

CHARAKTERYSTYKA FRAKCJI MIKROBIOTY JELITOWEJ ZWIĄZANEJ Z WYDZIELNICZYMI IMMUNOGLOBULINAMI A U PACJENTÓW Z ZAAWANSOWANYM CZERNIAKIEM PODDANYCH IMMUNOTERAPII ANTY-PD-1

Bernadeta Pietrzak^{1*}, Katarzyna Tomela², Łukasz Galus³, Jacek Mackiewicz³, Agnieszka Olejnik-Schmidt¹, Andrzej Mackiewicz^{2,4}, Mariusz Kaczmarek^{2,4}, Marcin Schmidt¹

¹Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

³Klinika Onkologii Klinicznej i Doświadczalnej, Instytut Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

⁴Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań

*email: bernadeta.pietrzak@up.poznan.pl



Wprowadzenie

1. Immunoterapia poprzez inhibicję immunologicznych punktów kontrolnych (ICI) jest nowoczesną metodą leczenia zaawansowanych nowotworów, przynoszącą znaczne i długotrwałe korzyści kliniczne.
2. Jednakże, 60-70% pacjentów nie odpowiada na monoterapię ICI ze względu na zjawisko pierwotnej i wtórnej oporności na leczenie, a także występowanie odczynów niepożądanych.
3. Wiele badań wykazało związek pomiędzy składem mikrobioty jelitowej a odpowiedzią na immunoterapię.
4. Mikrobiota jelitowa poprzez oddziaływanie z układem odpornościowym związanym z przewodem pokarmowym (GALT), wpływa na przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną, regulując efektywność immunoterapii, jednak dokładny mechanizm tej zależności nie został w pełni poznany.
5. Wydzielnicze immunoglobuliny A (SIgA) są dominującymi przeciwciałami występującymi w śluzie jelitowym, odpowiadającymi za utrzymanie homeostazy i regulującymi skład mikrobioty jelitowej.

Cel pracy:

Charakterystyka frakcji mikrobioty jelitowej związanej z SIgA u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem przed i w trakcie immunoterapii anty-PD-1.

Materiały i metody

1. Rekrutacja pacjentów z zaawansowanym czerniakiem zakwalifikowanych do leczenia z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych anty-PD-1 (n=64).
2. Pobieranie i zabezpieczanie próbek kału przed rozpoczęciem immunoterapii anty-PD-1 (T₀) oraz po 3 (T₁) i 12 (T_n) miesiącach od rozpoczęcia leczenia.
3. Oznaczanie stężenia SIgA w kale z wykorzystaniem zestawu IDK[®] SIgA ELISA.
4. Separacja frakcji mikrobioty jelitowej związanej z SIgA na drodze koimmunoprecypitacji w oparciu o metodykę opisaną przez Madhwani i wsp. (2016).
5. Izolacja metagenomowego DNA z frakcji mikrobioty jelitowej związanej z SIgA wykorzystaniem zestawu DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen).
6. Przygotowanie biblioteki ampikonów regionów V3-V4 genu kodującego 16S rRNA na matrycy metagenomowego DNA.
7. Sekwencjonowanie z wykorzystaniem platformy Illumina MiSeq (Genomed SA).
8. Analiza bioinformatyczna otrzymanych wyników z wykorzystaniem oprogramowania R.

Wnioski

1. W badanej grupie zaobserwowano istotnie wyższe stężenie SIgA w kale pacjentów, którzy uzyskali korzyść kliniczną z leczenia w porównaniu z pacjentami, u których nastąpiła progresja choroby (Ryc. 1).
2. Analiza frakcji mikrobioty związanej z SIgA wykazała charakterystyczne wzorce u pacjentów odpowiadających i nieodpowiadających na immunoterapię anty-PD-1 przed rozpoczęciem oraz w trakcie leczenia (Ryc. 3, Tab. 1).
3. Stężenie SIgA w kale oraz zidentyfikowane taksony (przed rozpoczęciem leczenia) korelowały ze wskaźnikami czasu wolnego od progresji i przeżycia.
4. Otrzymane wyniki wskazują znaczenie odporności śluzówkowej w kształtowaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.
5. Dalsze badania są niezbędne do wyjaśnienia złożonego związku pomiędzy mikrobiotą jelitową, odpornością śluzówkową a przeciwnowotworową odpowiedzią immunologiczną.

Literatura:

- Ma, X.; Zhang, Y.; Wang, S et al. Immune Checkpoint Inhibitor (ICI) Combination Therapy Compared to Monotherapy in Advanced Solid Cancer: A Systematic Review. *J Cancer* 2021, 12, 1318–1333.
- Liu, X., Chen, Y., Zhang, S. et al. Gut microbiota-mediated immunomodulation in tumor. *J Exp Clin Cancer Res* 2021, 40, 221.
- Pietrzak B., Tomela K., et al. Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. *Int J Mol Sci*, 21 (23), 9254.
- León E. D., Francino M. P. Roles of Secretory Immunoglobulin A in Host-Microbiota Interactions in the Gut Ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13.

