

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

**Agnieszka Sroka - Oleksiak**

Badanie flory bakteryjnej odcinka dwunastniczego  
u pacjentów z otyłością oraz cukrzycą typu 2 i otyłością  
z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji.

Praca doktorska

**Promotor: prof. dr hab. n. med. Małgorzata Bulanda**

**Kierownik Katedry Mikrobiologii, Zakład Epidemiologii Zakażeń,**

**Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum**

Pracę wykonano w Katedrze Mikrobiologii

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

**Kraków, 2019**

**Składam serdeczne podziękowania:**

**Pani prof. dr hab. n. med. Małgorzacie Bulandzie**

za opiekę naukową, merytoryczne wskazówki,  
okazaną życzliwość oraz nieustanną motywację

**Panu dr hab.n.med. Tomaszowi Gosiewskiemu**

za cenne uwagi oraz wszelką pomoc na każdym etapie  
powstawania tej pracy

**Pani dr hab. n.med. Monice Brzychczy-Włoch**

**oraz Koleżankom z Zakładu Molekularnej**

**Mikrobiologii Medycznej UJ CM**

za pomoc, okazaną życzliwość i stworzenie przyjaznej  
atmosfery w pracy

**Moim Rodzicom i Mężowi**

za cierpliwość, motywację i nieustanne wsparcie

*Niniejszą pracę dedykuję moim Rodzicom i Mężowi*

Niniejsza praca została wykonana w laboratorium Zakładu Molekularnej Mikrobiologii Medycznej w Katedrze Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum oraz w Ośrodku Genomiki Medycznej - Omicron UJ CM



Badania prowadzone były w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (2011/03/D/NZ5/00551) kierownik projektu: dr hab. n. med. Tomasz Gosiewski, we współpracy z II Katedrą Chirurgii Ogólnej UJ CM.



Analiza bioinformatyczna danych uzyskanych po sekwencjonowaniu została zrealizowana we współpracy z firmą BioIdea.





## Spis treści

1	WSTĘP .....	12
1.1	Początki rewolucji w identyfikacji drobnoustrojów sekwencjonowanie Sanger'a.....	13
1.2	Przełomowy krok: odkrycie molekularnego markera 16S rRNA do identyfikacji drobnoustrojów.....	15
1.3	Wprowadzenie technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS).....	17
1.3.1	Pirosekwencjonowanie.....	17
1.3.2	Platforma do sekwencjonowania - MiSeq (Illumina) .....	19
1.3.3	Seqwencjonowanie trzeciej generacji .....	19
1.4	Wpływ sekwencjonowania nowej generacji na rozwój nauki i medycyny.....	20
1.4.1	Projekt Poznania Ludzkiego Mikrobiomu .....	21
1.4.2	Kolonizacja i rozwój mikrobioty jelitowej .....	22
1.4.3	Rola mikrobioty jelitowej .....	24
1.5	Otyłość .....	26
1.5.1	Wskaźniki i metody służące do rozpoznania i określania stopnia otyłości.....	26
1.5.2	Etiopatogeneza otyłości .....	28
1.5.3	Powikłania otyłości .....	30
1.6	Cukrzyca typu 2 .....	30
1.6.1	Etiopatogeneza cukrzycy typu 2 .....	31
1.6.2	Powikłania cukrzycy .....	32
1.7	Epidemiologia cukrzycy typu 2 i otyłości.....	32
1.8	Początki badań mikrobiologicznych w otyłości i cukrzycy typu 2.....	33
1.9	Aktualny stan wiedzy i proponowane mechanizmy mikrobioty jelitowej w powstawaniu i rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2.....	34
1.10	Metody leczenia cukrzycy typu 2 i otyłości.....	37
2	ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....	41
3	MATERIAŁ .....	42
3.1	Pacjenci – kryteria włączenia i wykluczenia .....	42
3.1.1	Podział na grupy badawcze.....	43
3.2	Materiał biologiczny .....	44
4	METODY .....	45
4.1	Izolacja bakteryjnego DNA .....	45
4.2	Ocena stężenia i czystości izolatów .....	46
4.3	Przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania.....	47
4.3.1	Metoda nested-PCR .....	47
4.3.2	Startery do reakcji nested-PCR.....	49

4.3.3	Standaryzacja metody nested - PCR. ....	50
4.3.4	Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji nested-PCR.....	51
4.3.5	Właściwe parametry reakcji nested – PCR.....	52
4.4	I Oczyszczanie produktów po reakcji nested-PCR.....	53
4.5	Index PCR.....	55
4.6	II Oczyszczanie produktów po reakcji Index PCR.....	56
4.7	Walidacja stężenia amplikonów i ich pulowanie.....	57
4.8	Denaturacja biblioteki.....	60
4.9	Sekwencjonowanie przez syntezę (SBS).....	63
4.10	Bufory i odczynniki.....	66
4.11	Bioinformatyczna analiza danych po sekwencjonowaniu.....	68
4.12	Testy statystyczne oraz programy bioinformatyczne wykorzystane w trakcie analizy wyników.....	69
4.13	Pozostałe programy komputerowe.....	71
5	WYNIKI.....	72
5.1	Charakterystyka pacjentów.....	72
5.2	Charakterystyka próbek.....	74
5.3	Ogólna analiza sekwencjonowania 16S rRNA przy użyciu narzędzia Qiime.....	75
5.4	Analiza alfa bioróżnorodności.....	76
5.5	Analiza beta różnorodności.....	78
5.6	Analiza profili bakteryjnych na różnych poziomach taksonomicznych.....	79
5.7	Analiza korelacji.....	87
6	DYSKUSJA.....	91
6.1	Wybór materiału klinicznego do badań.....	91
6.2	Metodyka oraz narzędzia do przygotowania i analizy materiału badawczego.....	92
6.3	Analiza uzyskanych wyników w kontekście innych prac badawczych.....	94
6.4	Podsumowanie.....	102
7	WNIOSKI.....	104
8	STRESZCZENIE.....	105
9	SUMMARY.....	107
10	SPIS RYCIN.....	109
11	SPIS TABEL.....	111
12	LITERATURA.....	112
13	ZAŁĄCZNIKI.....	128
13.1	Załącznik nr 1 – Opinia Komisji Bioetycznej UJ.....	128
13.2	Załącznik nr 2 – Karta pacjenta, stworzona na potrzeby niniejszych badań.....	131

13.3 Załącznik nr 3 – Szczegółowy wykaz bakterii wyrażonych, jako operacyjne jednostki taksonomiczne (OTU`s), które stanowiły w analizowanych grupach na poziomach taksonomicznych począwszy od L4 do L7, co najmniej 1%. ..... 132



**WYKAZ SKRÓTÓW**

**Ad-36** – adenowirus 36

**AGB** – ang. *ad-justable gastric banding*, regulowana opaska żołądkowa

**ALT** – ang. – *alanine transaminase*, aminotransferaza alaninowa

**AMPK** - ang. *adenosine monophosphate activated protein kinase*, kinaza proteinowa aktywowana przez AMP

**ATP** – ang. *adenosine triphosphate*, adenozyotrójfosforan

**BMI** – ang. *body mass index*, wskaźnik masy ciała

**BPD** – ang. *biliopancreatic diversion*, wyłączenie żółciowo-trzustkowe

**BPD-DS** – ang. *biliopancreatic diversion with duodenal switch*, wyłączenie żółciowo-trzustkowe z przełączeniem dwunastnicy

**dATP** – ang. *deoxyadenosine triphosphate*, 2`-deoksyadenozyno-5'-trifosforan

**dCTP** – ang. *deoxycytidine triphosphate*, 2`-deoksycytozyno-5'-trifosforan

**ddATP** – ang. *dideoxyadenosine triphosphate*, 2`,3`-dideoksyadenozyno-5'-trifosforan

**ddCTP** – ang. *dideoxycytidine triphosphate*, 2`,3`-dideoksycytozyno-5'-trifosforan

**ddGTP** – ang. *dideoxyguanosine triphosphate*, 2`,3`-dideoksyguanozyno-5'-trifosforan

**ddTTP** – ang. *dideoxythymidine triphosphate*, 2`,3`-dideoksytymidyno-5'-trifosforan

**dGTP** – ang. *deoxyguanosine triphosphate*, 2`-deoksyguanozyno-5'-trifosforan

**DNA**- ang. *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy

**dsDNA**- ang. *double stranded deoxyribonucleic acid*, podwójna nić kwasu deoksyrybonukleinowego

**dTTP** – ang. *deoxythymidine triphosphate*, deoksytymidyno-5'-trifosforan

**DXA** - ang. *dual energy X-ray absorptiometry*, rentgenowska absorpcjometria podwójnej energii

**emPCR** – emulsyjna reakcja łańcuchowej polimerazy

**FIAF** - ang. *fasting induced adipocyte factor*, czynnik tkankowy indukowany głodem

**G41** - ang. *glycoprotein 41*, białko, glikoproteina 41

**GF** - ang. *germ-free*, pozbawione mikroorganizmów i pasożytów

**GPR41, GPR43** – ang. *G protein-coupled receptors*, receptory sprzężone z białkiem G

**HbA<sub>1c</sub>** - hemoglobina glikowana

**HDL** - ang. *high density lipoprotein*, lipoproteina wysokiej gęstości

**HGP** - ang. *Human Genomic Project*, Projekt Poznania Ludzkiego Genomu

**HMP** - ang. *Human Microbiome Project*, Projekt Poznania Ludzkiego Mikrobiomu

**IBD** - ang. *inflammatory bowel diseases*, nieswoiste zapalenie jelit

**L2** – ang. *level 2 - phylum*, poziom taksonomiczny 2 oznaczający gromadę bakterii

**L3** – ang. *level 3 – class*, poziom taksonomiczny 3 oznaczający klasę bakterii

**L4** – ang. *level 4 – order*, poziom taksonomiczny 4 oznaczający rząd bakterii

**L5** – ang. *level 5 – family*, poziom taksonomiczny 5 oznaczający rodzinę bakterii

**L6** – ang. *level 6 – genus*, poziom taksonomiczny 6 oznaczający rodzaj bakterii

**L7** – ang. *level 7 – species*, poziom taksonomiczny 7 oznaczający gatunek bakterii

**LADA** – ang. *latent autoimmune diabetes of adults*, utajona autoimmunologiczna cukrzyca dorosłych

**LDL** - ang. *low-density lipoprotein*, lipoproteina o małej gęstości

**LPL** - ang. *lipoprotein lipase*, lipaza lipoproteinowa

**LPS** – ang. *lipopolysaccharide*, liposacharyd

**LRYGB** - ang. *laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass*, operacja laparoskopowego wyłączenia żołądkowego

**LSG** – ang. *laparoscopic gastric sleeve resection*, laparoskopowa resekcja żołądka

**MC4R** – ang. *melanocortin 4 receptor*, receptor typu 4 melanokortyny

**Me** - mediana

**MODY**- ang. *maturity onset diabetes of the young*, cukrzyca typu dorosłego u ludzi młodych

**NGS** - ang. *next generation sequencing*, sekwencjonowanie następnej/nowej generacji

**Nested- PCR** – ang. *nested - polymerase chain reaction*, zagnieżdżona reakcja łańcuchowa polimerazy

**OTU** – ang. *operative taxonomy unit*, operacyjna jednostka taksonomiczna

**OUN** – ośrodkowy układ nerwowy

**PCR** – ang. *polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy

**POMC** – proopiomelanokortyna

**PYY** - ang. *peptide YY*, peptyd Y

**RNA** – ang. *ribonucleic acid*, kwas rybonukleinowy

**SBS** – ang. *sequencing by synthesis*, sekwencjonowanie przez syntezę

**SCFA** - ang. *short chain fatty acid*, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

**SD** – ang. *standard deviation*, odchylenie standardowe

**SMAM-1** – ptasi adenowirus

**T2DM** – ang. *type 2 diabetes mellitus*, cukrzyca typu 2

**TG** - trójglicerydy

**VGB** – ang. *vertical banded gastroplasty*, pionowa plastyka żołądka

**WHO** – ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia

**WHR** - ang. *waist-hip-ratio*, stosunek obwodu talii do obwodu bioder

**16S rRNA** – fragment małej podjednostki rybosomu 30S, charakterystycznej dla prokariotów

## 1 WSTĘP

Szybka i dokładna identyfikacja drobnoustrojów stanowi fundament mikrobiologicznej diagnostyki klinicznej. Choć bakterie odkryto już w połowie XVII wieku, tuż po wynalezieniu mikroskopu przez Antoniego van Leeuwenhoek'a, to początkowo ignorowano ich obecność, a nauka o mikroorganizmach popadła przez długi czas w zapomnienie [1]. Dopiero pod koniec XIX wieku, gdy zaczęto zdawać sobie sprawę, że to właśnie drobnoustroje powodują choroby, wzrosło zainteresowanie i potrzeba zrozumienia ich znaczenia. Naukowcy rozpoczęli wówczas opracowywanie technik ich izolacji i hodowli w laboratorium. Przy użyciu mikroskopu świetlnego opisywali swoje obserwacje, porównując bakterie do znanych z życia codziennego kształtów. Zarówno techniki mikroskopowe, jak i hodowlane zapoczątkowały rozwój mikrobiologii i nadal są powszechnie używane. Choć te konwencjonalne metody są niedrogie, to pozwalają tylko na identyfikację najczęściej spotykanych grup bakterii. Zapewniają w ten sposób ograniczony pogląd na złożony świat drobnoustrojów, szczególnie tych, które rezydują w ciele człowieka.

Mimo dalszego rozwoju mikrobiologii i wprowadzeniu wielu nowych testów m.in. biochemicznych, fenotypowych, technik mikroskopowych opartych o fluorescencję, umożliwiających odróżnianie gatunków, możliwe było poznanie zaledwie niewielkiej liczby drobnoustrojów. Liczba ta ograniczona była wyłącznie do tych bakterii, które wyhodowano w warunkach laboratoryjnych [2]. W dalszym, ciągu nie było osiągalne rzetelne określenie choćby struktury drobnoustrojów zasiedlających np. jelita człowieka, ponieważ znaczna liczba bakterii nie rozwija się poza ich naturalnym środowiskiem [3]. Innymi ograniczeniami powszechnie stosowanych metod w identyfikacji były np. odmienne cechy biochemiczne, które nie pasowały do wzorców znanych rodzajów, czy gatunków. Wówczas takie testy traciły swą przydatność, szczególnie, gdy badane bakterie nie ulegały fermentacji. Ponadto do ich przeprowadzenia konieczne było uzyskanie czystych hodowli. Z kolei identyfikacja szczególnych grup bakterii, np. niektórych beztlenowców, wymagała dodatkowego sprzętu, znacznie dłuższego czasu hodowli i specjalistycznej wiedzy. Nawet po spełnieniu tych warunków, nie było gwarancji na uzyskanie rzetelnych wyników [4].

## 1.1 Początki rewolucji w identyfikacji drobnoustrojów sekwencjonowanie Sanger'a.

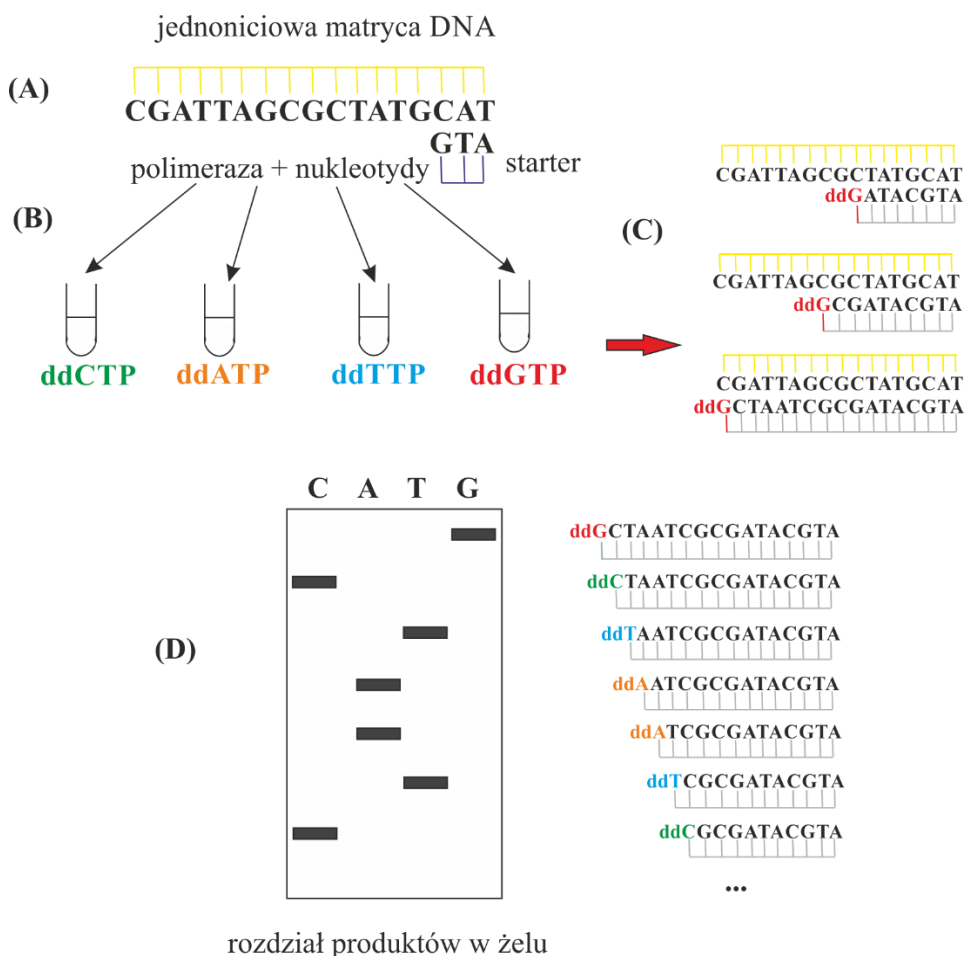
W latach 90-tych, wraz z odkryciem procesu sekwencjonowania DNA, diametralnie zmieniło się podejście do badań naukowych w zakresie identyfikacji drobnoustrojów. Niewątpliwie podstawy tego sukcesu, budowane były na wcześniejszych odkryciach, dotyczących odtworzenia replikacji DNA w komórkach bakteryjnych (w warunkach laboratoryjnych) przez Artura Kornberga, czy odkrycie procesu zbliżonego do przebiegu PCR przez Kjell Kleppe [5], [6].

W 1977 r. Sanger i jego współpracownicy opublikowali pracę, w której przedstawili procedurę szybkiego określania sekwencji DNA [7]. Metoda ta stanowiła wówczas jedynie zapowiedź nadciągającej rewolucji, która swym zasięgiem nie tylko obejmowała sekwencjonowanie genomu człowieka, ale również mikroorganizmów w nim rezydujących. W późniejszym okresie stała się jedną z najczęściej wykorzystywanych metod w przypadku problemów z identyfikacją bakterii w badaniach naukowych.

Od czasu wdrożenia do laboratoriów sekwencjonowania Sangera przez ponad 3 dekady systematycznie ulepszano metodykę, m.in. zastosowano rekombinowaną polimerazę, a dideoksynukleotydy, które spełniają zadanie terminatora reakcji, znakowano fluorescencyjnie zamiast izotopowo. Dalsze modyfikacje polegały na automatyzacji sekwenatorów, wyposażono je w cienkie kapilary, w których wykonywano rozdział fragmentów DNA [8]. Metoda sekwencjonowania Sangera, której najważniejsze etapy zostały przedstawione na rycinie 1, nazywana jest inaczej metodą terminacji łańcucha, metodą dideoksy lub metodą sekwencjonowania przez syntezę.

Równolegle do metody Sanger'a powstawała inna technika sekwencjonowania, opracowana przez Allana Maxam'a i Waltera Gilbert'a. Zespół badaczy opublikował również w 1977 r. pracę dotyczącą metody sekwencjonowania opartej na chemicznej degradacji nukleotydów pod wpływem różnych związków chemicznych [9]. Reakcja prowadziła do powstania wielu fragmentów DNA o różnej wielkości, które rozdzielano elektroforetycznie. Zarówno metoda Maxam'a - Gilbert'a jak i Sangera zaliczane są do **sekwencjonowania pierwszej generacji** [8], [10]. Choć za obie metody zostały przyznane w 1980 r. Nagrody Nobla, to sekwencjonowanie Sanger'a zdominowało

badania naukowe, ze względu na większą prostotę, niezawodność i zastosowanie mniejszej ilości związków toksycznych oraz substancji radioaktywnych. [11].



**Rycina 1.** Reakcja sekwencjonowania Sanger'a.

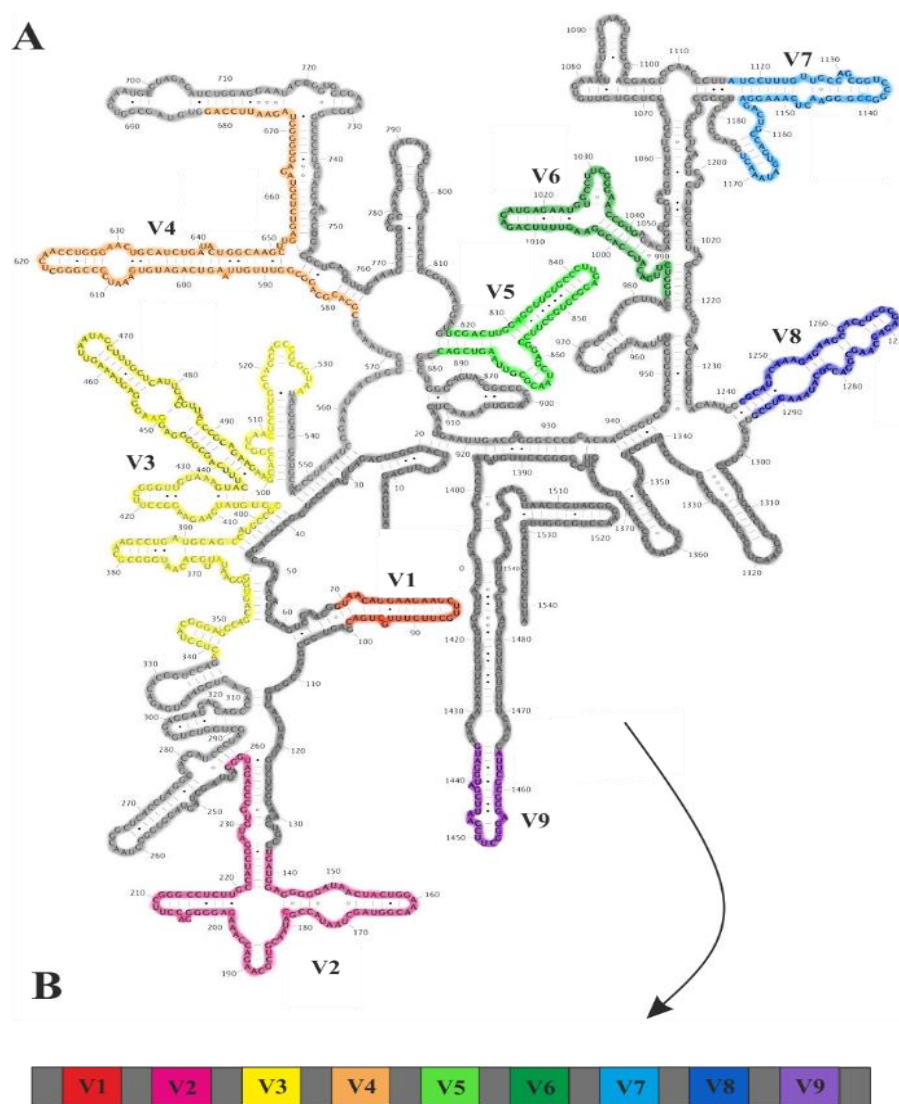
Reakcja nazywana również metodą terminacji łańcucha rozpoczyna się od amplifikacji matrycy DNA, a następnie denaturacji, która prowadzi do uzyskania pojedynczych nici. W kolejnym etapie startery zostają przyłączone do jednoniciowych matryc (A), a dalsze reakcje przeprowadzane są osobo w czterech wersjach. W każdej z nich polimeraza wbudowuje na zasadzie komplementarności deoksynukleotydy (dATP, dCTP, dGTP dTTP) (B). Wydłużanie łańcucha zostaje przerwane w momencie, gdy zostanie przyłączony jeden dla danej wersji typ wyznakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów (ddATP, ddTTP, ddGTP lub ddCTP), czyli nukleotydów nieposiadających grupy hydroksylowej na końcu 3'. Brak grupy hydroksylowej w cząsteczce dideoksynukleotydu uniemożliwia dalszą elongację (C). W rezultacie w każdej z czterech probówek powstają mieszaniny łańcuchów DNA o różnej długości, które rozdziela się elektroforetycznie pod względem wielkości (D). Końcowy efekt uwidaczniany jest pod wpływem promieni UV i dokumentowany, jako obraz kolejności nukleotydów [8].

Sekwencjonowanie Sangera przez 37 lat stanowiło metodę referencyjną dla sekwencjonowania DNA, a wprowadzone modyfikacje położyły podwaliny pod sekwencjonowanie całych genów i genomów. W ciągu 10 lat średnia długość odczytu sekwencji wzrosła z około 450 do 850 par zasad [12]. Problem jednak leżał w ograniczonej przepustowości. Powolne tempo sekwencjonowania wymagało zapotrzebowania na bardziej niezawodne technologie, które mogłyby generować znacznie większe ilości danych w szybszy i bardziej przystępny sposób [10].

## **1.2 Przelomowy krok: odkrycie molekularnego markera 16S rRNA do identyfikacji drobnoustrojów.**

W 1987 r. ukazała się pionierska praca Carla Woese'a, który wykazał, że geny rRNA mogą być użyte, jako ewolucyjny chronometr [13]. Zalety przemawiające za ich użyciem były następujące: wykazują one wysoki stopień funkcjonalnej stałości, występują we wszystkich mikroorganizmach, a różne pozycje w ich sekwencjach zmieniają się w bardzo różnym tempie, umożliwiając pomiar większości związków filogenetycznych. Bazując na tych odkryciach Pace i współpracownicy zastosowali bezpośrednią analizę sekwencji genu 16S rRNA do opisu różnorodności mikrobiologicznej w próbce środowiskowej, bez wcześniejszej hodowli [14]. Przeprowadzone przez powyższy zespół prace zmieniły sposób postrzegania mikroorganizmów i stworzyły nową gałąź ekologii mikrobiologicznej. Od tego czasu badania drobnoustrojów oparte o analizę ich DNA, a dokładniej genu kodującego małą podjednostkę rybosomu: 16S rRNA odgrywają kluczową rolę i stanowią „złoty standard” w identyfikacji oraz odkrywaniu nowych gatunków. Gen ten obecny jest u wszystkich bakterii, ale jego sekwencja jest unikalna dla każdego gatunku. W związku z tym 16S rRNA wykorzystywany jest, jako rodzaj molekularnego odcisku palca. Sekwencja tego genu ma wielkość ok 1500 pz i podzielona jest na 9 hiperzmiennych (V1-V9) regionów o średniej długości od 50 - 100 pz. Każdy z hiperzmiennych regionów oddzielony jest tzw. regionem konserwatywnym [15]. Strukturę przestrzenną oraz liniową genu 16S rRNA przedstawiono na rycinie 2.

Identyfikacja drobnoustrojów w tym wypadku polega na sekwencjonowaniu wybranych regionów genu 16S rRNA, a następnie porównaniu badanej sekwencji z sekwencjami zdeponowanymi w bazach danych [16]. Uzyskanie dopasowania na odpowiednim poziomie taksonomicznym umożliwi identyfikację bakterii. Badania oparte o analizę 16S rRNA znacznie poszerzyły naszą świadomość na temat świata drobnoustrojów, a także pozwoliły ustalić ewolucyjne relacje pomiędzy gatunkami na podstawie skonstruowanych drzew genealogicznych.



**Rycina 2.** Struktura genu 16S rRNA.

Część A odpowiada strukturze przestrzennej, a część B – liniowej genu 16S rRNA. Struktura przestrzenna została zaczerpnięta z pracy: “Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences” [15] i zmodyfikowana przez autora rozprawy. Szarym kolorem oznaczono regiony konserwatywne.

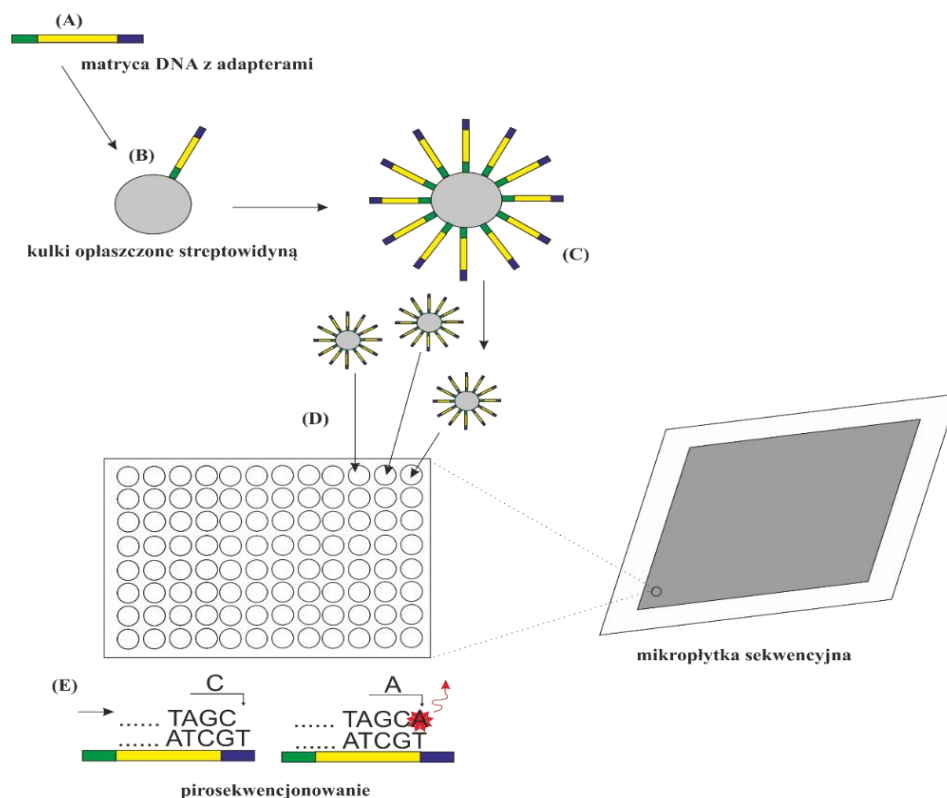


### 1.3 Wprowadzenie technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS).

Koniec XX wieku zaowocował zsekwencjonowaniem kompletnych genomów dwóch mikroorganizmów: *Haemophilus influenzae* i *Mycoplasma genitalium* [17]. Wydarzenie to otworzyło wówczas drzwi do badania kodu genetycznego mikroorganizmów i stało się inspiracją dla naukowców, którzy dążyli do dalszego ulepszania sekwenatorów. To z kolei przyczyniło się do rozwoju kolejnej technologii, nazwanej sekwencjonowaniem następnej generacji - NGS (ang. *next generation sequencing*) lub sekwencjonowaniem drugiej generacji. Strategia NGS oparta jest na masowym, równoległym odczycie sekwencji z wielu próbek, przy zachowaniu dużej przepustowości i wysokiego stopnia pokrycia sekwencji [8], [11]. Podstawowe cechy, które definiują sekwencjonowanie następnej generacji to: obecność sekwencji łącznikowych i/lub adapterowych, umożliwiających stworzenie biblioteki amplikonów, amplifikacja biblioteki na powierzchni stałej lub na kulkach opłaszczonych streptawidyną, bezpośrednie monitorowanie procesu wbudowania nukleotydów podczas sekwencjonowania przez wykrywanie luminescencji lub zmiany ładunku elektrycznego oraz generowanie cyfrowych odczytów, które pozwalają na bezpośrednie pomiary ilościowe [11]. Najbardziej powszechne i najczęściej cytowane w obrębie drugiej generacji są metody pirosekwencjonowania (454 GS Junior Roche) oraz sekwencjonowanie przez syntezę (Illumina, Miseq).

#### 1.3.1 Pirosekwencjonowanie

Skutecznym argumentem przemawiającym za zastąpieniem metody Sanger'a pirosekwencjonowaniem była możliwość masowego, równoległego, a co za tym idzie szybszego sekwencjonowania nici DNA. Metoda ta była pierwszym komercyjnym systemem NGS i stanowiła podstawę nowej analizy genomowej, nazwanej sekwencjonowaniem przez syntezę [17]. Najważniejsze etapy wraz z opisem pirosekwencjonowania przedstawiono na rycinie 3.



**Rycina 3.** Etapy Pirosekwencjonowania.

Po fragmentacji i przyłączeniu sekwencji adaptorowych, matrycowe DNA (A) jest amplifikowane na powierzchni kulek opłaszczonych streptawidyną (B), w emulsji wodno-olejowej (emPCR). W efekcie w jednej kropelce emulsji znajduje się jedna kulka z klonami DNA (C). Kulki są następnie przemywane na mikroplątce sekwencyjnej. Na tym etapie istotne jest, aby w każdej studzience znalazła się wyłącznie jedna kulka pokryta fragmentami DNA (D). W kolejnym kroku rozpoczyna się właściwe pirosekwencjonowanie. Do każdej studzienki dodawana jest polimeraza oraz nukleotydy. Reakcja zostaje zatrzymana, gdy nukleotyd nie przyłącza się do wydłużającej się sekwencji. Dopiero wbudowanie właściwego nukleotydu według zasady komplementarności pozwala na wznowienie reakcji. Podczas przyłączenia nukleotydu do syntetyzowanej nici DNA dochodzi do uwolnienia pirofosforanu i pomiaru jego ilości (E). Możliwe jest to dzięki dwóm reakcjom chemicznym z udziałem sulfurylasy i lucyferazy, które w efekcie przyczyniają się do powstania cząsteczek ATP, a te z kolei wytwarzają fotony, rejestrowane przez kamerę z matrycą CCD (ang. *charge coupled device*) [18], [19].

Typowym modelem wykorzystującym metodę pirosekwencjonowania był 454 GS Junior (w 2016 r. firma Roche ogłosiła zaprzestanie produkcji odczynników do pirosekwencjonowania i jednocześnie wycofanie technologii z rynku). Generował on najdłuższe odczyty (średnio 520 pz) i najmniejszą ilość złożonych, lecz pofragmentowanych sekwencji. Spore ograniczenie sekwenatora wynikało

z możliwości generowania błędów, związanych z trudnością w ustaleniu liczby powtórzeń nukleotydów w długich fragmentach homopolimerowych, a to z kolei było przyczyną generowania błędów w trakcie syntezy nici DNA [20].

### 1.3.2 Platforma do sekwencjonowania - MiSeq (Illumina)

Opracowanie wysokowydajnych sekwenatorów umożliwiło uzyskanie kompletnych sekwencji w ciągu kilku godzin lub dni, a nie jak w przypadku sekwencjonowania pierwszej generacji: miesięcy, czy lat [20]. Ponadto znacznie spadły koszty tego procesu, co spowodowało, że obecnie wiele firm wprowadza na rynek swoje platformy, np. Illumina, Pacific Biosciences, czy Life Technologies. Niewątpliwie najbardziej dominującą technologią są sekwensery wyprodukowane przez Illumina. Ponad 90% danych z badań naukowych w 2014 r. zostało wygenerowanych przy użyciu platform tej firmy [17]. Wśród nich najczęstsze zastosowanie w badaniach mikrobiologicznych ma platforma do sekwencjonowania MiSeq [20]. Wykazano, że MiSeq charakteryzuje się najniższym poziomem błędów oraz najbardziej przystępnym dla użytkownika oprogramowaniem, niewymagającym dodatkowych interwencji manualnych w trakcie sekwencjonowania [20]. Przy użyciu platformy MiSeq przeprowadzono sekwencjonowanie próbek, będące przedmiotem niniejszej rozprawy. Dokładny opis poszczególnych etapów sekwencjonowania został szczegółowo opisany w rozdziale Materiały i metody.

### 1.3.3 Sekwencjonowanie trzeciej generacji

Poza opisanymi metodami, od 2011 r. dostępne są kolejne, nowsze technologie zaliczane do **sekwencjonowania trzeciej generacji**, które nazwano technologią sekwencjonowania pojedynczych cząsteczek. Nie wymagają one tworzenia biblioteki amplikonów, co skraca czas przygotowania próbek z kilku dni do 4-6 godz. Średnia długość odczytów generowanych przez te sekwenatory wynosi ok 10000 par zasad. Natomiast sporym ograniczeniem tej technologii jest wysoki wskaźnik błędów (od 12 do 15%), losowo rozłożonych wzdłuż sekwencji odczytu [8].

Do badań metagenomowych m.in. z uprzednio wymienionego powodu zalecane są sekwenatory drugiej generacji, szczególnie: Illumina i SOLiD [10].

#### 1.4 Wpływ sekwencjonowania nowej generacji na rozwój nauki i medycyny

Rozwój sekwencjonowania zapoczątkował jedno z największych osiągnięć w historii badań naukowych - Projekt Poznania Ludzkiego Genomu (HGP), (ang. *Human Genomic Project*). W tym okresie narodziła się nowa dziedzina nauki – **genomika**, zajmująca się badaniem genów i ich funkcji [21]. W ramach trwającego 13 lat projektu wykazano m.in. że nasz genom zawiera około 20.000 genów. Jednak większość z nich nie należy do gospodarza, a mikroorganizmów, które go zasiedlają. W związku z tym w celu oddzielenia ogółu genomów mikroorganizmów od genomu gospodarza wprowadzono pojęcie **mikrobiom**. Z kolei **metagenomiką**, po kilku modyfikacjach definicji, nazwano proces stosowany do scharakteryzowania metagenomu [22] lub bezpośrednią analizę genetyczną genomów zawartych w badanej próbce, w celu uzyskania informacji na temat różnorodności mikrobiologicznej i ekologii określonego środowiska [23].

Na podstawie wstępnych badań przeprowadzonych w ramach HGP oszacowano, że liczba mikroorganizmów w naszym organizmie przewyższa \*dziesięciokrotnie liczbę ludzkich komórek somatycznych i rozrodczych [1]. Ta hipoteza zachęciła naukowców do intensywnych badań, mających na celu poznawanie i próbę zrozumienia roli mikroorganizmów, które nas zamieszkują. Zaledwie, w ciągu siedmiu lat (2001 - 2007) przy użyciu sekwencjonowania genu 16S rRNA odkryto 215 nowych gatunków bakterii, wyizolowanych z różnych materiałów, pochodzących od pacjentów. Wśród tych mikroorganizmów: *Streptococcus sinensis*, *Laribacter hongkongensis*, *Clostridium hathewayi* i *Borrelia spielmanii* zostały najlepiej poznane i scharakteryzowane [4].

\* Ostatnie dane z 2016 r sugerują, że stosunek komórek ludzkich do bakteryjnych jest bliższy 1:1 [24].

