

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

Nadciśnienie tętnicze pierwotne (NTP) i niealkoholowa choroba tłuszczeniowa wątroby (SW) charakteryzują się przewlekłym, systemowym zapaleniem o słabym nasileniu, często z wykładnikami zespołu metabolicznego. Jednak u dzieci z SW rzadko występuje NTP, a dzieci z NTP raczej nie rozwijają SW, w przeciwieństwie do pacjentów dorosłych z zaburzeniami narządowymi.

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 o funkcji immunoregulacyjnej (komórki T-reg), **c)** profilu ekspresji genów (transkryptom).

Uzasadnienie podjętych badań: Skład i stan aktywacji komórek układu odpornościowego podlega stałej regulacji poprzez działania metabolitów mikrobioty jelitowej, co jest warunkiem ich prawidłowej odnowy i homeostazy oraz regulacji przepuszczalności nabłonka jelitowego, z jednoczesnym zwrotnym wpływem na skład mikrobioty. Mechanizm ten jest przyczyną bardzo zróżnicowanych zmian w zakresie składu mikrobioty w przebiegu wielu chorób charakteryzujących się przewlekłym, systemowym zapaleniem. Dys-bioza (zmiana składu mikrobioty) zmienia profil metabolitów mikrobioty, które nasilają produkcję pro-zapalnych komórek układu odpornościowego, powodując zaburzenia w zakresie ich składu oraz profilu aktywacji. Stąd w projekcie przewiduje się określenie składu mikrobioty jelitowej oraz jej metabolitów w powiązaniu z charakterystyką fenotypową i czynnościową komórek układu odpornościowego krwi obwodowej przed i po aktywacji z metabolitami mikroflory (wodne ekstrakty stolca) u dzieci z NTP i SW oraz kontroli.

Do badań zostanie włączonych: 50 dzieci otyłych z NTP; 50 dzieci otyłych z SW; 30 dzieci otyłych z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, bez SW; 30 dzieci zdrowych z prawidłowym BMI, w wieku 14-17 lat, rekrutowanych w Instytucie 'Pomnik- Centrum Zdrowia Dziecka' w Warszawie. Kryteria diagnostyczne: a) nadwaga/otyłość według kryteriów IOTF, b) pomiar ciśnienia tętniczego metodą oscylometryczną, pomiar kompleksu śród błonek-błona podstawna tętnicy szyjnej techniką ultrasonograficzną, ocena szybkości fali tętna i jej analiza z użyciem Vicorder (ocena według wytycznych European Society of Hypertension); c) stłuszczenie wątroby oceniane techniką fibroscan (wartości Controlled Attenuation Parameter (CAP) >250 dB/m), wzrostem aktywności ALT i/lub badaniem histologicznym w biopsji wątroby.

Analiza metagenomiczna mikroflory jelitowej: z użyciem Ion 16S™ Metagenomics Kit, a sekwencjonowanie będzie przeprowadzone w aparacie PGM z zastosowaniem zestawu Ion PGM™ Sequencing Kit w Zakładzie Genetyki Centrum Onkologii w Warszawie. **Metabolity** w ekstraktach stolca będą analizowane z użyciem spektrometrii masowej we współpracy z Zespołem Spektrometrii Mas Instytutu Chemii Organicznej. Ocena transkryptomu **PBMCs:** przy użyciu techniki sekwencjonowania RNA nowej generacji (NGS).

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 limfocytów T), 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,