



1917–2017
100 godina Medicinskog
fakulteta Sveučilišta
u Zagrebu

Projekt MINUTE for IBD HRZZ 5467 -pregled dosadašnjih rezultata-

Marina Panek

Odjel za međustaničnu komunikaciju, Centar za translacijska i klinička istraživanja
Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet i Klinički bolnički centar Zagreb



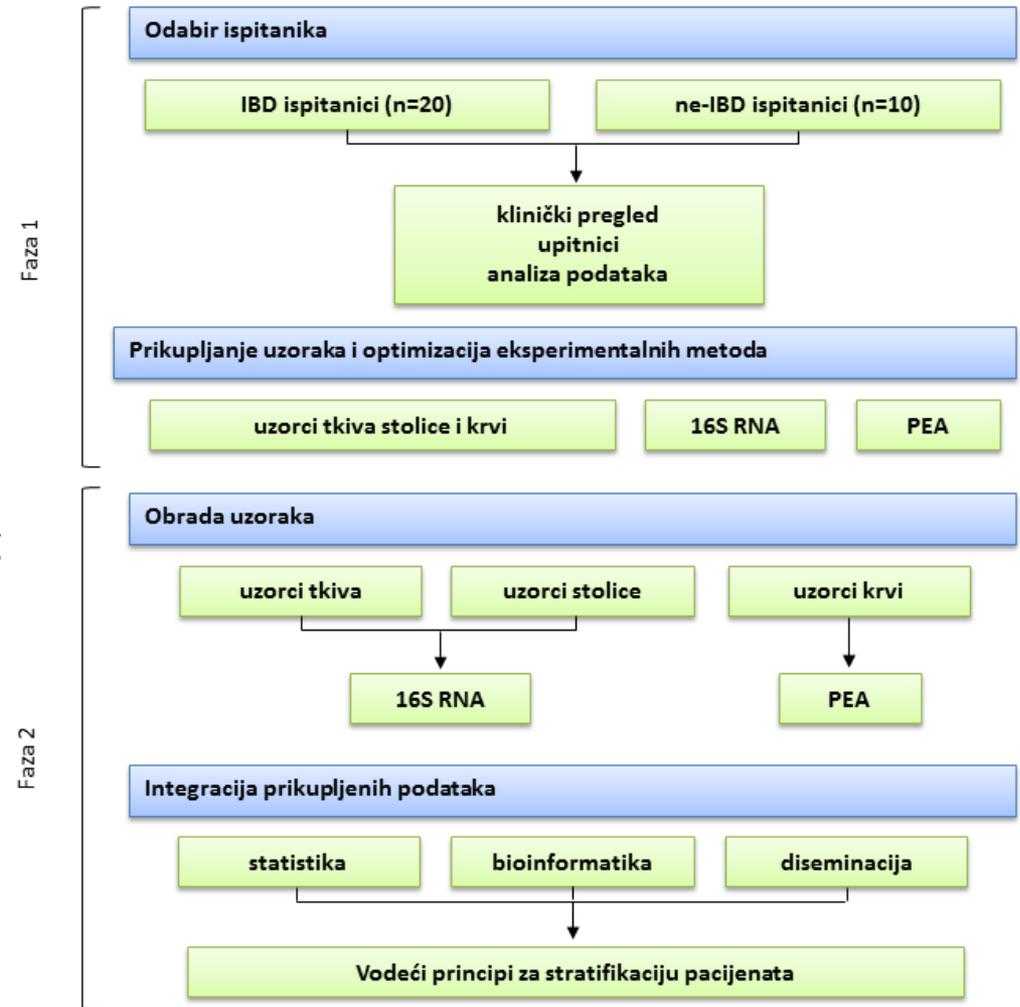
Zagreb, 09-12-2017



Projekt HRZZ: MINUTE for IBD

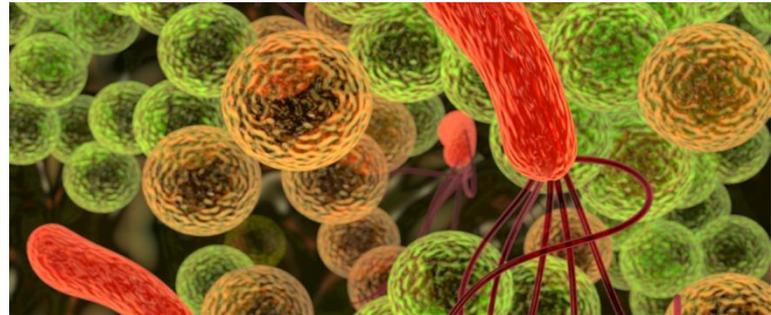
NAZIV: Assessment of Microbiota, Inflammatory Markers, Nutritional and Endocrine Status in IBD Patients (2014-2018)

