

Analiza mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia (ang. *myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome, ME/CFS*)

Wstęp:

Zespół przewlekłego zmęczenia (ME/CFS) jest ciężką, wyniszczającą chorobą, przebiegającą z okresami zaostrzeń i remisji, znacznie upośledzającą codzienną aktywność i obniżającą jakość życia chorego. Do objawów osiowych choroby należy przewlekłe zmęczenie, powysiłkowe nasilenie zmęczenia (PEM), nieregenerujący sen, zaburzenia pamięci i koncentracji, zaburzenia funkcji kognitywnych, objawy dysautonomii. Mimo prowadzenia wielu badań naukowych na temat ME/CFS, nadal nie udało się wyjaśnić etiologii i patogenezы oraz nie opracowano markera biologicznego i leczenia przyczynowego tej choroby. Jednym z sugerowanych czynników przyczynowych jest dysbioza jelitowa i ogólnoustrojowa odpowiedź organizmu gospodarza na zaburzony skład i funkcjonowanie mikrobiomu jelitowego. Dzięki rozwojowi metod badawczych opierających się na rozpoznawaniu sekwencji genu 16S rRNA stało się możliwe dokładniejsze poznanie ludzkiego mikrobiomu. Dotychczas przeprowadzono stosunkowo niewiele badań dotyczących składu mikrobiomu jelitowego u osób z zespołem przewlekłego zmęczenia i nie udało się jak dotąd jednoznacznie potwierdzić związku między zaburzeniami homeostazy mikrobiomu, a rozwojem ME/CFS. Istotnym zagadnieniem staje się zatem poszerzenie wiedzy na temat zaburzeń homeostazy mikrobiomu jelitowego u pacjentów z ME/CFS, co ma duże znaczenie w uzupełnieniu wiedzy na temat etiologii i patogenezы tej choroby, a także może przyczynić się do poprawy jej diagnostyki oraz stać się potencjalnym punktem uchwytu w terapii tego schorzenia.

Cele pracy:

Celem pracy jest analiza składu ilościowego i jakościowego mikrobiomu jelitowego u pacjentów z zespołem przewlekłego zmęczenia (ME/CFS). W niniejszej pracy dokonano również oceny zależności mikrobiomu jelitowego z wiekiem i płcią pacjentów, a także z nasileniem wybranych objawów ME/CFS, funkcjonowaniem autonomicznego układu nerwowego i funkcjonowaniem poznawczym pacjentów. Dokonano również porównania mikrobiomu jelitowego pomiędzy grupą badaną i kontrolną na podstawie analizy sieciowej mikrobiomu jelitowego dla sieci stworzonej na podstawie ASV.

Materiał i metody:

Badanie zostało przeprowadzone w okresie od stycznia 2018 roku do marca 2019 roku w Bydgoszczy. W projekcie badawczym wzięli udział pełnoletni ochotnicy w wieku między 25. a 65. rokiem życia. Rekrutacja do badania odbywała się za pomocą środków masowego przekazu. Wśród zgłoszonych ochotników przeprowadzono kwalifikację i wyodrębniono grupę 32 pacjentów, u których potwierdzono ME/CFS. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 18 zdrowych osób. Ostatecznie 27 pacjentów z grupy badanej i 15 z grupy kontrolnej wyraziło zgodę na wykonanie badania kału i dostarczyło próbki do badania. U wszystkich chorych przeprowadzono ocenę nasilenia objawów zmęczenia, ocenę funkcjonalną autonomicznego układu nerwowego oraz ocenę funkcji poznawczych. Do analizy mikrobiomu jelitowego zastosowano metodę sekwencjonowania genu 16S rRNA. Przeprowadzono analizę statystyczną uzyskanych parametrów.