### 1.4.1 Projekt Poznania Ludzkiego Mikrobiomu

Rosnąca liczba dowodów naukowych wskazywała, że mikroby, dostarczają naszemu organizmowi wielu korzyści. Trudno było natomiast potwierdzić tę hipotezę, ponieważ do tej pory tylko kilka badań wiązało mikroorganizmy ze zmianami w zdrowiu. Pogłębiająca się ciekawość badaczy przyczyniła się do rozpoczęcia kolejnego projektu, realizowanego na szeroką skalę – Projektu Poznania Ludzkiego Mikrobiomu (HMP), (ang. *Human Microbiome Project*), który stanowił eksperymentalne rozszerzenie HGP [25]. Głównym celem HMP było dokładne poznanie i scharakteryzowanie ludzkiej mikroflory od zdrowych osób, z kilku różnych miejsc ludzkiego ciała: z dróg nosowych, jamy ustnej, skóry, przewodu pokarmowego i dróg moczowo-płciowych. Dodatkowo badano różnorodność mikroorganizmów w zależności od wieku, spożywanej diety, stanu zdrowia [26]. Rezultaty zaplanowanych analiz miały dostarczyć odpowiedzi na wiele fundamentalnych, a zarazem nurtujących pytań, m.in.: w jakim stopniu podobne są mikrobiomy osób w obrębie rodziny i jak bardzo mikrobiom różni się pomiędzy ludźmi pochodzącymi z różnych środowisk? Czy można zidentyfikować wspólny dla wszystkich ludzi rdzeń mikrobiomu? Co wpływa na różnorodność genetyczną mikrobiomu? Jak ta różnorodność przekłada się na adaptację mikroorganizmów i gospodarza do stanu fizjologicznego lub patologicznego? [25]. Znaczna uwaga badaczy została skoncentrowana na poznawaniu mikrobioty jelit (**mikrobiota** oznacza zestaw mikroorganizmów obecnych w określonym środowisku [22]), ponieważ dostrzegano w niej największy potencjał badawczy, chociażby ze względu na ilość mikroorganizmów, które je zasiedlają. Szacuje się, bowiem, że w samej okrężnicy dorosłego człowieka jest ich od 10-100 trylionów [27]. Zbadanie tak złożonego ekosystemu oraz znalezienie powiązań pomiędzy mikrobiotą, a gospodarzem nie było łatwym zadaniem i choć metagenomiczne sekwencjonowanie pozwoliło na wgląd w społeczność mikroorganizmów zasiedlających jelita, ich skatalogowanie i wyjaśnienie niektórych szlaków, to w dalszym ciągu nie było możliwe uzyskanie odpowiedzi na niektóre pytania.

Przykładowe rezultaty badań prowadzonych w ramach HMP potwierdziły, że różnorodność mikrobiomu jest ogromna w porównaniu do zmienności genomowej człowieka. Przykładowo, ludzie w 99,9% są identyczni pod względem genomu

gospodarza [1], ale gdy porównamy te same osoby pod kątem ich mikrobioty dłoni [28], czy jelit [29], to będą się różnić nawet od 80 do 90% [28]. Oszacowano, że mikrobiota jelitowa u zdrowych osobników składa się z około 1000 różnych gatunków bakterii, które w większości należą do dwóch znanych typów: Firmicutes i Bacteroidetes [30]. Na podstawie badań przeprowadzonych na grupie Amerykanów, stwierdzono, że osoby, które nie przyjmowały antybiotyków charakteryzowała stabilność flory bakteryjnej. Ponad 70% gatunków bakterii nie ulegało istotnym zmianom jakościowym i ilościowym w ciągu roku, a u niektórych osób nawet w ciągu 5 lat [31]. Mimo, iż przebadano mikrobiotę jelitową u 1070 osób (stan na 2014 r.) nie udało się znaleźć wspólnego dla wszystkich rdzenia, czyli gatunków, które są obecne u każdej osoby [32]. Początkowo proponowanymi kandydatami do zbioru wspólnych gatunków były bakterie: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* i *Bacteroides uniformis*. Jednak, gdy rozszerzono badania o kraje rozwijające się i uwzględniono szeroką gamę wiekową (od niemowlęcia po osoby zaawansowane wiekowo – do stu lat), pojęcie rdzenia w mikrobiocie jelitowej uległo zatarciu [30]. W związku z tym należało odpowiedzieć na pytanie, z czego wynika ta zmienność? Jak mikrobiota zmienia się wraz z wiekiem, czy w okresie ciąży oraz jak czynniki zewnętrzne w tym dieta wpływają na zmianę mikrobioty?

Aby móc odpowiedzieć na te i inne pytania należało rozpocząć badania od początku, to jest od kolonizacji jelit tuż po narodzinach człowieka.

#### **1.4.2 Kolonizacja i rozwój mikrobioty jelitowej**

Najbardziej złożonym ekosystemem bakteryjnym w ustroju człowieka jak już wcześniej wspomniano jest mikrobiota przewodu pokarmowego, a przede wszystkim jelit. Stanowi ona istotną część organizmu, a jej oddziaływania na gospodarza zachodzą na wielu płaszczyznach. Kształtowanie mikrobioty jelitowej rozpoczyna się tuż po narodzinach. Mikrobiota przewodu pokarmowego niemowlęcia urodzonego drogą naturalną kolonizowana jest początkowo przez bakterie przypominające mikrobiotę pochwy matki, przede wszystkim: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i/lub *Prevotella*. Natomiast, w przypadku dzieci urodzonych przez cesarskie cięcie, przewód pokarmowy nabywa florę charakterystyczną dla skóry matki i środowiska szpitalnego, głównie są to: *Staphylococcus*, *Propionibacterium* i *Corynebacterium* [33].

Odmienny skład flory bakteryjnej u tych dzieci wiązany jest z częstym występowaniem biegunek, alergii i chorób zapalnych przewodu pokarmowego [34]. Nie bez znaczenia dla kolonizacji przewodu pokarmowego jest już również rodzaj podawanego dziecku mleka. Karmienie piersią sprzyja nabywaniu *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*, a stosowanie sztucznych mieszanek powoduje dostarczenie *Bacteroides*, *Enterobacter* oraz *Clostridium* [35]. W okresie pomiędzy pierwszym, a drugim rokiem życia flora przewodu pokarmowego jest podobna do tej, która charakteryzuje dorosłego człowieka [33]. Podobieństwa w jej składzie obserwowane są również u bliźniąt jednojajowych, co potwierdza udział czynników genetycznych w kształtowaniu mikrobioty [36]. Począwszy od tego czasu różnorodność filogenetyczna mikroorganizmów stale wzrasta oraz podlega wielokrotnym zmianom w ciągu całego życia. Wśród czynników predysponujących do fluktuacji w obrębie mikrobioty wymienia się najczęściej: wiek, rodzaj diety, przewlekły stres, przyjmowanie leków, stosowanie używek, przebyte lub rozwijające się choroby [37]. Badania porównawcze przeprowadzone na dorosłych osobach z różnym stopniem pokrewieństwa wykazały, że w porównaniu do wcześniej wymienionych czynników, genotyp gospodarza ma największy wpływ na skład mikrobioty jelitowej [38], [39], [40].

Skład gatunkowy bakterii różni się także w zależności od odcinka przewodu pokarmowego oraz dostępności do tlenu. Przykładowo, w żołądku ze względu na kwaśne środowisko występują bakterie z rodzaju: *Lactobacillus*, *Helicobacter* i *Streptococcus*. Z kolei w jelicie cienkim oprócz rodzaju *Lactobacillus* bytują także: *Bacteroides*, *Clostridium* i *Enterococcus*. Natomiast największe zróżnicowanie obserwowane jest w jelicie grubym. Szacowana ilość bakterii w 1g kału wynosi  $10^{12}$  [41]. W tym odcinku ze względu na znacznie mniejszą dostępność tlenu większość mikrobioty jest beztlenowa i względnie beztlenowa [40], [42].

Mimo ciągłych zmian na poziomie gatunkowym, typy bakterii pozostają względnie stałe. Wśród 55 typów, które do tej pory zostały poznane i opisane, zaledwie osiem zasiedla jelito człowieka: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria i Spirochaetes [41]. Z wymienionej grupy, cztery pierwsze charakteryzują się wyraźną dominacją, która może sięgać nawet 90% wszystkich bakterii [40].

### 1.4.3 Rola mikrobioty jelitowej

Genom mikrobioty jelitowej nazywany jest trzecim tuż po jądrowym i mitochondrialnym genomem człowieka i zawiera geny, które odpowiedzialne są za utrzymanie homeostazy organizmu gospodarza [43]. Bakterie jelitowe spełniają ważne funkcje troficzne, ochronne i metaboliczne [37]. Funkcje troficzne wynikają z wpływu mikrobów na proliferację i różnicowanie enterocytów oraz kolonocytów. Zaobserwowano, że niektóre obszary jelita, liczniej zasiedlane przez bakterie, charakteryzują się wydłużonymi kosmkami jelitowymi o większych rozmiarach, w porównaniu z enterocytami, które pokrywa znacznie mniejsza liczba bakterii [44]. Funkcja ochronna polega na zapobieganiu kolonizacji przez patogenne bakterie, takie jak: *Escherichia coli*, *Clostridia*, *Salmonella* i *Shigella spp* [40]. Możliwe jest to dzięki stymulacji wydzielania produktów hamujących adhezję patogenów oraz obniżaniu pH treści jelit, poprzez produkcję kwasów organicznych. Funkcja metaboliczna związana z procesami trawienia oraz przyswajania energii z pożywienia, szerzej została omówiona w podrozdziale 1.9. („Aktualny stan wiedzy i proponowane mechanizmy mikrobioty jelitowej w powstawaniu i rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2”). Ponadto mikrobiota jelitowa zaangażowana jest w regulację czynności motorycznych jelit, syntezę witamin z grup B i K, niektórych aminokwasów, np. lizyny i treoniny [45] oraz utrzymanie homeostazy układu immunologicznego poprzez regulację liczebności i stosunku limfocytów Th1 do Th2 [36], [37], [43].

Wiedza dotycząca kolonizacji jelit, a następnie fluktuacji w obrębie „dojrzałej” mikrobioty pod wpływem różnych czynników oraz roli, jaką spełnia w naszym organizmie pozwoliła na lepsze zrozumienie ludzkiego mikrobiomu. Stanowi ponadto solidne fundamenty dla kolejnych badań, mających na celu sprawdzenie, w jaki sposób zmiany w mikrobiomie są powiązane z chorobami. Obecnie projektowane są nowe podejścia terapeutyczne do manipulacji składem mikrobiomu w celu leczenia różnych schorzeń. Przykładowo, zaobserwowano, że mikrobiota jelit pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit IBD (ang. *inflammatory bowel diseases*) podlega znacznym zmianom w czasie w porównaniu do zdrowych osób. Nagłe fluktuacje w składzie mikrobioty skorelowane były z intensywniejszym leczeniem, spowodowanym zaostrzeniem choroby. Jedynie okresowo mikroorganizmy jelitowe pacjentów z IBD, wykazują



podobieństwo do „normalnej” flory, charakterystycznej dla tego odcinka. Wyniki te mogą w przyszłości posłużyć do wprowadzenia monitorowania mikrobioty jelitowej i oceny skuteczności stosowanych terapii [46]. Inne badania wykazały, że bakterie jelitowe mogą wywołać sepsę u wcześniaków. Przebadano z zastosowaniem sekwencjonowania prospektywnie próbki kału i krwi od zdrowych niemowląt oraz od tych, u których rozwinęła się sepsa. Wyniki badań z krwi u niemowląt z sepsą potwierdziły obecność bakterii naturalnie występujących w jelitach: *Streptococcus* typu B, *Escherichia coli* i *Serratia marcescens*. Te informacje z kolei powinny zwrócić uwagę lekarzy, na konieczność wcześniejszego ustalenia ryzyka i zminimalizowania go poprzez zastosowanie odpowiednich środków prewencyjnych [47]. Dowiedziono również, że zmiany w mikrobiocie jelitowej mogą mieć bezpośredni wpływ na rozwój raka jelita grubego [48].

Sukcesy HMP nadal zachęcają kolejne zespoły badawcze do dalszej eksploracji mikrobioty jelit, o czym świadczą badania prowadzone w ramach projektów takich jak: American Gut Project, British Gut Project, czy Metagenomics of the Human Intestinal Tract.

Badania metagenomiczne to nie tylko poznawanie nowych gatunków, ale przede wszystkim możliwość szukania i identyfikowania biomarkerów, które mogą być zaangażowane w kluczowe procesy zachodzące w danym środowisku [12]. Tylko taka metodologia pozwala ukierunkować prace na wyjaśnienie roli konkretnej bakterii lub grupy bakterii w przebiegu choroby.

W wyniku rosnącej dostępności urządzeń, sekwencjonowanie nie zostało ograniczone jedynie do celów naukowych, ale jest obecnie na progu wdrażania do klinicznych laboratoriów mikrobiologicznych. Sekwencjonowanie 16S rRNA jest szczególnie ważne w przypadku identyfikacji bakterii rzadkich, wolnorosnących oraz w przebiegu infekcji o ujemnych wynikach w hodowlach. Nie tylko może zapewnić wgląd w etiologię chorób zakaźnych, ale także pomóc klinicystom w wyborze antybiotyków i procedur kontroli zakażeń. NGS charakteryzuje także duży potencjał do zmiany sposobu diagnozowania chorób zakaźnych, które są jedną z głównych przyczyn śmiertelności na całym świecie [4]. Odpowiednio szybkie wykrycie czynnika etiologicznego w tym przypadku ma kluczowe znaczenia dla wdrożenia odpowiedniego leczenia i poprawy zdrowia pacjenta.

W rozwoju bądź przebiegu coraz to większej liczby chorób wykazywany jest związek ze specyficznymi zmianami w składzie ilościowym i jakościowym flory bakteryjnej. Szczególną rolę w patogenezie chorób takich nieswoiste stany zapalne jelit [46], choroba Leśniowskiego - Crohna [49], cukrzyca typu 1, 2 [50], czy otyłość [51] odgrywa właśnie mikrobiota jelitowa.

## 1.5 Otyłość

Otyłość definiowana jest, jako zaburzenie homeostazy energetycznej, związanej z nadmiernym przyrostem masy ciała, spowodowanym nagromadzeniem tkanki tłuszczowej [52]. Uznawana jest za stan patologiczny, który może prowadzić do upośledzenia wielu czynności życiowych człowieka, chorób układu krążenia, układu oddechowego, niektórych nowotworów złośliwych, cukrzycy typu 2 [53].

Zależnie od płci odmienne wartości definiują otyłość. U mężczyzn jest równoznaczna z nagromadzeniem tkanki tłuszczowej w ilości przekraczającej o 25% masę ciała, a u kobiet o 30% [54].

### 1.5.1 Wskaźniki i metody służące do rozpoznania i określania stopnia otyłości.

Zasady określania prawidłowej wagi lub stopnia otyłości opierają się przede wszystkim na wskaźniku masy ciała – BMI (ang. *body mass index*), nazywanym też wskaźnikiem Queteleta [54]. Wskaźnik BMI oblicza się dzieląc masę ciała wyrażoną w kilogramach przez wzrost wyrażony w metrach do kwadratu [55], [56].

$$BMI = \frac{\text{masa ciała [kg]}}{\text{wzrost}^2 \text{ [m}^2\text{]}}$$

Przedziały wartości wskaźnika BMI, pozwalające na klasyfikację otyłości według wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) zostały przedstawione w tabeli 1.

**Tabela 1.** Klasyfikacja otyłości w oparciu o BMI na podstawie wytycznych WHO.

Wartość BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Klasyfikacja otyłości
< 18,5	Niedowaga
18,5 – 24,9	Norma
25,0 -29,9	nadwaga
30,0 – 34,9	otyłość I°
35,0 – 39,9	otyłość II°
≥ 40,0	otyłość III° (olbrzymia)

Mimo iż wskaźnik BMI jest najpowszechniejszą metodą określania stopnia otyłości, to na jego podstawie nie jesteśmy w stanie określić ilości tkanki tłuszczowej, ponieważ w wartości wyrażającej masę ciała należy również wziąć pod uwagę masę mięśni, kości oraz wody [57]. Ponadto BMI nie uwzględnia różnic związanych z płcią. Z tego powodu stosowany jest też dodatkowo inny wskaźnik antropometryczny, tzw. wskaźnik talia – biodro, określane skrótem - WHR (ang. *waist-hip-ratio*). Służy on do rozpoznania otyłości centralnej, czyli nadmiernego nagromadzenia tkanki tłuszczowej w okolicy brzusznej [54]. Wskaźnik WHR oznacza się według poniższego wzoru:

$$WHR = \frac{\text{obwód talii [cm]}}{\text{obwód bioder [cm]}}$$

Wartości WHR > 0,85 u kobiet i >1,0 u mężczyzn świadczą o występowaniu otyłości centralnej [56].

W badaniach specjalistycznych poza wyżej wymienionymi wskaźnikami coraz częściej stosuje się nieinwazyjną metodę opartą o ocenę składu ciała przy użyciu bioimpedancji, która rozważana jest w kontekście podstawowego narzędzia

w diagnozowaniu otyłości. Polega ona na pomiarze oporu elektrycznego tkanek, przez które przepuszcza się prąd elektryczny o niewielkim natężeniu. Tkanka mięśniowa, kości oraz struktury zawierające znaczną ilość wody przewodzą prąd elektryczny znacznie szybciej niż tkanka tłuszczowa. Dzięki obliczeniu różnic w przewodnictwie można oznaczyć m.in. całkowitą ilość wody w organizmie, masę tkanki tłuszczowej, masę ciała pozbawioną tłuszczu, czy masę kości [58]. Pozostałe metody, które pozwalają na pomiar tkanki tłuszczowej to: tomografia komputerowa, magnetyczny rezonans jądrowy [56] i rentgenowska absorpcjometria podwójnej energii – DXA (ang. *dual energy X-ray absorptiometry*) [54].

### 1.5.2 Etiopatogeneza otyłości

Zgodnie ze współczesnym stanem wiedzy otyłość jest złożoną chorobą, będącą wynikiem interakcji czynników genetycznych, metabolicznych, i/lub środowiskowych. W obrębie tych ostatnich można wyróżnić czynniki behawioralne, socjalne i kulturowe [54], [59], [60], [61]. Ogólna klasyfikacja, uwzględniająca etiologię oparta jest na podziale otyłości na: otyłość pierwotną i wtórną [62]. **Otyłość pierwotna**, inaczej prosta lub pokarmowa rozpoznawana jest u ponad 90% pacjentów z otyłością. Spowodowana jest długotrwałym dodatnim bilansem energetycznym, wywołanym nadmierną podażą pokarmu, w stosunku do wydatkowanej energii, która magazynowana jest w tkance tłuszczowej. Z kolei **otyłość wtórna** występuje u niewielkiego odsetka pacjentów i jest wynikiem zaburzeń genetycznych (zespół Lawrence-Moon-Biedla, zespół Willi-Pradera), hormonalnych (niedoczynność tarczycy, niedobór hormonu wzrostu, choroba i zespół Cushinga, zespół policystycznych jajników), uszkodzeń OUN (guzy, stany zapalne, zabiegi chirurgiczne podwzgórza) lub przyjmowanych leków (glikokortykosteroidy, estrogeny, progesteron, niektóre leki przeciwdepresyjne) [56], [63].

Za podstawową przyczynę rozwoju otyłości pierwotnej uważa się wpływ **czynników środowiskowych**, które spowodowały zmianę nawyków żywieniowych, m.in. zwiększenie konsumpcji tłuszczów, cukrów oraz żywności wysoko przetworzonej o długim terminie przydatności. Wraz z rozwojem urbanizacji, technologii i środków transportu doszło także do istotnego ograniczenia aktywności fizycznej i zmian w funkcjonowaniu rodziny [54]. Te niezdrowe nawyki doprowadzają w konsekwencji

u znacznej części populacji do przekroczenia zapotrzebowania energetycznego. Dodatkowo efekt ten może być potęgowany przez częsty lub ciągły stres, który nierzadko przekształca się w **zaburzenia emocjonalne** obejmujące: uzależnienie od jedzenia, zespół nocnego lub kompulsywnego jedzenia [64].

Równie ważną rolę odgrywają **czynniki genetyczne**, które stanowią od 25 - 40% przypadków otyłości [65]. Szacuje się, że liczba genów, mająca wpływ na jej rozwój przekracza 600. Podłoże genetyczne otyłości najczęściej uwarunkowane jest wielogenowo (efekt współdziałania genów z czynnikami środowiska) i dotyczy polimorfizmów licznych genów, które powodują subtelną, ale istotną zmianę funkcji białek [66]. Uwarunkowania jednogenowe występują rzadko i są wynikiem mutacji w obrębie pojedynczych genów, których produkty uczestniczą w regulacji apetytu, np. mutacje genu leptyny (gen ob), receptora typu 4 melanokortyny (MC4R) oraz proopiomelanokortyny (POMC). Do tej pory opisano ok 200 przypadków monogenowej otyłości, dziedziczonej zgodnie z prawami Mendla.

Otyłość może także być elementem składowym kompleksu rzadkich zaburzeń genetycznych, takich jak: Prader-Willi, Cohen, Alström oraz Bardet-Biedl. Zespoły te charakteryzują się dodatkowo wadami rozwojowymi, cechami dysmorficznymi i upośledzeniem umysłowym [66].

Niektóre doniesienia sugerują także związek adenowirusów: Ad-36 i SMAM-1 z rozwojem otyłości [67], [68], [69]. Choć w części środowisk naukowych temat ten jest nadal kontrowersyjny, istnieje wiele prac badawczych przeprowadzonych na zwierzętach, a następnie na ludziach, które potwierdzają tę hipotezę. Przykładowo, zaobserwowano, że u osób, które przebyły infekcję wywołaną przez adenowirusa występuje otyłość brzuszna oraz niski poziom cholesterolu i trójglicerydów w surowicy [67]. Tłumaczone to jest aktywacją przez Ad-36 enzymów oraz kofaktorów odpowiedzialnych za gromadzenie tłuszczu. Wirus wychytuje cząsteczki tłuszczu z krwi, przyczyniając się do spadku cholesterolu i trójglicerydów. Ponadto glukozę we krwi oraz komórki macierzyste tkanki tłuszczowej do przekształcenia w adipocyty [68]. Skłonność pacjentów po przebytej infekcji do rozwoju otyłości tłumaczona jest także możliwym uszkodzeniem jądra brzuszno-przyśrodkowego oraz przykomorowego podwzgórza, co prowadzi do pobudzenia zwiększonego apetytu [69].

### 1.5.3 Powikłania otyłości.

Ryzyko rozwoju powikłań otyłości u różnych pacjentów zależy od ilości nadmiaru tkanki tłuszczowej, jej rozmieszczenia oraz czasu trwania choroby. Innymi czynnikami mającymi wpływ na wystąpienie powikłań to: wiek, płeć, pochodzenie etniczne i warunki socjalne. Skutki zdrowotne obejmują zarówno zwiększone ryzyko przedwczesnej śmierci, jak i poważne przewlekłe choroby, które obniżają ogólną jakość życia. Niektóre z nich przedstawiono poniżej:

- **Zaburzenia sercowo – naczyniowe** (choroba niedokrwienna serca, udar, niewydolność krążenia, nadciśnienie tętnicze, zakrzepica żylna)
- **Choroby układu oddechowego** (astma, niedotlenienie, zespół bezdechu sennego)
- **Nowotwory** (przetyku, jelita cienkiego, okrężnicy, odbytnicy, wątroby, białaczka, choniak), u kobiet: nowotwory endometrium, szyjki macicy, jajnika, piersi.
- **Zaburzenia metaboliczne** (dyslipidemia, hipercholesterolemia, zespół metaboliczny, cukrzyca) [70].

## 1.6 Cukrzyca typu 2

Jednym z najczęstszych powikłań otyłości jest cukrzyca typu 2. Choroba ta charakteryzuje się hiperglikemią wynikającą z defektu wydzielania i/lub działania insuliny. Niezdiagnozowana lub źle kontrolowana jest przyczyną wielu powikłań, które mogą doprowadzić do uszkodzenia, zaburzenia czynności i niewydolności różnych narządów, zwłaszcza narządu wzroku, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych [71]. Cukrzyca typu 2, dotyczy głównie osób dorosłych oraz w podeszłym wieku i stanowi ok 80 - 90% przypadków cukrzycy. Niepokojący jest fakt, że coraz częściej odnotowuje się również przypadki zachorowań wśród dzieci i młodzieży [72].

### 1.6.1 Etiopatogeneza cukrzycy typu 2

Główną rolę w rozwoju cukrzycy typu 2 odgrywają zaburzenia wydzielania insuliny i insulinooporność oraz współdziałanie czynników genetycznych i środowiskowych. Gwałtowny wzrost przypadków z cukrzycą typu 2 tłumaczony jest wpływem **czynników środowiskowych**: przede wszystkim diety oraz małej aktywności fizycznej. Otyłość brzuszna stanowi najistotniejszy czynnik ryzyka, który wzrasta wraz ze zwiększeniem BMI i WHR. W następstwie rozwija się **insulinooporność**, poprzedzająca niedobór insuliny nawet na kilka lat. Definiowana jest, jako stan, w którym dochodzi do zmniejszenia wrażliwości na insulinę, co z kolei próbuje być kompensowane, przez komórki  $\beta$  wysp trzustkowych, wydzielające zwiększone ilości tego hormonu. Pogłębiająca się insulinooporność prowadzi do progresji zaburzeń w funkcjonowaniu komórek  $\beta$ , które wyczerpują rezerwy wydzielnicze insuliny, a to skutkuje narastaniem hiperglikemii [71], [73].

**Zaburzenia produkcji i/lub sekrecji insuliny** polegające na opóźnionym i dłuższym wydzielaniu mają zazwyczaj **podłoże genetyczne**. Rola **czynników genetycznych** w znacznej mierze uwarunkowana jest wielogenowo i wiąże się z polimorfizmami, które zmieniają ekspresję lub sekwencję aminokwasową białek. Chociaż do tej pory przebadano setki genów, które potencjalnie mogą mieć znaczenie w rozwoju cukrzycy typu 2, to potwierdzony związek opisano zaledwie w kilku przypadkach, m.in. gen dla kalpainy 10, czy geny PPAR $\gamma$  i KCNJ11 [74]. Z kolei formy monogenowe obejmują niewielki odsetek przypadków i są spowodowane rzadkimi mutacjami, zmieniającymi funkcję białka, kodowanego przez wadliwy gen, np. mutacje w genie receptora insuliny. Obraz kliniczny wywołany formami monogenowymi charakteryzuje się znacznym upośledzeniem wydzielania insuliny lub wysokim stopniem insulinooporności, którym mogą towarzyszyć objawy pozatrzustkowe [73]. Przykłady chorób spowodowanych formami monogenowymi obejmują: zespół Rabsona-Mendehalla, zespół insulinooporności typu A, zespół Donohue (krasnoludkowatość) [74].

### 1.6.2 Powikłania cukrzycy

Powikłania cukrzycy można podzielić na ostre oraz przewlekłe. Wśród ostrych powikłań u pacjentów mogą występować:

- kwasica i śpiączka ketonowa
- zespół hiperglikemiczno - hiperosmolarny
- kwasica mleczanowa
- hipoglikemia polekowa

Przewlekłe powikłania spowodowane są najczęściej trudnościami w osiągnięciu kryteriów wyrównania cukrzycy, co może doprowadzić do powstania powikłań mikroangiopatycznych (powikłania oczne, nerkowe, neuropatie) i makroangiopatycznych (związane głównie z rozwojem miażdżycy) [75].

### 1.7 Epidemiologia cukrzycy typu 2 i otyłości.

Liczba chorych z otyłością i z cukrzycą typu 2 rośnie nieustannie w alarmującym tempie, zarówno w krajach uprzemysłowionych, jak i rozwijających się. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) uznała cukrzycę i otyłość, za pierwsze niezakaźne epidemie. Według ustaleń WHO z dnia 07.04.2016 roku, ponad 422 miliony ludzi na świecie cierpi z powodu cukrzycy, a co 10 osoba jest otyła [72]. W porównaniu do roku 1980 jest to czterokrotny wzrost, wówczas liczba diabetyków wynosiła 108 mln. Obecne wskaźniki amputacji stopy cukrzycowej, która jest jednym z powikłań niekontrolowanej cukrzycy, są od 10 do 20 razy większe niż w poprzednich latach, a liczba zgonów w wyniku tych chorób w 2012 roku osiągnęła 5 mln [76].

Badania epidemiologiczne przeprowadzone w Polsce, podczas Wieloośrodkowego Ogólnopolskiego Badania Stanu Zdrowia Ludności na przestrzeni lat 2003-2005 oraz 2013-2014 również nie napawają optymizmem. Wykazano, że w grupie wiekowej 20 - 74 lata stale wzrasta liczba Polaków z nadwagą i otyłością. Odsetek mężczyzn z nadwagą wzrósł z 40,2% do 43,1%, a z otyłością od 20,0% do 24,2%. Z kolei nadwaga u kobiet wzrosła z 27,7% do 29,5%, a otyłość z 22,3% do 23,4% [77].



W przypadku cukrzycy typu 2, zachorowalność w Polsce wynosi 1,6-1,7%. W 2013 roku problem ten dotyczył 3 mln Polaków, z czego według danych szacunkowych u 1/3 z nich choroba ta nie była zdiagnozowana [78]. Niepokojący jest także fakt, że problem cukrzycy i otyłości coraz częściej dotyczy dzieci i młodzieży. Mimo znacznego postępu medycyny w dalszym ciągu nie znaleziono skutecznego środka walki z tymi chorobami, a prognozy na kolejne lata przewidują, że do 2040 roku na świecie liczba osób z cukrzycą przekroczy 642 miliony [79].

## 1.8 Początki badań mikrobiologicznych w otyłości i cukrzycy typu 2

Pierwsze doświadczenia dotyczące wpływu mikroorganizmów na patogenezę otyłości zostały przeprowadzone na mysim modelu. Polegały one na transferze mikrobioty tylnego odcinka jelit myszy o prawidłowej wadze do jelit myszy hodowanych w sterylnych warunkach - GF (ang. *germ-free*). Po okresie 14 dni, u myszy GF z przeszczepioną florą zaobserwowano wzrost zawartości tłuszczu o 60% w stosunku do pierwotnych pomiarów oraz rozwój insulinooporności. Badania te wykazały, że obecność mikrobioty sprzyja wchłanianiu cukrów w jelicie oraz indukuje lipogenezę w wątrobie [80].

Kolejne eksperymenty polegały na wprowadzeniu myszom o właściwej wadze wysokotłuszczowej i bogatej w cukier diety, co skutkowało zmianami w mikrobiocie jelitowej nawet w przeciągu jednego dnia. Zaobserwowano wówczas drastyczną redukcję bakterii należących do typu Bacteroidetes, sięgającą nawet 50% pierwotnej ilości oraz proporcjonalny wzrost bakterii typu Firmicutes [81].

W dalszej serii doświadczeń drobnoustroje zasiedlające okrężnicę myszy z otyłością (ob./ob.) oraz myszy szczupłych przeniesiono do jelit szczupłych myszy „germ-free”. Po okresie 2 tygodni od kolonizacji bakteriami pochodzącymi od myszy ob./ob. uzyskano znacznie wyższy przyrost masy ciała, przy niezmiętej ilości pokarmu i stałej ilości traconej energii. Dodatkowo u tych zwierząt wystąpiły: insulinooporność, wzrost stężenia leptyny i glukozy we krwi. Natomiast kolonizacja bakteriami pochodzącymi od szczupłych myszy, nie wpłynęła na istotne statystycznie zmiany przyrostu masy ciała [80].

Powyższe badania sugerowały ewidentny udział mikrobioty jelitowej w rozwoju otyłości i w efekcie cukrzycy typu 2. Przełomowe eksperymenty przeprowadzone na zwierzętach, utorowały drogę do trwających obecnie intensywnych badań nad wpływem mikroflory przewodu pokarmowego na patogenezę powyższych chorób u ludzi.

### **1.9 Aktualny stan wiedzy i proponowane mechanizmy mikrobioty jelitowej w powstawaniu i rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2.**

Podstawą rozpoczęcia badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmu rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2, było sprawdzenie, czy zaobserwowane na mysim modelu, istotne różnice dotyczące ilości typów *Bacteroides* i *Firmicutes*, występują również u ludzi. W związku z tym konieczne było przeprowadzenie podobnych badań z udziałem osób szczupłych oraz otyłych. W jednym z nich włączono osoby otyłe, które losowo przydzielono do jednej z dwóch grup. Uczestnikom grupy pierwszej wprowadzono dietę o obniżonej zawartości tłuszczu, a w drugiej grupie: dietę o obniżonej zawartości węglowodanów. Poza otyłymi osobami w badaniach brały udział również osoby szczupłe, które stanowiły grupę kontrolną. Skład mikrobioty jelitowej, pochodzącej z próbek kału badanych był monitorowany przez okres 1 roku. Przed zastosowaniem diety wszystkie osoby otyłe miały istotnie mniejszą ilość bakterii typu *Bacteroides* i większą ilość bakterii *Firmicutes* w stosunku do osób szczupłych. Natomiast po trwającej rok diecie zarówno w pierwszej jak i drugiej grupie doszło do wzrostu ilości bakterii *Bacteroides* i spadku *Firmicutes*. Badania te nie tylko potwierdziły wyniki uzyskane na mysim modelu, ale także dowiodły, że wzrost liczebności *Bacteroides* jest skorelowany z utratą masy, a nie kalorycznością diety [82]. Podobne prace, oceniające stosunek ilościowy *Firmicutes* do *Bacteroidetes* przeprowadziło jeszcze kilka zespołów badawczych [83], [84].

Na podstawie wielu długoletnich i wnikliwych badań wykazano związek składu mikroflory z dietą, a także zaproponowano kilka mechanizmów wyjaśniających wpływ różnic w mikrobiocie jelitowej, które mogą przyczyniać się do rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2 w organizmie gospodarza.

W ogólnym zarysie mechanizmy te oparte są o szlaki metaboliczne, które na pewnych etapach pod wpływem zmian ilościowych i/lub jakościowych w mikrobiocie

jelitowej, ulegają aktywacji lub inhibicji, doprowadzając do zaburzenia homeostazy organizmu gospodarza. Choć jak wcześniej wspomniano istnieje kilka propozycji mechanizmów, które na pozór mogą dotyczyć różnych związków i receptorów, to jednak większość z nich stanowi zaledwie odgałęzienie od głównego szlaku metabolicznego, który sprowadza się najczęściej do dwóch cząstek: SCFA i LPS.

Na podstawie badań dotyczących stosunku ilościowego Firmicutes i Bacteroidetes u osób otyłych, rozpoczęto dokładną analizę gatunków bakterii należących do tych grup. Wykazano, że Bacteroidetes, czyli gram ujemne pałeczki u pacjentów z otyłością powodują uwalnianie lipopolisacharydu LPS - endotoksyny, będącej składnikiem błony zewnętrznej tych bakterii [82].

Rozwojowi otyłości i cukrzycy typu 2 towarzyszy zazwyczaj ogólnoustrojowy lub ograniczony wyłącznie do tkanki tłuszczowej stan zapalny. Dysbioza organizmu poprzedzająca ten proces wiązana jest właśnie z cząstkami liposacharydu. Rola LPS polega na indukcji oraz nasileniu produkcji prozapalnych cytokin, a to z kolei doprowadza do osłabienia szczelności ściany jelita [45]. W rezultacie antygeny bakteryjne przenikają do krwiobiegu i narządów zapoczątkowując subkliniczny stan zapalny. Wraz ze wzrostem ilości krążącego w organizmie LPS, wzrasta także stężenie trójglicerydów i glukozy. Efekty te przyczyniają się do rozwoju otyłości oraz oporności na insulinę, co w późniejszym okresie prowadzi do rozwoju cukrzycy typu 2 [43]. Choć mechanizm indukcji stanu zapalnego przez LPS został odkryty i opisany na modelu zwierzęcym, to uzyskane wyniki potwierdzono również w badaniach z udziałem ludzi [44]. Wykazano, że u pacjentów z cukrzycą typu 2 występował znacznie wyższy poziom LPS niż w grupie kontrolnej. Ponadto terapia polimyksyną B – antybiotykiem, skierowanym przeciwko bakteriom Gram ujemnym, przyczyniła się do obniżenia stężenia liposacharydu [85].

Kolejny z mechanizmów odnosi się do jednej z podstawowych ról mikrobioty jelitowej, jaką jest rozkład węglowodanów do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych SCFA (ang. *short chain fatty acid*) [43], głównie kwasu octowego oraz w mniejszej ilości propionowego i butanowego (masłowego) [82]. Szacuje się, że w trakcie tego procesu pozyskiwana jest energia, stanowiąca do 10% dziennego zapotrzebowania [86]. Udowodniono, że w stanie homeostazy organizmu SCFA wpływają na stymulację wzrostu, różnicowanie, regenerację i uszczelnianie nabłonka jelitowego, a także utrzymanie właściwego pH jelit [36], [37]. Ponadto kwas propionowy może zapoczątkować glukoneogenezę w jelitach, chroniąc przed rozwojem otyłości [87].

Problem pojawia się, gdy przewlekłe gromadzenie nadmiaru energii doprowadza do stymulacji lipogenezy w tkance tłuszczowej [88] i glukoneogenezy w wątrobie. W wielu pracach na podstawie analizowanych próbek kału podkreślany jest związek SCFA z fenotypem otyłości zarówno w badaniach na zwierzętach jak i na ludziach [89], [90]. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe są aktywatorem receptora GPR41, który wiąże białko G41, co wpływa stymulująco na wydzielanie peptydu YY (ang. *peptide YY*, PYY), odpowiedzialnego za spowolnienie pasażu jelitowego i w konsekwencji prowadzi do zwiększonego wchłaniania składników odżywczych i pozyskiwania energii [37], [82], [45]. Zaobserwowano również, że nadmierna produkcja kwasu octowego, zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju otyłości, poprzez indukcję wydzielania greliny, hormonu pobudzającego apetyt [91]. Zarówno kwas octowy, propionowy jak i masłowy spełniają rolę ligandów dla wspomnianego wcześniej receptora GPR41 oraz GPR43. Według przeprowadzonych na mysim modelu badań receptory te stanowią molekularny regulator równowagi energetycznej w oddziaływaniach z produktami przemian metabolicznych mikrobioty jelitowej. Myszy, które nie posiadały receptorów GPR41 i GPR43 wykazywały szczupły fenotyp w porównaniu do ich dzikich odpowiedników [44].

W związku z tym, że zwiększona produkcja SCFA związana jest z wieloma czynnikami, (m.in.: dostępnością substratu, tranzytem jelitowym, zdolnością wchłaniania przez błonę śluzową oraz obecnością specyficznych grup bakterii), nie ma pewności, czy otyłość jest głównie efektem ilości przyjmowanych węglowodanów, czy obecnością konkretnej populacji mikroflory, powiązanej ze zwiększeniem produkcji, absorpcją i magazynowaniem SCFA [82].

Inny mechanizm, w którym mikrobiota jelitowa wywiera wpływ na gospodarkę lipidową gospodarza związany jest z hamowaniem aktywności kinazy proteinowej aktywowanej przez AMP (ang. *adenosine monophosphate activated protein kinase*, AMPK). Prowadzi to do zablokowania szlaku metabolicznego, którego końcowym etapem jest proces utleniania kwasów tłuszczowych. W efekcie w mięśniach i w wątrobie zmniejsza się oksydacja kwasów tłuszczowych, a także dochodzi do ich magazynowania w tkance tłuszczowej [44], [82].

