaccine immune responses. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1305.

80. Wang, Y., Yang, Q., Zhu, Y., et al. (2022). Intestinal *Klebsiella pneumoniae* contributes to pneumonia by synthesizing glutamine in multiple myeloma. *Cancers*, *14*(17), 4188.
81. Khan, N., Lindner, S., Gomes, A. L. C., et al. (2021). Fecal microbiota diversity disruption and clinical outcomes after auto-HCT: a multicenter observational study. *Blood*, *137*(11), 1527–1537.
82. Jian, X., Zhu, Y., Ouyang, J., et al. (2020). Alterations of gut microbiome accelerate multiple myeloma progression by increasing the relative abundances of nitrogen-recycling bacteria. *Microbiome*, *8*(1), 74.
83. Taur, Y., Jenq, R. R., Perales, M.-A., et al. (2014). The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, *124*(7), 1174–1182.
84. Greco, R., Nitti, R., Mancini, N., et al. (2021). Microbiome markers are early predictors of acute GVHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*, *137*(11), 1556–1559.
85. Lederberg, J., McCray, A. T. (2001). Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. Genealogical Treasury of Words. *Scientist*, *15*(7).
86. Relman, D. A., Falkow, S. (2001). The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends in Microbiology*, *9*(5), 206–208.
87. Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., et al. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms-from past to present. *Microorganisms*, *7*(5), 130.
88. Winand, R., Bogaerts, B., Hoffman, S., et al. (2019). Targeting the 16s rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: Comparative evaluation of second (Illumina) and third (Oxford Nanopore Technologies) generation sequencing technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1), 298.
89. Rintala, A., Pietilä, S., Munukka, E., et al. (2017). Gut Microbiota analysis results are highly dependent on the 16S rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, *28*(1), 19–30.

90. Trylska, J. (2010). Budowa przestrzenna i działanie rybosomu bakteryjnego. Nagroda Nobla z chemii 2009. *Kosmos*, 59, 9–16.
91. Trotha, R., Hanck, T., König, W., et al. (2001). Rapid ribosequencing--an effective diagnostic tool for detecting microbial infection. *Infection*, 29(1), 12–16.
92. Poretsky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., et al. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One*, 9(4), e93827.
93. Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., et al. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(10), 908–934.
94. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857.
95. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10.
96. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., et al. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
97. Debelius, J. W., Robeson, M., Hugerth, L. W., et al. (2021). A comparison of approaches to scaffolding multiple regions along the 16S rRNA gene for improved resolution (p. 2021.03.23.436606).
98. Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., et al. (2018). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6(1), 17.
99. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590-6.
100. Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., et al. (2014). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D643-8.

101. Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., et al. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, 261, 169–176.
102. Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423.
103. Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61(1), 1–10.
104. Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131–144.
105. ETH-Bibliothek Zuerich. (n.d.). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. Retrieved May 29, 2023, from E-Periodica website: <https://www.e-periodica.ch/digbib/view?pid=bsv-002:1901:37::790>
106. Bray, J. R., Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349.
107. Lozupone, C., Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235.
108. Lozupone, C. A., Hamady, M., Kelley, S. T., et al. (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1576–1585.
109. Halko, N., Martinsson, P.-G., Shkolnisky, Y., et al. (2010). An algorithm for the principal component analysis of large data sets. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/1007.5510>
110. Mandal, S., Van Treuren, W., White, R. A., et al. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26(0), 27663.
111. Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(3), 90–95.
112. Waskom, M. (2021). seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021.

