

**Odpowiedź immunologiczna a skład mikrobioty jelitowej u dzieci z niealkoholową chorobą stłuszczeniową wątroby i nadciśnieniem tętniczym pierwotnym.**

Projekt NCN



INSTYTUT „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”



# Konsorcjum

- IPCZD
  - P. Socha, A. Wierzbicka-Rucińska, W. Jańczyk, J. Michałkiewicz, Anna Świąder-Leśniak, S. Więckowski, I. Jankowska
  - M. Litwin, Ł. Obrycki
  - M. Szalecki, E. Moszczyńska, J. Świdorska
  - CMKP- J. Ostrowski z zespołem Zakładu Genetyki Instytutu Onkologii
  - Nieoceniona pomoc pielęgniarska
- UM w Bydgoszczy
  - A. Helmin-Basa, L. Gackowska, I. Kubiszewska, M. Wieseszkowska

# Otyłość

- Choroba zapalna
- Udział mikrobioty jelitowej w rozwoju otyłości i procesów zapalnych
- Powikłania otyłości są związane z rodzajem zapalenia i mikrobiomem jelitowym

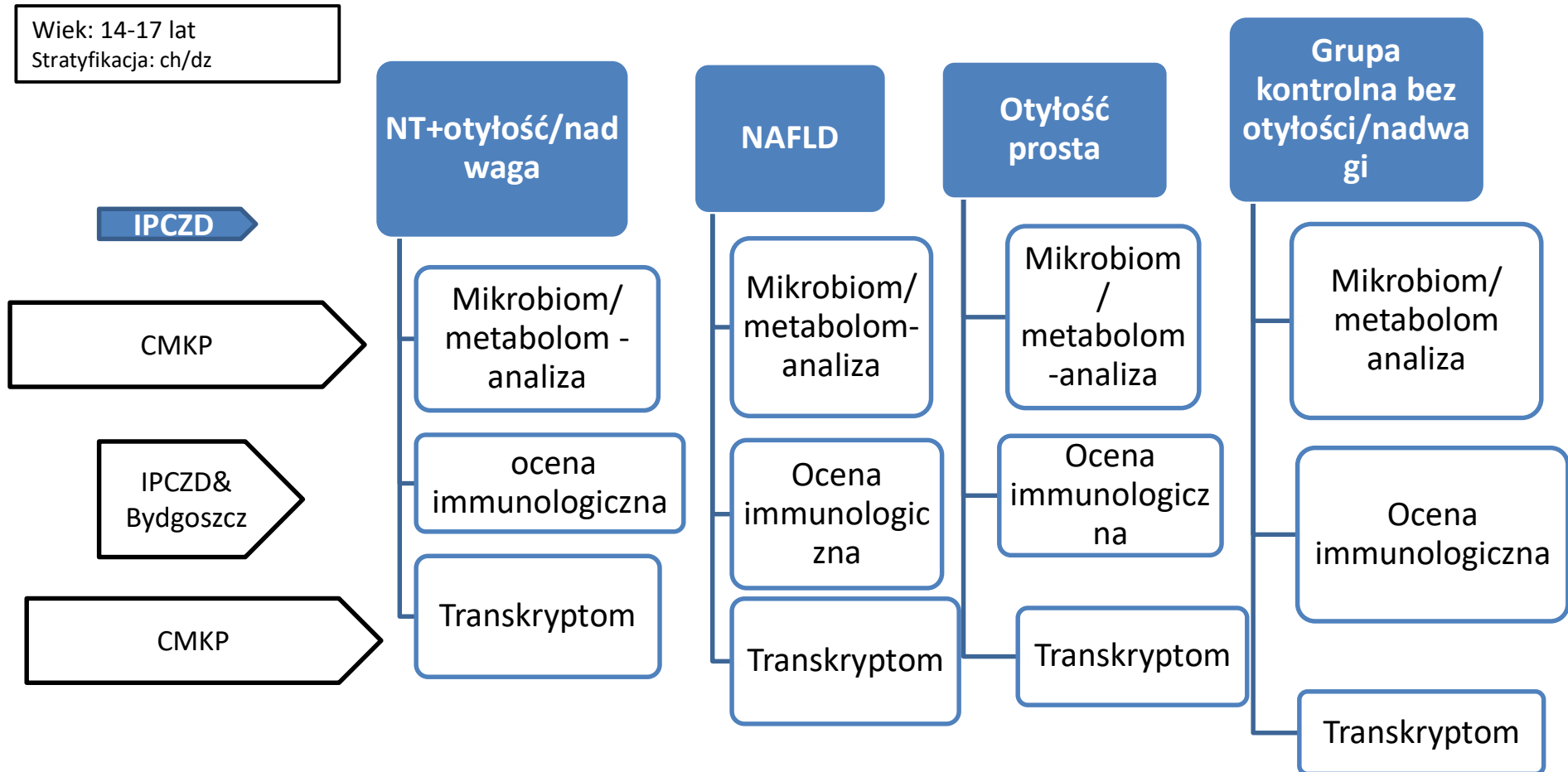
# CHAT GPT4

- Związek mikrobiomu z zapaleniem w otyłości
  - **Różnorodność mikrobiomu**
  - **Indukcja procesu zapalnego**
  - Przepuszczalność jelit
  - **Metabolity bakteryjne**
  - Interakcja z dietą i stylem życia
  - **Wpływ na regulację metaboliczną**

# CEL

- **Celem projektu jest**
- 1/ ocena typowych cech **mikrobiomu i metabolomu jelitowego oraz odpowiedzi immunologicznej** u dzieci z **NTP** oraz **SW**;
- 2/ ocena profilu odpowiedzi jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (**PBMCs**) **na stymulację przez metabolity mikrobioty** (ekstrakty wodne próbek kału) w zakresie:
  - **a)** produkcji cytokin pro- i przeciw-zapalnych
  - **b)** charakterystyki fenotypowej, tj. dystrybucji i stanu aktywacji limfocytów T ofunkcji immunoregulacyjnej (komórki T-reg),
  - **c)** profilu ekspresji genów (transkryptom).

# Study flow chart



# Wykonywane badania

- Parametry kliniczne: dojrzewanie płciowe, ciśnienie tętnicze w ambulatorium i warunkach domowych, stłuszczenie wątroby metodą elastograficzną (FibroScan<sup>®</sup> Echosens, Paryż, Francja), przy użyciu wskaźnika CAP ( $> 250$  dB/m); włóknienie jako sztywność (E w dB/m).