Nadmierne odkładanie tłuszczu może być także spowodowane poprzez zmniejszenie ekspresji czynnika tkankowego indukowanego głodem – FIAF (ang. *fasting induced adipocyte factor*). W naturalnych warunkach FIAF antagonizuje aktywność lipazy lipoproteinowej LPL (ang. *lipoprotein lipase*). LPL odgrywa kluczową

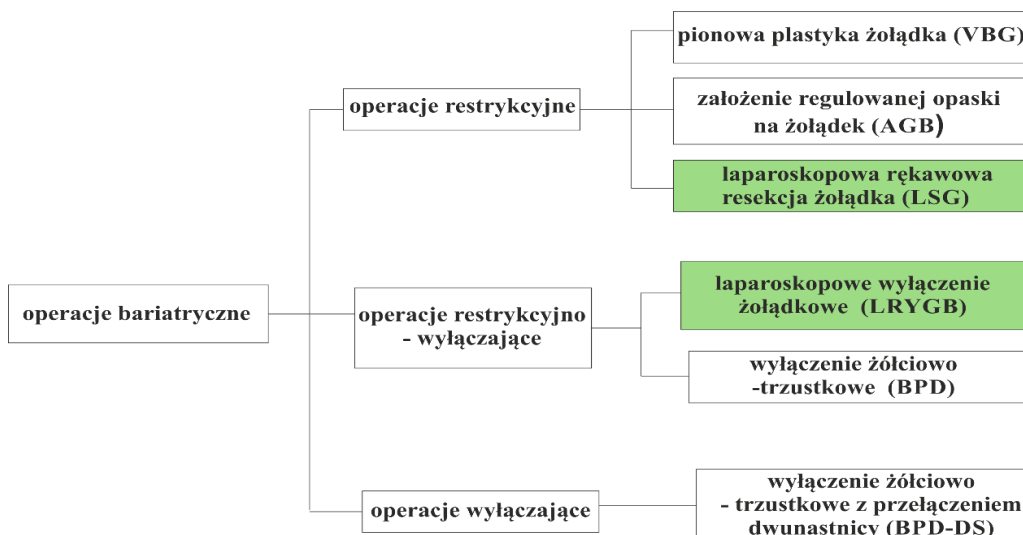
rolę w hydrolizowaniu trójglicerydów i uwalnianiu kwasów tłuszczowych, które transportowane są do adipocytów. Z kolei w adipocytach, kwasy tłuszczowe zanim zostaną zmagazynowane są ponownie estryfikowane w trójglicerydy. W wyniku ograniczonej ekspresji FIAF, wzrasta aktywność LPL prowadząc do rozrostu tkanki tłuszczowej [45].

### **1.10 Metody leczenia cukrzycy typu 2 i otyłości**

Skuteczne leczenie cukrzycy typu 2 oraz otyłości wymaga połączenia kilku metod: leczenia farmakologicznego, dietetycznego wraz z wysiłkiem fizycznym oraz zastosowanie metod niefarmakologicznych [92].

Chirurgia metaboliczna jest obecnie najbardziej efektywną metodą leczenia otyłości oraz chorób współistniejących, przede wszystkim cukrzycy typu 2. Poprawia jakość życia, a w przypadku otyłości olbrzymiej długofalowo zmniejsza ogólną śmiertelność [93],[94]. Wykonanie zabiegu bariatrycznego powinno się rozważyć u każdego otyłego pacjenta, chorego na cukrzycę typu 2, ze wskaźnikiem BMI >35 kg/m<sup>2</sup>. Natomiast, gdy BMI u tych pacjentów przekracza 40 kg/m<sup>2</sup>, zabieg bariatryczny jest wręcz rekomendowany [95]. Szczególnym wskazaniem są słabe efekty w terapii farmakologicznej i behawioralnej. Poza wyżej wymienionymi czynnikami o kwalifikacji do zabiegu decyduje również wiek pacjenta. W zaleceniach klinicznych dotyczących postępowania u chorych na cukrzycę typu 2 [96] zakres wiekowy pacjentów wynosi od 18 – 65 lat. W uzasadnionych przypadkach górna granica wieku może być poszerzona do 70. roku życia, jeżeli ryzyko związane z przeprowadzeniem zabiegu jest mniejsze niż potencjalne korzyści, wynikające z wykonania operacji [95].

Obecnie wykonywanych jest kilka rodzajów zabiegów bariatrycznych (Ryc 4).



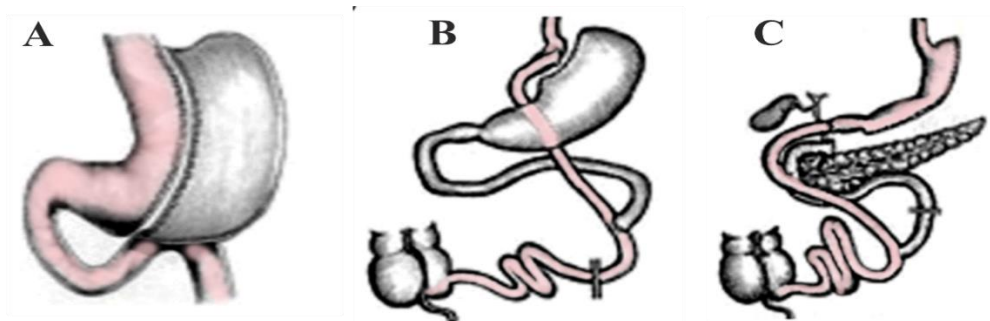
**Rycina 4.** Rodzaje operacji bariatrycznych oraz przykładowe metody.

Na zielono oznaczono te zabiegi, które obecnie są najczęściej stosowane w Polsce. W nawiasach podano skróty metod pochodzące od ich angielskich nazw. Pełne nazwy zostały rozwinięte w wykazie skrótów.

- **operacje restrykcyjne** – oparte są na zachowaniu ciągłości przewodu pokarmowego poprzez zmniejszenie żołądka, co w konsekwencji prowadzi do ograniczonego spożywania posiłków. Wśród tych zabiegów najczęściej stosowana jest **laparoskopowa rękawowa resekcja żołądka** (ang. *laparoscopic gastric sleeve resection*; LSG), która polega na usunięciu głównej części dna i korpusu żołądka, czyli ok 90% tego narządu. Zabieg LSG nie doprowadza do naruszenia ujścia podstawy żołądka, dzięki czemu zachowana jest jego prawidłowa funkcja. Po zabiegu żołądek przypomina wąski „rękaw”, a ilość spożywanego jednorazowo pokarmu nie przekracza 1/10 objętości poprzednio przyjmowanych posiłków. Ponadto zmniejsza się uczucie łaknienia i sytości, wynikające z usunięcia komórek zlokalizowanych w poddanej resekcji części żołądka, które produkują „hormon głodu” – grelinę [97].
- **operacje restrykcyjno - wyłączające** poza usunięciem części żołądka umożliwiają skrócenie pasażu treści żołądkowej przez jelito cienkie. Najczęściej wykonywaną metodą w tego rodzaju zabiegach jest **operacja laparoskopowego wyłączenia żołądkowego** (ang. *Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass*, LRYGB). Polega ona na podziale żołądka na dwie części: mniejszą, stanowiącą zbiornik żołądkowy, do którego doszywane jest jelito cienkie oraz większą - fragment, wyłączony z pasażu pokarmu, którego funkcja ogranicza

się do produkcji soków trawiennych. Po zbiegu pasaż odbywa się skróconą drogą, tj. z pominięciem znacznej części żołądka, dwunastnicy i jelita cienkiego. W efekcie proces trawienia i wchłaniania zachodzi znacznie szybciej [97].

- **operacje wyłączające** – polegają na ograniczeniu pojemności żołądka poprzez jego przeszycie lub częściowe wycięcie. W efekcie znacznie zmniejsza się pasaż przez jelito cienkie oraz wchłanianie pożywienia. Operacje wyłączające są rzadko stosowane, ze względu na możliwość spowodowania zespołu upośledzonego wchłaniania.



**Rycina 5.** Przykładowe rodzaje operacji bariatrycznych.

(A) rękawowa resekcja żołądka, (B) operacja laparoskopowego wyłączenia żołądkowego, (C) wyłączenie żołądkowo-trzustkowe z przełączeniem dwunastnicy.

Po zabiegach bariatrycznych, szczególnie LSG i LRYGB następuje istotna i długotrwała redukcja masy, wzrasta ilość receptorów insulionowych, spada insulinemia na czczo i dochodzi do poprawy tolerancji węglowodanów. Wyniki niektórych badań sugerują, że zabiegi bariatryczne są skuteczną metodą, poprawiającą kontrolę glikemii u pacjentów z otyłością i cukrzycą typu 2 [98], [99], [100]. Ponadto u większości pacjentów poza utratą masy ciała obserwuje się remisję cukrzycy oraz powikłań związanych z otyłością, np. nadciśnienia tętniczego [101], [102]. Kolejną zaletą zabiegów bariatrycznych jest zmniejszenie ryzyka zgonu, a nawet wydłużenie okresu życia [103]. Choć w takiej sytuacji zmienia się istotnie jakość życia pacjenta, to musi on pamiętać również o nowych wymaganiach i ograniczeniach, gdyż przestrzeganie ustalonych zasad po zabiegach bariatrycznych stanowi jedyną szansę na powrót do zdrowia i normalnego, aktywnego życia.

W dostępnej literaturze naukowej znaleziono również dowody na to, że pod wpływem zabiegów bariatrycznych zmienia się także skład mikrobioty jelitowej pacjentów [89], [104], [105]. Co ciekawe, zmiany te dotyczą różnych grup bakterii w zależności od zastosowanego zabiegu. Przykładowo w pracy Mediny i wsp. po zastosowaniu zabiegu RYGB obserwowano wzrost liczebności bakterii typu Bacteroidetes i Actinobacteria i spadek bakterii typu Firmicutes. Natomiast u pacjentów po zabiegu SG wyniki były odmienne: zmniejszyła się liczebność Bacteroidetes, a wzrosła liczebność typu Firmicutes i bakterii z rzędu Enterobacteriales [106].



## 2 ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

W obliczu raportów epidemiologicznych opisujących skalę zachorowań, powikłań oraz umieralności związanej z otyłością oraz z cukrzycą typu 2 konieczne jest multidyscyplinarne podejście do dokładnego zbadania i poznania tych chorób. Przytoczone we wstępie doniesienia naukowe podkreślają m.in. rolę mikrobioty w przebiegu otyłości i cukrzycy typu 2. O ile skład ilościowy i jakościowy mikrobioty jelita grubego jest powszechnie badany i poznawany, to proksymalny odcinek – jelito cienkie pozostaje nadal pomijane, a to właśnie w tej części przewodu pokarmowego zachodzą początkowe etapy wchłaniania.

Głównym celem rozprawy jest ocena jakościowa i ilościowa (procentowa) struktury taksonomicznej mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy u pacjentów z otyłością oraz cukrzycą typu 2 i otyłością, w odniesieniu do grupy osób zdrowych.

W pracy wyznaczono również szczegółowe cele badawcze, do których należało:

1. Opracowanie oraz standaryzacja metody amplifikacji, stanowiącej kluczowy etap w przygotowaniu badanych materiałów do sekwencjonowania nowej generacji.
2. Zaprojektowanie dodatkowej pary starterów zewnętrznych (*ang. external primers*), w celu zwiększenia czułości i specyficzności amplifikacji.
3. Porównanie uzyskanych z sekwencjonowania danych jakościowych oraz ilościowych pomiędzy grupami badawczymi, a grupą kontrolną na poziomach: typu, klasy, rzędu, rodziny, rodzaju i gatunku.
4. Zestawienie danych z punktu 3-go z podstawowymi parametrami metabolizmu glukozy i lipidów: glikemią, hemoglobina glikowaną (HbA<sub>1c</sub>), całkowitym cholesterolem, frakcjami LDL, HDL, trójglicerydami, a także markerem aktywności enzymu wątrobowego (ALT), wiekiem oraz współczynnikiem masy ciała (BMI).

### 3 MATERIAŁ

#### 3.1 Pacjenci – kryteria włączenia i wykluczenia.

Projekt badawczy w ramach, którego wykonano niniejszą pracę uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (opinia nr: KBET/81/B/2010 - Załącznik 1).

Rekrutacja pacjentów miała miejsce w II Katedrze Chirurgii Ogólnej UJ CM. Każdy z uczestników przed włączeniem do odpowiedniej grupy został pisemnie poinformowany o celu i przebiegu badania oraz o dobrowolnym charakterze uczestnictwa. Podstawą zakwalifikowania pacjentów do grup badawczych było spełnienie kryteriów włączenia, wymienionych w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Kryteria włączenia pacjentów do poszczególnych grup badawczych.

<b>grupa</b> <b>kryteria</b>	<b>pacjenci z T2DM i z otyłością</b>	<b>pacjenci z otyłością</b>	<b>grupa kontrolna</b>
<b>wiek</b>	20 – 70 lat		
<b>rozpoznanie</b>	kliniczne rozpoznanie cukrzycy *	kliniczne rozpoznanie otyłości *	brak chorób, osoby zdrowe
<b>długość trwania choroby</b>	co najmniej 2 lata	co najmniej 2 lata	-
<b>długość doustnego przyjmowania leków</b>	minimum 2 lata	-	-
<b>BMI</b>	> 35 kg/m <sup>2</sup>	> 35 kg/m <sup>2</sup>	18,5 - 24,9 kg/m <sup>2</sup>

\*Rozpoznanie w oparciu o wytyczne Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) z 2016 r [107].

Stwierdzenie obecności, choć jednego z poniższych kryteriów było jednoznaczne z wykluczeniem pacjentów z badania.

**Kryteria wykluczenia:**

- pacjenci poniżej 20 i powyżej 75 roku życia
- leczenie antybiotykami w okresie 30 dni przed pobraniem biopsji z dwunastnicy
- przyjmowanie preparatów probiotycznych
- potwierdzone zakażenia układu pokarmowego
- przewlekłe stany zapalne jelit o nieznannej etiologii
- czynne choroby nowotworowe
- niedobory odporności
- uzależnienie od alkoholu i narkotyków
- schorzenia wymagające leczenia psychiatrycznego
- kobiety w ciąży
- pacjenci z cukrzycą LADA lub MODY
- brak zgody na włączenie do badania lub wycofanie jej w trakcie trwania projektu

**3.1.1 Podział na grupy badawcze**

Na podstawie powyższych kryteriów do udziału w badaniach zakwalifikowano łącznie 86 pacjentów, których podzielono na grupy:

1. **Grupa badawcza** (n = 39) obejmowała 17 pacjentów z otyłością oraz 22 osoby z otyłością i cukrzycą typu 2.

Wszyscy pacjenci z grupy badawczej zostali ponadto poddani zabiegowi bariatrycznemu – rękawowej resekcji żołądka.

2. **Grupa kontrolna** obejmowała 27 zdrowych pacjentów, o prawidłowej masie ciała, którzy zgłaszali się w latach 2011 - 2014 do II Katedry Chirurgii Ogólnej UJ CM na badania kontrolne z powodu bólu brzucha o niezidentyfikowanej etiologii.

### 3.2 Materiał biologiczny

Zarówno w przypadku grupy badanej, jak i kontrolnej, materiałem poddanym badaniom były biopaty z części zstępującej dwunastnicy, pobrane za pomocą gastrokopu w II Katedrze Chirurgii Ogólnej CM UJ. Po zabiegu materiał biologiczny niezwłocznie przenoszono do jałowych probówek typu Eppendorff o pojemności 1,5 ml, a następnie zamrażano (-70 °C). Ponadto u pacjentów wykonywano podstawowe badania profilaktyczne krwi obejmujące: poziom glikemii na czczo, odsetek hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>), całkowity cholesterol, frakcje LDL, HDL, trójglicerydy oraz aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT).

Dane kliniczne pacjentów wraz z informacjami o wieku, wskaźniku BMI oraz długości trwania choroby nanoszono na specjalnie skonstruowany na potrzeby badania formularz (Załącznik 2).

Uzyskane materiały biologiczne w stanie głębokiego zamrożenia wraz z formularzem i podpisaną zgodą pacjentów na udział w badaniu, dostarczano do laboratorium Zakładu Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, mieszczącego się w Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dane pacjentów, zgodnie z ustawą o ochronie danych osobowych, zostały zakodowane. Począwszy od momentu otrzymania probówek z wycinkami dwunastniczymi, każdemu pacjentowi nadawany był unikalny numer, którym posługiwano się we wszystkich kolejnych etapach analizy.

Z przyczyn niezależnych od badacza nie była możliwa realizacja pierwotnych założeń projektu obejmujących ustalenie struktury mikrobioty:

- z próbek kału pobranych przed zabiegiem bariatryi – głównie z powodu braku zgody pacjentów na oddanie materiału.
- z biopatów dwunastniczych oraz próbek kału po upływie 6 tygodni od zabiegu bariatrycznego – pacjenci nie zgłaszali się na wizytę kontrolną po zabiegu lub nie wykonywano im ponownej gastrokopii.

Nie uzyskano również wiarygodnych informacji odnośnie przyjmowanych leków i stosowanej diety.

## 4 METODY

### 4.1 Izolacja bakteryjnego DNA

Przed wykonaniem właściwej izolacji z bioptatów dwunastniczych, przeprowadzono wstępną procedurę, opartą o lizę enzymatyczną oraz mechaniczną, opracowaną przez Gosiewskiego i wsp. [108]. Zastosowanie tych etapów znacznie wpływa na poprawę czułości i wydajności procesu izolacji. Procedurę dostosowano adekwatnie do panelu wykrywanych mikroorganizmów, pomijając lizę chemiczno-enzymatyczną i termiczną z wykorzystaniem NaOH,  $\beta$ -merkптоetanolu (MrEt) i litykazy, które umożliwiają ekstrakcję grzybów z materiału klinicznego.

Kolejne etapy procedury zostały przedstawione poniżej:

1. Bioptaty dwunastnicze rozmrożono, a następnie przeniesiono do jałowych probówek typu Eppendorf (Axygen), zawierających około 1,5 g szklanych kulek o średnicy 700-1100  $\mu\text{m}$  (Sigma).
2. Do każdej próbki dodano kolejno: 100  $\mu\text{l}$  roztworu Tris-HCl (10 mM, pH = 8,5), 20  $\mu\text{l}$  lizozymu o stężeniu 50 mg/ml oraz 10  $\mu\text{l}$  lizostafiny o stężeniu 1,0 mg/ml.
3. Próbkę poddano homogenizacji w urządzeniu FastPrep (FP120, MP Biomedical) przy prędkości 4,0 m/s przez 30 sek.
4. Po homogenizacji próbki delikatnie zwirowano (wirówka MPW 65R), w celu usunięcia piany, a następnie inkubowano w termobloku (Eppendorf), w temperaturze 37 °C przez 30 min.
5. Próbkę wirowano przy prędkości 12 000 RPM przez 10 min.
6. Nadsącz usuwano.

Dalej postępowano według procedury producenta komercyjnego zestawu do izolacji Genomic Mini (A&A Biotechnology):

1. Do osadu dodano 200  $\mu$ l roztworu lizującego LT i 20  $\mu$ l Proteinyzy K.
2. Całość wymieszano i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 20 min, a następnie próbki przeniesiono do 70 °C na 5 min.
3. Próbkę intensywnie mieszano na wortexie (BioSan) przez około 20 sek, a następnie wirowano przy prędkości 14 000 RPM przez 3 min.
4. Supernatant pobrano i naniesiono na minikolumny do oczyszczania genomowego DNA.
5. Próbkę wirowano przy prędkości 14 000 RPM przez 1 min.
6. Do minikolumny dodano 500  $\mu$ l roztworu płuczającego A1.
7. Ponownie wirowano przy prędkości 14 000 RPM przez 1 min.
8. Minikolumny przeniesiono do nowej probówki 2 ml (dołączonej do zestawu) i dodano 400  $\mu$ l roztworu płuczającego A1.
9. Próbkę wirowano przy prędkości 14 000 RPM przez 2 min.
10. Osuszone minikolumny umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml.
11. Do złoża znajdującego się na dnie minikolumnienek dodano 50  $\mu$ l buforu Tris-HCl, uprzednio ogrzanego do temperatury 75 °C.
12. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min, a następnie wirowano przy prędkości 14 000 RPM przez 1 min.

Minikolumny usunięto, a oczyszczone DNA znajdujące się w probówce przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20 °C do czasu dalszych analiz.

#### **4.2 Ocena stężenia i czystości izolatów**

Stężenie wyizolowanego DNA mierzono metodą spektrofotometryczną, przy użyciu urządzenia Nano-Drop (Thermo Scientific). W tym celu wybrano w ustawieniach aparatu opcję: kwasy nukleinowe, a następnie: dsDNA. Na detektor - fotodiode krzemową nakładano pipetą 3  $\mu$ l czystej wody pozbawionej nukleaz (A&A Biotechnology) w celu inicjalizacji pomiaru. Następnie w takiej samej objętości wykonywano pomiar próby ślepej (tła) - buforu Tris-HCl, w którym zawieszano izolaty. Po przetrzaniu miejsca pomiarowego chusteczką do czyszczenia mikroskopów (Kimberly - Clark) dokonywano właściwego pomiaru stężenia badanych próbek. Każdorazowo

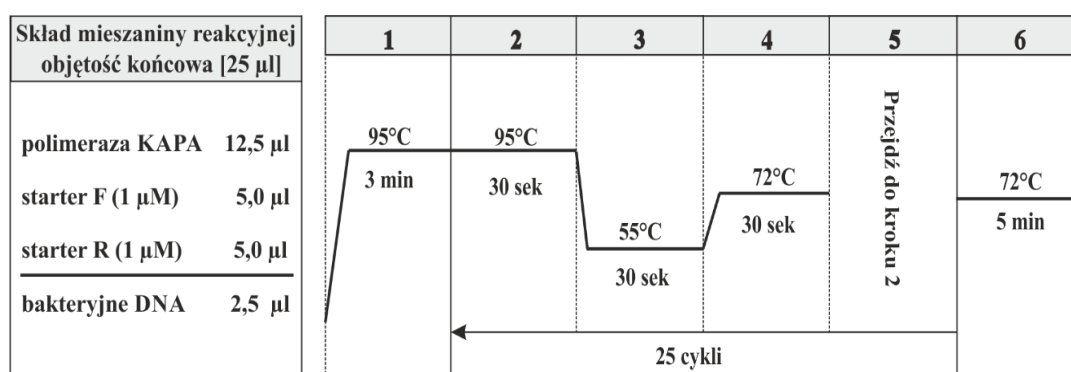
nakładano taką samą objętość próbki – 3  $\mu\text{l}$  i po odnotowaniu wyników pomiaru, dokładnie przecierano detektor. Stężenie DNA wyrażone było w jednostkach  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Urządzenie NanoDrop pozwoliło dodatkowo na określenie stopnia czystości otrzymanego DNA, poprzez pomiar stosunku absorbancji przy długości fali 260 nm do fali o długości 280 nm. Wartość stosunku  $A_{260}/A_{280}$  mieszcząca się w przedziale od 1,8 do 2,0 świadczyła o wysokim stopniu oczyszczenia produktu.

### 4.3 Przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania

Wyizolowane z bioptatów dwunastniczych bakteryjne DNA stanowiło matrycę w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), pierwszego etapu przygotowania materiału do sekwencjonowania. W trakcie tego procesu powielano dwa hiperzmiennie regiony bakteryjnego 16S rRNA: V3 i V4, na podstawie, których po sekwencjonowaniu określano przynależność bakterii do odpowiednich poziomów taksonomicznych.

#### 4.3.1 Metoda nested-PCR

Przedstawiony na rycinie 6 skład mieszaniny reakcyjnej oraz program amplifikacji zaczerpnięto z protokołu producenta odczynników do sekwencjonowania - 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina) [109].



**Rycina 6.** Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji PCR.

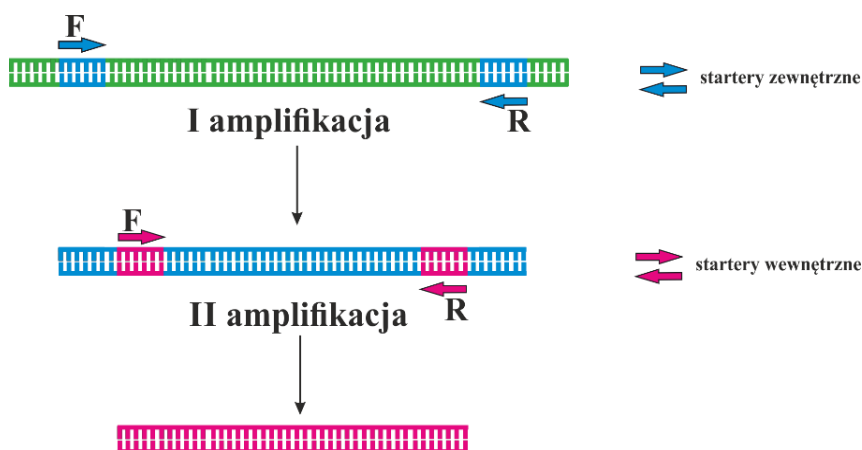
Zastosowanie powyższych parametrów zarówno w zakresie przygotowania mieszaniny reakcyjnej, jak i przebiegu amplifikacji nie pozwoliło na uzyskanie

pozytywnego sygnału po reakcji PCR, w postaci widocznego prążka na żelu elektroforetycznym.

W związku z tym zwiększono ilość cykli amplifikacji, początkowo do 30, następnie 35 i ostatecznie do 40 cykli. Dalszy brak widocznych rezultatów spowodował konieczność wdrożenia innego rozwiązania, które zwiększyłoby czułość i jednocześnie specyficzną reakcji amplifikacji. Te dwa warunki mogły być spełnione przy zastosowaniu dwustopniowej reakcji PCR, nazywanej inaczej zagnieżdżonym PCR (ang. *nested-PCR*). Schemat reakcji nested-PCR przedstawiono na rycinie 7. Zanim uzyskano pozytywne wyniki przy użyciu tej metody, niezbędne było opracowanie i wystandaryzowanie warunków reakcji.

W pierwszym etapie użyto zaprojektowane na potrzeby niniejszego badania startery niespecyficzne, tzw. zewnętrzne, które umożliwiają amplifikację dłuższego fragmentu DNA (sekwencje starterów przedstawiono w podrozdziale 4.3.2 Startery do reakcji nested-PCR, w tabeli 3). Produkt tej reakcji stanowił matrycę w kolejnej amplifikacji.

W drugim etapie miejsce przyłączenia starterów specyficznych, tzw. wewnętrznych, umożliwiających powielenie regionów V3 i V4, zlokalizowane było wewnątrz matrycy – produktu otrzymanego z pierwszej reakcji amplifikacji.



**Rycina 7.** Schemat mechanizmu reakcji nested-PCR.



### 4.3.2 Startery do reakcji nested-PCR

Parę starterów zewnętrznych do reakcji nested-PCR zaprojektowano przy użyciu bazy danych NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), a ocenę specyficzności sekwencji wykonano w programie BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ponadto przeprowadzono analizę obejmującą określenie: temperatury topnienia starterów, zawartości par CG (%) oraz weryfikację samoistnego tworzenia dimerów. Do tego celu zastosowano dostępny online kalkulator - Multiple Primer Analyzer:

(<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>).

Sekwencje starterów wewnętrznych zostały zaczerpnięte z pracy Klindworth [110]. Dodatkowo do tych sekwencji dołączono zgodnie z protokołem procedury do sekwencjonowania tzw. sekwencje adapterowe (ang. *overhang adapters*). Startery wraz z sekwencjami adapterowymi zostały zsyntetyzowane w firmie Genomed w Warszawie i dostarczone do Katedry Mikrobiologii UJCM w formie zliofilizowanej.

**Tabela 3.** Sekwencje starterów zewnętrznych, wewnętrznych oraz sekwencje adapterowe zastosowane do reakcji nested-PCR.

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'	T <sub>m</sub> [°C]	Źródło
Starter zewnętrzny F	ACGGCCNRACTCCTAC	52,4 °C	*
Starter zewnętrzny R	TTACGGNNTGGACTACHV	45,1 °C	*
Starter wewnętrzny F	CCTACGGGNGGCWGCAG	61,2 °C	[110]
Starter wewnętrzny R	GACTACHVGGGTATCTAATCC	52,5 °C	[110]
Sekwencja <i>overhang adapter</i> F	TCGTCCGACGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	-	[109]
Sekwencja <i>overhang adapter</i> R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG	-	[109]

\* - startery zaprojektowane na potrzeby niniejszych badań.

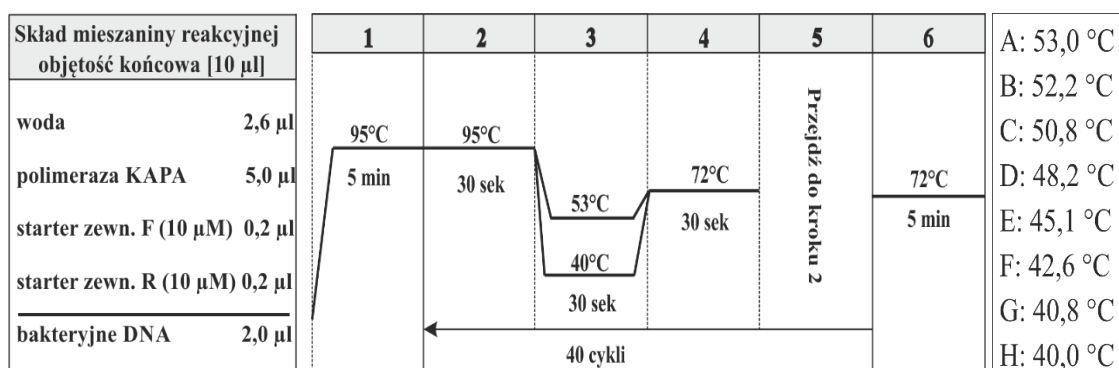
### 4.3.3 Standaryzacja metody nested - PCR.

W celu doboru odpowiednich warunków reakcji przeprowadzono optymalizację w zakresie dwóch parametrów: temperatury przyłączenia starterów oraz ilości cykli w procesie amplifikacji.

Mieszaninę reakcyjną do pierwszej i drugiej amplifikacji przygotowywano na lodzie, w komorze laminarnej (Alpina). Każdorazowo przed rozpoczęciem pracy komora laminarna była spryskiwana środkiem do dekontaminacji DNA Remover (Minerva BioLabs), a następnie poddawana dodatkowej dezynfekcji, promieniowaniem UV przez 30 min.

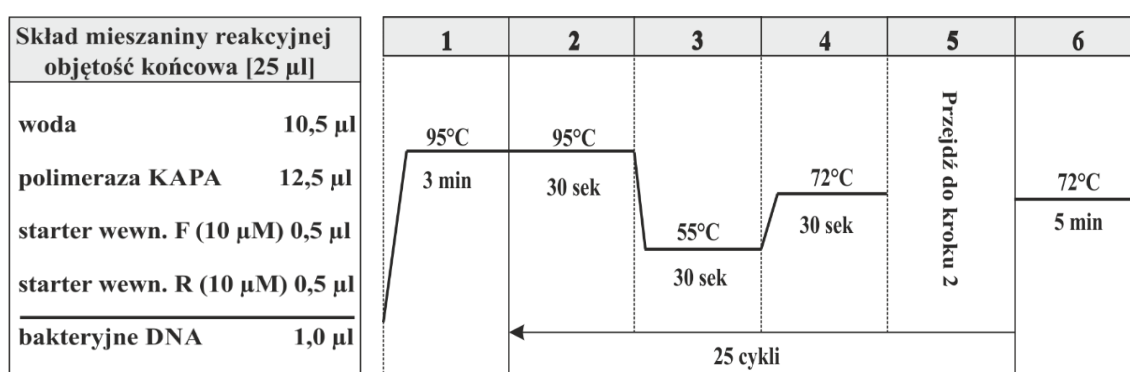
#### Wyznaczenie optymalnej temperatury przyłączenia starterów – gradient temperatury dla I reakcji amplifikacji.

1. Parę starterów zewnętrznych rozcieńczono do stężenia 10  $\mu$ M.
2. Przygotowano mieszaninę reakcyjną do pierwszej amplifikacji w objętości końcowej 10  $\mu$ l na 1 próbkę. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono na rycinie 8.
3. Do reakcji dołączano kontrolę ujemną – mieszaninę reakcyjną, w której matrycowe DNA zostało zastąpione wodą destylowaną, pozbawioną DNaz i RNaz (A&A Biotechnology).
4. Amplifikację z gradientem temperatury przyłączenia starterów prowadzono w termocyklerze T100C (BioRad), (ryc.8). Ustawiono 40 cykli, w celu zwiększenia prawdopodobieństwa uwidocznienia produktu na żelu elektroforetycznym po drugiej amplifikacji, a tym samym możliwości dokonania wyboru najbardziej optymalnej temperatury przyłączenia starterów.



**Rycina 8.** Skład mieszaniny reakcyjnej, profil termiczny reakcji amplifikacji oraz rozkład gradientu temperatur dla I amplifikacji.

Produkty z pierwszej amplifikacji w objętości 1 µl każdy wykorzystano, jako matrycę do drugiego etapu. Zastosowano proponowany w protokole Illumina skład mieszaniny reakcyjnej oraz program amplifikacji (ryc.9).



**Rycina 9.** Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla drugiej reakcji amplifikacji.

#### 4.3.4 Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji nested-PCR

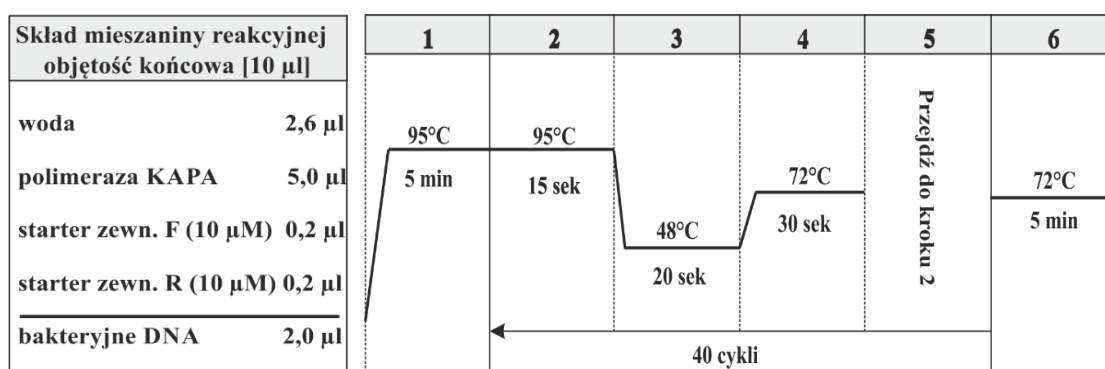
W celu wyboru optymalnej temperatury przyłączania starterów w pierwszej amplifikacji produkty drugiej amplifikacji zostały rozdzielone elektroforetycznie, w 1,5 % żelu agarozowym z dodatkiem 4 µl bromku etydyny (Sigma). Jako obciążenie zastosowano roztwór błękitu bromofenolowego, a za wzorzec ciężaru cząsteczkowego posłużył Marker DNA (A&A Biotechnology). Elektroforezę prowadzono w 0,5x buforze TBE (BioRad), przez 60 min przy napięciu 75 V. Produkty uwidoczniono w świetle UV z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli GelDoc 2000 (Bio-Rad).

Wyznaczenie optymalnej ilości cykli dla drugiej amplifikacji.

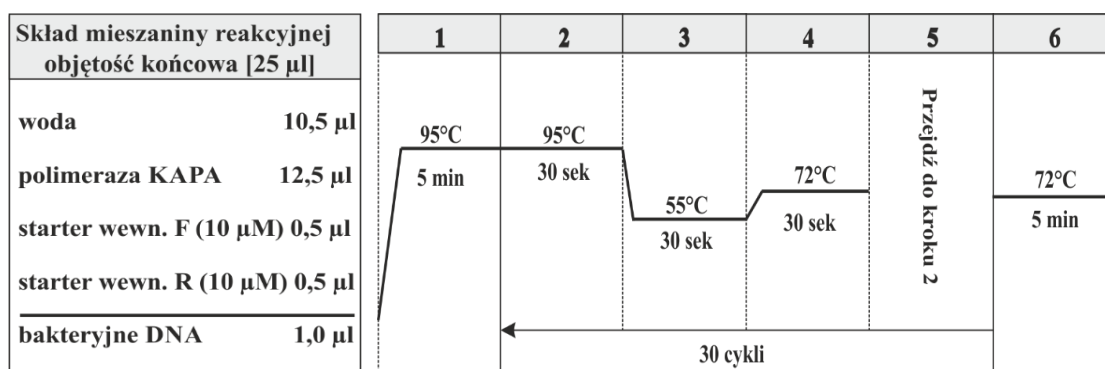
Po rozdziale elektroforetycznym uzyskano wyniki w postaci delikatnie świecącego prążka. Z tego powodu powtórzono drugą amplifikację w trzech wariantach, zwiększając ilość cykli do 30, 35 i 40.

**4.3.5 Właściwe parametry reakcji nested – PCR**

Po rozdziale elektroforetycznym, zaobserwowano silnie świecące prążki dla próbek, amplifikowanych zarówno w 30, 35, jak i 40 cyklach. Do właściwej części badań wybrano wariant z 30 cyklami, ponieważ przy 35 i 40 cyklu, dodatkowo zauważalne były prążki dla kontroli ujemnej. Za optymalną temperaturę przyłączania starterów dla pierwszej reakcji amplifikacji wybrano 48 °C. Właściwe parametry dla I oraz II reakcji amplifikacji, przedstawiono na schematach poniżej (ryc. 10 i 11).



Rycina 10. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla I reakcji nested - PCR.



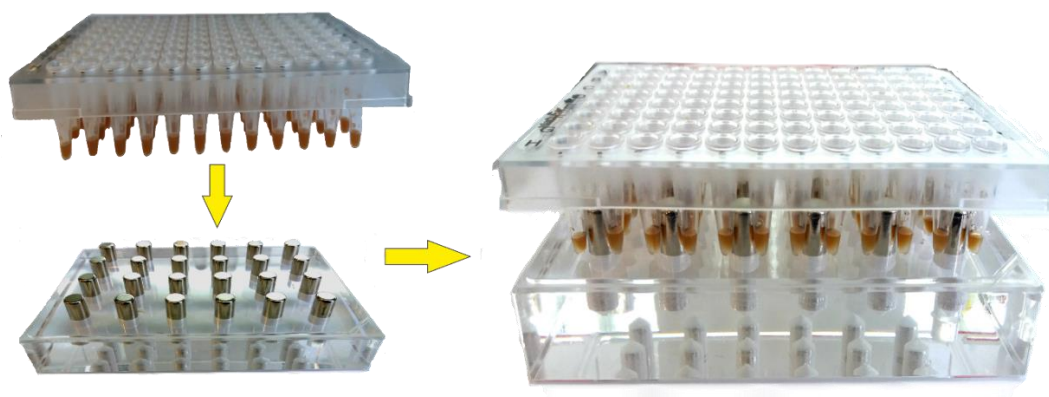
Rycina 11. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla II reakcji nested - PCR.