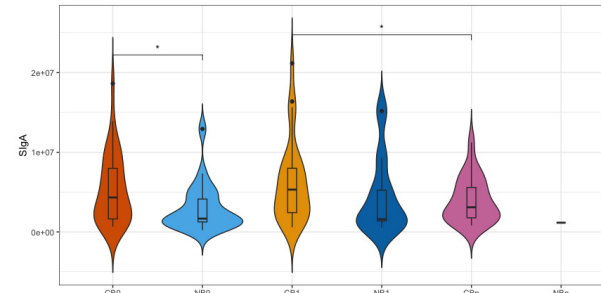
Źródło finansowania:

Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr grantu 2017/25/B/NZ5/01949).



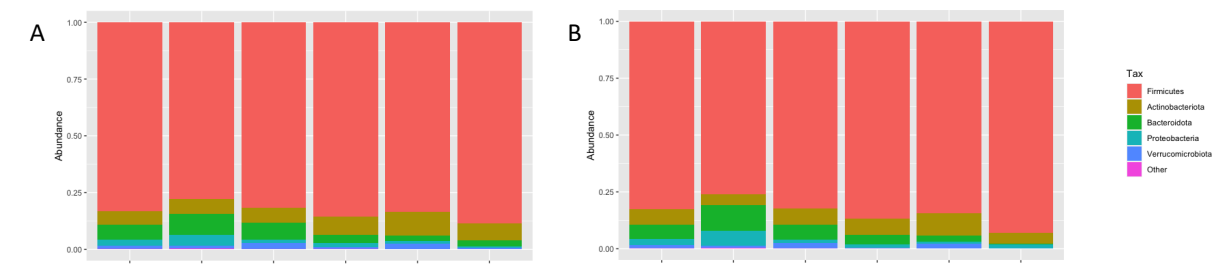
Wyniki

Przed rozpoczęciem leczenia, stężenie SIgA w próbkach kału pacjentów, którzy uzyskali korzyść kliniczną z immunoterapii anty-PD-1 było wyższe niż pacjentów, u których nastąpiła progresja choroby (Ryc. 1).



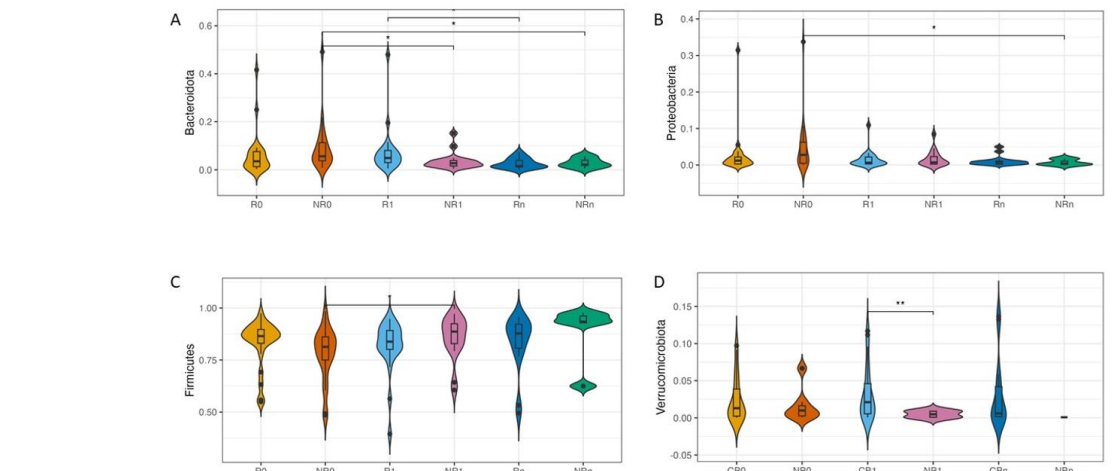
Rycina 1. Porównanie stężenia SIgA w próbkach kału pomiędzy pacjentami, którzy odnieśli korzyść kliniczną z immunoterapii anty-PD-1 (CB) a tymi, u których nastąpiła progresja choroby (NB) przed rozpoczęciem (T₀) oraz w trakcie leczenia (T₁ oraz T_n). *p*-wartości opisujące istotność statystyczną różnic w stężeniu SIgA w kale pomiędzy badanymi grupami zostały obliczone z wykorzystaniem testu *t* Studenta. *p*-wartości ≤ 0.05 przyjęto jako istotne statystycznie (*: *p*-wartość ≤ 0.05). Dane na osi *y* przedstawione są w ng · ml⁻¹.