CILJ: Istražiti klinički značaj i odnos sastava crijevne mikrobiote, upalnih i endokrinih biljega te prehrambenog statusa kod oboljelih od upalne bolesti crijeva.



Ljudska mikroflora

- **Mikroorganizmi koji nastanjuju dijelove ljudskog tijela nazivaju se skupno mikrobiota**
 - Koža, dišni trakt, usta, crijevo, urogenitalni trakt...
- **Većinu mikrobiote čine bakterije** – 10^{14} (sve stanice ljudskog organizma 10^{13})
- **Crijevna mikrobiota** – ekosistem mikroorganizama koji koloniziraju GI trakt i žive u simbiozi sa svojim domaćinom
 - Zavisno od metode detekcije 400-1500 bakterijskih vrsta
 - 99% tih organizama su anaerobi
- **Metagenomika** – analiza ukupnog genetskog materijala nekog kompleksnog ekosistema u svom prirodnom sastavu
- **Ljudski genom ↔ mikrobiom**
 - Ljudskih gena >23.000
 - Mikrobnih gena >3.000.000



Uloga mikrobiote

• Zaštitna

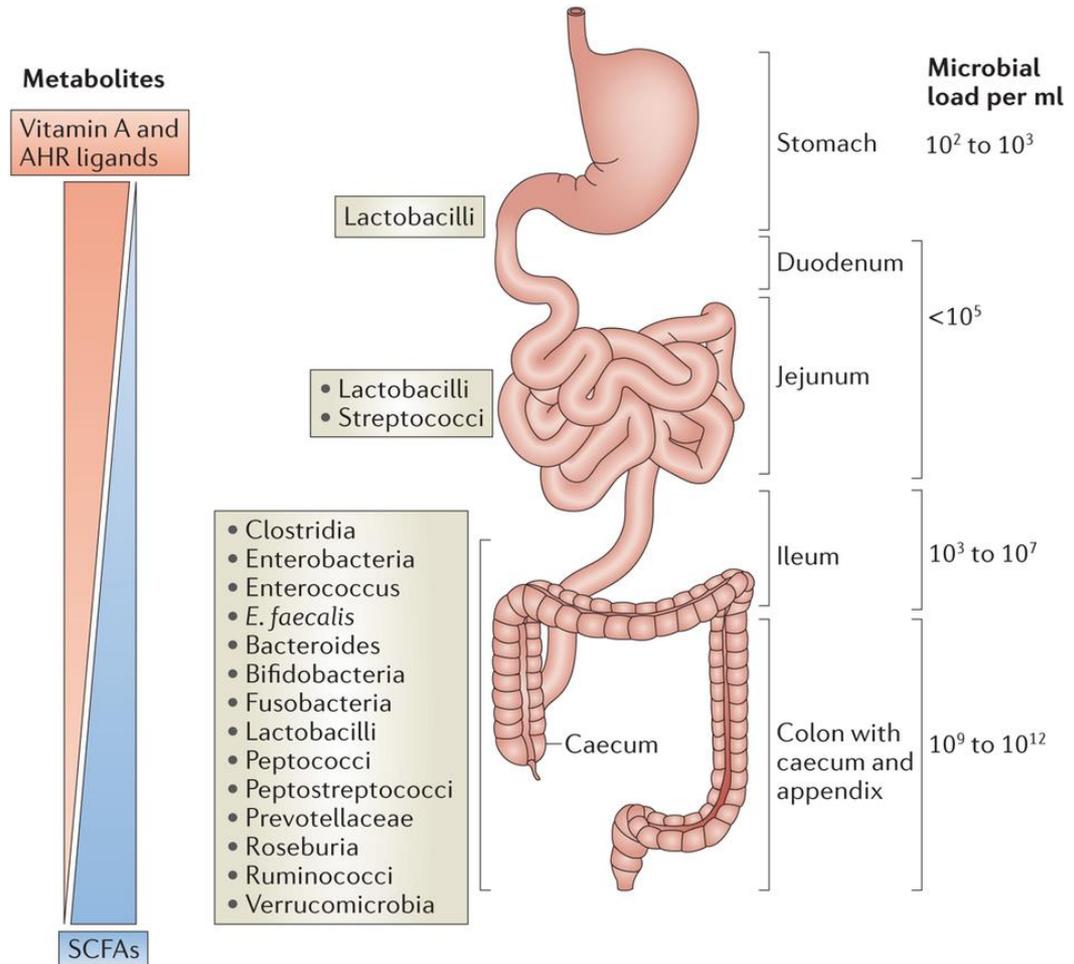
- Otklanja patogene bakterije
 - Kompeticija za hranjiva
 - Kompeticija za receptore
 - Lučenje antimikrobnih čimbenika