Wszystkie izolaty DNA włączone do badań zostały poddane I i II amplifikacji oraz rozdzielowi elektroforetycznemu przy wymienionych wcześniej warunkach.

#### 4.4 I Oczyszczanie produktów po reakcji nested-PCR.

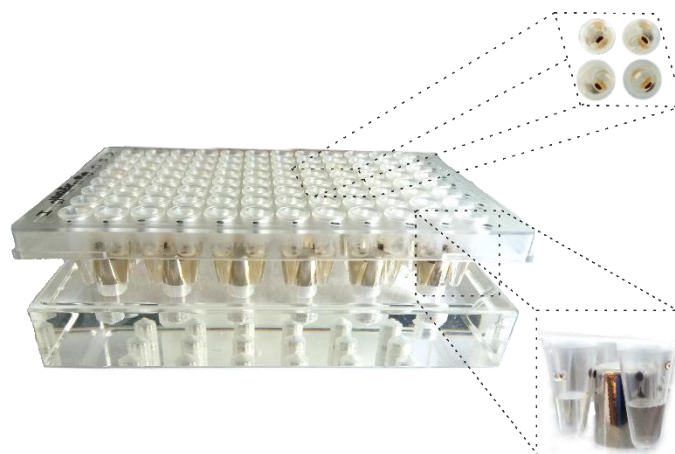
Po weryfikacji wielkości produktów amplifikacji wykonano oczyszczanie przy użyciu roztworu, zawierającego magnetyczne kulki (AMPure XP beads). Etap ten pozwala na usunięcie niezwiązanych starterów lub dimerów starterów, które mogły powstać podczas reakcji nested - PCR.

1. 96-dołkową płytkę z produktami reakcji nested - PCR (amplikonami) wirowano przy prędkości 1,000 g przez 1 min.
2. Używając pipety wielokanałowej przeniesiono objętość 20  $\mu$ l każdego z amplikonów do nowej 96-dołkowej płytki, zmieniając za każdym razem końcówki pipety.
3. Roztwór z magnetycznymi kulkami po doprowadzeniu do temperatury pokojowej mieszano na wortexie, aż do uzyskania jednorodnej mieszaniny.
4. Używając pipety wielokanałowej dodano po 20  $\mu$ l roztworu z magnetycznymi kulkami do każdej studzienki z amplikonami.
5. Całość wymieszano poprzez dziesięciokrotne pipetowanie “górze - dół”.
6. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min.
7. Po inkubacji płytkę umieszczono na statywie magnetycznym Ambion Magnetic Stand, (Thermo Scientific), (ryc. 12), do czasu uzyskania przezroczystego supernatantu.



**Rycina 12.** Oczyszczanie amplikonów na statywie magnetycznym.

8. Nie ściągając płytki ze statywu magnetycznego, delikatnie usunięto pipetą supernatant.
9. Do każdej studzienki dodano po 200  $\mu$ l świeżo przygotowanego 80% etanolu.
10. Płytkę z amplikonami i alkoholem inkubowano na statywie magnetycznym przez 30 sek, a następnie usuwano supernatant.
11. Ponownie wykonano etapy opisane w punkcie 9 i 10.
12. W dalszym ciągu umieszczoną na statywie magnetycznym 96-cio dołkową płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min, w celu usunięcia pozostałego etanolu.
13. Płytkę usunięto ze statywu magnetycznego, a do każdej próbki dodano po 52,5  $\mu$ l 10 mM buforu Tris-HCl (pH 8,5).
14. Całość wymieszano poprzez kilkunastokrotne pipetowanie „góra-dół” do czasu, aż kulki zostały dokładnie zawieszono w buforze Tris-HCl, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min.
15. Płytkę PCR ponownie umieszczono na statywie magnetycznym i inkubowano do czasu, aż supernatant stał się przezroczysty (ryc. 13).
16. Objętość 50  $\mu$ l supernatantu z każdej studzienki przeniesiono do nowej 96-cio dołkowej płytki PCR.



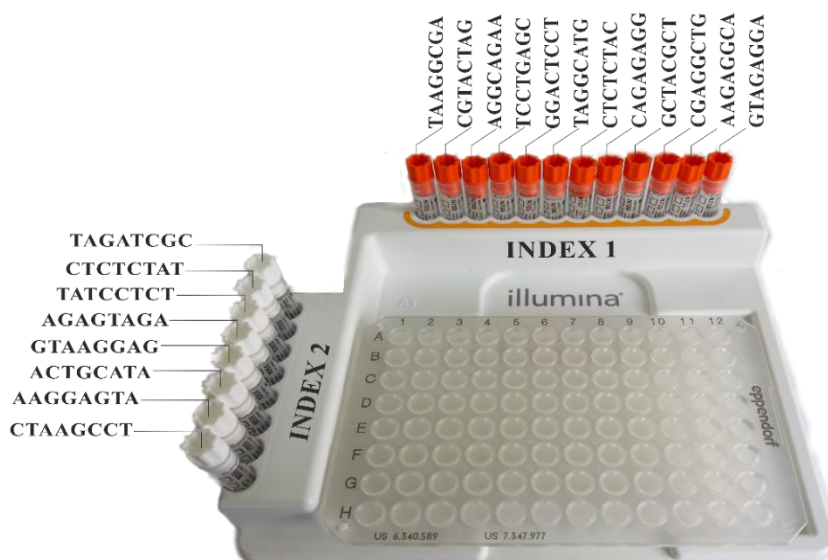
**Rycina 13.** Końcowy etap oczyszczania na statywie magnetycznym.

Amplikony zawieszono w buforze Tris-HCl, a niezwiązane fragmenty starterów lub dimery starterów zostały przyłączone przez kulki magnetyczne do statywu.

## 4.5 Index PCR

Każdy amplikon po oczyszczeniu został poddany procedurze mającej na celu przyłączenie w procesie amplifikacji unikalnej kombinacji sekwencji znakujących (index PCR) oraz końcowych adapterów (P5 i P7), (ryc. 16). Czynności te umożliwiły, podczas analizy bioinformatycznej przyporządkowanie wyników sekwencjonowania do odpowiednich próbek pacjentów.

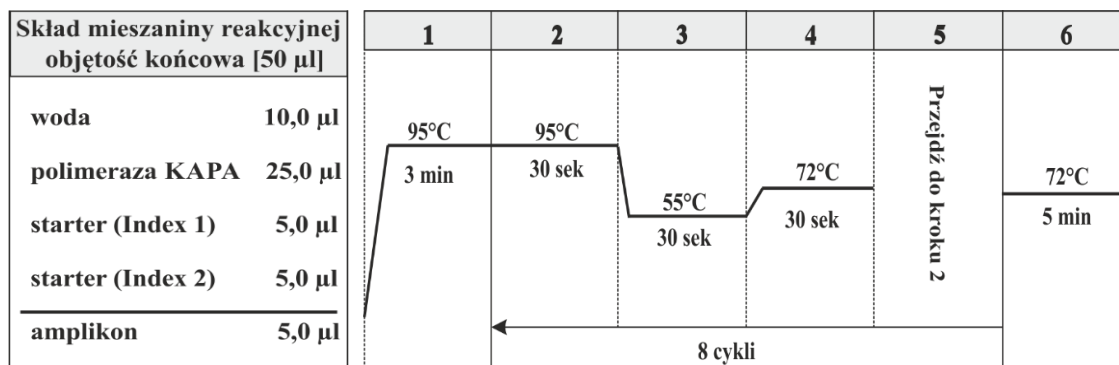
1. Objętość 5  $\mu$ l każdego z oczyszczonych amplikonów przeniesiono do nowej płytki PCR, którą ustawiono w określonym miejscu zestawu TruSeq Index Plate Fixture (Illumina).
2. Startery oznaczone, jako Index 1 (i7) ułożono równoległe do kolumn 1-12, natomiast startery oznaczone, jako Index 2 (i5) - równoległe do wierszy A-H płytki PCR (ryc.14).



**Rycina 14.** Przygotowanie indeksowania amplikonów przy użyciu odpowiedniej kombinacji sekwencji starterów.

1. Do każdej studzienki nakładano pipetą wielokanałową mieszaninę wody destylowanej i polimerazy w objętości 35  $\mu$ l na próbkę, a następnie kombinację starterów według przepisu przedstawionego na rycinie 15.
2. Całość wymieszano przez kilkunastokrotne pipetowanie „górze-dół”.
3. Płytkę PCR zaklejono przezroczystą taśmą dołączoną do zestawu i poddano wirowaniu przy prędkości 1,000 x g przez 1 min.

4. Amplifikację przeprowadzano według programu przedstawionego na rycinie 15. Układ sekwencji adapterowych oraz znacznikowych przyłączonych do amplikonów został przedstawiony na rycinie 16.



Rycina 15. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla reakcji znakowania amplikonów.



Rycina 16. Amplikon z przyłączonymi w odpowiedniej kolejności sekwencjami znacznikowymi i adapterowymi.

#### 4.6 II Oczyszczanie produktów po reakcji Index PCR.

Ponowne oczyszczanie amplikonów po wyznakowaniu miało na celu usunięcie niezwiązanych lub nadmiarowych starterów.

1. 96-cio dołkową płytkę PCR z amplikonami poddano wirowaniu przy prędkości 280 x g przez 1 min.
2. Roztwór z magnetycznymi kulkami AMPure XP worteksowano przez około 30 sek., a następnie naniesiono po 56 µl do każdej studzienki z amplikonami.
3. Całość wymieszano poprzez 10-cio krotne pipetowanie „góra-dół” i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min.
4. Płytkę 96-cio dołkową ustawiono na statywie magnetycznym do czasu, aż supernatant stał się przezroczysty.



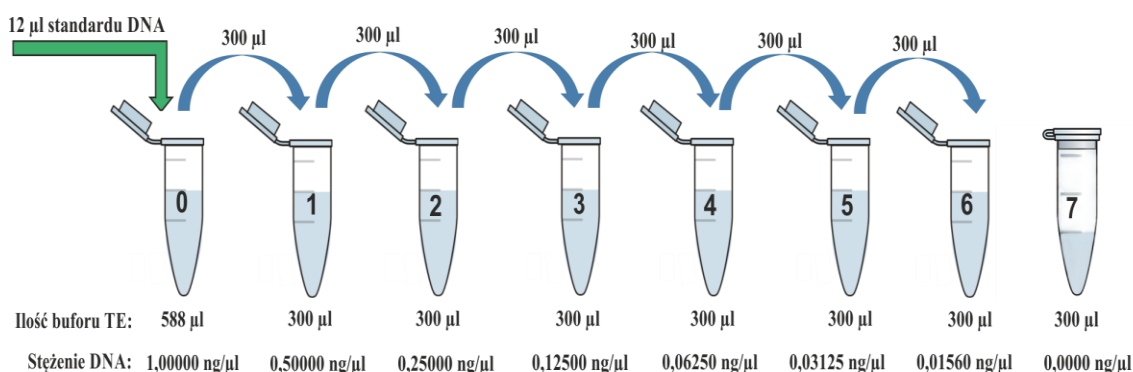
5. Nie ściągając płytki z mieszadła magnetycznego, delikatnie usunięto pipetą supernatant.
6. Do każdej próbki dodano po 200  $\mu$ l 80 % etanolu.
7. Całość inkubowano na mieszadle magnetycznym przez 30 sek.
8. Po tym czasie usunięto supernatant.
9. Powtórzono kroki od 7-9.
10. Umieszczoną w dalszym ciągu na mieszadle magnetycznym płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min, w celu osuszenia z pozostałego etanolu.
11. Płytkę usunięto z mieszadła magnetycznego i dodano do każdej próbki po 27,5  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl (pH 8,5).
12. Całość wymieszano poprzez 10-cio krotne pipetowanie „góra-dół” i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min.
13. Płytkę PCR ponownie umieszczono na mieszadle magnetycznym i inkubowano próbki do czasu, aż supernatant stał się przezroczysty.
14. Objętość 25 $\mu$ l supernatantu przeniesiono z każdej studzienki do nowej 96-cio dołkowej płytki PCR.

#### 4.7 Walidacja stężenia amplikonów i ich pulowanie

Kwantyfikację amplikonów przeprowadzono metodą fluorymetryczną przy użyciu gotowego zestawu PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit (Life Technologies). W pierwszym etapie, przed rozpoczęciem właściwych pomiarów, wykonano krzywą standardową. Na jej podstawie możliwe było precyzyjne oznaczenie ilości DNA w badanych próbkach.

1. Przygotowano 8 probówek typu Eppendorf, każda o pojemności 1,5 ml.
  - do pierwszej probówki oznaczonej, jako „0” nałożono 588  $\mu$ l buforu TE jednokrotnie stężonego oraz 12  $\mu$ l standardu DNA, dołączonego do zestawu.
  - do pozostałych probówek, oznaczonych numerami od 1 do 7 dodano po 300  $\mu$ l buforu TE.
2. Zawartość probówki „0” worteksowano przez 10 sekund.
3. Objętość 300  $\mu$ l mieszaniny z probówki „0” przeniesiono do probówki nr 1.

4. Próbkę nr 1 wortexowano, przez 10 sekund a następnie pobrano objętość 300  $\mu\text{l}$  i przeniesiono do probówki nr 2.
5. Powyższe czynności powtórzono na kolejnych próbkach, aż do 6-tej probówki, wykonując seryjne rozcieńczenia (rycina 17).
6. Probówka nr 7 zawierała jedynie bufor TE, bez standardu DNA i stanowiła kontrolę ujemną. Stężenie standardu DNA w  $\text{ng}/\mu\text{l}$  dla każdego rozcieńczenia zostało przedstawione na ryc. 17
7. Objętość 100  $\mu\text{l}$  z każdego rozcieńczenia przeniesiono do kolejnych 8 studzienek 96-cio dołkowej, czarnej płytki (Corning Costar).



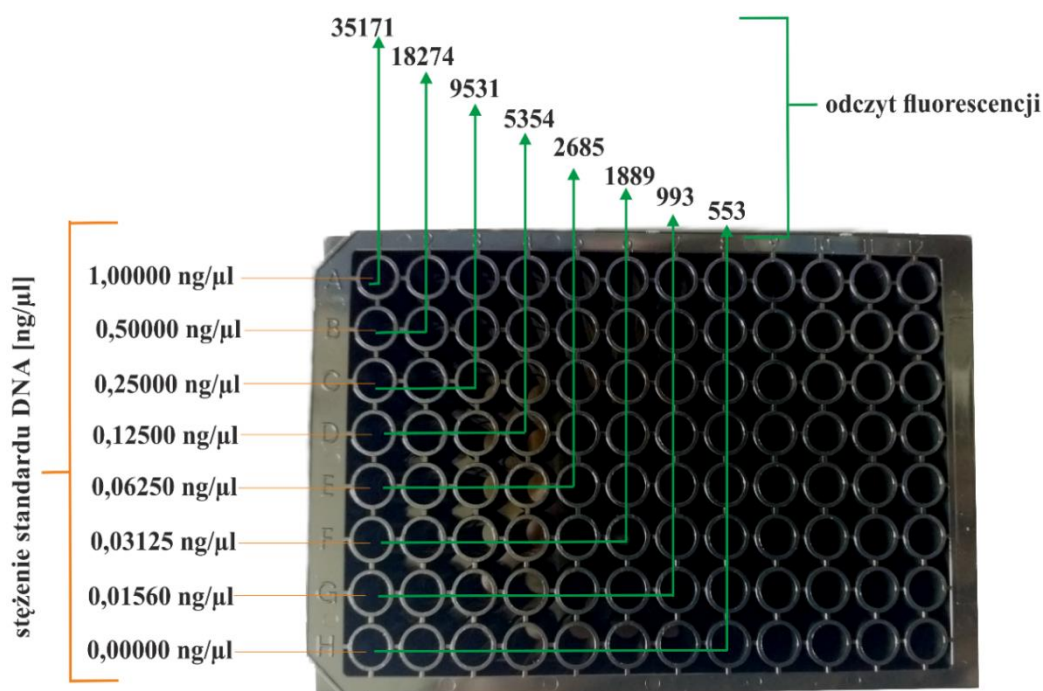
**Rycina 17.** Seryjne rozcieńczenia standardu DNA do przygotowania krzywej wzorcowej.

#### Przygotowanie próbek:

8. Do pozostałych studzienek czarnej płytki przeniesiono po 99  $\mu\text{l}$  buforu TE, a następnie dodano po 1  $\mu\text{l}$  każdego z oczyszczonych ampikonów.
9. Całość wymieszano poprzez czterokrotne pipetowanie „góra-dół”.
10. Do każdego dołka zawierającego badaną próbkę, dodano po 100  $\mu\text{l}$  roztworu barwnika PicoGreen, rozcieńczonego 200 x w buforze 1x TE. Całość ponownie wymieszano poprzez czterokrotne pipetowanie „góra-dół”.
11. Płytkę z próbkami inkubowano przez 5 min w ciemności, a następnie dokonywano pomiaru w czytniku płytek GENios FL (Tecan) przy użyciu filtru dla fluoresceiny (długość fali wzbudzenia 480nm, długość fali emisji 520 nm).
12. Wyniki pomiarów odczytywano przy użyciu oprogramowania Magellan (wersja v.66, 2009).

Obliczanie stężenia DNA w próbkach:

13. Na podstawie ustalonych kolejnych stężeń standardu DNA oraz uzyskanych dla tych próbek wartości odczytu absorbancji (rycina 18) wyznaczono krzywą standardową wraz z równaniem regresji liniowej i współczynnikiem dopasowania  $R^2$ .



**Rycina 18.** Przykładowe wartości odczytów fluorescencji dla kolejnych rozcieńczeń standardu DNA.

14. Po przekształceniu równania regresji i podstawieniu w odpowiednie miejsce wartości absorbancji dla badanych próbek uzyskano stężenie DNA w jednostce ng/μl. Stosując poniższe równanie uzyskane stężenie DNA wyrażono w nM:

$$\frac{\text{stężenie w } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{średnia wielkość biblioteki}} \times 10^6 = \text{stężenie DNA w nM}$$

Pulowanie próbek:

15. Próbkę rozcieńczano odpowiednią ilością 10 mM buforu Tris (pH 8,5) do stężenia 10 nM.

16. Z każdej studzienki pobrano po 5  $\mu$ l rozcieńczonej próbki do zbiorczej probówki typu Eppendorf (Axygen). Całość wymieszano na wortexie.

W ramach kontroli przeprowadzono pomiar końcowego stężenia biblioteki po pulowaniu.

17. Ponownie przygotowano seryjne rozcieńczenia wzorcowego DNA, które przeniesiono do ośmiu kolejnych dołków płytki 96-cio dołkowej.

18. Do czterech dołków płytki dodano oprócz 99  $\mu$ l Tris-HCl, po 1  $\mu$ l biblioteki po pulowaniu. Pozostałe czynności poszawszy od punktu 9-go do 14-go niniejszej procedury zostały powtórzone.

19. Wyniki absorbancji z czterech dołków uśredniono.

20. Średnia wartość stanowiła punkt wyjściowy do ponownego rozcieńczenia biblioteki w dalszym etapie.

21. Bibliotekę po pulowaniu przechowywano w zamrażarce (-20 °C) do czasu przeprowadzenia kolejnych czynności przed właściwym sekwencjonowaniem.

#### 4.8 Denaturacja biblioteki

Ostatni etap przygotowania materiału do sekwencjonowania polegał na denaturacji biblioteki w obecności NaOH, rozcieńczeniu w buforze przeznaczonym do hybrydyzacji oraz denaturacji termicznej w wyniku, której uzyskano pojedyncze nici DNA. Każda z wymienionych czynności była ponownie wykonywana na tzw. kontroli wewnętrznej sekwencjonowania – roztworowi PhiX. Po dodaniu PhiX`a do zdenaturowanej biblioteki konieczne było niezwłoczne umieszczenie mieszaniny w kasecie platformy do sekwencjonowania. W związku z tym, wszystkie czynności, opisane szczegółowo poniżej, zostały wykonane w laboratorium Ośrodka Genomiki Medycznej UJ CM – OMICRON.

W pierwszej kolejności przepłukano kilkakrotnie wodą destylowaną tzw. *flow cell* – szklaną płytkę, na której odbywa się klastrowanie i właściwe sekwencjonowanie. Następnie oczyszczoną i wysuszoną płytkę włożono do sekwenatora. Kasetę do sekwencjonowania umieszczano w kąpielii wodnej do czasu rozmrożenia zawartych w niej buforów, a następnie po dokładnym osuszeniu przechowywano w lodówce, do czasu przygotowania końcowej mieszaniny biblioteki i kontroli wewnętrznej.

Denaturacja biblioteki:

1. Objętość 5  $\mu\text{l}$  świeżo przygotowanego 0.2 N NaOH przeniesiono do jałowej probówki typu Eppendorf (Axygen) i dodano 5  $\mu\text{l}$  4 nM biblioteki.
2. Całość worteksowano i zwirowano przy prędkości 280 x g przez 1 minutę.
3. W kolejnym etapie próbkę inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej, doprowadzając tym samym do denaturacji DNA.
4. Do probówki z zdenaturowanym DNA dodano 990  $\mu\text{l}$  schłodzonego buforu do hybrydyzacji HT1. W rezultacie uzyskano 20 pM zdenaturowanej biblioteki w 1 nM NaOH.
5. Probówkę z ssDNA umieszczono na lodzie do czasu ostatecznego rozcieńczenia.

Rozcieńczenie biblioteki:

6. Zdenaturowane DNA rozcieńczono przy użyciu schłodzonego buforu HT1 do stężenia 10 pM, według schematu, zalecanego przez producenta (Illumina) [109].

**Tabela 4.** Schematy rozcieńczania badanej biblioteki oraz kontroli wewnętrznej.

Końcowe stężenie	2 pM	4 pM	6 pM	8 pM	10 pM
20 $\mu\text{l}$ zdenaturowanej biblioteki	60 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	180 $\mu\text{l}$	240 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$
Schłodzony bufor do hybrydyzacji	540 $\mu\text{l}$	480 $\mu\text{l}$	420 $\mu\text{l}$	360 $\mu\text{l}$	300 $\mu\text{l}$

7. Całość wymieszano poprzez kilkukrotne odwracanie probówki, delikatnie zwirowano i umieszczono na lodzie.

Denaturacja i rozcieńczanie kontroli wewnętrznej - roztworu PhiX

8. W probówce zmieszano 2  $\mu\text{l}$  biblioteki PhiX (10 nM) z 3  $\mu\text{l}$  buforu Tris pH 8.5 (10 mM), w celu uzyskania 4 nM stężenia kontroli wewnętrznej.
9. Do probówki z kontrolą wewnętrzną dodano 5  $\mu\text{l}$  NaOH (0,2 N). Całość worteksowano i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej doprowadzając do denaturacji kontrolę wewnętrzną.

10. Do próbki z zdenaturowanym PhiX dodano 990  $\mu$ l schłodzonego buforu HT1 i uzyskano stężenie 20 pM.
11. Wykonano ostatnie rozcieńczenie 20 pM biblioteki PhiX do stężenia 10pM (tak jak w przypadku badanej biblioteki), według tabeli 4.
12. Całość wymieszano poprzez kilkukrotne odwracanie próbki, delikatnie zwirowano i umieszczono na lodzie.

Przygotowanie mieszaniny zawierającej rozcieńczone roztwory biblioteki ampliconów i kontroli wewnętrznej

13. Zmieszano 30  $\mu$ l zdenaturowanego i rozcieńczonego roztworu PhiX z 570  $\mu$ l uprzednio zdenaturowaną i rozcieńczoną biblioteką ampliconów.
14. Całość wymieszano i umieszczono na lodzie, a następnie przeniesiono do termobloku na 2 min do temperatury 96 °C.
15. Po tym czasie wymieszano zawartość próbki poprzez dwukrotne odwrócenie i przeniesiono do kąpieli z lodem na 5min.
16. Zawartość próbki w objętości 600  $\mu$ l umieszczono w specjalnie oznaczonym miejscu kasety - *sample load* i włożono do sekwenatora – platformy MiSeq (Illumina), (ryc.19).

Zastosowanie zestawu MiSeq Reagents Kit v3 pozwoliło na wykonanie 625 cykli sekwencjonowania.

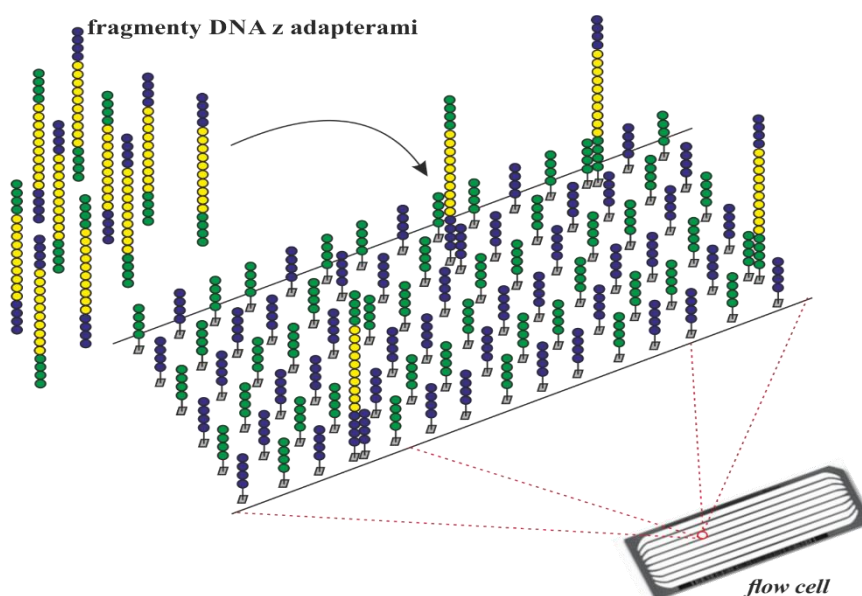


**Rycina 19.** Nakładanie biblioteki genomowej do wyznaczonego miejsca oraz umieszczanie kasety w sekwenatorze MiSeq.

## 4.9 Sekwencjonowanie przez syntezę (SBS).

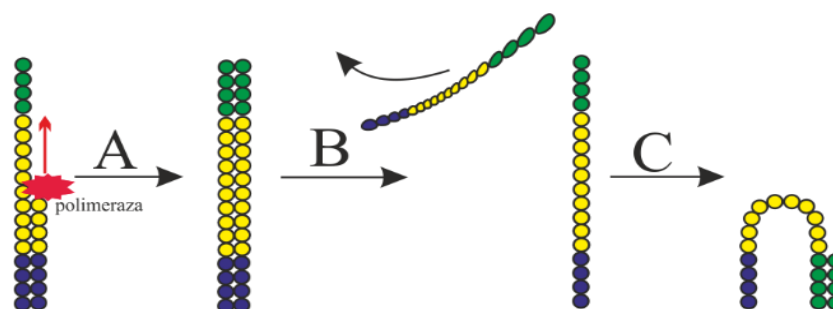
### Generowanie klastrów

Klastrowanie jest procesem w trakcie, którego dochodzi do izotermicznej amplifikacji fragmentów DNA na tzw. *flow cell* - szklanej płytce, pokrytej akryloamidem. Płytkę tę poprzedzają liniowymi kanałami. Każdy kanał opłaszczają setki tysięcy oligonukleotydów o sekwencji komplementarnej do adapterów przyłączonych do badanego DNA (sekwencje P5 i P7). Złączenie tych fragmentów na zasadzie hybrydyzacji inicjuje generację klastra (ryc.20).



**Rycina 20.** Generowanie klastrów.

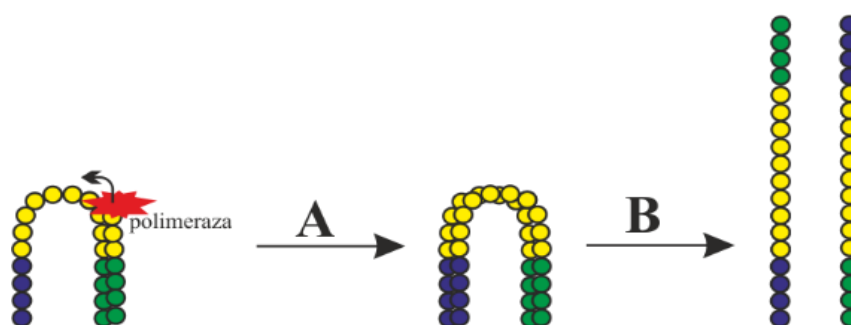
Unieruchomione fragmenty DNA stają się matrycą, na której polimeraza dobudowuje do zhybryzowanych oligonukleotydów komplementarne deoksynukleotydy (ryc. 21. A.) Powstałe podwójne nici ulegają denaturacji, pierwotne matryce zostają usunięte (ryc. 21. B.), a nowo zsyntetyzowane nici hybrydują z sąsiednimi oligonukleotydami, tworząc tzw. mostki (ryc. 21. C). Rozpoczyna się wówczas amplifikacja przez mostkowanie.



**Rycina 21.** Schemat amplifikacji poprzedzającej mostkowanie.

A – dobudowanie deoksynukleotydów, B – denaturacja pierwotnej matrycy, C- tworzenie mostków.

W trakcie tego procesu polimeraza ponownie dobudowuje komplementarne nici, tworząc podwójne mostki (ryc. 22. A.). Następnie dochodzi do denaturacji, której rezultatem są pojedyncze nici, unieruchomione jednym końcem na płytce (ryc. 22. B.). Proces mostkowania jest wielokrotnie powtarzany. W efekcie dochodzi do utworzenia około 1000 kopii sekwencji matrycowej.



**Rycina 22.** Schemat amplifikacji przez mostkowanie.

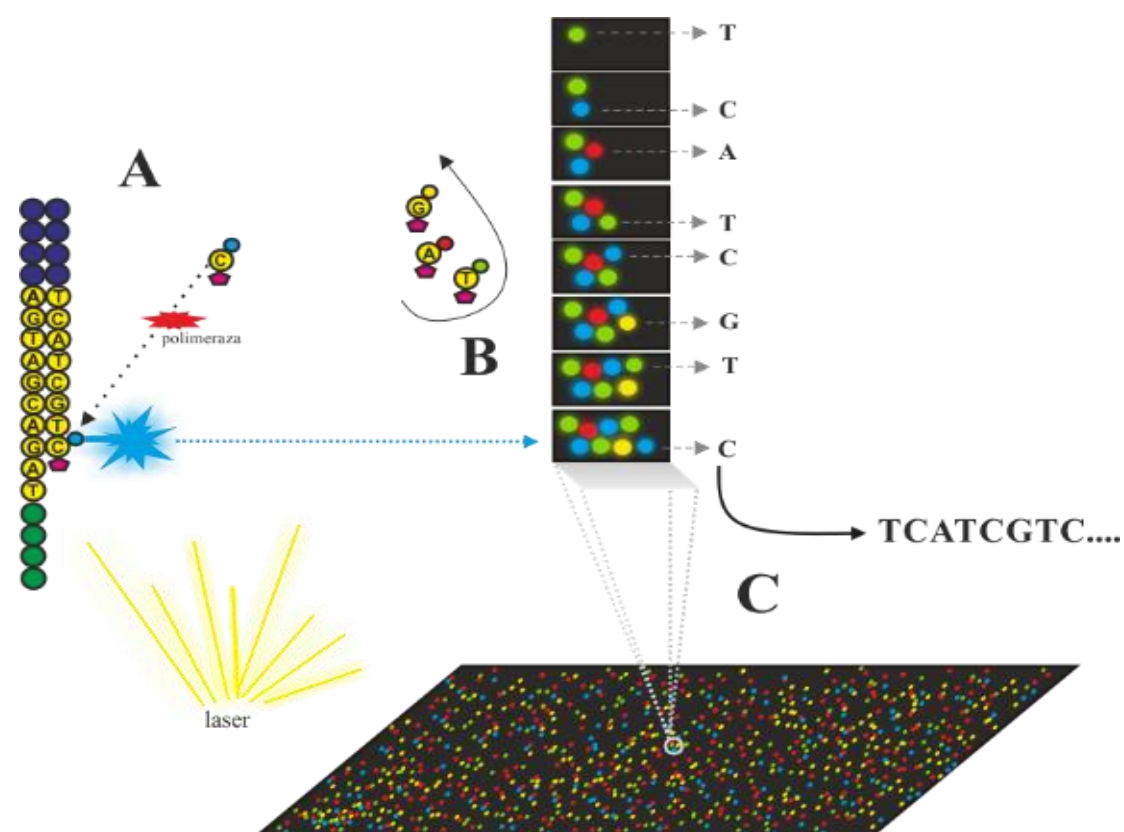
A – tworzenie podwójnych mostków, B – denaturacja i uzyskanie pojedynczych nici.

### Właściwe sekwencjonowanie

Jednoniciowe fragmenty we wszystkich klastrach stanowią matryce, na których polimeraza dobudowuje pojedynczo nukleotydy. W każdym cyklu fluorescencyjnie znakowany nukleotyd sprzężony z terminatorem, rywalizuje o dołączenie do wydłużającego się łańcucha, ale tylko jeden z nich – komplementarny do sekwencji zostaje wbudowany. Po osadzeniu nukleotydu, terminator zapobiega dalszej syntezie nici. Reakcja ulega zatrzymaniu, a pozostałe nukleotydy znajdujące się w mieszaninie zostają wypłukane. Światło lasera wzbudza emisję fluorescencji, która jest rejestrowana

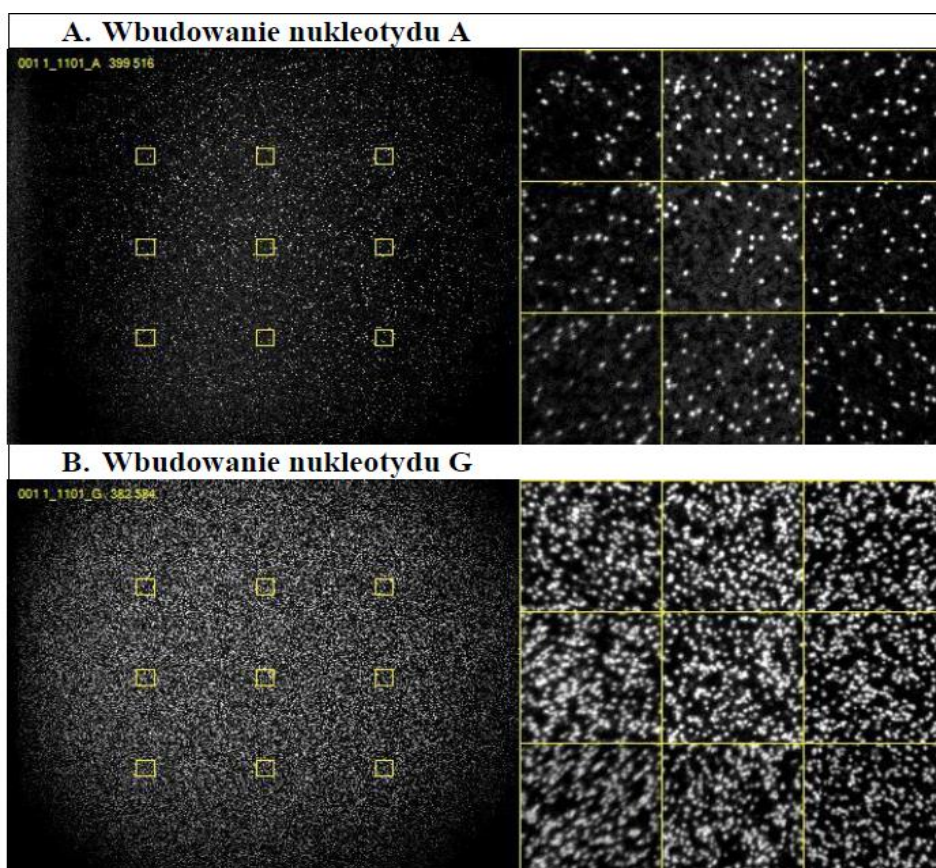


przez kamerę CCD. Każdy nukleotyd emituje światło o innej długości fali oraz intensywności, co jest zapisywane przez kamerę, jako cztery różne kolory (żółty, zielony, czerwony i niebieski). Fluorofory wraz z terminatorami zostają usunięte, a dodanie kolejnej porcji polimerazy i nukleotydów inicjuje rozpoczęcie następnego cyklu. Miliony klastrów ulegają równoległemu, masowemu sekwencjonowaniu, a cały proces powtarza się kilkaset razy, aż zostanie osiągnięta zamierzona długość odczytów – tzw. *readów* (ryc. 23, 24).



**Rycina 23.** Właściwe sekwencjonowanie.

A – wydłużanie łańcucha poprzez wbudowanie znakowanego fluorescencyjnie nukleotydu, B – wypłukanie nukleotydów, które nie zostały przyłączone, C – przypisanie sekwencji nowego nukleotdu w zależności od długości fali i intensywności fluorescencji.



**Rycina 24.** Zapis kamery CCD dla początkowych cykli sekwencjonowania: A - przy wbudowaniu nukleotydu A, B – przy wbudowaniu nukleotydu G.

