

Streszczenie

Wstęp.

W ostatnim czasie pojawiła się spora liczba doniesień dotyczących mikrobioty jelitowej w patogenezie otyłości i cukrzycy oraz między innymi wpływie na rozwój raka jelita grubego czy zaburzenia zachowania. Dziś znanym faktem jest, że fenotyp człowieka nie stanowi prostej sumy ekspresji genetycznej zapisanej w ludzkim genomie jądrowym, ponieważ na całościowy obraz nakreśla się w w stopniu co najmniej znacznym metabolizm mikroorganizmów go zasiedlających. Fenotyp człowieka jest więc wypadkową ludzkiego genotypu i oddziałujących na niego ze wszystkich stron środowiska. Według różnych analiz w jelicie człowieka znajduje się ponad 3 000 000 różnych genów, dodatkowo liczba bakterii stanowi około 10 razy więcej komórek niż całe ciało zdrowego dorosłego człowieka. W ostatnich latach poświęca się sporo uwagi analizie różnorodności mikrobiomów obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka, podkreślając że zaraz po jądrowym i oddziedziczonym po matce (genomie mitochondrialnym) na trzecim miejscu znajduję 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 rozpoznany szpiczakiem plazmocytoowym (Newly diagnosed multiple myeloma, NDMM) w odniesieniu do składu mikrobiomu zdrowych Polaków.

W pracy postawiono następujące pytania:

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

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

Material i Metody:

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

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

Następnie po odpowiednim przygotowaniu materiału próbki poddano sekwencjonowaniu.

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

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

Wyniki

W kontekście alfa- różnorodności nie uzyskano istotności statystycznej ($p > 0.05$). Jednak w aspekcie beta- różnorodności w wykonanej analizie różnice istotnie statystycznie otrzymano we wszystkich 4 metrykach. W wykonanej analizie uzyskano istotność statystyczną w metrykach Jaccard ($p = 0.001$), Bray-Curtis ($p = 0.001$), Unweighted-unifrac ($p = 0.011$), Weighted-unifrac ($p = 0.029$). Dodatkowo za pomocą metody ANCOM wykazano różnice względne wśród bakterii zaliczanych do rodzin:

-Peptostreptococcaceae ($p < 0.016$)

-Lachnospiraceae ($p < 0.016$)

-Staphylococcaceae ($p < 0.012$)

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

Wnioski

1. Mikrobiom chorych na świeżo zdiagnozowanego szpiczaka plazmocytozy 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 plazmocytozy. 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 plazmocytozy i mikrobiom osób zdrowych nie różni się w aspekcie różnorodności alfa , w żadnej z czterech podstawowych miar: Indeks Shannon, Pielou's Evenness, Observed Features (OF), Faith's Phylogenetic Diversity (PD).