- Badania laboratoryjne (surowica): poziom ALT, AST, GGT, bilirubiny, fosfatazy alkalicznej, albumin, ferrytyny, GLP-1, hsCRP; ocena profilu lipidowego oraz glukozy i insuliny na czczo.

# Wykonywane badania

- Parametry antropometryczne: BMI, obwód w pasie, obwód bioder, wskaźniki WHR i WHTR.
  - Otyłość i nadwaga rozpoznawane według International Obesity Task Force (IOTF).
- Pomiar ciśnienia tętniczego: metodą oscylometryczną na prawym ramieniu w pozycji siedzącej po 5 minutowym odpoczynku i odniesiony do polskich norm.
- Badania naczyniowe:
  - -pomiar kompleksu śródbłonek-błona podstawna tętnicy szyjnej (cIMT), techniką ultrasonograficzną
  - - ocena szybkości fali tętna (PWV) oraz jej analiza (PWA), techniką oscylometryczną, przy użyciu urządzenia Vicorder



# Ocena mikrobiomu i metabolomu stolca

U wszystkich pacjentów wykonano poniższe analizy:

- **Analiza metagenomiczna** mikrobioty jelitowej z użyciem sekwencjonowania hiperzmiennych fragmentów genu podjednostki rybosomalnej 16S
- **Analiza poziomu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i aminokwasów** w ekstraktach stolca z użyciem chromatografii gazowej w powiązaniu ze spektrometrią masową.
- Ocena transkryptomu **PBMCs** z użyciem sekwencjonowania RNA

# Ocena odpowiedzi immunologicznej

## Metody badań immunologicznych:

- a) pre-inkubacja PBMC (18 godzin) w obecności lub nieobecności ekstraktów stolca (metabolity mikroflory) oraz re-indukcja przez 72 godziny z przeciwciałami anti-CD3 (induktor limfocytówT),
- b) ocena ekspresji cytokin techniką immunoenzymatyczną ELISA (w hodowlach PBMC indukowanych 18 i 72 godziny),
- c) ocena fenotypu populacji limfocytów regulatorowych (T-reg) przed i po aktywacji (ekstrakty stolca + p. ciała anti-CD3), techniką cytometrii przepływowej,