• Strukturna

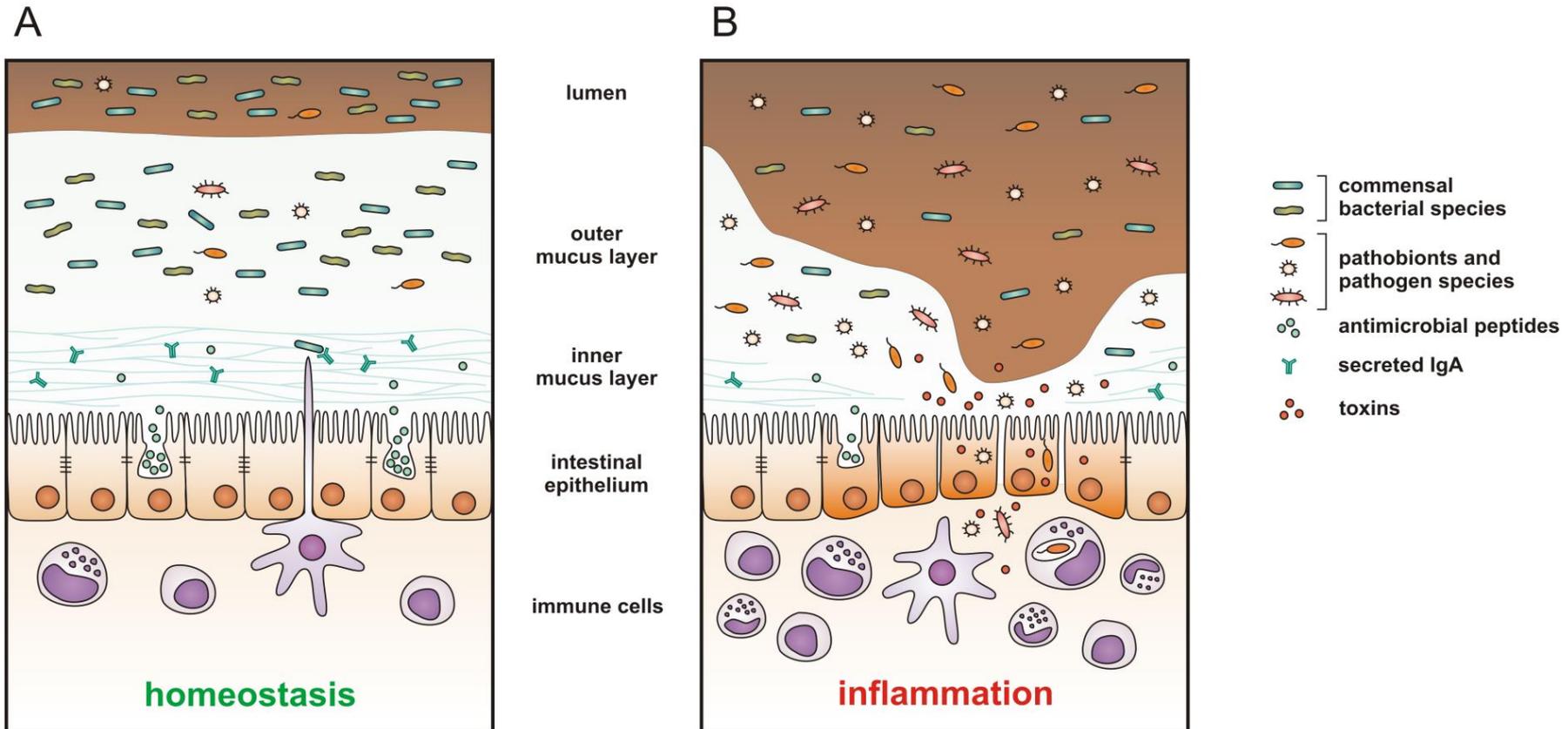
- „Prirodna granica”
 - „*Tight junctions*” među stanicama epitela
- Razvoj imunog sustava
- Sinteza IgA