#### 4.10 Bufory i odczynniki

**Tabela 5.** Szczegółowa lista buforów i odczynników zastosowanych w trakcie badań.

Bufory i odczynniki	Producent
<b>4.1 Izolacja bakteryjnego DNA</b>	
lizozym 50 mg/ml	Sigma
lizostafyna 0,4 U/ $\mu$ l	A&A Biotechnology
Zestaw do izolacji Mini Genomic <ul style="list-style-type: none"> <li>• bufor Tris (10 mM, pH 8,5)</li> <li>• Proteinza K (20 mg/ml)</li> <li>• roztwór lizujący LT</li> <li>• roztwór płuczący A1</li> <li>• minikolumny ze złożem krzemionkowym</li> </ul>	A&A Biotechnology

<b>4.2 Ocena stężenia i czystości izolatów</b>	
Woda wolna od nukleaz	A&A Biotechnology
bufor Tris (10 mM, pH 8,5)	A&A Biotechnology
<b>4.3.1 Metoda nested - PCR,</b>	
<b>4.3.2 Startery do reakcji nested - PCR</b>	
<b>4.3.3 Standaryzacja metody nested - PCR,</b>	
Woda wolna od nukleaz	A&A Biotechnology
2x KAPA HiFi HotSTART ReadyMix PCR Kit, skład: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (1x)</li> <li>• 0,3 mM każdego z czterech deoksynukleotydów (dATP, dTTP, dGTP oraz dCTP)</li> <li>• 1 U KAPA HiFi HotStart Polimerazy DNA</li> </ul>	KAPA Biosystems
- Startery zewnętrzne forward i reverse - Startery wewnętrzne forward i reverse z dołączonymi sekwencjami overhang adapters	Genomed
<b>4.3.4 Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji nested -PCR</b>	
Agaroza	BioRad
Bromek etydyny (10 mg/ml)	Sigma
Bufor obciążający, skład: <ul style="list-style-type: none"> <li>• błękit bromofenolowy (0,25 g/ml)</li> <li>• glicerol (60 %)</li> </ul>	Sigma
Marker DNA 100-1000 pz (0,1 µg/µl)	A&A Biotechnology
Bufor TBE 10x	BioRad
<b>4.4 I Oczyszczanie produktów, 4.6 II Oczyszczanie produktów</b>	
Agencourt® AMPure® XP z kulkami magnetycznymi 60 ml	Beckman Coulter
Bufor Tris-HCl 10 mM pH 8,5	Sigma
Alkohol etylowy 96%	POCH
<b>4.5 Index PCR</b>	
Woda desylowana DEPEC	A&A Biotechnology
2 x KAPA HiFi Hot START Ready Mix PCR Kit, skład: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (1x)</li> <li>• 0,3 mM każdego z 4 deoksynukleotydów (dATP, dTTP, dGTP oraz dCTP)</li> <li>• 1 U KAPA HiFi HotStart Polimerazy DNA</li> </ul>	Kapa Biosystems

Nextera XT Index kit, skład: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nextera XT Index Primer 1</li> <li>• Nextera XT Index Primer 2</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Illumina</p>
<b>4.7 Walidacja stężenia amplikonów i ich pulowanie.</b>	
Zestaw Quanti-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, skład: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bufor 20x TE</li> <li>• Lambda DNA standard 100 µg/ml</li> <li>• Quanti-iT™ PicoGreen dsDNA</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Life technologies</p>
Bufor Tris HCl 10 mM pH 8,5	<p style="text-align: center;">Sigma</p>
<b>4.8 Denaturacja biblioteki</b>	
0.2 N NaOH	<p style="text-align: center;">Sigma</p>
PhiX Control Kit v3	<p style="text-align: center;">Illumina</p>
Bufor do hybrydyzacji HT1	<p style="text-align: center;">Illumina</p>
Bufor Tris HCl 10 mM pH 8,5	<p style="text-align: center;">Sigma</p>
<b>4.9 Sekwencjonowanie przez syntezę (SBS)</b>	
Zestaw MiSeq Reagents Kit v3 (600 cykli), skład: <ul style="list-style-type: none"> <li>• szklana płytka (ang. <i>flow cell</i>)</li> <li>• kasetta (ang. <i>cartridge</i>) z buforami i miejscem na badaną próbkę</li> <li>• bufor płuczący (PR2)</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Illumina</p>

#### 4.11 Bioinformatyczna analiza danych po sekwencjonowaniu

Uzyskane sekwencje R1 i R2 zostały połączone w dłuższe fragmenty nukleotydowe. Następnie poddano je filtrowaniu, pod kątem jakości (ang. *quality scores*). Ze zbioru danych usunięto te sekwencje, którym została przypisana wartość, świadcząca o niskiej jakości, tj.  $Q < 15$  (kodowanie phred33). W kolejnym etapie dane zostały oczyszczone z duplikatów i poddane klastrowaniu w OTU - operacyjne jednostki taksonomiczne (ang. *operative taxonomy unit*) na zasadzie podobieństwa do innych sekwencji w próbce (próg identyczności 97%). Każda OTU jest uznawana za molekularny odpowiednik gatunku i porównywana z sekwencjami zawartymi w referencyjnej bazie danych. Taksonomia została utworzona za pomocą pakietu QIIME i programu `assign_taxonomy.py`, w którym wykorzystano algorytm UCLUST z progiem identyczności 90%. Przypisanie OTU do odpowiednich poziomów taksonomicznych

zostało wykonane przy użyciu autorskiej bazy sekwencji referencyjnych 16S (BioIdea) z dnia 10.09.2018r (referencja diagnostyczna), zawierającej 19316 gatunków bakterii i archaea. Sekwencje genów 16S pobrano z bazy NCBI. Podział wyników na poszczególne poziomy taksonomiczne został wykonany za pomocą programu `summarize_taxa.py` pakietu QIIME. Analizie poddano również kontrole negatywne – próbki wody (n=5). Uzyskane z kontroli negatywnych odczyty usunięto z próbek diagnostycznych. W kolejnym etapie sekwencje OTU zostały przyrównane do referencyjnych sekwencji genów 16S (BioMeta16SALN) za pomocą programu `align_seq.py` z wykorzystaniem algorytmu PyNAST. Następnie z przyrównania odfiltrowano wyniki z dużą ilością dziur (gaps) i utworzono drzewo filogenetyczne (program `make_phylogeny.py`), stanowiące taksonomiczne podsumowanie na poziomach: typu (L2), klasy (L3), rzędu (L4), rodziny (L5), rodzaju (L6) i gatunku (L7).

Dodatkowa analiza polegała na określeniu alfa i beta różnorodności.

**różnorodność alfa** (ang. *alfa diversity*) - opisuje bogactwo i rozkład gatunków (rozumianych, jako OTU`s) w pojedynczej próbce.

W celu oceny alfa różnorodności posłużono się metrykami: *observed OTUs*, *Chao1*, a także indexami Simpson`a oraz Shannon`a.

**różnorodność beta** – (ang. *beta diversity*) - opisuje różnorodność pomiędzy próbkami.

Metryki umożliwiające ocenę beta różnorodności to *weighted UniFrac* i *unweighted UniFrac*. Służą one do pomiaru odległości na drzewie filogenetycznym pomiędzy uzyskanymi OTUs.

#### **4.12 Testy statystyczne oraz programy bioinformatyczne wykorzystane w trakcie analizy wyników.**

Charakterystyka pacjentów - w celu doboru odpowiedniego testu statystycznego, wykonano test Shapiro-Wilka, oceniający obecność lub brak rozkładu normalnego. Tylko dane dla parametru stężenia LDL spełniły warunki testu i w celu dalszej analizy wykonano test ANOVA z identyfikacją różnic między grupami za pomocą analizy Tukey post-hoc. Do analizy pozostałych danych posłużono się nieparametrycznym testem Kruskal`a-Wallis`a z analizą post-hoc (test Nemenyi).

Analiza alfa bioróżnorodności między częstościami występowania OTU wykonana została za pomocą pipelin'u `alpha_rarefaction.py` zaimplementowanego w pakiecie QIIME. Statystyki obliczone zostały przy użyciu programu `compare_alpha_diversity.py` (QIIME) dla każdego indeksu bioróżnorodności. Analizę statystyczną wykonano dwoma testami: t – parametrycznym i nieparametrycznym (Monte Carlo).

Analiza beta bioróżnorodności między częstościami występowania OTU wykonana została za pomocą pipelin'u `beta_diversity.py` w pakiecie QIIME. Maksymalną ilość odczytu do analizy określono, jako stosunek 85% z ilości odczytów reprezentujących najmniejszą próbkę (36TK: 8,142;  $0,85 \times 8142 = 6921$ ). Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwustronny test T-Studenta. Nieparametryczne wartości p obliczono przy użyciu permutacji 999 Monte Carlo.

Analiza OTU's, przypisanych do odpowiednich poziomów taksonomicznych w obrębie dwóch grup badawczych oraz grupy kontrolnej została wykonana za pomocą programu `summarize_taxa.py` pakietu QIIME. Przygotowane tabele BIOM, uwzględniające wartości częstości znormalizowanych między próbkami, zostały poddane analizie statystycznej za pomocą programu `group_significance.py`. Dla każdego poziomu taksonomicznego wykonano dwa typy testów statystycznych ANOVA oraz Kruskal-Wallis. W dalszej części analizę porównawczą przeprowadzono w podgrupach: T2DM i control, T2DM i obese, a także obese i control. W tym celu posłużono się nieparametrycznym testem t (Monte Carlo, 1000 permutacji).

Analiza korelacji danych mikrobiologicznych i klinicznych. Podział na poszczególne poziomy taksonomiczne został wykonany za pomocą programu `summarize_taxa.py` pakietu QIIME. Przygotowane tabele BIOM, uwzględniające wartości częstości znormalizowanych między próbkami, zostały poddane analizie korelacji statystycznej z danymi klinicznymi za pomocą programu `observation_metadata_correlation.py`.

Dla każdego poziomu taksonomicznego wykonano dwa typy korelacji: Pearson oraz Spearman. Wartość prawdopodobieństwa oszacowano na podstawie rozkładu Fisher-Z. Za wyniki istotnie statystyczne uznawano te, których wartość prawdopodobieństwa po korekcji FDR była mniejsza od 0,05.

#### 4.13 Pozostałe programy komputerowe

W celu analizy i wizualizacji danych uzyskanych w trakcie badań posługiwano się poniższymi programami komputerowymi:

##### Opracowanie danych liczbowych, tworzenie wykresów, analiza statystyczna:

- Microsoft Excel 2013, wersja 15.0.5045.1000
- QIIME, wersja 1.9.0
- Usearch, wersja v.10.0.240
- Pakiet statystyczny R (Project for Statistical Computing), wersja 3.5.1

##### Edycja oraz tworzenie dokumentacji tekstowej:

- Microsoft Word 2013, wersja 15.0.5049.1000
- Adobe, Acrobat Reader DC wersja 18.011.20055

##### Tworzenie grafiki oraz obróbka zdjęć:

- CorelDRAW® X8, wersja 18.1.0.661 Corel Corporation 2016
- PIXLR – program online do edycji zdjęć ([www.pixlr.com](http://www.pixlr.com))

## 5 WYNIKI

### 5.1 Charakterystyka pacjentów

Tabela 6 przedstawia porównanie danych klinicznych pacjentów w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. W przypadku dwóch parametrów: wieku oraz stężenia LDL nie zaobserwowano pomiędzy grupami różnic istotnych statystycznie. Pozostałe parametry zostały poddane analizie testem Kruskal`a -Wallis`a z testem post-hoc Nemeyi (ryc. 25).

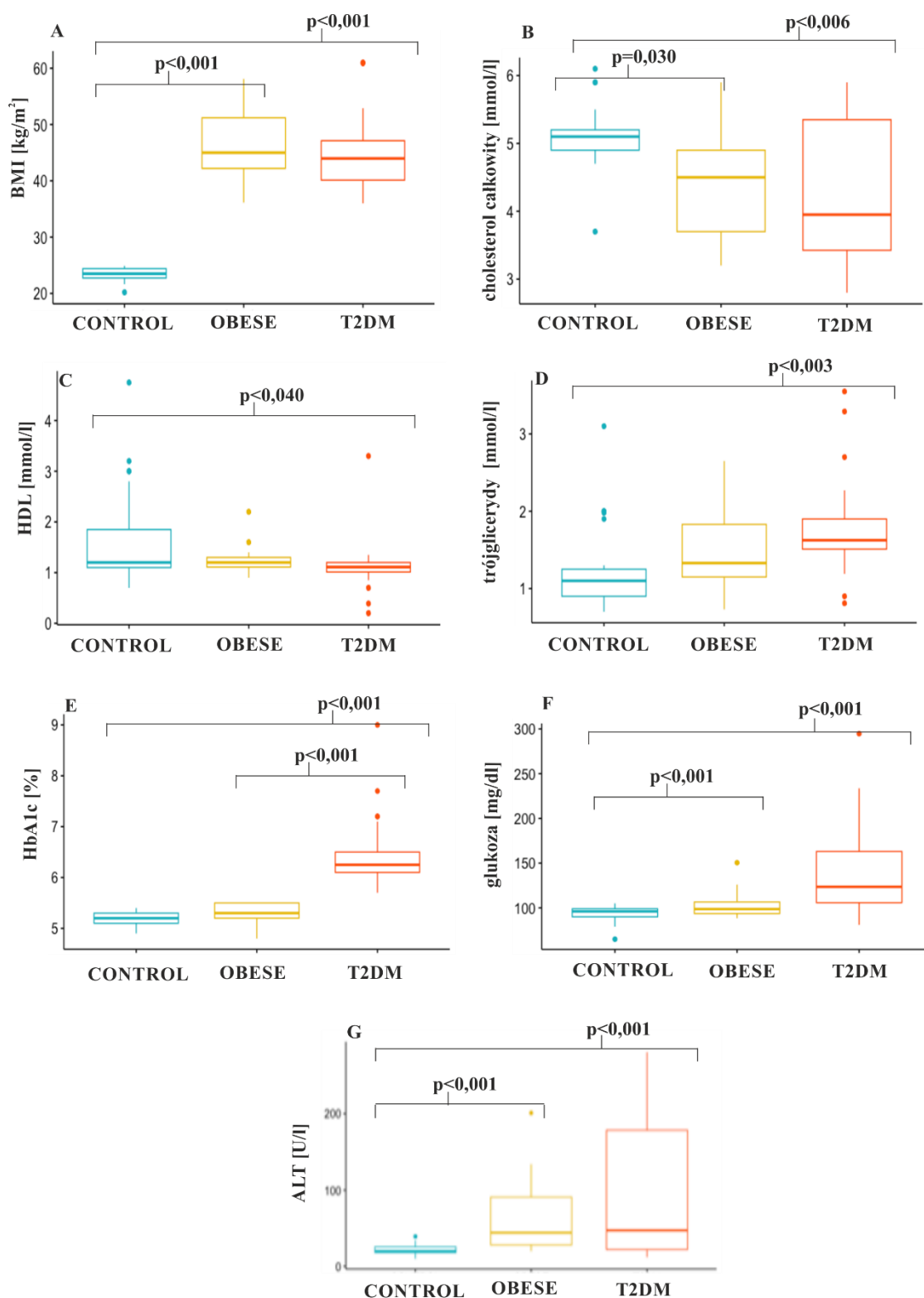
**Tabela 6.** Charakterystyka porównawcza danych klinicznych w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.

Parametr	CONTROL (n=27)	OBESE (n=17)	T2DM (n=22)	Wartość p
<b>Wiek [lata]</b> Me (Q1-Q3)	42 (36,0 – 48,5)	40 (26 - 42)	45,5(37,0 -55,25)	p = 0,179
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b> Me (Q1-Q3)	23,2 (22,9 – 23,7)	45 (42,2 – 5,2)	44 (40,1 – 47,1)	<b>p &lt; 0,001</b>
<b>Glikemia [mmol/l]</b> Me (Q1-Q3)	96 (90 - 99)	98,6(93,8 - 106,6)	123,5 (105,7 - 163,0)	<b>p &lt; 0,001</b>
<b>HbA1c [%]</b> Me (Q1-Q3)	5,2 (5,1 - 5,3)	5,3 (5,2 – 5,5)	6,25 (6,1 – 6,5)	<b>p &lt; 0,001</b>
<b>Cholesterol całkowity [mmol/l]</b> Me (Q1-Q3)	5,1 (4,9 – 5,2)	4,5 (3,6 – 5,0)	3,9 (3,4 – 5,4)	<b>p = 0,003</b>
<b>HDL [mmol/l]</b> Me (Q1-Q3)	0,98 (0,91 – 3,0)	1,14 (1,13 – 1,23)	1 (0,7 – 1,18)	<b>p = 0,040</b>
<b>*LDL [mmol/l]</b> Średnia (SD)	3,16 (0,88)	2,75 (0,65)	2,73 (0,98)	p = 0,160
<b>TGs [mmol/l]</b> Me (Q1-Q3)	0,9 (0,9 – 1,2)	1,26 (0,9 – 1,7)	1,6 (1,5 – 1,9)	<b>p = 0,005</b>
<b>ALT [U/l]</b> Me (Q1-Q3)	20 (18,0 – 25,6)	44 (28 - 91)	47 (22,0 – 178,5)	<b>p &lt; 0,001</b>

Pogrubioną czcionką w ostatniej kolumnie oznaczono wyniki istotne statystycznie.

\*dane z rozkładem normalnym – test Shapiro-Wilka. Dla tych danych wykonano test ANOVA z identyfikacją różnic między grupami za pomocą analizy Tukey post-hoc.





**Rycina 25.** Analiza porównawcza parametrów klinicznych w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.

W analizie zastosowano test Kruskal'a-Wallis'a i test post-hoc (test Nemenyi). Na rycinie przedstawiono wyłącznie wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Dłuższe klamry odpowiadają różnicom istotnie statystycznym pomiędzy grupami control i T2DM.

## 5.2 Charakterystyka próbek

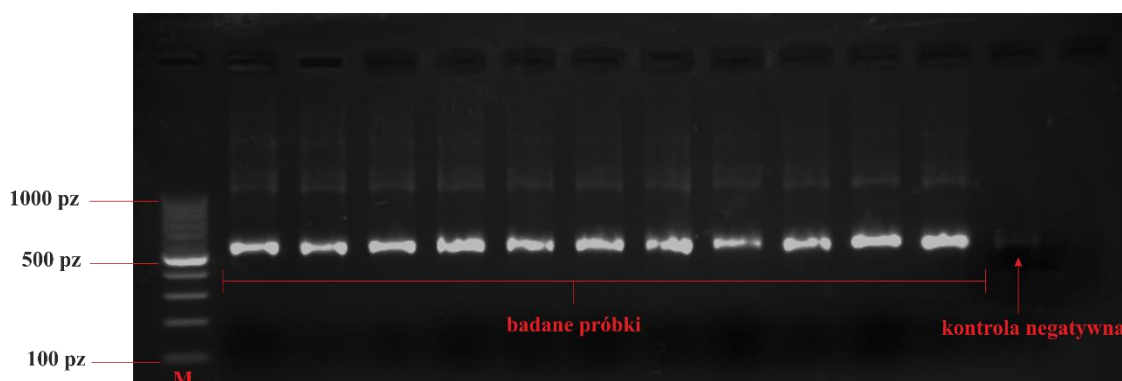
Zebrane materiały biologiczne pacjentów, w postaci bioptatów dwunastniczych posłużyły do izolacji bakteryjnego DNA, a następnie do opracowania reakcji PCR. Poniższa rycina, obrazująca wyniki dla pojedynczej reakcji (rycina 26), uzasadnia konieczność wyboru odmiennej metody - podwójnej reakcji amplifikacji, tzw. zagnieżdżonego PCR (ang. *nested-PCR*), której zadaniem było zwiększenie czułości i specyficzności (rycina 27).



**Rycina 26.** Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji po pojedynczej reakcji PCR (40 cykli).

M – marker wielkości 100-1000 pz, kontrola negatywna – woda wolna od nukleaz.

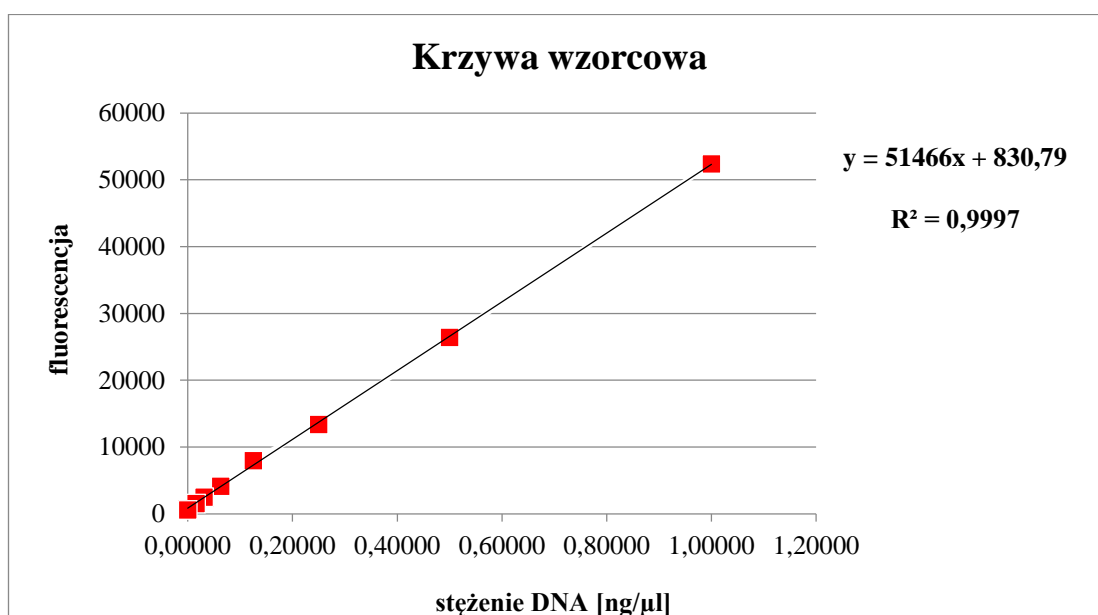
Przeprowadzony rozdział elektroforetyczny pozwolił na weryfikację wielkości produktu. Po reakcji nested - PCR długość każdego z ampikonów wynosiła ok. 550 par zasad (rycina 27).



**Rycina 27.** Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji po zastosowaniu reakcji nested – PCR.

W I reakcji zastosowano 20 cykli, a w II reakcji - 30 cykli.

Produkty reakcji nested-PCR po wyznakowaniu (index PCR) oraz oczyszczaniu poddano procedurze kwantyfikacji w spektrofлуorometrze. Niezbędnym etapem do określenia stężenia DNA w każdej próbce było wykonanie seryjnego rozcieńczenia wzorcowego DNA na podstawie, którego wyznaczono krzywą standardową oraz równanie regresji (rycina 28). W oparciu o wartość współczynnika dopasowania  $R^2$  możliwa była ocena jakości wykonania krzywej wzorcowej. Wynik -  $R^2$  równy lub wyższy od 0,98 świadczy o precyzyjnym przygotowaniu seryjnych rozcieńczeń.



**Rycina 28.** Krzywa wzorcowa uzyskana na podstawie odczytu fluorescencji dla poszczególnych rozcieńczeń standardu DNA.

### 5.3 Ogólna analiza sekwencjonowania 16S rRNA przy użyciu narzędzia Qiime.

Po sekwencjonowaniu 66 próbek diagnostycznych oraz 5 próbek stanowiących kontrolę ujemną, uzyskano łącznie 9536638 odczytów (ang. *reads*). Parametry statystyczne, szczególnie charakteryzujące uzyskane odczyty z po oczyszczeniu próbek (tj. po usunięciu odczytów występujących w kontroli negatywnej z próbek diagnostycznych) zostały uwzględnione w tabeli 7.

**Tabela 7.** Podstawowe statystyki po ogólnej analizie sekwencjonowania.

	<b>Wartości po usunięciu kontroli ujemnej</b>
Ilość próbek	66
Ilość surowych odczytów	9536638
Ilość połączonych odczytów	8606568 (90,25%)
Ilość odczytów po analizie jakości (Q15)	5690721 (66,12%)
Ilość otrzymanych OTU`s	438
Ilość odczytów przypisanych do OTU`s	4919658 (51,6%)
Ilość odczytów przypisanych do taksonomii	484701 (98,5%)
Minimalna ilość odczytów	8142
Maksymalna ilość odczytów	206703
Mediana ilości odczytów	63860,5
Średnia ilość odczytów	74540,2
Odchylenie standardowe	43656,7

Wyodrębnione po oczyszczeniu OTU`s przypisano do odpowiednich poziomów taksonomicznych: typów, klas, rzędów, rodzin, rodzajów oraz gatunków. Tabela 8 stanowi filogenetyczne podsumowanie uzyskanych przypisów.

**Tabela 8.** Filogenetyczne podsumowanie uzyskanych przypisów.

<b>Poziom taksonomiczny</b>	<b>Ilość*</b>	<b>Ilość odczytów</b>	<b>Procent odczytów **</b>
Królestwo	1	4844701	98,50%
Typ	7	4844701	98,50%
Klasa	22	4844701	98,50%
Rząd	43	4844701	98,50%
Rodzina	100	4840921	98,40%
Rodzaj	175	4720767	95,96%
Gatunek	149	1948899	39,61%

W tabeli nie zostały uwzględnione taksonomie „other”, oznaczające niejednoznaczny wynik przyrównania.

Ta kwestia została szerzej omówiona w rozdziale poświęconym dyskusji wyników.

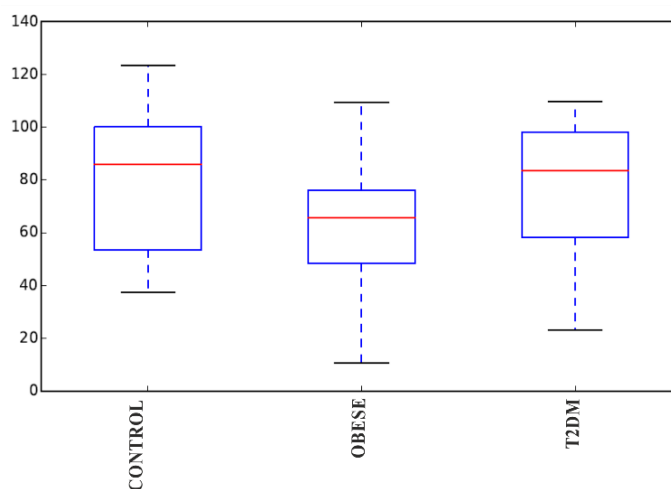
\*Ilość różnych taksonów, przypisanych do danego poziomu systematycznego.

\*\* Procent odczytów przypisanych do odpowiednich poziomów systematycznych.

#### **5.4 Analiza alfa bioróżnorodności**

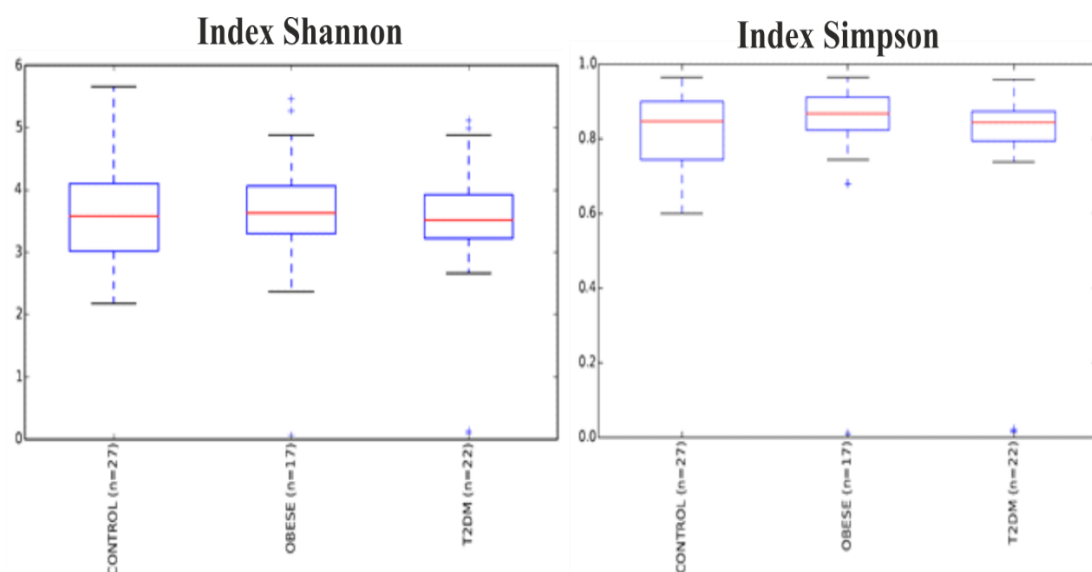
Bioróżnorodność gatunkowa w obrębie próbek, wyrażona indexem Chao1 (rycina 29) w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 była zbliżona,

a w odniesieniu do grupy pacjentów otyłych nieznacznie wyższa. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie ( $p > 0,05$ ).

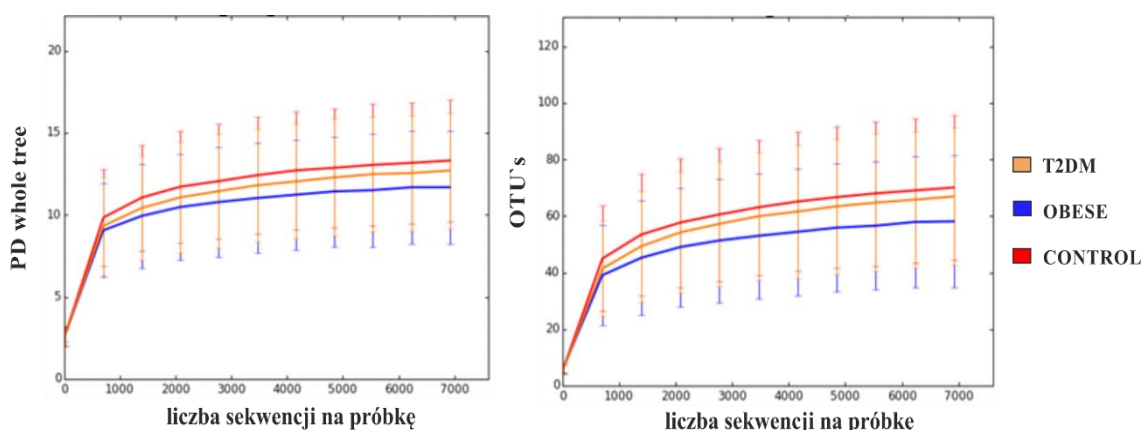


**Rycina 29.** Wykres pudełkowy, tzw. *boxplot* indexu Chao 1.

Podobnie kształtowała się bioróżnorodność wyrażona estymatorami statystycznymi: indexem Simpson`a i Shannon`a (rycina 30) oraz parametrami takimi jak: PD whole tree oraz OTU`s (rycina 31). W każdej z analizowanych grup wartości testów zarówno parametrycznych jak i nieparametrycznych były zbliżone i nieistotne statystycznie ( $p > 0,05$ ).



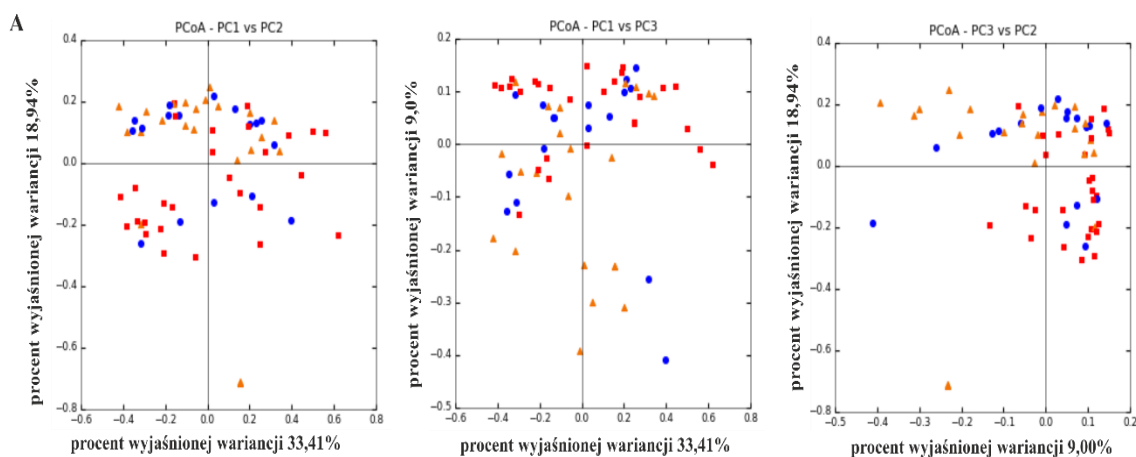
**Rycina 30.** Wykresy pudełkowe indexów Shannon`a i Simpson`a.

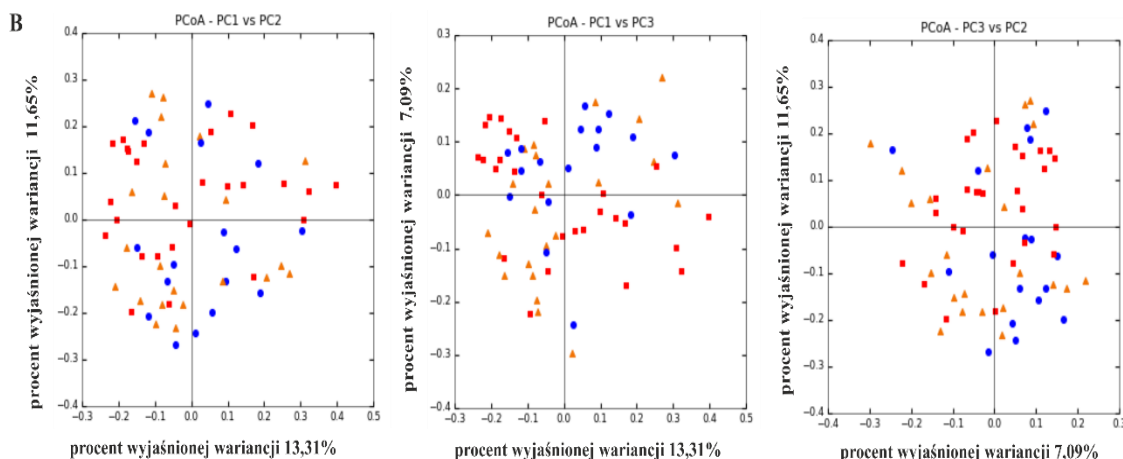


**Rycina 31.** Krzywe rozrzedzenia dla parametrów PD whole tree oraz OTU's w badanych grupach. Powyższe krzywe mają zastosowanie w oszacowaniu liczby OTU's zaobserwowanych w próbce oraz w porównaniu próbek o różnych rozmiarach.

## 5.5 Analiza beta różnorodności

Analiza beta różnorodności próbek pomiędzy grupami badawczymi, wyrażona przy pomocy metryki UniFrac (rycina 32. A-B) w wersji *weighted* (A) i *unweighted* (B) także nie wykazała istotnych różnic ( $p > 0,05$ ). Próbkę w każdej z grup badawczych charakteryzuje podobny układ rozproszenia, na podstawie którego można wnioskować o dużym podobieństwie mikrobioty odcinka dwunastniczego.





Rycina 32. Wykresy PCoA.

Analiza głównych współrzędnych PCoA (ang. *principal coordinate analysis*) dla wersji *weighted* (A) i *unweighted* (B). Czerwone kwadraty odnoszą się do grupy control, niebieskie punkty – obese, a pomarańczowe trójkąty – T2DM. Wartości procentowe, umieszczone w opisach osi przedstawiają odsetek zmienności wyjaśnionej przez główne współrzędne.

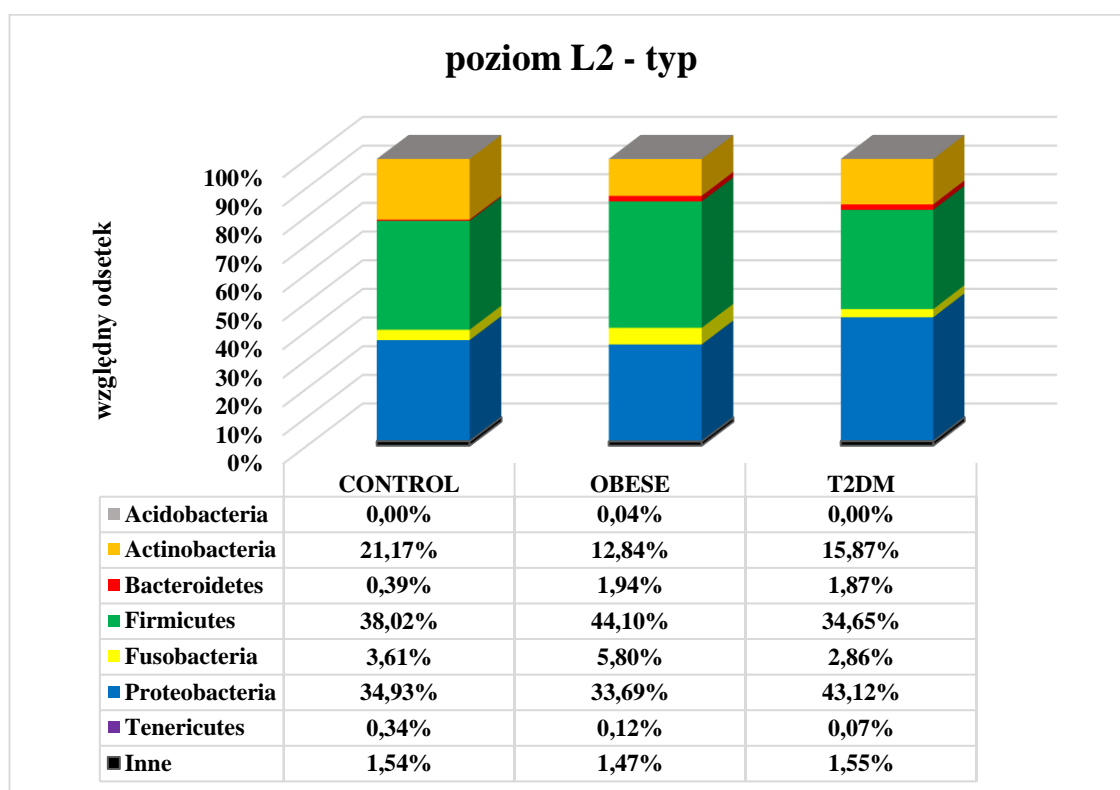
## 5.6 Analiza profili bakteryjnych na różnych poziomach taksonomicznych.

Uzyskane po sekwencjonowaniu dane, uwzględniające udział procentowy zidentyfikowanych OTU's na różnych poziomach taksonomicznych zostały poniżej szczegółowo opisane. W celu ułatwienia oznaczenia prezentowanych w grupach wyników, posłużono się nazewnictwem anglojęzycznym, tj.: **control** – grupa kontrolna, **obese** – grupa pacjentów z otyłością, **T2DM** – grupa pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością. Ze względu na dużą ilość taksonów począwszy od poziomu L4 do L7, profile bakteryjne przedstawione na rycinach mają charakter poglądowy, a zawarty w tekście opis odnosi się jedynie wybranych wartości procentowych. Dane uwzględniające udział procentowy wszystkich taksonów, stanowiących więcej niż 1%, zostały umieszczone w tabelach, jako załączniki do pracy (numery załączników: 3A-D). Operacyjne jednostki taksonomiczne (OTU's), które nie zostały zidentyfikowane, tj. przypisane do konkretnego taksonu, umieszczono w kategorii – **Inne**. Z kolei te taksony, których odsetek we wszystkich 3 badanych grupach był niższy od 1% przydzielono do kategorii – **Pozostałe**.

**W obrębie poziomu L2**, uzyskane OTU's zostały przypisane do 7 typów (ang. *phylum*): Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria,

Proteobacteria oraz Tenericutes (rycina 33). Zarówno w grupach badawczych jak i w grupie kontrolnej dominujące były bakterie, należące do dwóch typów Firmicutes (38,02% - control, 44,10% - obese, 34,65% - T2DM) oraz Proteobacteria (odpowiednio: 34,93%, 33,69% i 43,12%). W dalszej kolejności znaczny, względny odsetek należał do typu Actinobacteria (21,17%, 12,84% i 15,87%). Dużo mniejszy procent stanowiły bakterie należące do typów: Fusobacteria (odpowiednio: 3,61%, 5,80% 2,86%), Bacteroidetes (0,39%, 1,94% i 1,87%), a pozostałe: Tenericutes oraz Acidobacteria występowały w śladowych ilościach.

Po wykonaniu normalizacji danych, porównano powyższe typy drobnoustrojów w analizowanych grupach badawczych. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą obese i control zaobserwowano w odniesieniu do typu Actinobacteria ( $p_{FDR} = 0,019$ ) oraz Bacteroidetes ( $p_{FDR} = 0,007$ ). Z kolei w grupie T2DM odsetek bakterii należących do typu Bacteroidetes był istotnie statystycznie wyższy niż w grupie control ( $p_{FDR} = 0,015$ ). Zaobserwowano również tendencję do wzrostu proporcji Firmicutes do Proteobacteria w grupie control (1,1) i (1,3) obese w stosunku do T2DM (0,8).