Wyniki:

W zakresie analizy składu ilościowego mikrobiomu stolca między pacjentami z ME/CFS, a grupą kontrolną, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie wskaźników różnorodności i równomierności Shannona. Wykazano, że pacjenci z ME/CFS charakteryzowali się istotnie wyższym bogactwem gatunkowym mikrobiomu jelitowego (rozumianym jako wyższa liczebność jednostek OTU) w porównaniu do grupy kontrolnej. W zakresie składu jakościowego mikrobiomu stolca, przeanalizowano wszystkie poziomy taksonomiczne między grupą kontrolną i grupą badaną, i zaobserwowano: na poziomie gromad - mniejszą obfitość *Firmicutes*, *Actinobacteria* oraz *Proteobacteria* i gromad rzadkich u pacjentów z ME/CFS niż w grupie kontrolnej; na poziomie klas - większą obfitość *Bacteroidia*, a mniejszą *Negativicutes*, *Actinobacteria* oraz klas rzadkich w grupie ME/CFS, w porównaniu do osób z grupy kontrolnej; na poziomie rzędów - większą obfitość *Bacteroidales*, a mniejszą *Selenomonadales* oraz rzędów rzadkich, u pacjentów z grupy badanej niż u osób z grupy kontrolnej ; na poziomie rodzin - mniejszą obfitość bakterii z rodziny *Veillonellaceae* oraz bakterii z rodzin rzadkich u pacjentów z ME/CFS, niż u pacjentów z grupy kontrolnej; na poziomie rodzaju - stwierdzono większą obfitość bakterii z rodzaju *Bacteroides*, *Alistipes* i *Ruminococcaceae* u pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Porównano również skład jakościowy stolca między grupą badaną a kontrolną na podstawie sekwencji ASV i wykazano, że najbardziej charakterystycznymi sekwencjami dla pacjentów z ME/CFS są warianty sekwencji ASV121 (*Alistipes*), ASV147 (*Odoribacter*) oraz ASV180 (*Ruminococcaceae*), natomiast dla grupy kontrolnej są to ASV 135 (*Lachnospiraceae*), ASV155 (*Christensenellaceae*) oraz ASV310

(*Lachnospira*). Zaobserwowano istotne różnice wykazane przy użyciu metod redukcji złożoności (sPLS-DA i NMDS) pomiędzy mikrobiomem stolca w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie składu mikrobiomu stolca w zależności od płci i wieku między grupą badaną i grupą kontrolną. Mikrobiom stolca pacjentów z grupy badanej i kontrolnej sklasyfikowano przy użyciu metod uczenia maszynowego, wykorzystując do tego celu modele sieci neuronowej, losowego drzewa klasyfikacyjnego oraz maszyny wektorów nośnych, uzyskano wartości poniżej wartości istotnych klinicznie. Przeprowadzono analizę sieciową dla sieci stworzonej na podstawie ASV w grupie ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, nie zaobserwowano jednak istotnych zależności pomiędzy poszczególnymi ASV. Przy użyciu metody NMDS porównano mikrobiom w grupie pacjentów z ME/CFS i osób z grupy kontrolnej w zależności od funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego oraz nasilenia objawów ME/CFS, ocenionych na podstawie skali FSS i FIS, i wykazano zależność między tymi parametrami, a mikrobiomem stolca porównywanych grup.

Wnioski:

1. Wykazano istotnie statystycznie wyższą alfa-różnorodność mikrobiomu stolca w grupie pacjentów z ME/CFS w porównaniu do grupy kontrolnej, rozumianą jako wyższą liczebność jednostek OTU. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zakresie współczynników różnorodności oraz równomierności mikrobiomu stolca między grupą badaną, a kontrolną.
2. Wykazano istotne statystycznie różnice w zakresie beta-różnorodności mikrobiomu stolca między pacjentami z ME/CFS, a grupą kontrolną, przy wykorzystaniu PERMANOVY.
3. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie składu mikrobiomu stolca, w zależności od płci i wieku, między grupą badaną i kontrolną.
4. Zaobserwowano istotną zależność funkcjonowania autonomicznego układu nerwowego, funkcjonowania poznawczego oraz nasilenia zmęczenia ze składem mikrobiomu stolca porównywanych grup.