113. Ruff, W. E., Greiling, T. M., Kriegel, M. A. (2020). Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(9), 521–538.
114. Pei, Z., Xiaowei, W., Yajuan, L., et al. (2021). Exploring the characteristics of intestinal Microbiota in hematologic malignancy patients via 16s rDNA high-throughput sequencing. *Clinical Laboratory*, 67(2).
115. Chua, L. L., Rajasuriar, R., Lim, Y. A. L., et al. (2020). Temporal changes in gut microbiota profile in children with acute lymphoblastic leukemia prior to commencement-, during-, and post-cessation of chemotherapy. *BMC Cancer*, 20(1), 151.
116. Jian, X., Zhu, Y., Ouyang, J., et al. (2020). Alterations of gut microbiome accelerate multiple myeloma progression by increasing the relative abundances of nitrogen-recycling bacteria. *Microbiome*, 8(1), 74.
117. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., et al. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230.
118. Lee, D. H., Fung, T. T., Tabung, F. K., et al. (2020). Prediagnosis dietary pattern and survival in patients with multiple myeloma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 147(7), 1823–1830.
119. Vernocchi, P., Del Chierico, F., Putignani, L. (2020). Gut Microbiota metabolism and interaction with food components. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3688.
120. Leng, Y., Yi, M., Fan, J., et al. (2016). Effects of acute intra-abdominal hypertension on multiple intestinal barrier functions in rats. *Scientific Reports*, 6(1), 22814.
121. Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., et al. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*, 66(5), 813–822.
122. Lavelle, A., Lennon, G., O'Sullivan, O., et al. (2015). Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers. *Gut*, 64(10), 1553–1561.
123. Qin, X., Bi, L., Yang, W., et al. (2022). Dysbiosis of the gut microbiome is associated with histopathology of lung cancer. *Frontiers in Microbiology*, 13, 918823.
124. Tsoi, H., Chu, E. S. H., Zhang, X., et al. (2017). Peptostreptococcus anaerobius induces intracellular cholesterol biosynthesis in colon cells to induce proliferation and causes dysplasia in mice. *Gastroenterology*, 152(6), 1419-1433.e5.

125. Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., (2013). Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*, 5(3), 627–640.
126. Sohn, K., Underwood, M. A. (2017). Prenatal and postnatal administration of prebiotics and probiotics. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 22(5), 284–289.
127. Shen, F., Zheng, R.-D., Sun, X.-Q., et al. (2017). Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT*, 16(4), 375–381.
128. Vascellari, S., Palmas, V., Melis, M., et al. (2020). Gut Microbiota and metabolome alterations associated with Parkinson's disease. *MSystems*, 5(5).
129. Han, L., Jin, H., Zhou, L., et al. (2018). Intestinal Microbiota at engraftment influence acute graft-versus-host disease via the Treg/Th17 balance in Allo-HSCT recipients. *Frontiers in Immunology*, 9, 669.
130. Payen, M., Nicolis, I., Robin, M., et al. (2020). Functional and phylogenetic alterations in gut microbiome are linked to graft-versus-host disease severity. *Blood Advances*, 4(9), 1824–1832.
131. Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., et al. (2021). SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), 37–49.
132. Stasiak, M., Lasek J., Witkowski, Z., et al. (2012), Zakażenia skóry i tkanek miękkich—złożony i aktualny problem diagnostyczny i terapeutyczny lekarza każdej specjalności medycznej. *Forum Medycyny Rodzinnej*. Vol. 6. No. 4.
133. Montewka, M., Skrzek A., Plewik D., et al. "Zakażenia miejsca operowanego—charakterystyka czynników ryzyka, endogennych źródeł zakażenia i metody zapobiegania." *Post Mikrobiol* 51.3 (2012): 227-235.
134. Styczyński, J., Jachna-Sawicka, K., Czyżewski, K., et al. (2015). Zakażenia gronkowcowe u dzieci z chorobami nowotworowymi lub poddawanych przeszczepieniu komórek krwiotwórczych. *Pediatrics Polska*, 90(1), 26-31.
135. Lin, D., Hu, B., Li, P., et al. (2021). Roles of the intestinal microbiota and microbial metabolites in acute GVHD. *Experimental Hematology & Oncology*, 10, 1-19.

136. Mancini, N., Greco, R., Pasciuta, R., et al. (2017). Enteric microbiome markers as early predictors of clinical outcome in allogeneic hematopoietic stem cell transplant: results of a prospective study in adult patients. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 4, No. 4, p. ofx215). US: Oxford University Press.
137. Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., et al. (2020). The controversial role of human gut lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 573.
138. Zhang, H., Wu, J., Liu, Y., et al. (2023). Identification reproducible microbiota biomarkers for the diagnosis of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *AMB Express*, 13(1), 1-14.
139. Wei, H., Xie, L., Zhao, Y., et al. (2023). Diverse gut microbiota pattern between mild and severe cancer-related fatigue in lung cancer patients treated with first-line chemotherapy: A pilot study. *Thoracic Cancer*, 14(3), 309-319.
140. Zhang, F., Ma, C., Zhang, B., et al. (2020). Dynamic changes in gut microbiota under the influence of smoking and TNF- α -blocker in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical Rheumatology*, 39, 2653-2661.
141. Wang, Y., Nan, X., Zhao, Y., et al. (2021). Ruminal degradation of rumen-protected glucose influences the ruminal microbiota and metabolites in early-lactation dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2), e01908-20.
142. Liu, S., Li, E., Sun, Z., et al. (2019). Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Scientific reports*, 9(1), 287.
143. Dinh, D. M., Volpe, G. E., Duffalo, C., et al. (2015). Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *The Journal of infectious diseases*, 211(1), 19-27.
144. Labbé, A., Ganopolsky, J. G., Martoni, C. J., et al. (2014). Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PloS one*, 9(12), e115175.
145. Zhao, F., An, R., Wang, L., et al. (2021). Specific gut microbiome and serum metabolome changes in lung cancer patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 725284.