Frakcja mikrobioty jelitowej związanej z SIgA była zdominowana przez bakterie należące do typu *Firmicutes* we wszystkich badanych grupach (Ryc. 2).



Rycina 2. Względny udział poszczególnych bakterii na poziomie typu we frakcji mikrobioty jelitowej związanej z SIgA: A – pacjentów odpowiadających (R) oraz nieodpowiadających (NR) na immunoterapię anty-PD-1 oraz B – pacjentów, którzy odnieśli korzyść kliniczną z immunoterapii anty-PD-1 (CB) oraz tych, u których nastąpiła progresja choroby (NB) przed rozpoczęciem (T₀) oraz w trakcie leczenia (T₁ oraz T_n).

W trakcie leczenia (T₁) obserwowano wyższy względny udział bakterii z typu *Verrucomicrobiota* u pacjentów odpowiadających na immunoterapię anty-PD-1 w porównaniu z pacjentami nieodpowiadającymi. Ponadto, w trakcie leczenia, u pacjentów nieodpowiadających nastąpił wzrost względnego udziału bakterii z typu *Firmicutes* oraz obniżenie względnego udziału bakterii z typów *Bacteroidota* i *Proteobacteria*. U odpowiadających, względny udział bakterii z typu *Bacteroidota* również zmalał (Ryc. 3).



Rycina 3. Porównanie względnego udziału bakterii na poziomie typu: A – *Bacteroidota*, B – *Proteobacteria*, C – *Firmicutes*, D – *Verrucomicrobiota* we frakcji mikrobioty jelitowej związanej z SIgA pacjentów odpowiadających (R) i nieodpowiadających (NR) na immunoterapię anty-PD-1 oraz pacjentów, którzy odnieśli korzyść kliniczną z immunoterapii anty-PD-1 (CB) oraz tych, u których nastąpiła progresja choroby (NB) przed rozpoczęciem (T₀) oraz w trakcie leczenia (T₁ oraz T_n). *p*-wartości opisujące istotność statystyczną różnic we względnym udziale poszczególnych typów w wolnym cfDNA zostały obliczone z wykorzystaniem testu *t* Studenta. *p*-wartości ≤ 0.05 przyjęto jako istotne statystycznie (*: *p*-wartość ≤ 0.05, **: *p*-wartość ≤ 0.01).

W analizie przeprowadzonej na poziomie taksonomicznym rodzaju, również wykazano różnice we względnym udziale poszczególnych ASV we frakcji mikrobioty jelitowej związanej z SIgA pomiędzy pacjentami odpowiadającymi i nieodpowiadającymi na immunoterapię anty-PD-1 przed rozpoczęciem oraz w trakcie leczenia (Tab. 1, R0 vs. NR0, CB0 vs. NB0, R1 vs. NR1, CB1 vs. NB1, Rn vs. NRn, *p*-wartość ≤ 0.05, test sumy rang Wilcoxon).

Tabela 1. Taksony, których względny udział we frakcji mikrobioty jelitowej związanej z SIgA był istotnie statystycznie związany z odpowiedzią/brakiem odpowiedzi oraz korzyścią kliniczną/progresją choroby.

	Taksony związane z odpowiedzią i korzyścią kliniczną z immunoterapii anty-PD-1	Taksony związane z brakiem odpowiedzi i korzyści klinicznej z immunoterapii anty-PD-1
Przed rozpoczęciem immunoterapii anty-PD-1 (T ₀)	<i>Dorea longicatena</i>	<i>Odoribacter splanchnicus</i> , rodzaj <i>Desulfovibrio</i> , rodzina <i>Enterobacteriaceae</i> (rodzaje <i>Citrobacter</i> , <i>Escherichia-Shigella</i> , <i>Enterococcus</i>), rodzina <i>Ruminococcaceae</i> , rodzina <i>Oscillospiraceae</i> (rodzaje <i>Colidextribacter</i> , <i>Intestinimonas</i>)
Po ~3 miesiącach od rozpoczęcia immunoterapii anty-PD-1 (T ₁)	<i>Akkermansia muciniphila</i> , <i>Christensenellaceae</i> R-7 group	<i>Intestinibacter bartlettii</i>
Po ~12 miesiącach od rozpoczęcia immunoterapii anty-PD-1 (T _n)	<i>[Eubacterium] hallii</i> group	<i>[Eubacterium] ventriosum</i> group

Stężenie SIgA w kale przed rozpoczęciem immunoterapii wyższe niż 819.50 μg · ml⁻¹ oraz 5477.00 μg · ml⁻¹ zmniejszało odpowiednio ryzyko progresji choroby i śmierci, podczas gdy zwiększony względny udział bakterii związanych z brakiem odpowiedzi i korzyści klinicznej z immunoterapii anty-PD-1 zwiększał ryzyko progresji choroby i śmierci w badanej grupie (*p*-wartość < 0.1).