Rycina 33. Udział procentowy bakterii na poziomie typu w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.



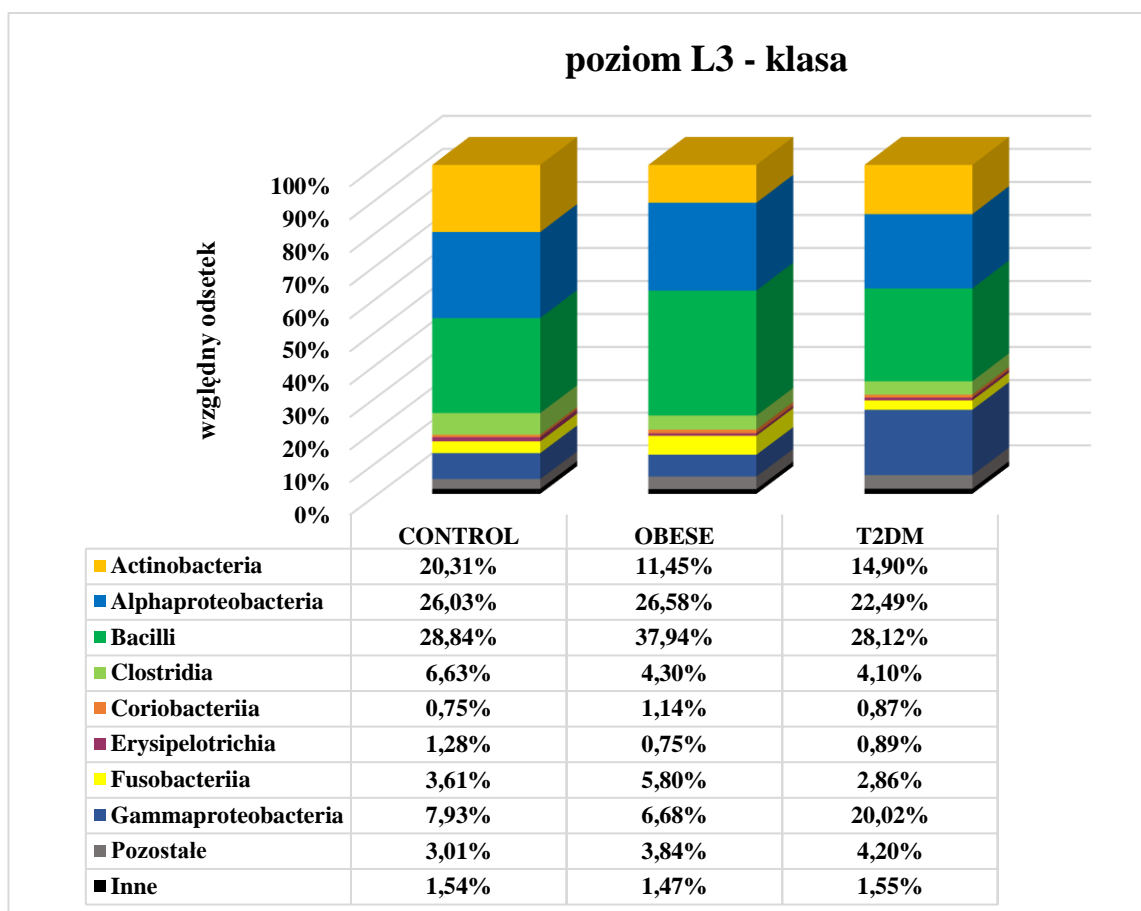
Na każdym poziomie systematycznym oprócz wykresów, obrazujących udział procentowy bakterii w grupach badawczych, uzyskano również profile bakteryjne, charakteryzujące osobno każdego pacjenta. Przykładowy wykres wyłącznie o charakterze poglądowym na poziomie typu uwzględniający te dane został przedstawiony na ryc. 34.



**Rycina 34.** Udział procentowy bakterii na poziomie typu dla każdego z pacjentów z grup badawczych oraz z grupy kontrolnej.

**Na poziomie L3**, uzyskane OTU`s przypisano łącznie do 22 klas (ang. *class*). Najliczniej reprezentowane były: Actinobacteria (20,31% w grupie control, 11,45% w grupie obese i 14,90% w grupie T2DM), Bacilli (odpowiednio: 28,84%, 37,94% i 28,12%), Alphaproteobacteria (26,03%, 26,58% i 22,49%) oraz Gammaproteobacteria w grupie T2DM: 20,02% (rycina 35). Znacznie mniejszy względny odsetek występował w przypadku klas: Coriobacteria (0,75%, 1,14%, 0,87%), Clostridia (6,63%, 4,30% i 4,10%), Erysipelotrichia (1,28%, 0,75% i 0,89%) i Fusobacteriia (3,61%, 5,80% i 2,86%). Do kategorii Pozostałe przypisano 14 klas.

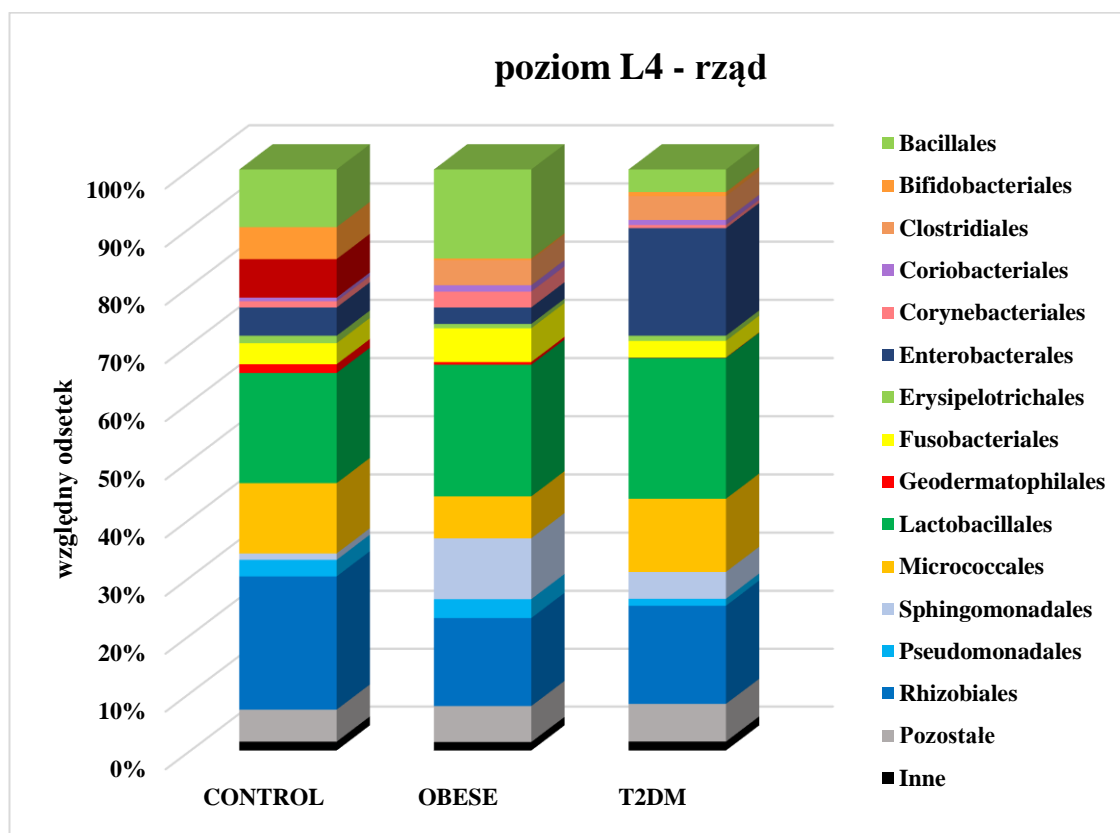
W grupie obese stwierdzono niższy, będący na granicy istotności statystycznej odsetek bakterii należących do klasy Actinobacteria ( $p_{FDR} = 0,057$ ) w odniesieniu do grupy control.



Rycina 35. Udział procentowy bakterii na poziomie klasy w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.

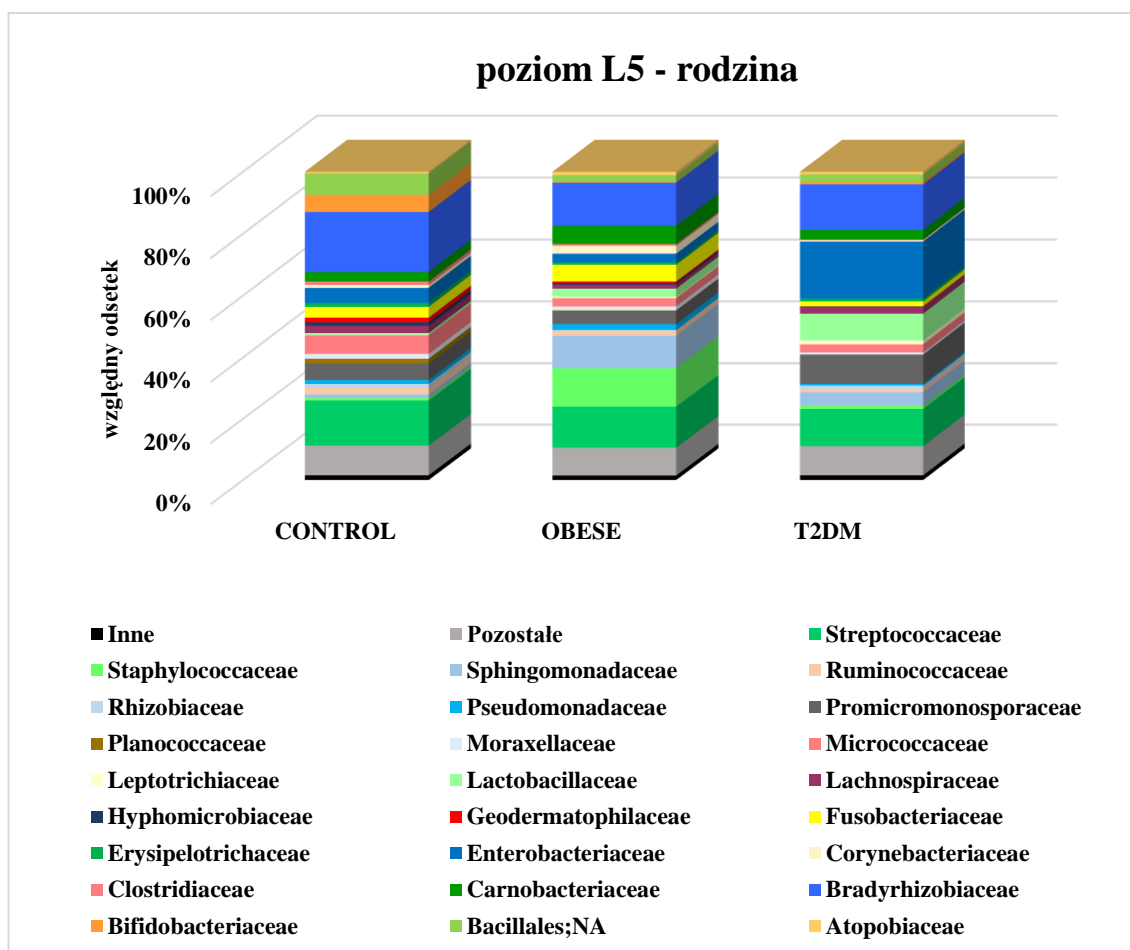
**Na poziomie L4**, zidentyfikowano OTU's należące do łącznie 43 rzędów (ang. *order*). W obrębie tej liczby, 14 rzędów występowało w odsetku > 1%, a pozostałe 29, stanowiło znikome wartości w każdej z badanych grup (rycina 36). Największy udział procentowy odnotowano w odniesieniu do rzędów: Lactobacillales (18,94%, 22,63% i 24,23%), Rhizobiales (22,99%, 15,22% i 16,96%) oraz Micrococcales (12,08%, 7,20% i 12,57%). Względny odsetek procentowy rzędu Bifidobacteriales w grupie kontrolnej (5,49%) był wyższy i istotny statystycznie ( $p_{FDR} = 0,001$ ) w stosunku do grupy obese i T2DM (odpowiednio: 0,29% i 0,69%). W grupie pacjentów otyłych znaczną przewagę procentową w odniesieniu do pozostałych analizowanych grup zaobserwowano w przypadku rzędów: Sphingomonadales (10,46% vs. 1,10% - control i 4,61% - T2DM) oraz Bacillales (15,31% vs. 9,91% i 3,89%), ale różnice istotne statystycznie odnotowano tylko dla rzędu Sphingomonadales ( $p_{FDR} = 0,028$ ). Różnice te były większe, gdy porównywano grupy obese i control ( $p_{FDR} = 0,043$ ) niż T2DM i control ( $p_{FDR} = 0,087$ ). Z kolei w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością udział procentowy rzędu Enterobacteriales (18,48%) był prawie czterokrotnie większy

niż w grupie kontrolnej (4,86%), ( $p_{\text{FDR}} = 0,087$ ) oraz ponad sześciokrotnie większy niż w grupie obese (2,83%), ( $p_{\text{FDR}} = 0,028$ ).



**Rycina 36.** Udział procentowy bakterii na poziomie rzędu w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.

**W obrębie poziomu L5,** zidentyfikowane OTU`s przypisano do łącznie 100 rodzin (ang. *family*), z których zaledwie 25 występowało w ilości większej niż 1% (rycina 37). Największy względny odsetek w analizowanych grupach należał do rodzin: Streptococcaceae (control – 14,73%, obese - 13,41% i T2DM - 12,15%) oraz Bradyrhizobiaceae (19,38%, 13,90% i 14,73%). W udziale procentowym poszczególnych rodzin wyróżniająca były: w grupie obese wysoki, lecz nieistotny statystycznie odsetek Staphylococcaceae (12,61% vs. 0,88% - control i 0,99% - T2DM) oraz istotnie wysoki odsetek Sphingomonadaceae (10,41% vs. 1,08% - control i 4,53% - T2DM), ( $p_{\text{FDR}} = 0,05$ ). Z kolei w grupie kontrolnej stwierdzono istotnie wyższy niż w pozostałych grupach odsetek bakterii należących do rodziny Bifidobacteriaceae ( $p_{\text{FDR}} = 0,002$ ).

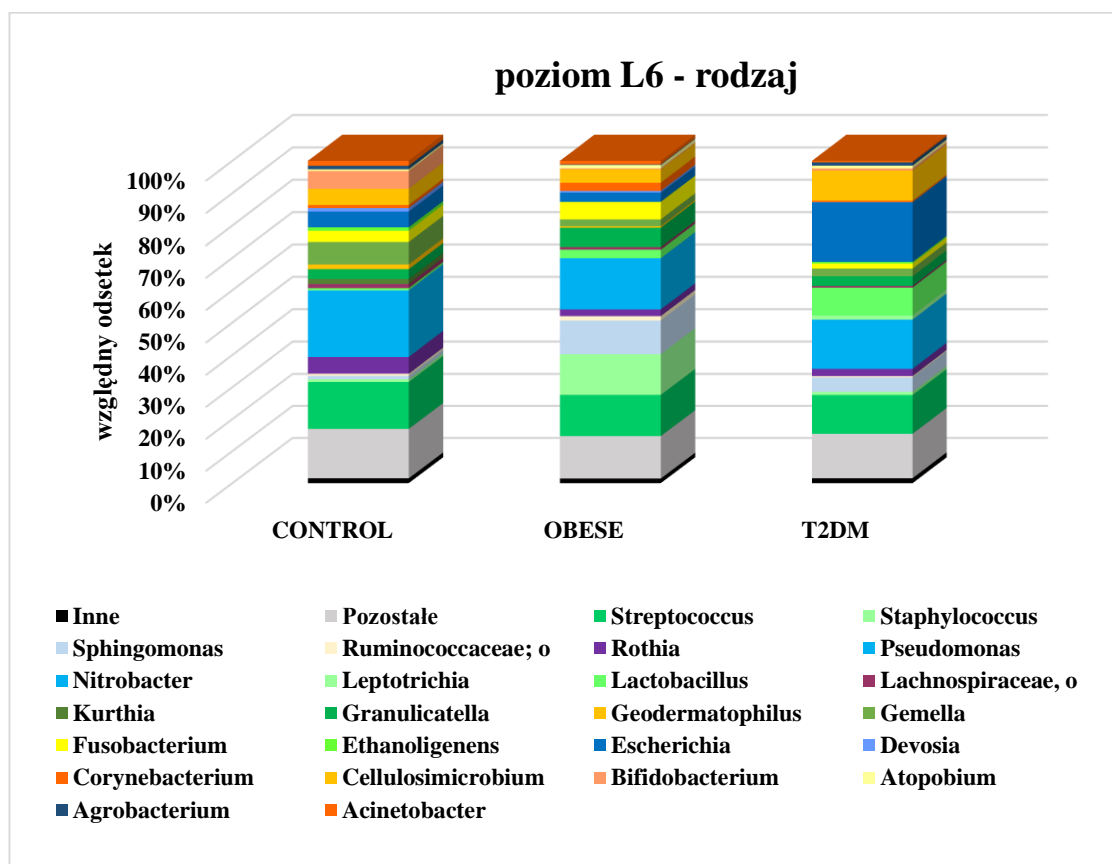


**Rycina 37.** Udział procentowy bakterii na poziomie rodziny w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.

Zastosowany w legendzie skrót „NA” (ang. *not assigned*), oznacza niezidentyfikowaną rodzinę należącą do rzędu Bacillales.

Na poziomie L6 zidentyfikowane OTU`s przypisano do 175 rodzajów (ang. *genus*), z których 24 występowały w ilości większej niż 1% (rycina 38). Największy udział procentowy w analizowanych grupach należał do rodzaju *Nitrobacter* (19,27%, 13,89% i 14,67%) oraz *Streptococcus* (14,66%, 12,91% i 12,14%). Podobnie jak powyżej, tj. na poziomie rodziny, w grupie obese odnotowano znacznie wyższy, lecz nieistotny statystycznie w odniesieniu do pozostałych grup badawczych odsetek rodzaju *Staphylococcus* (12,61% vs. 0,87% - control i 0,99% T2DM) i *Sphingomonas* (10,42% vs. 1,04% - control i 4,53% - T2DM). Z kolei w grupie T2DM zaobserwowano podobną, lecz również nieistotną statystycznie tendencję wzrostową, w odniesieniu do bakterii z rodzajów: *Lactobacillus* (8,62% vs. 0,58% - control, 2,61% - obese) oraz *Escherichia* (18,42% vs. 4,84% - control, 2,83% - obese). W grupie kontrolnej

stwierdzono wyróżniający oraz istotny statystycznie odsetek rodzaju *Bifidobacterium* (5,47% vs. 0,28% - obese i 0,69% - T2DM) ( $p_{FDR} = 0,009$ ).

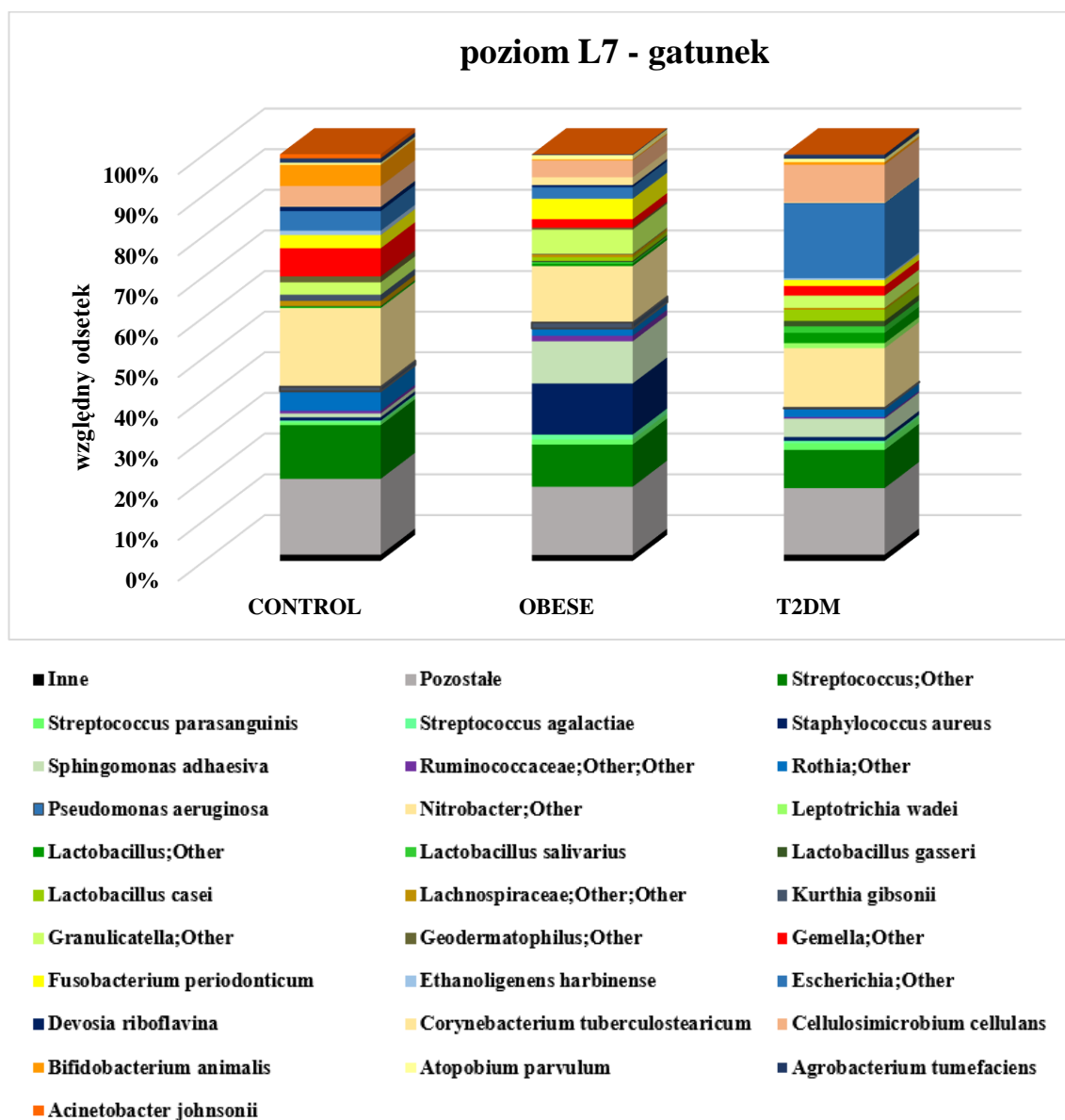


**Rycina 38.** Udział procentowy bakterii na poziomie rodzaju w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.

W przypadku dwóch rodzin: Ruminococcaceae i Lachnospiraceae - „o”- ( ang. *other*), oznacza niejednoznaczny wynik porównania.

**Na poziomie L7**, operacyjne jednostki taksonomiczne zostały przypisane do 149 gatunków (ang. *species*), z czego 29 występowało w ilości większej niż 1% (rycina 39). We wszystkich trzech grupach dominujące były: niejednoznaczne gatunki należące do rodzaju *Streptococcus* (13,18% - control, 10,35% - obese i 9,36% - T2DM), i *Nitrobacter* (19,27% - control, 13,89% - obese, 14,67% - T2DM) oraz *Cellulosimicrobium cellulans* (5,01% - control, 4,14% - obese, 9,28% - T2DM). W grupie pacjentów otyłych zaobserwowano znacznie wyższy procent gatunków *Staphylococcus aureus* (12,58% vs. 0,82% - control i 0,95% T2DM) i *Sphingomonas adhaesiva* (10,39% vs. 0,93% - control i 4,50% - T2DM). W grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością, dominował niejednoznaczny gatunek z rodzaju *Escherichia* (18,42%

vs. 4,84% - control i 2,83% - obese). Z kolei w grupie kontrolnej wśród gatunków z rodzaju *Bifidobacterium* (5,47%), które na poziomie L6 stanowiły istotnie statystycznie wyższy odsetek w odniesieniu do grupy obese i T2DM, były: *Bifidobacterium animalis* (5,20%), *Bifidobacterium adolescentis* (0,15%), *Bifidobacterium longum* (0,10%) i *Bifidobacterium bifidum* (0,02%). W żadnej z analizowanych grup na tym poziomie nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic gatunkowych.



**Rycina 39.** Udział procentowy bakterii na poziomie gatunku w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej.

## 5.7 Analiza korealacji

Uzyskane na każdym poziomie taksonomicznym dane mikrobiologiczne zostały skorelowane z parametrami klinicznymi pacjentów (cholesterol całkowity, LDL, HDL, TG, ALT, poziom glikemii i HbA1c), a także wiekiem i wskaźnikiem BMI. W analizie zastosowano dwie metody: korelację Pearson`a i Spearman`a.

**W grupie pacjentów otyłych** stwierdzono istotne statystycznie, silne korelacje pomiędzy:

- poziomem glikemii, a bakteriami na poziomach od L5 do L7: niezidentyfikowanym gatunkiem (L7) z rodzaju *Methylopila*, należącym do rodziny (L5) Methylocystaceae (Pearson,  $r = 0,78$ ,  $p_{FDR} = 0,013$ ). Z kolei na poziomie L4 zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy poziomem glikemii, a bakteriami z rzędu Rhodospirillales (Spearman,  $\rho = -0,72$ ,  $p_{FDR} = 0,026$ ).
- stężeniem cholesterolu HDL, a bakteriami z rzędu Pseudomonadales (Pearson,  $r = 0,70$ ,  $p_{FDR} = 0,043$ , a także gatunkami przedstawionymi w tabeli 9.

**Tabela 9.** Istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem cholesterolu HDL, a bakteriami na poziomie L7 w grupie pacjentów z otyłością.

Typ	Gatunek	Współczynnik Pearson`a	Wartość p(FDR)
Firmicutes	* <i>Lactococcus</i> _NA	0,83	< 0,001
Actinobacteria	* <i>Gordonia</i> _NA	0,72	0,023
Proteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,83	< 0,001
Proteobacteria	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0,70	0,031

\*NA – oznacza niezidentyfikowany gatunek, należący odpowiednio do rodzaju *Lactococcus* i *Gordonia*.

- stężeniem trójglicerydów a bakteriami należącymi do typu Actinobacteria (Pearson,  $r = 0,65$ ,  $p_{FDR} = 0,027$ )
- aktywnością enzymu ALT, a bakteriami na poziomach od L2 do L4 Mycoplasmatales (Pearson,  $r = 0,72$ ,  $p_{FDR} = 0,031$ )
- indeksem BMI, a bakteriami z rzędu Bacillales (Spearman,  $\rho = 0,73$ ,  $p_{FDR} = 0,017$ ) – korelacja dodatnia

Nie zaobserwowano natomiast korelacji na żadnym z poziomów taksonomicznych w stosunku do parametrów: cholesterol całkowity, LDL, HBA1c oraz wieku.

**W grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz otyłością** zaobserwowano istotne statystycznie, silne korelacje pomiędzy:

- poziomem glikemii a bakteriami na poziomach od L4 do L7: *Rhodococcus erythropolis* (Pearson,  $r = 0,69$ ,  $p_{FDR} = 0,019$ ) a także *Staphylococcus capitis* (Pearson,  $r = 0,74$ ,  $p_{FDR} = 0,008$ ) i niezidentyfikowanym gatunkiem z rodzaju *Alkalibacterium* (Pearson,  $r = 0,69$ ,  $p_{FDR} = 0,019$ ), należącymi do Bacillales. Korelacja na poziomie rzędu Bacillales była również istotnie silna w teście korelacji Spearman`a ( $\rho = 0,065$ ,  $p_{FDR}=0,031$ ).
- wskaźnikiem BMI a bakteriami z rodzaju *Rothia* (Pearson,  $r = 0,75$ ,  $p_{FDR} = 0,003$ , Spearman,  $\rho = 0,67$ ,  $p_{FDR} = 0,007$ ) oraz ujemną korelację z bakteriami należącymi do rodziny Promicromonosporaceae, (Spearman,  $\rho = -0,67$ ,  $p_{FDR} = 0,018$ )
- stężeniem HDL, a bakteriami na poziomach od L4-L7, przedstawionymi w tabeli 10.

**Tabela 10.** Korelacje pomiędzy stężeniem cholesterolu HDL, a bakteriami na poziomie L7 w grupie pacjentów z cukrzycą i otyłością.

Typ	Gatunek	Współczynnik Pearson`a	Wartość p(FDR)
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium animalis</i>	0,87	< 0,001
Bacteroidetes	<i>Dysgonomonas_NA</i>	0,87	< 0,001
Firmicutes	<i>Anaerococcus prevotii</i>	0,87	< 0,001
Proteobacteria	<i>Comamonadaceae_NA</i>	0,87	< 0,001
Proteobacteria	<i>Marinomonas_NA</i>	0,87	< 0,001
Proteobacteria	<i>Diaphorobacter_NA</i>	0,86	< 0,001
Proteobacteria	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	0,85	< 0,001
Bacteroidetes	<i>Cloacibacterium rupense</i>	0,79	< 0,001

NA – podobnie jak powyżej oznacza niezidentyfikowane gatunki, należące do wymienionych w tabeli rodzajów.



- odsetkiem HbA1c, a bakteriami należącymi do typu: Proteobacteria (Spearman,  $\rho = -0,57$ ,  $p_{FDR} = 0,034$ ), a także z bakteriami na poziomach od L5 do L7, wymienionymi w tabeli 11.

**Tabela 11.** Korelacje pomiędzy odsetkiem HbA1c, a bakteriami na poziomie L7 w grupie pacjentów z cukrzycą i otyłością.

Typ	Gatunek	Współczynnik Pearson`a	Wartość p(FDR)
Firmicutes	<i>Clostridiales_NA</i>	0,84	< 0,001
Firmicutes	<i>Enterococcus cecorum</i>	0,73	0,001
Firmicutes	<i>Anoxybacillus_NA</i>	0,73	0,001
Actinobacteria	<i>Olsenella_NA</i>	0,73	0,001
Bacteroidetes	<i>Riemerella anatipestifer</i>	0,73	0,001
Firmicutes	<i>Bacillus simplex</i>	0,73	0,001
Firmicutes	<i>Erysipelothrix_NA</i>	0,73	0,001
Firmicutes	<i>Butyrivicoccus_NA</i>	0,73	0,001
Firmicutes	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	0,73	0,001
Actinobacteria	<i>Georgenia satyanarayanani</i>	0,73	0,001
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,71	0,002
Actinobacteria	<i>Collinsella aerofaciens</i>	0,65	0,014

W odniesieniu do pozostałych parametrów: cholesterolu całkowitego, stężenia LDL, trójglicerydów, aktywności enzymu ALT oraz wieku nie zaobserwowano statystycznie istotnych korelacji.

W **grupie kontrolnej** ciekawą obserwacją było stwierdzenie istotnej statystycznie, dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem HDL, a bakteriami z rzędu Lactobacillales (Pearson,  $r = 0,64$ ,  $p_{FDR} = 0,007$ ), a zarazem ujemnej korelacji tych bakterii ze stężeniem LDL (Pearson,  $r = -0,57$ ,  $p_{FDR} = 0,003$ ).

Pozostałe korelacje w tej grupie występowały pomiędzy:

- stężeniem cholesterolu całkowitego, a bakteriami z gatunku *Mycoplasma salivarium* (Pearson,  $r = -0,63$ ,  $p_{FDR} = 0,017$  - ujemne korelacje istotne statystycznie od poziomu L2 do poziomu L7), a także ujemne korelacje

dla niejednoznacznie przypisanego gatunku należącego do rodzaju *Nesternokonia* (Pearson,  $r = -0,63$ ,  $p_{FDR} = 0,024$ ) i *Streptococcus sobrinus* (Pearson,  $r = -0,62$ ,  $p_{FDR} = 0,025$ )

- stężeniem HDL, a bakteriami wymienionymi w tabeli 12.

**Tabela 12.** Korelacje pomiędzy stężeniem HDL, a bakteriami na poziomie L7 w grupie kontrolnej.

Typ	Gatunek	Współczynnik Pearson`a	Wartość p(FDR)
Firmicutes	<i>Mogibacterium_NA</i>	0,73	0,001
Firmicutes	<i>Streptococcus_NA</i>	0,64	0,011
Actinobacteria	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	0,64	0,011
Actinobacteria	<i>Actinomyces oris</i>	0,63	0,011
Firmicutes	<i>Filifactor alocis</i>	0,62	0,016

- stężeniem trójglicerydów, a gatunkami bakterii, wymienionymi w tabeli 13.

**Tabela 13.** Korelacje pomiędzy stężeniem trójglicerydów, a bakteriami na poziomie L7 w grupie kontrolnej.

Typ	Gatunek	Współczynnik Pearson`a	Wartość p(FDR)
Firmicutes	<i>Filifactor alocis</i>	0,69	0,006
Actinobacteria	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	0,67	0,008
Firmicutes	<i>Ruminococcus_NA</i>	0,66	0,008
Firmicutes	<i>Mogibacterium_NA</i>	0,61	0,025

## 6 DYSKUSJA

### 6.1 Wybór materiału klinicznego do badań

W obecnych pracach dotyczących poszukiwania związków pomiędzy mikrobiotą, a otyłością, czy cukrzycą typu 2 lub innymi chorobami metabolicznymi, głównym narzędziem badawczym jest metoda sekwencjonowania nowej generacji. Z kolei podstawowym, wyjściowym materiałem, poddawany po odpowiedniej obróbce analizom metagenomicznym, są izolaty z bakteryjnym DNA, pochodzące z próbek kału, pobranego od pacjentów. W ten sposób poznawana jest mikrobiota jelita grubego [111]. W niektórych pracach sugerowane jest inne podejście, które zakłada, że tego typu badania powinny uwzględniać przede wszystkim mikrobiotę jelita cienkiego [111], [112]. Dotychczas w literaturze rzadko poruszana jest tematyka badawcza, obejmująca analizę mikrobiologiczną górnych części przewodu pokarmowego, np. dwunastnicy, szczególnie, w przebiegu otyłości lub cukrzycy [111], [112]. Główną przyczyną braku prac o tej tematyce tkwi w trudnym dostępie do proksymalnych odcinków jelita [112], ponieważ pobranie bioptatów związane jest z interwencją chirurgiczną, wymagającą zastosowania gastrokopu. Innym powodem jest ograniczona przez kwaśne pH żołądka i obecność enzymów trawiennych liczba bakterii, które zasiedlają jelito cienkie [24]. Najwięcej danych literaturowych, opartych na badaniach mikrobioty dwunastnicy można odnaleźć głównie w odniesieniu do pacjentów pediatrycznych z celiakią [113], [114], [115].

W niniejszej pracy po raz pierwszy w Polsce została przedstawiona i scharakteryzowana struktura mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy u pacjentów z otyłością, a także z cukrzycą typu 2 i otyłością. Odcinek dwunastniczy położony jest na skrzyżowaniu pomiędzy żołądkiem, wydzielającym enzymy trawienne, a absorbującymi substancje odżywcze jelitem czczym oraz krętym [110]. Ze względu na strategiczną pozycję w przewodzie pokarmowym dwunastnica odgrywa ważne funkcje związane z procesem trawienia oraz przyswajania składników odżywczych [116]. W związku z tym struktura mikrobioty w obrębie tego odcinka jest warta zbadania, a zastosowana w prezentowanej pracy metoda sekwencjonowania nowej generacji, wpisuje się w obecne trendy badań mikrobiologicznych.

## 6.2 Metodyka oraz narzędzia do przygotowania i analizy materiału badawczego

Proces sekwencjonowania do prezentowanych badań przeprowadzono na platformie MiSeq firmy Illumina, której sprzęt jest obecnie najczęściej wybierany wśród naukowców. Amplifikację wykonano przy użyciu hiperzmiennych regionów V3-V4, zalecanych przez producenta sekwenatora. Problem wyboru odpowiednich regionów bakteryjnego genu 16S rRNA w badaniach mikrobioty człowieka jest szeroko dyskutowanym zagadnieniem. Do tej pory nie ustalono uniwersalnego rozwiązania, pozwalającego na zastosowanie konkretnej pary starterów w zależności od rodzaju materiału i miejsca pobrania od pacjenta. W badaniach naukowych często używane są regiony V1-V3, V3-V5, V6-V9, V3-V4, lub V1-V9 [117], [118], [119]. Chociaż każdy z nich umożliwia wgląd w społeczność bakterii występujących w próbce, należy uwzględnić, że rezultaty badań mogą być odmienne. Porównawcze prace wykazały np., że V1-V3 pozwala na uzyskanie lepszych rezultatów w kontekście różnorodności bakterii niż V3-V5, ale z drugiej strony nie jest odpowiedni do identyfikacji bakterii należących do rodziny Bifidobacteriaceae [117]. Alternatywnym rozwiązaniem mogłoby być sekwencjonowanie całej długości genu 16S rRNA, przy użyciu sekwencjonowania trzeciej generacji, ale jak już wspomniano we wstępie, technologia ta generuje znaczny odsetek błędów, a to może skutkować niewłaściwym dopasowaniem do poziomu taksonomicznego, co więcej koszty takiej metody znacznie przekraczają sekwencjonowanie drugiej generacji [8].

Przyczyna rozbieżności w uzyskiwanych wynikach może również być skutkiem zastosowania odmiennych protokołów i zestawów do izolacji bakteryjnego DNA z materiałów klinicznych. Według Thomas'a, Clark'a i Dorę wcześniejsze etapy przygotowania próbek nie mają wpływu na wyniki, podkreślane jest natomiast nadrzędne znaczenie wyboru regionów [117].

Bazując na dotychczasowych badaniach przeprowadzonych w Katedrze Mikrobiologii CMUJ, zarówno wybór zestawu do izolacji jak i zakres czynności opisanych w protokole mają istotne znaczenie w liczebności uzyskiwanych po ekstrakcji taksonów [108], więc ten aspekt również powinien być brany pod uwagę, przede wszystkim w procedurze przygotowania próbek do tak czulej techniki, jaką jest sekwencjonowanie. W obecnej pracy oprócz komercyjnego zestawu zastosowano dodatkową, poprzedzającą właściwą ekstrakcję metodę, polegającą na lizie

enzymatycznej oraz mechanicznej, dzięki czemu możliwe było zwiększenie czułości uzyskiwanych wyników. Ponadto każdy etap podlegał kontroli wewnętrznej (pomiar stężenia izolatów, walidacja produktu PCR oraz kontroli ujemnej przy użyciu elektroforezy, dodatkowa ocena stężenia próbek po procesie poolowania, kontrola wewnętrzna sekwencjonowania w postaci PhiXa, odłączenie po sekwencjonowaniu z puli próbek badanych odczytów, które zostały wygenerowane w kontroli ujemnej). Ostatnia kwestia – usunięcie odczytów zdefiniowanych w kontroli negatywnej z próbek klinicznych, jest również istotna przy ostatecznej ocenie taksonomicznej, szczególnie, gdy do amplifikacji zastosowano metodę nested-PCR. Pominięcie tego etapu może skutkować przeszacowaniem OTU`s, co z kolei przekłada się na jakość i wiarygodność uzyskanych wyników. Otrzymana w niniejszych badaniach całkowita liczba OTU`s, którą można utożsamiać z liczbą gatunków, wyniosła 438 i odpowiada rzędowi wielkości, który podawany jest w danych literaturowych dla odcinka dwunastniczego [120].