146. Louca, P., Nogal, A., Wells, P. M., et al. (2021). Gut microbiome diversity and composition is associated with hypertension in women. *Journal of hypertension*, 39(9), 1810.
147. Kaiyrylykyzy, A., Kozhakhmetov, S., Babenko, D., et al. (2022). Study of gut microbiota alterations in Alzheimer's dementia patients from Kazakhstan. *Scientific Reports*, 12(1), 15115.
148. Lubomski, M., Xu, X., Holmes, A. J., et al. (2022). The gut microbiome in Parkinson's disease: A longitudinal study of the impacts on disease progression and the use of device-assisted therapies. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 414.
149. Bui, T. P. N., de Vos, W. M., Plugge, C. M. (2014). *Anaerostipes rhamnosivorans* sp. nov., a human intestinal, butyrate-forming bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_3), 787-793.
150. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. doi:10.1038/nature09944
151. Belzer, C., Chia, L. W., Aalvink, S., et al. (2017). Microbial metabolic networks at the mucus layer lead to diet-independent butyrate and vitamin B12 production by intestinal symbionts. *MBio*, 8(5), e00770-17.
152. Yuan, X., Chen, R., McCormick, K. L., et al. (2021). The role of the gut microbiota on the metabolic status of obese children. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-13.
153. Lee, J. Y., Kang, W., Shin, N. R., et al. (2021). *Anaerostipes hominis* sp. nov., a novel butyrate-producing bacteria isolated from faeces of a patient with Crohn's disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(12), 005129.
154. Liu, X., Cheng, Y. W., Shao, L., et al. . (2021). Gut microbiota dysbiosis in Chinese children with type 1 diabetes mellitus: An observational study. *World Journal of Gastroenterology*, 27(19), 2394.
155. Doumatey, A. P., Adeyemo, A., Zhou, J., et al. (2020). Gut microbiome profiles are associated with type 2 diabetes in urban Africans. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 63.
156. Zeevi, D., Korem, T., Godneva, A., et al. (2019). Structural variation in the gut microbiome associates with host health. *Nature*, 568(7750), 43-48.

157. Ai, D., Pan, H., Li, X., et al. (2019). Identifying gut microbiota associated with colorectal cancer using a zero-inflated lognormal model. *Frontiers in microbiology*, *10*, 826.
158. Pagliai, G., Russo, E., Niccolai, E., et al. (2020). Influence of a 3-month low-calorie Mediterranean diet compared to the vegetarian diet on human gut microbiota and SCFA: The CARDIVEG Study. *European Journal of Nutrition*, *59*, 2011-2024.
159. Hornig, M. (2013). The role of microbes and autoimmunity in the pathogenesis of neuropsychiatric illness. *Current opinion in rheumatology*, *25*(4), 488-795.
160. Karakuła-Juchnowicz, H., Pankowicz, H., Juchnowicz, D., et al. (2018). Intestinal microbiota--a key to understanding the pathophysiology of anorexia nervosa?. *Psychiatria Polska*, *52*(5).
161. Yu, Y., Mao, G., Wang, J., et al. (2018). Gut dysbiosis is associated with the reduced exercise capacity of elderly patients with hypertension. *Hypertension Research*, *41*(12), 1036-1044.
162. Vitaglione, P., Mazzone, G., Lembo, V., et al. (2019). Coffee prevents fatty liver disease induced by a high-fat diet by modulating pathways of the gut–liver axis. *Journal of nutritional science*, *8*, e15.
163. He, H., Lin, M., You, L., et al. (2021). Gut microbiota profile in adult patients with idiopathic nephrotic syndrome. *BioMed Research International*, *2021*, 1-12.
164. Bajaj, J. S. (2014). The role of microbiota in hepatic encephalopathy. *Gut microbes*, *5*(3), 397-403.
165. Marsilio, S., Pilla, R., Sarawichitr, B., et al. (2019). Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Scientific reports*, *9*(1), 19208.
166. Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., et al. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*, *359*(6371), 91-97.
167. McCulloch, J. A., Davar, D., Rodrigues, R. R., et al. (2022). Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. *Nature Medicine*, *28*(3), 545-556.

168. Xun, Z., Zhang, Q., Xu, T., et al. (2018). Dysbiosis and ecotypes of the salivary microbiome associated with inflammatory bowel diseases and the assistance in diagnosis of diseases using oral bacterial profiles. *Frontiers in microbiology*, 9, 1136.

169. Jian, X., Zhu, Y., Ouyang, J., et al. (2020). Alterations of gut microbiome accelerate multiple myeloma progression by increasing the relative abundances of nitrogen-recycling bacteria. *Microbiome*, 8, 1-21.

13. Wykaz rycin i tabel.

13.1. Wykaz tabel:

Numer Strony	Numer Tabeli, Nazwa Tabeli.
16-17	1. Kryteria diagnostyczne MGUS, szpiczaka asymptotycznego, szpiczaka objawowego cechy CRAB SLIM (wg. IMWG, Rajkumar 2014)
21	2. Międzynarodowa klasyfikacja prognostyczna szpiczaka plazmocytoowego (International Staging System, ISS)
21	2a. Zrewidowany system prognostyczny R-ISS (Revised International Staging System) Tabela 4.Definicje odpowiedzi na leczenie wg ujednoliconych kryteriów IMWG.
22-23	3. Definicje odpowiedzi na leczenie wg ujednoliconych kryteriów IMWG
24	4. Leki zatwierdzone do leczenia szpiczaka plazmocytoowego.
41	5. Charakterystyka grupy badanej (NDMM).
43	6. Wyniki beta-różnorodności. Porównywano próbki pochodzące od osób zdrowych i osób z rozpoznaniem MM..
48	7. Podsumowanie wartości alfa- różnorodności. W badaniu porównywano grupę badaną (pacjentów z rozpoznaniem MM) do grupy kontrolnej (osoby zdrowe).

13.2 Wykaz Rycin. 1111

Numer Strony	Nazwa Ryciny
44	Rycina 1a i 1b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Braya-Curtisa.
45	Rycina 2a i 2b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Jaccard.
46	Rycina 3a i 3b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Unweighted-UniFrac.
47	Rycina 4a i 4b. Wykresy PCoA 2D i 3D dla metryki Weighted-UniFrac.
50	Rycina 5. Na zaprezentowanych rysunkach przedstawiono wykres pudełkowy (box-and-whisker) dla badanych metryk w alfa-różnorodności: Indeks Shannon, Pielou's Evenness, Observed Features (OF), Faith's Phylogenetic Diversity (PD). Strona
52	Rycina 6. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe). wśród osób z NDMM zauważalne jest występowanie mniejszej obfitości względnej wśród bakterii zaliczanych do Clostridia.
53	Rycina 7. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia, Rzędu Clostridiales pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
54	Rycina 8. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia, Rzędu Clostridiales, Rodziny Peptostreptococcaceae (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
55	Rycina 9. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Clostridia, Rząd Clostridia, Rodzina Lachnospiraceae pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

- 56 Rycina 10. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Bacilli, Rządu Bacillales pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
- 57 Rycina 11. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Bacilli, Rząd Bacillales, Rodzina Staphylococcaceae pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
- 58 Rycina 12. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasa Clostridia, Rząd Clostridiales, Rodzina Lachnospiraceae, Rodzaj Lachnospiraceae UCG- 008 pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
- 59 Rycina 13. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasy Erysipelotrichia, Rząd Erysipelotrichales, Rodzina Erysipelotrichaceae, Rodzaj Erysipelotrichaceae UCG-003 pomiędzy grupami (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
- 60 Rycina 14. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes, Klasa Clostridia, Rząd Clostridiales, Rodzina Lachnospiraceae, Rodzaj Anerostipes (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
- 61 Rycina 15. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Proteobacteria, Klasa Betaproteobacteria, Rząd Burkholderiales, Rodzina Alicaligenaceae (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
- 62 Rycina 16. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes , Klasa Clostridia, Rząd Clostridiales, Rodzina Ruminococcaceae (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).
- 63 Rycina 17. Przedstawia różnicę w obfitości względnej bakterii zaliczanych do Typu Firmicutes , Klasa Bacilli, Rząd Lactobacillales, Rodzina Streptococcaceae (MM - NDMM, kontrola - osoby zdrowe).

14. Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badania- w załączeniu.