Kolejnym aspektem, na który należy zwrócić uwagę przy interpretacji wyników i porównywaniu z innymi pracami jest wybór oprogramowania do analizy sekwencji oraz bazy danych, pozwalających na klasyfikację taksonomiczną. Obecnie dostępnych jest kilka propozycji, ale najczęściej używane są klasyfikatory takie jak RDP, 16S Classifier, SILVA, GreenGenes, BLAST i OTT oraz oprogramowania z opcją klasyfikacji: Qiime, lub MG-RAST [118], [121]. Mimo dużego wyboru i ogólnej dostępności tych narzędzi, klasyfikacja na poszczególnych poziomach taksonomicznych może wyglądać odmiennie w zależności od zastosowanego klasyfikatora. Przykładowo RDP, SILVA i 16S Classifier mają ograniczony zakres ustalania taksonomii do poziomu rodzaju. Przy użyciu SILVA i 16S Classifier nie jest możliwa identyfikacja gatunkowa, a w przypadku RDP, konieczne jest wcześniejsze przeprogramowanie algorytmów celu sklasyfikowania gatunku, co niestety nie zawsze gwarantuje uzyskanie wiarygodnych wyników. Tego typu problemy szczegółowo zostały omówione m.in. w pracy Gao i Tuzhikov [122], [123].

Każdy z wymienionych wcześniej klasyfikatorów, ma w swojej bazie danych wiele taksonów, które nie występują w innych bazach. Na podstawie powyższych przykładów przeprowadzono analizę porównawczą, która wykazała, że łącznie aż 89% rodzajów jest unikalnych dla SILVA, RDP, GreenGenes lub NCBI. Najwięcej wspólnych taksonów mają bazy NCBI i SILVA (60% na poziomie klasy i 10% na poziomie rodziny i rodzaju). W przypadku porównania bazy NCBI i pozostałych klasyfikatorów odsetek

ten jest znacznie niższy i wynosi odpowiednio 23% i 5% dla RDP oraz 13% i 2% dla GreenGenes [124]. W publikacji Balvociute i Huson proponowane jest zastosowanie bazy NCBI przy wykonywaniu analiz na różnych poziomach taksonomicznych. Baza ta aktualizowana jest codziennie i zawiera nazwy oraz sekwencje wszystkich mikroorganizmów. Opracowywana jest na podstawie aktualnej literatury oraz ponad 150 źródeł (np. „Catalog of Life”, czy „Name Bank”) [124]. Inne badania przeprowadzone przez Lindgreen wykazały, że obecnie żaden z klasyfikatorów nie może być uznany za najlepszy do analizy sekwencji [125].

W niniejszej pracy posłużono się autorskim oprogramowaniem firmy BioIdea. Opracowana baza danych sekwencji - BioMeta16SRef, powstała na podstawie danych, pochodzących z wielu źródeł – przede wszystkim baz: Greengenes oraz NCBI. Okresowe i automatyczne aktualizowanie bazy BioMeta16SRef, umożliwi ciągłe wzbogacanie jej o nowe sekwencje mikroorganizmów. Pakiet BioMeta16S pozwolił na identyfikację bakterii z dokładnością 98,50% do poziomu rzędu i 95,96 % do poziomu rodzaju. Na poziomie gatunku wartość ta jest znacznie niższa - 39,61% ze względu na szereg sekwencji, które wykazywały wysoki (na poziomie 97%), lecz identyczny procent podobieństwa. Problem ten jest nieunikniony, gdy sekwencjonowaniu poddawane są krótkie fragmenty. Wówczas zazwyczaj automatycznie wybierany jest pierwszy w kolejności wynik, co nie zawsze odzwierciedla prawidłowe postępowanie. Z tego powodu, do analizy na poziomie L7 zostały uwzględnione tylko te OTU's, które jednoznacznie zostały przypisane do danego gatunku.

### **6.3 Analiza uzyskanych wyników w kontekście innych prac badawczych**

W analizie bioróżnorodności zarówno w obrębie próbek (alfa różnorodność) jak i pomiędzy próbkami (beta różnorodność) w badanych grupach uwagę zwraca brak różnic istotnych statystycznie. Wyniki te wskazują na duże podobieństwo flory bakteryjnej, co może świadczyć o znacznym udziale wspólnych bakterii, tworzących tzw. rdzeń mikrobioty odcinka dwunastniczego. W związku z tym można się spodziewać, że różnice w profilach bakteryjnych pomiędzy grupami badawczymi będą dotyczyły nieznacznej ilości taksonów.

Proksymalna część jelita cienkiego – w tym dwunastnica oprócz wspomnianego wcześniej kontaktu z enzymami trawiennymi żołądka, wystawiona jest także na działanie kwasów żółciowych i enzymów trzustkowych, co może wpływać na zmniejszenie różnorodności i liczebności mikrobioty, w przeciwieństwie do mikrobioty dystalnej części jelit. Według szacunkowych danych, liczba bakterii w dwunastnicy mieści się w granicach  $10^1 - 10^2$  CFU/ml [126] lub według innego źródła  $10^3-10^4$  [24]. W związku z tym możliwe było dokładne scharakteryzowanie struktury mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy, o czym świadczą krzywe rarefakcji (rycina 31), które osiągnęły *plateau* przy wartości 7000 odczytów.

W analizowanym materiale, pochodzącym od uczestników prezentowanego badania potencjalnymi bakteriami, które można określić mianem wspólnego rdzenia mikrobioty dwunastnicy, dla grupy osób zdrowych, jak i chorych są typy: Firmicutes, Proteobacteria oraz Actinobacteria. Podobne badania na bioptatach dwunastniczych zostały przeprowadzone w grupie pacjentów otyłych oraz u zdrowych ochotników przez zespół Angelakis [116] oraz u osób zdrowych przez zespół Li. W pracy Li zdecydowaną dominację obserwowano w odniesieniu do typów Firmicutes i Proteobacteria. Pozostałe typy występowały w niewielkich ilościach, co jest zgodne z wynikami prezentowanymi w niniejszej pracy. Dominującymi typami w badaniach Angelakis u obu grup były Firmicutes oraz Actinobacteria, a Proteobacteria stanowiły znacznie mniejszy odsetek (9,5% w grupie kontrolnej oraz 4% w grupie pacjentów otyłych). Te dysproporcje mogą wynikać z ograniczenia uczestników badań wyłącznie do płci męskiej oraz ich niedużej liczebności - 5-ciu osób na grupę. Jeszcze inne badania pokazują, że struktura mikrobioty w obrębie tego samego odcinka może różnić się istotnie w zależności od rodzaju pobieranego materiału. Przykładowo w próbkach płynu żołądkowego największy udział procentowy stanowiły Firmicutes, Bacteroidetes oraz Actinobacteria, a w błonie śluzowej żołądka były to: Proteobacteria oraz Firmicutes [127]. W odniesieniu do powyższych wyników, przewaga liczebna Firmicutes oraz Proteobacteria w bioptatach błony śluzowej dwunastnicy pacjentów wydaje się być uzasadniona, ponieważ ta proksymalna część jelita cienkiego stanowi kolejny odcinek przewodu pokarmowego, oddzielony od żołądka jedynie odźwiernikiem [128]. W dalszej części jelita, przede wszystkim w okrężnicy liczba bakterii należących do typu Proteobacteria spada i zostaje zastąpiona znacznym udziałem Bacteroidetes.

W niniejszych badaniach typ Bacteroidetes występował w niewielkim, ale istotnie statystycznym procencie w grupie pacjentów otyłych oraz z cukrzycą typu 2 i otyłością, w stosunku do osób zdrowych. Wyraźnie mniejszą liczbę Bacteroidetes w dwunastnicy zaobserwowano również w pracy Angelakis [116]. Przyczyną może być ograniczona dostępność mucyny, stanowiącej źródło węgla dla tych mikroorganizmów. Bakterie należące do typu Bacteroidetes charakteryzuje duża ilość genów kodujących enzymy powodujące degradację tej glikoproteiny, takie jak: hydrolazy glikozyłowe, proteazy, peptydazy, sulfatazy, sialidazy i neuraminidazy. Natomiast warstwa mucyny w jelicie cienkim jest znacznie cieńsza niż w żołądku i okrężnicy [129].

W pracach dotyczących ludzkiego mikrobiomu od dłuższego czasu podejmowane są próby ustalenia właściwych dla zdrowia jelit (przede wszystkim jelita grubego) proporcji głównych typów bakterii. W dotychczasowych publikacjach nadal nie odnaleziono w tym temacie konsensusu. Niektórzy naukowcy wykazują w badaniach z udziałem osób otyłych tendencję do wzrostu proporcji Firmicutes do Bacteroidetes (F/B) w porównaniu do osób szczupłych oraz zmniejszenie tego stosunku wraz z utratą wagi [130], [131]. Wiele doniesień prezentuje również sprzeczne z powyższymi wyniki. W niektórych pracach nie odnaleziono znaczących różnic w stosunku F/B pomiędzy osobami szczupłymi i otyłymi zarówno przed jak i po utracie masy ciała [105], [132], [133], [134]. W celu określenia proporcji głównych typów w błonie śluzowej dwunastnicy na podstawie prezentowanych w pracy wyników należało posłużyć się stosunkiem Firmicutes do Proteobacteria (F/P). Wówczas ciekawą obserwacją była tendencja wzrostowa proporcji F/P u osób zdrowych i u pacjentów z otyłością, a odwrotna w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością. Według danych literaturowych bakterie należące do Proteobacteria wiązane są z negatywnym wpływem na zdrowie człowieka, przede wszystkim ze względu na obecność w ścianie komórkowej endotoksyny - liposacharydu (LPS) [135]. W obecnej pracy w obrębie tego typu, uwagę zwracał wysoki odsetek procentowy klasy Gammaproteobacteria w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością (20,02% vs. 7,93% - control i 6,68% - obese). Przewaga liczebna tej grupy może być związana z przyjmowaniem przez pacjentów metforminy, powszechnie używanej w leczeniu cukrzycy typu 2. W kilku badaniach wykazano, że stosowanie niektórych leków, w tym właśnie metforminy związane jest ze wzrostem liczebności kilku rodzajów bakterii, należących do klasy Gammaproteobacteria: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*,



*Citrobacter*, *Salmonella* i *Proteus* [136]. Wyniki te były spójne z kilkoma dużymi badaniami obserwacyjnymi lub interwencyjnymi, a także w odniesieniu do rodzaju *Escherichia* (18,42% vs. 4,84% - control, 2,83% - obese) w niniejszej pracy.

Z kolei w publikacji Li przedstawiona została hipoteza, według której obfita kolonizacja jelit przez Gammaproteobacterie jest pożądanym zjawiskiem, ponieważ spełniają one rolę wydajnych „metabolizatorów” węglowodanów. Wnioski te zostały sformułowane na podstawie badań flory bakteryjnej jelit pacjentów po zabiegach bariatrycznych. Ci sami badacze stwierdzili, że utrzymywanie się większej liczby Gammaproteobacteria przez dłuższy okres czasu może faworyzować apoptozę komórek nabłonka i wywierać negatywny wpływ na zdrowie [103]. Dowiedziono także, że dieta bogata w tłuszcze predysponuje do wzrostu udziału nie tylko tej klasy, ale także innych bakterii, należących do typu Proteobacteria w przewodzie pokarmowym człowieka. W konsekwencji, zwiększa się przepływ cząstek LPS przez barierę jelita i indukowany jest stan zapalny, który może prowadzić do rozwoju otyłości i cukrzycy. Dodatkowo, tłuszcze nasilają produkcję żółci, która ma nie tylko silne działanie przeciwdrobnoustrojowe, ale także jest detergentem, który może mieć wpływ na przepuszczalność błony śluzowej i pośredniczyć w nadmiernej przepuszczalności LPS [104]. Sugeruje się, że Proteobacteria mogą ulegać translokacji do tkanek jeszcze przed rozwojem cukrzycy typu 2 [137]. Zarówno w badaniach na zwierzętach jak i na ludziach zaobserwowano, większą liczbę wszystkich bakterii we krwi u osobników mających predyspozycje do rozwoju cukrzycy, co więcej, u wszystkich uczestników rdzeń mikrobioty należał w 85-90% do tego typu [138].

Rezultaty powyższych badań wzbogacają argumentację do teorii translokacji bakterii do tkanek, a tym samym spadek ich liczebności w jelicie grubym [135]. Opisywane zmiany mogą jednak ulec odwróceniu w wyniku stosowania leczenia szczepem probiotycznym *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 420 (B420), które w badaniach na myszach, przeprowadzonych przez zespół Amar`a spowodowały redukcję adherencji bakterii z rodziny Enterobacteriaceae (należącej do typu Proteobacteria) do śluzówki jelita oraz ograniczenie translokacji. W efekcie doszło do normalizacji stanu zapalnego tkanki tłuszczowej. Równie obiecujące wyniki uzyskano w pracach Stenman`a oraz Million`a. Zastosowanie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* doprowadziło do utraty masy ciała i zmniejszonej akumulacji tłuszczu, a także poprawiło tolerancję glukozy u myszy poddanych diecie bogatej w tłuszcze. Podobnie

jak w uprzednio wspomnianych badaniach, potwierdzono także ograniczoną adherencję bakterii do śluzówki jelita, a także zmniejszenie poziomu LPS [139]. W innych badaniach zaobserwowano, że zastosowanie metforminy w połączeniu z B420 przynosi znacznie lepsze efekty w leczeniu cukrzycy [140]. Powyższe wyniki stanowią kolejną solidną argumentację, przemawiającą za zastosowaniem *Bifidobacterium animalis* w redukcji metabolicznej endotoksemii oraz do opracowania strategii terapeutycznej, opartej o kontrolę translokacji bakterii i dysbiozę śluzówki w przebiegu cukrzycy typu 2, połączonej z otyłością lub zespołem metabolicznym [141]. Do tej pory w dostępnej literaturze znaleziono tylko jedną pracę, w której przeprowadzono badania kliniczne na ludziach, dotyczące wpływu *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* 420. W grupie wolontariuszy z nadwagą i otyłością po przyjmowaniu B420, zaobserwowano redukcję masy ciała i tłuszczu w stosunku do grupy otrzymującej placebo. Nie odnotowano natomiast spadku glukozy we krwi, hemoglobiny glikowanej, czy insuliny, ale ten rodzaj badań powinien być przeprowadzony głównie u pacjentów z zaburzeniami metabolizmu glukozy lub z cukrzycą typu 2 [142].

Z kolei w badaniach podstawowych przeprowadzonych na próbkach kału, pochodzących od osób otyłych, z nadwagą, szczupłych oraz z anoreksją, zaobserwowano, że liczba *Bifidobacterium animalis* była istotnie wyższa w grupie osób szczupłych w porównaniu do otyłych. Podobne rezultaty przypisywane są do ogólnej liczby bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w badaniach z udziałem pacjentów z cukrzycą typu 2 [90]. Przytoczone dane oparte są wyłącznie na badaniach jelita grubego i jego zawartości. Żadna z dotychczas opublikowanych prac nie podkreśla tych zależności, w innych odcinkach przewodu pokarmowego. Natomiast zmiany te można zaobserwować już w błonie śluzowej dwunastnicy, a wskazują na to uzyskane w prezentowanej pracy wyniki, w których odsetek bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* był istotnie wyższy w grupie kontrolnej (5,47%), w porównaniu do odsetka u pacjentów z otyłością (0,28%) oraz z cukrzycą typu 2 i otyłością (0,69%). Zależności te występowały także na wyższych poziomach taksonomicznych (rodzina Bifidobacteriaceae i rząd Bifidobacteriales: 5,49% vs 0,29% - obese i 0,69% - T2DM,  $p_{FDR} = 0,002$ , klasa Actinobacteria: 20,31% vs 11,45% - obese i 14,90% - T2DM,  $p_{FDR} = 0,057$ , typ Actinobacteria: 21,17% vs 12,84% - obese, 15,87% - T2DM,  $p_{FDR} = 0,019$ ). Na poziomie gatunku związek ten nie był istotny statystycznie, co prawdopodobnie świadczy o tym, że nie tylko *Bifidobacterium animalis*, ale również inny/inne gatunki

w obrębie rodzaju *Bifidobacterium* (np. *B. adolescentis*, *B. longum* i *B. bifidum*) mogą wspólnie wywierać widoczny na wyższych poziomach efekt. Na szczególną uwagę zasługuje również wykazanie dodatniego i silnego związku ( $r = 0,87$ ,  $p < 0,001$ ) pomiędzy rodzajem *Bifidobacterium*, a stężeniem HDL w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością. W pracy Salamon i współautorów zaobserwowano po sekwencjonowaniu izolatów z próbek kału podobny, lecz o przeciętnym nasileniu związek zarówno w grupie pacjentów z cukrzycą typu 1 ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,03$ ) jak i 2-go ( $r = 0,43$ ;  $p = 0,03$ ) [43]. Obserwacje te stanowią potwierdzenie zależności pomiędzy rodzajem *Bifidobacterium* a stężeniem HDL w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach [144], [145], [146].

Zebrane do tej pory wyniki badań świadczą o istotnej roli rodzaju *Bifidobacterium* w funkcjonowaniu mikrobiomu jelitowego, zarówno w części dystalnej jak i proksymalnej, co więcej bakterie te można rozpatrywać w kontekście potencjalnego markera dysbiozy jelit. Kolejnym krokiem w przyszłych badaniach powinno być ustalenie zakresu optymalnych dla zachowania homeostazy wartości *Bifidobacterium*, które stanowiłyby cel terapeutyczny [141].

Podobną zależność w odniesieniu do stężenia HDL, lecz w grupie pacjentów z otyłością wykazano dla nieznanego gatunku należącego do rodzaju *Lactococcus* ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,001$ ). Wśród tego rodzaju dane literaturowe nawiązują przede wszystkim do bakterii o właściwościach probiotycznych - *Lactococcus lactis* [147], [148], [149], [150].

W badaniach przeprowadzonych na kobietach z hypercholesterolemią odnotowano, że po spożywaniu przez okres 7 tygodni jogurtów wzbogaconych m.in. o ten gatunek bakterii, wzrósł istotnie poziom HDL w surowicy, a jednocześnie zaobserwowano znaczny spadek frakcji LDL [147]. W jednej z prac przeglądowych przytoczono wiele badań z udziałem wybranych szczepów *Lactococcus lactis* [150]. Przykładowo, na podstawie długoletnich obserwacji *in vitro* zaproponowano dwa mechanizmy działania *L. lactis*, polegające na adhezji oraz asymilacji cholesterolu, które w konsekwencji prowadzą do jego redukcji w podłożu. Z kolei w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na szczurach, podawanie dwóch szczepów *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527 wpłynęło na obniżenie cholesterolu całkowitego oraz trójglicerydów w surowicy, a także wzrost frakcji HDL w stosunku do cholesterolu całkowitego [150]. Poza rodzajem *Lactococcus*

i opisanym wcześniej *Bifidobacterium*, również bakterie *Lactobacillus* zaliczane są do probiotyków, które wywierają korzystny wpływ na zdrowie człowieka, m.in. poprzez utrzymywanie homeostazy w jelitach, hamowanie reakcji zapalnych i translokacji bakterii z jelit. W analizie korelacji w grupie kontrolnej niniejszej pracy wykazano pozytywny wpływ rzędu Lactobacillales na stężenie HDL (Pearson,  $r = 0,64$ ,  $p_{FDR} = 0,007$ ) oraz spadek tych bakterii wraz ze wzrostem stężenia LDL (Pearson,  $r = - 0,57$ ,  $p_{FDR} = 0,003$ ). Jednak w niektórych doniesieniach wyniki metaanalizy wskazują, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oprócz korzystnego działania mają także wpływ na przyrost wagi [151], co można rozważyć w kontekście uzyskanych w obecnej pracy wyników, w których zaobserwowano tendencję wzrostową rodzaju *Lactobacillus* w grupie pacjentów z otyłością (2,61%) oraz z cukrzycą typu 2 i otyłością (8,62%) w stosunku do osób zdrowych (0,58%). Równie ciekawe obserwacje, potwierdzone na razie na modelu zwierzęcym zaobserwowano w odniesieniu do gatunku *Lactobacillus salivarius*, który produkuje bakteriocyny, co wpływa na zwiększenie liczebności Bacteroidetes oraz Proteobacteria i zmniejszenie stężenia Actinobacteria [152]. Wyniki te mogą tłumaczyć zaobserwowany istotnie statystycznie wzrost typu Bacteroidetes, tendencję wzrostową Proteobacteria, a zarazem istotny statystycznie spadek Actinobacteria w grupie pacjentów z otyłością oraz z cukrzycą typu 2 i otyłością.

W analizie korelacji, najwięcej związków z parametrami biochemicznymi pacjentów, zaobserwowano na poziomie gatunku. Wśród nich, uwagę zwraca spora ilość bakterii, które bardziej związane są ze środowiskiem zewnętrznym niż fizjologiczną mikrobiotą człowieka. Ich obecność może wynikać z kontaminacji na etapie izolacji. W literaturze znaleziono kilka prac wraz z listą mikroorganizmów, które stanowią częste źródło zanieczyszczeń w zestawach odczynników używanych do ekstrakcji DNA [153]. W niniejszej pracy, po izolacji bakteryjnego DNA, do dalszych etapów przygotowania materiału (począwszy od przygotowania reakcji PCR po sekwencjonowanie) włączono kontrole negatywne. Natomiast jak już wcześniej wspomniano, po procesie sekwencjonowania usunięto z uzyskanych danych te odczyty, które występowały w kontroli ujemnej. W związku z tym kontaminacja na tych etapach została zminimalizowana. Podobny problem opisywany jest w pracy Gosiewskiego i współautorów [154]. Po sekwencjonowaniu bakteryjnego DNA, wyizolowanego z próbek krwi pacjentów z sepsą, uzyskano spory odsetek bakterii żyjących w glebie, w wodzie (m.in. *Pseudomonadales*, *Aeromonadales*, *Sphingomonadales*,

czy *Cellulosimicrobium*), lub co było największym zaskoczeniem: bakterii wiążących azot i żyjących w symbiozie z roślinami motylkowymi (*Rhizobiales*). Autorzy innej publikacji wyjaśniają, że obecność szczególnie tych ostatnich bakterii może być związana z częstym gromadzeniem azotu zamiast powietrza w ultra czystych zbiornikach do przechowywania wody [153]. Co ciekawe, DNA tych bakterii występowało wyłącznie w grupie badawczej, nie odnotowano ich natomiast w próbkach pochodzących od osób zdrowych. Z kolei w pracy Stearns podobne grupy bakterii były włączone, w skład mikrobioty człowieka, zasiedlających różne odcinki przewodu pokarmowego [155]. Nie można wykluczyć, że mikroorganizmy typowe dla środowiska zewnętrznego mogą być dostarczane do organizmu wraz z żywnością i wodą, nie bez znaczenia pozostaje także środowisko, w którym przebywa człowiek oraz kontakt ze zwierzętami. Czynniki te wpływają na przekazywanie, a zarazem nabywanie mikrobioty jelitowej [156]. Nie wiadomo natomiast, czy i jak te mikroorganizmy wpływają na procesy zachodzące w przewodzie pokarmowym. Według niektórych naukowców nie powinno się pomijać w analizie mikrobiomu człowieka gatunków, które do tej pory związane były wyłącznie z jego otoczeniem, ponieważ zależnie od warunków, mogą ostatecznie stać się chorobotwórczymi [157],[158], np. od pierwszego opisu bakterii - *Ricettsia parkeri* do powiązania jej z infekcjami u ludzi minęło aż 39 lat [159]. Od tego czasu ilość przypadków zachorowań, w których czynnikiem etiologicznym była ta bakteria znacznie wzrosła [157]. Doskonałym przykładem jest *Akkermansia muciniphila*, należąca do typu Verrucomicrobia, który początkowo zawierał gatunki izolowane z gleby. W 2004 r. po raz pierwszy wyhodowano ten gatunek z próbek ludzkiego kału. W kolejnych latach wykazano, że *Akkermansia muciniphila* stanowi średnio do ok 5% mikrobioty jelitowej, a jej liczebność była istotnie mniejsza w przebiegu cukrzycy i/lub otyłości. Naukowcy sugerują, że bakterie te spełniają ochronną rolę przed zaburzeniami metabolicznym [160]. W jednym z badań interwencyjnych po zastosowaniu odpowiedniej diety zaobserwowano wzrost liczebności *Akkermansia muciniphila*, który ujemnie korelował ze stanem zapalnym, a także poziomem glukozy i lipidów we krwi pacjentów z otyłością [161].

Niewykluczone, że wymienione w niniejszej pracy gatunki środowiskowe mogą być składnikiem tzw. nieaktywnej frakcji mikrobiomu, stanowiącej bakterie uśpione lub martwe [162]. W celu odróżnienia tej frakcji od aktywnych metabolicznie komórek, w kilku pracach sugerowane jest zastosowanie cytometrii przepływowej połączonej z techniką sortowaniem komórek - FCM-CS (aktywne metabolicznie komórki ulegają

wybarwieniu pyroniną-Y, a pozostałe nieaktywne komórki, nie wiążą barwnika) [162] lub analizy opartej o ekstrakcję i sekwencjonowanie DNA i RNA do scharakteryzowania całkowitej liczby bakterii (DNA) i aktywnych metabolicznie bakterii (RNA) [163], [164]. W przytoczonych powyżej pracach autorzy wykazali, że liczba aktywnych metabolicznie bakterii znacznie różni się od całkowitej społeczności mikroorganizmów, wśród której większość stanowią formy nieaktywne [162], [163], [164]. W przyszłych badaniach o podobnym charakterze, warto byłoby zwrócić uwagę na określenie oraz rozdzielenie frakcji bakterii, które występują w formie aktywnej od całkowitej liczby bakterii zasiedlających przewód pokarmowy, w tym bakterii środowiskowych. Być może takie podejście zawęziłoby ogrom danych, uzyskiwanych po sekwencjonowaniu, do zakresu obejmującego jedynie te bakterie, które wpływają poprzez swój metabolizm na prawidłowy lub patologiczny przebieg procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym. Niestety do tej pory stan wiedzy na temat gatunków środowiskowych w kontekście mikrobioty człowieka jest znikomy i nie pozwala na wyciągnięcie niebudzących wątpliwości wniosków. Zagadnienia związane z kontaminacją odczynników oraz sposobami ich wykluczenia również powinny stanowić wyzwanie do dalszych badań, ponieważ interpretacja wzbogaconych o zanieczyszczenia wyników może doprowadzić do wyciągnięcia błędnych wniosków i np. fałszywie powiązać mikroorganizmy z jednostką chorobową, a także stać się przyczyną niespójności w badaniach prowadzonych przez różne laboratoria [153].

#### **6.4 Podsumowanie**

Obecnie żyjemy w epoce genomu, w której technologia sekwencjonowania następnej generacji umożliwia rewolucyjny postęp w zrozumieniu stanu zdrowia i choroby, a badania oparte o analizę 16S rRNA, sprawiają, że mikrobiologia przeżywa swój ponowny rozkwit. Zachęca to do podejmowania nowych wyzwań związanych także z metodologią, bioinformatyką i bazami danych. Jedynym problemem jest w dalszym ciągu brak ujednoczonych zasad, przede wszystkim opracowania uniwersalnych starterów, oraz wyboru oprogramowania i narzędzi, wykorzystywanych na początkowych etapach obróbki danych, tuż po sekwencjonowaniu. Mimo ograniczeń związanych z wyborem amplifikowanego regionu oraz narzędzi bioinformatycznych, NGS stanowi znacznie dokładniejsze i szybsze rozwiązanie niż dotychczasowe metody fenotypowe i molekularne. W bazach naukowych, np. Pubmed stale rośnie liczba badań dotyczących

składu mikrobioty w przebiegu różnych chorób, proponowane są mechanizmy wyjaśniające patogenezę, a także sposoby leczenia, oparte m.in. o manipulację składem mikrobioty. Opisywane wyniki w kontekście grupy badawczej nie zawsze są zgodne z innymi pracami. Nawet, jeżeli wykazywane są podobieństwa, to należy uważnie, z dozą dystansu podchodzić do interpretacji wyników, szczególnie, gdy w badaniach zastosowano odmienne protokoły. Niemniej jednak istnieje ciągła potrzeba prowadzenia badań w tej tematyce przez niezależne ośrodki badawcze. Odmienne spojrzenia na analizowane problemy stanowią podstawę odkryć, a tym samym nadawanie nowego kierunku rozwoju, który przybliży do ustalenia procesów, będących składowymi mechanizmami patofizjologicznego.

Prezentowane w niniejszej rozprawie wyniki podkreślają złożoność mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy w obrębie badanych grup. Choć mikrobiota w tej części przewodu pokarmowego wykazuje wspólny rdzeń oraz podobieństwo na różnych poziomach taksonomicznych, to zaobserwowane subtelne, lecz istotne zmiany w składzie ilościowym i jakościowym prawdopodobnie inicjują efekt patogenny, który może przejawiać się nasilonym efektem, prowadzącym do zaburzenia procesów fizjologicznych (np. zwiększonej przepuszczalności jelit), a tym samym dysproporcji innych grup mikroorganizmów w dalszych częściach przewodu pokarmowego. Powyższe przypuszczenia wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach, które należałoby poszerzyć o analizę próbek kału, co z przyczyn niezależnych od badacza nie było możliwe do zrealizowania w tym projekcie. Dodatkowo cennym, źródłem informacji byłaby także równoczesna analiza mikrobioty bioptatów jelita grubego i treści dwunastniczej.

Niewykluczone, że w przyszłości badania metagenomiczne będą elementem wchodzącym w skład rutynowej diagnostyki. Wówczas leczenie wzbogacone o manipulację składem mikrobioty poprzez zastosowanie prebiotyków, probiotyków lub innych środków mogłoby dawać znacznie lepsze efekty terapeutyczne, szczególnie, gdyby było dostosowane indywidualnie do profilu mikrobioty pacjenta i ewentualnych fluktuacji w jego obrębie, ponieważ każdy z nas ma swój unikalny zestaw bakterii, określany mianem molekularnego odcisku palca.

## 7 WNIOSKI

1. W celu zbadania struktury mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy niezbędne było opracowanie metody nested-PCR, która pozwoliła na zwiększenie czułości i specyficzności amplifikowanych do sekwencjonowania izolatów.
2. Zastosowanie metody sekwencjonowania następnej generacji w połączeniu z autorskim oprogramowaniem oraz bazą danych firmy BioIdea - BioMeta16SRef, pozwoliło na identyfikację 438 OTUs (operacyjnych jednostek taksonomicznych), ze średnią dokładnością wynoszącą 97,62% (od poziomu typu - L2 do poziomu rodzaju - L6).
3. Na podstawie analizy beta różnorodności wykazano, że struktura mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy pomiędzy grupami badawczymi jest podobna, co może świadczyć o istnieniu w tym odcinku przewodu pokarmowego wspólnego rdzenia, obejmującego bakterie należące do typów: Firmicutes, Proteobacteria i Actinobacteria.
4. W odniesieniu do osób zdrowych, grupę pacjentów otyłych charakteryzuje istotnie mniejsza ilość bakterii należących do typu Actinobacteria, a pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością istotnie wyższy odsetek bakterii należących do typu Bacteroidetes.
5. Zarówno w grupie pacjentów z otyłością, jak i cukrzycą typu 2 i otyłością występowała istotnie niższa liczebność bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium*, co zaobserwowano również na wyższych poziomach taksonomicznych (rodziny, rzędu, klasy i typu).
6. W analizie korelacji u pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością wykazano pozytywny związek bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* ze stężeniem HDL.  
Uwzględniając powyższe wyniki oraz prezentowane w dyskusji dane literaturowe, bakterie należące do rodzaju *Bifidobacterium* powinny w przyszłości być rozpatrywać w kontekście potencjalnego biomarkera w przebiegu zarówno cukrzycy typu 2 jak i otyłości.
7. W analizach metagenomicznych niezbędną czynnością powinno być usunięcie z próbek klinicznych odczytów przypisanych kontroli negatywnej, w celu eliminacji kontaminacji. Natomiast odczyty świadczące o obecności w badanym materiale bakterii środowiskowych nie należy pomijać, ze względu na możliwy wpływ tych bakterii na etiologię choroby.



## 8 STRESZCZENIE

Liczne prace naukowe potwierdzają, że w etiologii chorób metabolicznych, takich jak cukrzyca typu 2, czy otyłość oprócz czynników środowiskowych i uwarunkowań genetycznych, ważną rolę odgrywa również mikrobiota przewodu pokarmowego. Badania prowadzone z zastosowaniem wysokoprzepustowych technologii, głównie sekwencjonowania następnej generacji umożliwiają wgląd w społeczność drobnoustrojów, które do tej pory w większości przypadków nie były możliwe do wyhodowania w warunkach laboratoryjnych. Obecnie uwaga naukowców skoncentrowana jest głównie na mikrobiocie dystalnej części jelit – okrężnicy oraz jej zawartości, pomijane są natomiast równie ważne proksymalne odcinki jelit, w których zachodzą początkowe etapy trawienia i przyswajania składników odżywczych.

Głównym celem pracy była ilościowa oraz jakościowa analiza struktury mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy w grupach pacjentów z otyłością oraz z cukrzycą typu 2 i otyłością, zakwalifikowanych do zabiegu bariatrycznego - rękawowej resekcji żołądka. Dodatkowo, uzyskane wyniki mikrobiologiczne zestawiono z parametrami klinicznymi: glikemią, określoną przez poziom glukozy na czczo i odsetek hemoglobiny glikowanej, lipidogramem, obejmującym stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji LDL i HDL, trójglicerydów, a także wiekiem i BMI. Uzyskane wyniki interpretowano w odniesieniu do grupy kontrolnej, którą stanowiły zdrowe osoby. Realizacja powyższych zadań była możliwa dzięki opracowaniu metody nested-PCR, która pozwoliła na zwiększenie czułości i specyficzności poddawanych amplifikacji izolatów. W wyniku sekwencjonowania następnej generacji na platformie MiSeq (Illumina) oraz analizie bioinformatycznej uzyskano 438 operacyjnych jednostek taksonomicznych, które zostały przypisane do odpowiednich poziomów systematycznych. Wykazano, że struktura mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy nie różni się istotnie pomiędzy grupami pacjentów, a osobami zdrowymi, co więcej możliwe było wyodrębnienie wspólnego dla tych grup rdzenia mikrobiologicznego, który obejmował typy: Firmicutes, Proteobacteria oraz Actinobacteria. Zarówno w grupie pacjentów z otyłością jak i z cukrzycą typu 2 zaobserwowano zdecydowanie mniejszą liczebność bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, w odniesieniu do osób zdrowych. Zależności te występowały również na wyższych poziomach taksonomicznych: rodziny, rzędu klasy oraz typu. Ponadto w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 i otyłością, liczebność *Bifidobacterium* dodatkowo korelowała

ze stężeniem HDL. Powyższe argumenty stanowią podstawę do rozpatrywania w przyszłości bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, jako rodzaj biomarkera w rozpoznawaniu i leczeniu zaburzeń składu mikrobioty przewodu pokarmowego w przebiegu cukrzycy typu 2 i otyłości.

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że struktura mikrobioty błony śluzowej dwunastnicy na poziomie typu jest względnie stała, a zachodzące zmiany ilościowe na pozostałych poziomach taksonomicznych, choć są nieznaczne, mogą inicjować efekt patogenny, który ulega spotęgowaniu/wzmocnieniu w dalszych częściach jelita.

## 9 SUMMARY

Numerous scientific studies confirm the fact that a major role is played by gastrointestinal microbiota, apart from environmental and genetic factors, in the etiology of metabolic diseases, such as type 2 diabetes or obesity. Research carried out using high-throughput technologies, especially next-generation sequencing, allows insight into the community of microorganisms that, up to now and in the majority of cases, we haven't been able to culture under laboratory conditions. Currently, the attention of scientists is mainly focused on the distal intestinal microbiota, i.e. the colon and its contents, while the equally important proximal parts of the intestine, in which the initial stages of digestion and absorption of nutrients take place, are overlooked.

The main objective of the study was quantitative and qualitative analysis of the structure of duodenal mucosa microbiota in groups of patients with obesity and with type 2 diabetes and obesity qualified for bariatric surgery: sleeve gastrectomy. Additionally, the microbiological results obtained were compared with clinical parameters: blood glucose level, determined by fasting blood glucose and the percentage of glycated hemoglobin, lipid profile, including total cholesterol, LDL and HDL, triglycerides, as well as age and BMI. The results obtained were interpreted with respect to a control group comprising healthy subjects. The accomplishment of the above tasks was possible owing to devising the nested PCR method, which enabled us to increase the sensitivity and specificity of the isolates subjected to amplification. As a result of next-generation sequencing using MiSeq (Illumina) platform and bioinformatic analysis, 438 operational taxonomic units were obtained that were assigned to appropriate taxonomic ranks. It was demonstrated that the structure of duodenal mucosa microbiota does not differ significantly between groups of patients and healthy individuals. Moreover, it was possible to distinguish the microbiological core, which these groups had in common, including the following phyla: Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria. Both the group of patients with obesity as well as those with type 2 diabetes presented a significantly lower number of bacteria of the genus *Bifidobacterium*, compared to healthy subjects. These dependencies were also present at higher taxonomic levels: family, order, class, and phylum. Furthermore, in the group of patients with type 2 diabetes and obesity, the numbers of *Bifidobacterium* positively correlated with HDL concentration. The aforementioned arguments form a basis for considering bacteria of the genus

*Bifidobacterium* as a kind of biomarker in the diagnosis and treatment of gastrointestinal microbiota composition disorders in the course of type 2 diabetes and obesity in the future.

The results obtained indicate that the structure of duodenal mucosa microbiota at the phylum level is relatively constant and the quantitative changes taking place at the remaining taxonomic levels, although minor, may initiate a pathogenic effect that is intensified/strengthened in later parts of the intestine.

## 10 SPIS RYCIN

<b>Rycina 1.</b> Reakcja sekwencjonowania Sanger'a. ....	14
<b>Rycina 2.</b> Struktura genu 16S rRNA. ....	16
<b>Rycina 3.</b> Etapy Pirosekwencjonowania. ....	18
<b>Rycina 4.</b> Rodzaje operacji bariatrycznych oraz przykładowe metody. ....	38
<b>Rycina 5.</b> Przykładowe rodzaje operacji bariatrycznych. ....	39
<b>Rycina 6.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny reakcji PCR. ....	47
<b>Rycina 7.</b> Schemat mechanizmu reakcji nested –PCR. ....	48
<b>Rycina 8.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej, profil termiczny reakcji amplifikacji oraz rozkład gradientu temperatur dla I amplifikacji. ....	51
<b>Rycina 9.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla drugiej reakcji amplifikacji. ....	51
<b>Rycina 10.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla I reakcji nested - PCR. ....	52
<b>Rycina 11.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla II reakcji nested - PCR. ....	52
<b>Rycina 12.</b> Oczyszczanie amplikonów na statywie magnetycznym. ....	53
<b>Rycina 13.</b> Końcowy etap oczyszczania na statywie magnetycznym. ....	54
<b>Rycina 14.</b> Przygotowanie indeksowania amplikonów przy użyciu odpowiedniej kombinacji sekwencji starterów. ....	55
<b>Rycina 15.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil termiczny dla reakcji znakowania amplikonów. ....	56
<b>Rycina 16.</b> Amplikon z przyłączonymi w odpowiedniej kolejności sekwencjami znacznikowymi i adapterowymi. ....	56
<b>Rycina 17.</b> Seryjne rozcieńczenia standardu DNA do przygotowania krzywej wzorcowej. ....	58
<b>Rycina 18.</b> Przykładowe wartości odczytów fluorescencji dla kolejnych rozcieńczeń standardu DNA. ....	59
<b>Rycina 19.</b> Nakładanie biblioteki genomowej do wyznaczonego miejsca oraz umieszczanie kasety w sekwenatorze MiSeq. ....	62
<b>Rycina 20.</b> Generowanie klastrów. ....	63
<b>Rycina 21.</b> Schemat amplifikacji poprzedzającej mostkowanie. ....	64
<b>Rycina 22.</b> Schemat amplifikacji przez mostkowanie. ....	64

<b>Rycina 23.</b> Właściwe sekwencjonowanie. ....	65
<b>Rycina 24.</b> Zapis kamery CCD dla początkowych cykli sekwencjonowania: A - przy wbudowaniu nukleotydu A, B – przy wbudowaniu nukleotydu G.....	66
<b>Rycina 25.</b> Analiza porównawcza parametrów klinicznych w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	73
<b>Rycina 26.</b> Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji po pojedynczej reakcji PCR (40 cykli). ....	74
<b>Rycina 27.</b> Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji po zastosowaniu reakcji nested – PCR.....	74
<b>Rycina 28.</b> Krzywa wzorcowa uzyskana na podstawie odczytu fluorescencji dla poszczególnych rozcieńczeń standardu DNA. ....	75
<b>Rycina 29.</b> Wykres pudełkowy, tzw. <i>boxplot</i> indexu Chao 1. ....	77
<b>Rycina 30.</b> Wykresy pudełkowe indexów Shannon`a i Simpson`a.....	77
<b>Rycina 31.</b> Krzywe rozrzedzenia dla parametrów PD whole tree oraz OTU`s w badanych grupach. Powyższe krzywe mają zastosowanie w oszacowaniu liczby OTU`s zaobserwowanych w próbce oraz w porównaniu próbek o różnych rozmiarach.....	78
<b>Rycina 32.</b> Wykresy PCoA.....	79
<b>Rycina 33.</b> Udział procentowy bakterii na poziomie typu w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	80
<b>Rycina 34.</b> Udział procentowy bakterii na poziomie typu dla każdego z pacjentów z grup badawczych oraz z grupy kontrolnej. ....	81
<b>Rycina 35.</b> Udział procentowy bakterii na poziomie klasy w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	82
<b>Rycina 36.</b> Udział procentowy bakterii na poziomie rzędu w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	83
<b>Rycina 37.</b> Udział procentowy bakterii na poziomie rodziny w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	84
<b>Rycina 38.</b> Udział procentowy bakterii na poziomie rodzaju w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	85
<b>Rycina 39.</b> Udział procentowy bakterii na poziomie gatunku w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	86

## 11 SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Klasyfikacja otyłości w oparciu o BMI na podstawie wytycznych WHO.....	27
<b>Tabela 2.</b> Kryteria włączenia pacjentów do poszczególnych grup badawczych.....	42
<b>Tabela 3.</b> Sekwencje starterów zewnętrznych, wewnętrznych oraz sekwencje adapterowe zastosowane do reakcji nested-PCR. ....	49
<b>Tabela 4.</b> Schematy rozcieńczania badanej biblioteki oraz kontroli wewnętrznej. ....	61
<b>Tabela 5.</b> Szczegółowa lista buforów i odczynników zastosowanych w trakcie badań.	66
<b>Tabela 6.</b> Charakterystyka porównawcza danych klinicznych w grupach badawczych oraz w grupie kontrolnej. ....	72
<b>Tabela 7.</b> Podstawowe statystyki po ogólnej analizie sekwencjonowania.....	76
<b>Tabela 8.</b> Filogenetyczne podsumowanie uzyskanych przypisów.....	76
<b>Tabela 9.</b> Istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem cholesterolu HDL, a bakteriami na poziomie L7 w grupie pacjentów z otyłością.....	87
<b>Tabela 10.</b> Korelacje pomiędzy stężeniem cholesterolu HDL, a bakteriami na poziomie L7 w grupie pacjentów z cukrzycą i otyłością.....	88
<b>Tabela 11.</b> Korelacje pomiędzy odsetkiem HbA1c, a bakteriami na poziomie L7 w grupie pacjentów z cukrzycą i otyłością.....	89
<b>Tabela 12.</b> Korelacje pomiędzy stężeniem HDL, a bakteriami na poziomie L7 w grupie kontrolnej.....	90
<b>Tabela 13.</b> Korelacje pomiędzy stężeniem trójglicerydów, a bakteriami na poziomie L7 w grupie kontrolnej.....	90

## 12 LITERATURA

1. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*. 2012;70:S38–44.
2. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2004;68:669–685.
3. Wu GD, Lewis JD. Analysis of the human gut microbiome and association with disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2013;11:774–7.
4. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. 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*. 2008;14:908–34.
5. Gabryelska MM, Szymański M, Barciszewski J. DNA- cząsteczka, która zmieniła naukę. *Krótką historia odkryć*. Nauka 2009;2:111-134.
6. Kaunitz JD. The discovery of PCR: procurement of divine power. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015;60:2230–1.
7. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74:5463–7.
8. Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of sequencing technologies: from first to next generation. *Biology and Medicine*. 2017; 9:3.
9. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74:560–4.
10. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11:31–46.
11. Kulski JK. Next-generation sequencing — an overview of the history, tools, and “omic” applications. In: Kulski JK, editor. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech; 2016.



12. Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of Experimental Biology*. 2007;210:1518–25.
13. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 1987;51;2:221-271.
14. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985;82:6955–9.
15. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12:635–45.
16. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Computational Biology*. 2012;8:12.
17. Aliyu S. Bacterial whole genome sequencing: The future of clinical bacteriology. *Annals of Nigerian Medicine*. 2014;8:51.
18. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107:1–8.
19. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. 2009;25:195–203.
20. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell*. 2015;58:586–97.
21. World Health Organization, editor. *Genomics and world health: report of the Advisory Committee on Health Research*. Geneva: World Health Organization; 2002.
22. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31.
23. Thomas T. *Metagenomics - a guide from sampling to data analysis*. 2012;12:2:3.
24. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLOS Biology*. 2016;14:8.

25. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature*. 2007;449:804–10.
26. Olszewska J, Jagusztyn–Krynicka EK. Human Microbiome Project–Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post Mikrobiol*. 2012;51:243–256.
27. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148:1258–70.
28. Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105:17994–9.
29. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457:480–4.
30. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489:220–30.
31. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The Long-term stability of the human gut microbiota. *Science*. 2013;341:1237439–1237439.
32. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease: *Current Opinion in Gastroenterology*. 2015;31:69–75.
33. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS*. 2010;107:26:11971-11975.
34. Jańczewska I, Domżańska-Popadiuk I. Kolonizacja przewodu pokarmowego noworodków oraz wpływ czynników modyfikujących mikrobiotę jelitową na zachowanie zdrowia. *Forum Zakażeń*. 2016;7:443–8.
35. Guaraldi F, Salvatori G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012;2.

36. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*. 2017;474:1823–36.
37. Barczyńska R, Śliżewska K, Libudzisz Z, Litwin M. Rola mikrobioty jelit w utrzymaniu prawidłowej masy ciała. *Standardy Medyczne - Pediatria* 2013;8:1:55-62.
38. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, De Visser JAGM, De Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health & Disease*. 2001;13:129-134.
39. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014;159:789–99.
40. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008;83:460–9.
41. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124:837–48.
42. Majewska K, Smolarek I, Jabłecka A. Mikroflora przewodu pokarmowego i jej rola w patogenezie cukrzycy typu 2. *Farmacja Współczesna*. 2017;10:158-162.
43. Nawrocka M, Szulińska M, Bogdański P. The role of the gut microbiota in the pathogenesis and treatment of obesity and metabolic syndrome. *Wybrane Problemy Kliniczne*. 2015;6:3:95-102.
44. Pokrzywnicka P, Gumprecht J. Intestinal microbiota and its relationship with diabetes and obesity. *Clinical Diabetology*. 2017;5:164–72.
45. Marlicz W, Ostrowska L, Łoniewski I. Flora bakteryjna jelit i jej potencjalny związek z otyłością. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii*. 2013;9:1:20-28.
46. Halfvarson J, Brislawn CJ, Lamendella R, Vázquez-Baeza Y, Walters WA, Bramer LM, et al. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*. 2017;2:17004.

47. Carl MA, Ndao IM, Springman AC, Manning SD, Johnson JR, Johnston BD, et al. Sepsis from the gut: the enteric habitat of bacteria that cause late-onset neonatal bloodstream infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;58:1211–8.
48. Gao R, Gao Z, Huang L, Qin H. Gut microbiota and colorectal cancer. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017;36:757–69.
49. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Inflammatory bowel disease*. 2017;0:1-10.
50. Paun A, Danska JS. Modulation of type 1 and type 2 diabetes risk by the intestinal microbiome: Role of gut microbiome in diabetes. *Pediatric Diabetes*. 2016;17:469–77.
51. Marlene R. Abundance and diversity of microbiota in type 2 diabetes and obesity. *Journal of Diabetes & Metabolism*. 2013;4:3.
52. Szymocha M, Bryła M, Maniecka-Bryła I. Epidemia otyłości w XXI wieku. *Zdrowie Publiczne*. 2009;119(2):207-212.
53. Segula D. Complications of obesity in adults: A short review of the literature. *Malawi Medical Journal*. 2014;26(1):20-24.
54. Wąsowski M, Walicka M, Marcinowska-Suchowierska E. Obesity – definition, epidemiology, pathogenesis. *Postępy Nauk Medycznych*. 2013;4:301-306.
55. Aronne LJ. Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. *Obesity Research*. 2002;10:105S-115S.
56. Adamski W, Szulińska M, Bogdański P. Wtórne przyczyny otyłości. *Wybrane Problemy Kliniczne*. 2012;3:1:6-13.
57. Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Comprehensive clinical practice guidelines for medical care of patients with obesity. *Endocrine Practice*. 2016;22 Supplement 3:1–203.

58. Donini LM, Poggiogalle E, del Balzo V, Lubrano C, Faliva M, Opizzi A, et al. How to estimate fat mass in overweight and obese subjects. *International Journal of Endocrinology*. 2013;2013:1–9.
59. Farooqi IS, O’Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocrine Reviews*. 2006;27:710–8.
60. Tsigos C, Hainer V, Basdevant A, Finer N, Fried M, Mathus-Vliegen E, et al. Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *Obesity Facts*. 2008;1:106–16.
61. Kaila B, Raman M. Obesity: A review of pathogenesis and management strategies. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2008;22:61–8.
62. Przybylska D, Kurowska M, Przybylski P. Otyłość i nadwaga w populacji rozwojowej. *Hygeia Public Health*. 2012;47:1:28-35.
63. Czerwińska E, Walicka M, Marcinowska-Suchowierska E. Obesity – is always primary? *Postępy Nauk Medycznych*. 2013;4:307-310.
64. Koszowska A, Dittfeld A, Zubelewicz-Szkodzińska B. Psychologiczny aspekt odżywiania oraz wpływ wybranych substancji na zachowania i procesy myślowe. *Hygeia Public Health*. 2013;48(3):278-284.
65. Białkowska M. Etiopathogenesis of obesity. *Postępy Nauk Medycznych*. 2011;9:765-769.
66. Męczekalski B, Czyżyk A, Warenik-Szymankiewicz A. Rola genów w postawianiu otyłości. Współczesne poglądy, patogeneza, aspekty kliniczne. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii*. 2008;5:1:27-37.
67. Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB, et al. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *International Journal of Obesity*. 2005;29:281–6.
68. Sohrab SS, Kamal MA, Atkinson RL, Alawi MM, Azhar EI. Viral infection and obesity: current status and future prospective. *Current Drug Metabolism*. 2017;18.

69. Dhurandhar NV, Kulkarni PR, Ajinkya SM, Sherikar AA, Atkinson RL. Association of adenovirus infection with human obesity. *Obesity Research*. 1997;5:464–9.
70. Malnick SDH. The medical complications of obesity. *QJM*. 2006;99:565–79.
71. Czupryniak L, Strojek K, *Diabetologia* 2016. Wydawnictwo Via Medica. Gdańsk. 2016.
72. Roglic G, World Health Organization, editors. *Global report on diabetes*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016.
73. Małecki MT, Klupa T. Role of beta-cells in the pathogenesis of diabetes. *Diabetologia Praktyczna*. 2007;8:B1-B10.
74. Skupień J, Klupa T, Małecki MT. Genetic background of type 2 diabetes. *Diabetologia Praktyczna*. 2006;7:2:67-77.
75. Fowler MJ. Mikro- i makronaczyniowe powikłania cukrzycy. *Diabetologia po dyplomie*. 2011;8:4:40-44.
76. Sobierajski DT. Raport: Społeczny obraz cukrzycy. 2017;3-31.
77. Stepaniak U, Micek A, Waśkiewicz A, Bielecki W, Drygas W, Janion M, et al. Prevalence of general and abdominal obesity and overweight among adults in Poland. Results of the WOBASZ II study (2013–2014) and comparison with the WOBASZ study (2003–2005). *Polish Archives of Internal Medicine*. 2016;126:9:662-671.
78. Kałucka S. Rozpoznanie, zapobieganie, farmakoterapia stanu przedcukrzycowego u osób starszych. Jeden krok przed cukrzycą. *Geriatrics*. 2013;7:149-156.
79. International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas*. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.
80. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101:15718–23.

81. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102:11070–5.
82. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444:21:28.
83. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011;94:58–65.
84. Rahat-Rozenbloom S, Fernandes J, Gloor GB, Wolever TMS. Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans. *International Journal of Obesity*. 2014;38:1525–31.
85. Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, Ross PR, Shanahan F, O'Toole PW, et al. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: New insights. *Gut Microbes*. 2012;3:186–202.
86. Johnson EL, Heaver SL, Walters WA, Ley RE. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of Molecular Medicine*. 2017;95:1–8.
87. Yang J-Y, Kweon M-N. The gut microbiota: a key regulator of metabolic diseases. *BMB Reports*. 2016;49:536–41.
88. Payne AN, Chassard C, Banz Y, Lacroix C. The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads in an in vitro model of colonic fermentation. *FEMS Microbiology Ecology*. 2012;80:608–23.
89. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106:2365–70.
90. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*. 2010;18:190–5.

91. Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, et al. Acetate mediates a microbiome–brain– $\beta$ -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*. 2016;534:213–7.
92. Scheen AJ, Lefébvre PJ. Leczenie chorych na cukrzyce z nadwaga. *Diabetologia Praktyczna*. 2000;1:1:33-50.
93. Sierżantowicz R, Hady HR, Kirpsza B, Trochimowicz L, Dadan J. Preparation for bariatric surgery for patients with morbid obesity. 2012;3:105-108.
94. Thaler JP, Cummings DE. Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology*. 2009;150:2518–25.
95. Fried M, Yumuk V, Oppert J-M, Scopinaro N, Torres AJ, Weiner R, et al. Interdisciplinary European Guidelines on Metabolic and Bariatric Surgery. *Obesity Facts*. 2013;6:449–68.
96. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2018. *Diabetologia Praktyczna*. 2018;4:1:1-92.
97. Hsia DS, Fallon SC, Brandt ML. Adolescent bariatric surgery. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012;166:10.
98. Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, et al. Effect of laparoscopic Roux-En Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. Meeting of the American Surgical Association. 2003;121:160–78.
99. Gumbs AA, Modlin IM, Ballantyne GH. Changes in Insulin Resistance Following Bariatric Surgery: Role of caloric restriction and weight loss. *Obesity Surgery*. 2005;15:462–73.
100. Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. *Diabetes Care*. 2016;39:893–901.
101. Tham JC, Howes N, le Roux CW. The role of bariatric surgery in the treatment of diabetes. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2014;5:149–57.



102. Pories WJ, Macdonald KG, Flickinger EG, Dohm GL, Sinha MK, Barakat HA, et al. Is type 2 diabetes mellitus (NIDDM) a surgical disease?: *Annals of Surgery*. 1992;215:633–43.
103. Koliaki C, Liatis S, le Roux CW, Kokkinos A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. *BMC Endocrine Disorders*. 2017;17:50.
104. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. *Gut*. 2011;60:1214–23.
105. Kong L-C, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013;98:16–24.
106. Medina DA, Pedreros JP, Turiel D, Quezada N, Pimentel F, Escalona A, et al. Distinct patterns in the gut microbiota after surgical or medical therapy in obese patients. *PeerJ*. 2017;5:2-22.
107. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2016. *Diabetologia Kliniczna*. 2016;5:A1-A76.
108. Gosiewski T, Szala L, Pietrzyk A, Brzychczy-Włoch M, Heczko PB, Bulanda M. Comparison of methods for isolation of bacterial and fungal dna from human blood. *Current Microbiology*. 2014;68:149–55.
109. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)
110. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:2-11.
111. Wang Z-K. Upper gastrointestinal microbiota and digestive diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;19:1541.

112. Li G, Yang M, Zhou K, Zhang L, Tian L, Lv S, et al. Diversity of duodenal and rectal microbiota in biopsy tissues and luminal contents in healthy volunteers. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015;25:1136–45.
113. Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiology*. 2011;11:219.
114. Sánchez E, Donat E, Ribes-Koninckx C, Fernández-Murga ML, Sanz Y. Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79:5472–9.
115. Schippa S, Iebba V, Barbato M, Di Nardo G, Totino V, Checchi M, et al. A distinctive “microbial signature” in celiac pediatric patients. *BMC Microbiology*. 2010;10:175.
116. Angelakis E, Armougom F, Carrière F, Bachar D, Laugier R, Lagier J-C, et al. A metagenomic investigation of the duodenal microbiota reveals links with obesity. *PLOS ONE*. 2015;10:e0137784.
117. Thomas V, Clark J, Doré J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiology*. 2015;10:1485–504.
118. Martínez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Vargas-Albores F. Significant loss of sensitivity and specificity in the taxonomic classification occurs when short 16S rRNA gene sequences are used. *Heliyon*. 2016;2.
119. Zheng W, Tsompana M, Ruscitto A, Sharma A, Genco R, Sun Y, et al. An accurate and efficient experimental approach for characterization of the complex oral microbiota. *Microbiome*. 2015;3:48.
120. Yang I, Nell S, Suerbaum S. Survival in hostile territory: the microbiota of the stomach. *FEMS Microbiology Reviews*. 2013;37:736–61.
121. Mizrahi-Man O, Davenport ER, Gilad Y. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS ONE*. 2013;8:1.

122. Gao X, Lin H, Revanna K, Dong Q. A Bayesian taxonomic classification method for 16S rRNA gene sequences with improved species-level accuracy. *BMC Bioinformatics*. 2017;18:247.
123. Tuzhikov A, Panchin A, Shestopalov VI. TUIT, a BLAST-based tool for taxonomic classification of nucleotide sequences. *BioTechniques*. 2014;56(2):78-84.
124. Balvociute M, Huson DH. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*. 2017;18:114.
125. Lindgreen S, Adair KL, Gardner PP. An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Scientific Reports*. 2016;6:19233.
126. Sundin OH, Mendoza-Ladd A, Zeng M, Diaz-Arévalo D, Morales E, Fagan BM, et al. The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiology*. 2017;17:160.
127. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterology Journal*. 2015;3:255–60.
128. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:732–7.
129. Derrien M, van Passel MWJ, van de Bovenkamp JHB, Schipper R, de Vos W, Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2010;1:254–68.
130. Sweeney TE, Morton JM. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surgery*. 2013;148:563.
131. Barlow GM, Yu A, Mathur R. Role of the gut microbiome in obesity and diabetes mellitus. *Nutrition in Clinical Practice*. 2015;30:6:787-797.
132. Ismail NA, Ragab SH, ElBaky AA, Shoeib ARS, Alhosary Y, Fekry D. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Archives of Medical Science*. 2011;3:501–7.

133. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International Journal of Obesity*. 2008;32:1720–4.
134. Hu H-J, Park S-G, Jang HB, Choi M-G, Park K-H, Kang JH, et al. Obesity alters the microbial community profile in Korean adolescents. *PLOS ONE*. 2015;10:7.
135. Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *diabetes care*. 2011;34:392–7.
136. Le Bastard Q, Al-Ghalith GA, Grégoire M, Chapelet G, Javaudin F, Dailly E, et al. Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2018;47:332–45.
137. Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2013;27:73–83.
138. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012;3:279–88.
139. Stenman LK, Waget A, Garret C, Klopp P, Burcelin R, Lahtinen S. Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Beneficial Microbes*. 2014;5:437–45.
140. Stenman LK, Waget A, Garret C, Briand F, Burcelin R, Sulpice T, et al. Probiotic B420 and prebiotic polydextrose improve efficacy of antidiabetic drugs in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2015;7:75.
141. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment: Bacterial translocation during diabetes. *EMBO Molecular Medicine*. 2011;3:559–72.
142. Stenman LK, Lehtinen MJ, Meland N, Christensen JE, Yeung N, Saarinen MT, et al. Probiotic with or without fiber controls body fat mass, associated with serum zonulin,

- in overweight and obese adults—randomized controlled trial. *EBioMedicine*. 2016;13:190–200.
143. Salamon D, Sroka A, Kapusta P, Szopa M, Mrozińska S, Ludwig AH, et al. Characteristics of gut microbiota in adult patients with type 1 and type 2 diabetes based on next-generation sequencing of the 16S rRNA gene fragment. *Polish Archives of Internal Medicine*. 2018;128:6:336-343.
144. An H, Park S, Lee D, Kim J, Cha M, Lee S, et al. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10:116.
145. Ichim TE, Patel AN, Shafer KA. Experimental support for the effects of a probiotic/digestive enzyme supplement on serum cholesterol concentrations and the intestinal microbiome. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14:184.
146. Kießling G, Schneider J, Jahreis G. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2002;56:843–9.
147. Watson RR, Preedy VR, editors. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: bioactive foods in health promotion. Amsterdam; Boston: Elsevier, AP; 2016.
148. Hassanein WA, Awany NM, Ibraheim SM. Cholesterol reduction by *Lactococcus lactis* KF147. *African Journal of Microbiol Research*. 2013;7:34:4338-4348.
149. Lee W-K, Lim H-J, Kim S-Y, Kimoto H, Ohmomo S, Tashiro Y, et al. Hypocholesterolemic effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527 strains in SD rats. *Bioscience and Microflora*. 2005;24:11–6.
150. Yadav K, Bhardwaj A, Kaur G, Iyer R, De S, Malik RK. Potential of *Lactococcus lactis* as a probiotic and functional lactic acid bacteria in dairy industry. 2009;4:3:219-228.

151. Angelakis E, Merhej V, Raoult D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13:889–99.
152. Murphy EF, Cotter PD, Hogan A, O’Sullivan O, Joyce A, Fouhy F, et al. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut*. 2013;62:220–6.
153. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*. 2014;12:87.
154. Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K, Sroka-Oleksiak A, Radkowski P, Salamon D, et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method - the observation of DNAemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:329–36.
155. Stearns JC, Lynch MDJ, Senadheera DB, Tenenbaum HC, Goldberg MB, Cvitkovitch DG, et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Scientific Reports*. 2011;1:170.
156. Browne HP, Neville BA, Forster SC, Lawley TD. Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15:531–43.
157. Lagier J-C, Drancourt M, Charrel R, Bittar F, La Scola B, Ranque S, et al. Many more microbes in humans: enlarging the microbiome repertoire. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65 suppl\_1:S20–9.
158. Bilen M, Dufour J-C, Lagier J-C, Cadoret F, Daoud Z, Dubourg G, et al. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species. *Microbiome*. 2018;6:94.
159. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26:657–702.

160. Cani PD, de Vos WM. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8.
161. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. 2016;65:426–36.
162. Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, Moya A, D’Auria G. The active human gut microbiota differs from the total microbiota. *PLoS ONE*. 2011;6:7.
163. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*. 2013;62:1591–601.
164. Ji Y, Park S, Park H, Hwang E, Shin H, Pot B, et al. Modulation of active gut microbiota by *Lactobacillus rhamnosus* GG in a diet induced obesity murine model. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:710.

## 13 ZAŁĄCZNIKI

## 13.1 Załącznik nr 1 – Opinia Komisji Bioetycznej UJ

**OPINIA**  
**nr KBET/81/B/2010 z dnia 24 czerwca 2010 roku**



UNIWERSYTET  
 JAGIELLOŃSKI  
 W KRAKOWIE

Na zebraniu w dniu 24.06.2010 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 09.06.2010 r. złożonym

przez kierownika tematu: **Dr n. med. Tomasz Gosiewski**  
 zatrudnionego w **Katedra Mikrobiologii UJCM**  
**31-121 Kraków, ul. Czysła 18**

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Badanie flory bakteryjnej przewodu pokarmowego u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 oraz otyłością olbrzymią lub patologiczną poddawanych zabiegowi rękawowej resekcji żołądka”.

Komisja Bioetyczna  
 Uniwersytetu  
 Jagiellońskiego

Do wniosku dołączono:

1. Protokół eksperymentu medycznego.
2. Informacja dla pacjenta.
3. Zgoda na udział w badaniu.
4. Skierowanie do badania mikrobiologicznego próbek kału i tkanki dwunastnicy.
5. Zyciorys naukowy wnioskodawcy.
6. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJCM

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanych badań - na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

- 1/ obowiązek uzyskania pisemnej zgody każdej osoby wyrażającej wolę (gotowość) udziału w danym eksperymencie, zgodnie z obowiązującym przepisami.
- 2/ obowiązek przedstawienia Komisji:
  - wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
  - wszystkich przypadków poważnych zdarzeń niepożądanych,
  - zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
  - sprawozdania w toku przeprowadzanych badań - za sześć miesięcy,
  - raportu końcowego,
- 3/ warunek dołączenia do dokumentacji badania pisemnej zgody kierownika II Katedry Ogólnej UJCM na udział w badaniu,
- 4/ warunek przerehabrowania formularza „Informacja dla pacjenta” poprzez skierowanie jej treści do uczestnika badania oraz zastąpienia zwrotów medycznych językiem zrozumiałym dla uczestnika.

**Badanie może być prowadzone do dnia 24 czerwca 2011 roku.**  
**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, 24 czerwiec 2010 r.

Przewodniczący  
 Komisji Bioetycznej UJ  
 Prof. dr hab. Piotr Thor

ul. Jagiellońska 10  
 PL 31-010 Kraków  
 tel. +48(12) 422 04 11  
 wew. 349  
 tel./fax +48(12) 431 26 59  
 kbet@cm-uj.krakow.pl  
 www.cm-uj.krakow.pl/kbet





UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## AKCEPTACJA

dot. opinii nr: **KBET/81/B/2010 z dnia 24 czerwca 2010 r.**

### TYTUŁ BADANIA:

„Badanie flory bakteryjnej przewodu pokarmowego u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 oraz z otyłością olbrzymią lub patologiczną poddawanych zabiegowi rękawkowej resekcji żołądka”.

### WNIOSKODAWCA:

Dr n.med. Tomasz Gosiewski  
Katedra Mikrobiologii UJ CM  
31-121 Kraków, ul. Czysła 18

### PRZEDSTAWIONE DOKUMENTY:

Wniosek z dnia 26 sierpnia 2013 r. dotyczący wyrażenia zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na przedłużenie badania do dnia 31 grudnia 2015 r.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego na posiedzeniu w dniu 26 września 2013 r., po zapoznaniu się z wyżej wymienionym dokumentem, pozytywnie zaopiniowała zgłoszoną poprawkę.

Lista członków Komisji Bioetycznej biorących udział w posiedzeniu:

Przewodniczący: prof. dr hab. med. Piotr Thor (urolog) - Katedra Patofizjologii UJ CM,  
Zastępca Przewodniczącego: mgr Alicja Widera (psycholog kliniczny) - Szpital Uniwersytecki w Krakowie,

#### Członkowie:

dr med. Barbara Groszek (toksykolog) - Oddział Toksykologii i Chorób Wewnętrznych SS im. L. Rydygiera w Krakowie sp. z o.o.,  
dr hab. med. Grażyna Bochenek (internista/alerгоlog/pulmonolog) - II Katedra Chorób Wewnętrznych UJ CM,  
dr hab. med. Roman Pfitzner (chirurg ogólny/kardiochirurg) - Klinika Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii UJ CM,  
dr med. Teresa Pawlik (internista/lekarz rodzinny) - Przychodnia Podstawowej Opieki Zdrowotnej, Szpital Uniwersytecki w Krakowie,  
Barbara Kwinta (pielęgniarka) - Poradnia Urologiczna Niepublicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej „Grzegórzki” w Krakowie,  
Dr n.med. Bartosz Grabski (psychiatra) – Katedra Psychiatrii UJ CM.

Kraków, 26 września 2013 r.

Przewodniczący  
Komisji Bioetycznej UJ

*Prof. dr hab. n. med. Piotr Thor*

ul. Grzegórzecka 20

PL 31-531 Kraków

tel. +48 (12) 433 27 39

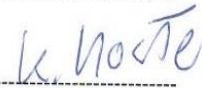
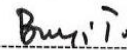
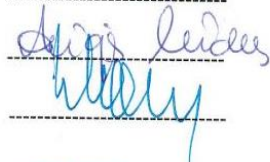
fax +48 (12) 433 27 43

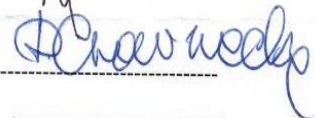
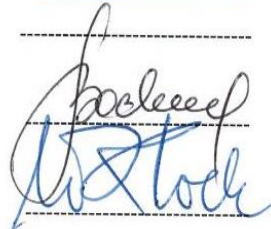
kbet@cm-uj.krakow.pl

www.kbet.cm-uj.krakow.pl

Lista członków KOMISJI BIOETYCZNEJ UJ biorących udział w podjęciu uchwały dotyczącej opinii nr: KBET/81/B/2010

1. Przewodniczący: Prof. dr hab. med. Piotr Thor (urologia)  
Katedra Patofizjologii UJ CM
2. Z-ca Przewodniczącego: Mgr Katarzyna Loster-Bacik (pielęgniarka)  
Szpital Uniwersytecki w Krakowie
3. Dr Jerzy Brusilo OFMConv.- PAT, Instytut Bioetyki
4. Prof. dr hab. med. Ryszard Lauterbach (neonatolog/pediatra)  
Klinika Neonatologii UJ CM
5. Mgr Alicja Widera (psycholog kliniczny) - Szpital Uniwersytecki w Krakowie
6. Mgr Leszek Kądziela (radca prawny)
7. Dr med. Stefan Bednarz (internista/przedstawiciel Okręgowej Rady  
Lekarskiej) - Katedra Chorób Wewnętrznych i Gerontologii UJ CM
8. Dr med. Barbara Groszek (toksykolog)  
Oddział Kliniczny Toksykologii i Chorób Środowiskowych  
WSS im. L. Rydygiera w Krakowie
9. Prof. dr hab. med. Danuta Czarnecka  
I Klinika Kardiologii i Nadciśnienia Tętniczego UJCM
10. Prof. dr hab. med. Andrzej Zięba (psychiatra)  
Katedra Psychiatrii UJ CM
11. Dr hab. med. Grażyna Bochenek (internista/alergolog/pulmonolog)  
II Katedra Chorób Wewnętrznych UJ CM
12. Prof. dr hab. med. Władysława Kolańska - Kloch (kardiolog)  
II Klinika Kardiologii UJ CM
13. Dr med. Teresa Pawlik (internista/lekarz rodzinny)  
Przychodnia Podstawowej Opieki Zdrowotnej  
Szpital Uniwersytecki w Krakowie


## 13.2 Załącznik nr 2 – Karta pacjenta, stworzona na potrzeby niniejszych badań

**KARTA PACJENTA**

**Skierowanie do badania  
mikrobiologicznego próbek kału**

program – CUKRZYCA/BAKTERIE



Imię i nazwisko pacjenta: .....

Wiek: .....

Data rozpoznania choroby:.....

Rodzaj badanej próbki:.....

Rozpoznanie:      cukrzyca 1       cukrzyca 2       zdrowy

BMI: .....

HbA1c [%]: .....

Glikemia na czczo [mmol/l]: .....

Lipidogram [mmol/l]: cholest. całk.:.....; HDL: .....; LDL: .....; TGs: .....

ALT [U/l]:.....

Data pobrania próbki: .....



Symbol  
próbki,  
np. Ik'

**13.3 Załącznik nr 3 – Szczegółowy wykaz bakterii wyrażonych, jako operacyjne jednostki taksonomiczne (OTU`s), które stanowiły w analizowanych grupach na poziomach taksonomicznych począwszy od L4 do L7, co najmniej 1%.**

„Nazwa”;\_o - oznacza *other*, inny, zidentyfikowany, ale jeszcze nienazwany takson

Poziom L4 – rząd

Nazwa rzędu	CONTROL	OBESE	T2DM
Bacillales	9,91%	15,31%	3,89%
Bifidobacteriales	5,49%	0,29%	0,69%
Clostridiales	6,63%	4,30%	4,10%
Coriobacteriales	0,62%	1,08%	0,87%
Corynebacteriales	1,07%	2,73%	0,54%
Enterobacterales	4,86%	2,83%	18,48%
Erysipelotrichales	1,28%	0,75%	0,89%
Fusobacteriales	3,61%	5,80%	2,86%
Geodermatophilales	1,50%	0,47%	0,06%
Lactobacillales	18,94%	22,63%	24,23%
Geodermatophilales	1,50%	0,47%	0,06%
Lactobacillales	18,94%	22,63%	24,23%
Micrococcales	12,08%	7,20%	12,57%
Sphingomonadales	1,10%	10,46%	4,61%
Pseudomonadales	2,84%	3,24%	1,20%
Rhizobiales	22,99%	15,22%	16,96%

## Poziom L5 - rodzina

<b>Nazwa rodziny</b>	<b>CONTROL</b>	<b>OBESE</b>	<b>T2DM</b>
Atopobiaceae	0,56%	1,07%	0,85%
Bacillales;_o	6,92%	2,14%	2,50%
Bifidobacteriaceae	5,49%	0,29%	0,69%
Bradyrhizobiaceae	19,38%	13,90%	14,73%
Carnobacteriaceae	3,10%	5,95%	3,13%
Clostridiaceae	1,10%	0,60%	0,18%
Corynebacteriaceae	0,96%	2,52%	0,45%
Enterobacteriaceae	4,85%	2,83%	18,47%
Erysipelotrichaceae	1,28%	0,75%	0,89%
Fusobacteriaceae	3,47%	5,38%	1,58%
Geodermatophilaceae	1,50%	0,47%	0,06%
Hyphomicrobiaceae	1,13%	0,54%	0,08%
Lachnospiraceae	2,33%	1,34%	2,24%
Lactobacillaceae	0,58%	2,61%	8,62%
Leptotrichiaceae	0,13%	0,43%	1,28%
Micrococcaceae	6,07%	2,68%	2,64%
Moraxellaceae	1,56%	1,31%	0,67%
Planococcaceae	1,54%	0,12%	0,00%
Promicromonosporaceae	5,32%	4,28%	9,53%
Pseudomonadaceae	1,29%	1,93%	0,53%
Rhizobiaceae	1,25%	0,20%	1,08%
Ruminococcaceae	2,24%	1,65%	1,06%
Sphingomonadaceae	1,08%	10,44%	4,53%

Staphylococcaceae	0,88%	12,61%	0,99%
Streptococcaceae	14,73%	13,41%	12,15%

## Poziom L6 – rodzaj

<b>Nazwa rodzaju</b>	<b>CONTROL</b>	<b>OBESE</b>	<b>T2DM</b>
Acinetobacter	1,53%	1,08%	0,46%
Agrobacterium	1,07%	0,20%	1,03%
Atopobium	0,54%	1,07%	0,85%
Bifidobacterium	5,47%	0,28%	0,69%
Cellulosimicrobium	5,01%	4,14%	9,28%
Corynebacterium	0,96%	2,52%	0,45%
Devosia	1,11%	0,54%	0,08%
Escherichia	4,84%	2,83%	18,42%
Ethanoligenens	1,07%	0,05%	0,45%
Fusobacterium	3,47%	5,38%	1,58%
Gemella	6,92%	2,11%	2,36%
Geodermatophilus	1,48%	0,47%	0,02%
Granulicatella	3,04%	5,94%	3,01%
Kurthia	1,54%	0,12%	0,00%
Lachnospiraceae;_o	1,25%	0,73%	0,50%
Lactobacillus	0,58%	2,61%	8,62%
Leptotrichia	0,13%	0,03%	1,28%
Nitrobacter	19,27%	13,89%	14,67%
Pseudomonas	1,29%	1,93%	0,53%
Rothia	5,19%	2,08%	2,25%

Ruminococcaceae;_o	0,67%	1,35%	0,38%
Sphingomonas	1,04%	10,42%	4,53%
Staphylococcus	0,87%	12,61%	0,99%
Streptococcus	14,66%	12,91%	12,14%

## Poziom L7 – gatunek

<b>Nazwa gatunku</b>	<b>CONTROL</b>	<b>OBESE</b>	<b>T2DM</b>
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1,01%	0,01%	0,07%
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1,07%	0,20%	1,03%
<i>Atopobium parvulum</i>	0,54%	1,07%	0,85%
<i>Bifidobacterium animalis</i>	5,20%	0,24%	0,62%
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	5,01%	4,14%	9,28%
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	0,10%	1,92%	0,18%
<i>Devosia riboflavina</i>	1,05%	0,53%	0,05%
<i>Escherichia;_o</i>	4,84%	2,83%	18,42%
<i>Ethanoligenens harbinense</i>	1,07%	0,05%	0,45%
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	3,23%	4,99%	1,47%
<i>Gemella;_o</i>	6,92%	2,11%	2,36%
<i>Geodermatophilus;_o</i>	1,48%	0,47%	0,02%
<i>Granulicatella;_o</i>	3,04%	5,94%	3,01%
<i>Kurthia gibsonii</i>	1,54%	0,12%	0,00%
<i>Lachnospiraceae;_o</i>	1,25%	0,73%	0,50%
<i>Lactobacillus casei</i>	0,00%	0,90%	2,71%
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0,13%	0,31%	1,34%

<i>Lactobacillus salivarius</i>	0,07%	0,40%	1,58%
<i>Lactobacillus;_o</i>	0,25%	0,56%	2,55%
<i>Leptotrichia wadei</i>	0,13%	0,01%	1,24%
<i>Nitrobacter;_o</i>	19,27%	13,89%	14,67%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,11%	1,44%	0,14%
<i>Rothia;_o</i>	4,81%	1,82%	2,16%
<i>Ruminococcaceae;_o</i>	0,67%	1,35%	0,38%
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	0,93%	10,39%	4,50%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,82%	12,58%	0,95%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,47%	1,22%	0,57%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0,64%	1,22%	1,65%
<i>Streptococcus;_o</i>	13,18%	10,35%	9,36%