• Metabolička

- Sinteza kratko-lančanih MK
- Metabolizam UH iz hrane
- Sinteza vitamina K, folne kiseline i biotina
- Apsorpcija Fe²⁺⁺



Poremećaj u ravnoteži crijevne mikrobiote – disbioza



Kronična upala - vodi do nastanka kroničnih metaboličkih bolesti

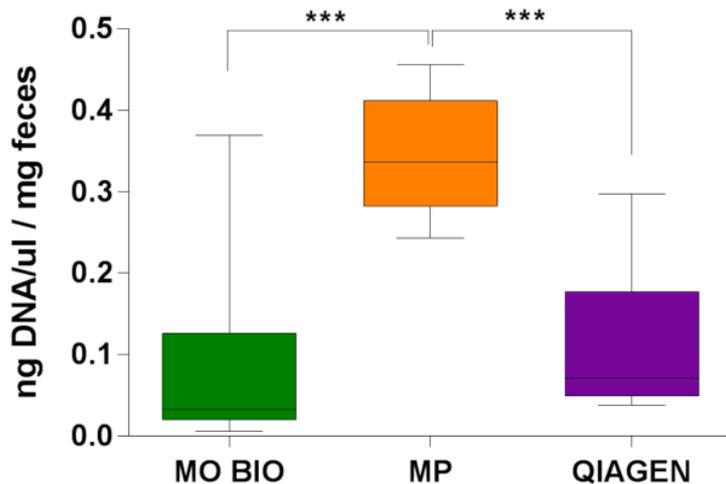
Optimizacija metode analize sastava crijevne mikrobiote

- Evaluacija novog sustava za **prikupljanje uzoraka fecesa** pod nazivom OMNIgene.gut, proizvođača DNA Genotek
 - Usporedba svježeg i zamrznutog fecesa
- Tri kita za **izolaciju DNA** iz fecesa
 - MO BIO, QIA i MP Biomedicals
- Usporedba **dviju next generation sequencing (NGS) platformi** za sekvenciranje bakterijskog gena za 16S rRNA
 - Illumina MiSeq i IonTorrent PGM
- Četiri zdrava donora – kombinacija/varijacija navedenih parametara
 - 24 uzorka po donoru – ukupno analizirano **96 uzoraka**

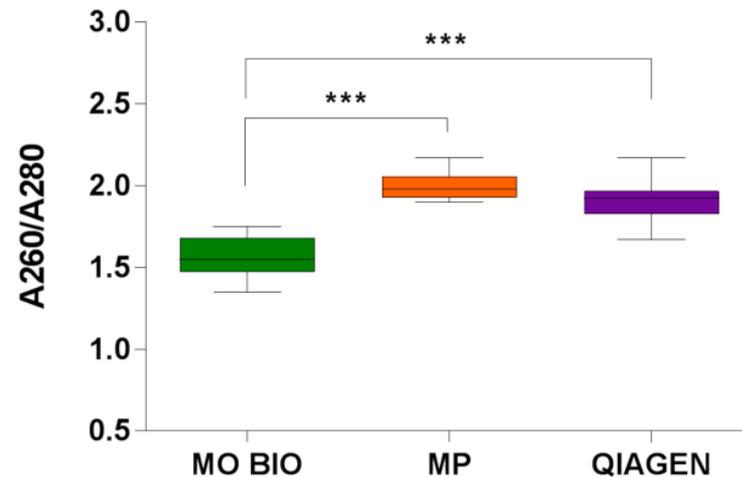
Usporedba kitova za izolaciju DNA- koncentracija i čistoća

- MO BIO - Power Fecal DNA Isolation Kit
- QIAGEN - QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit
- MP Biomedicals - Fast DNA SPIN Kit for Feces

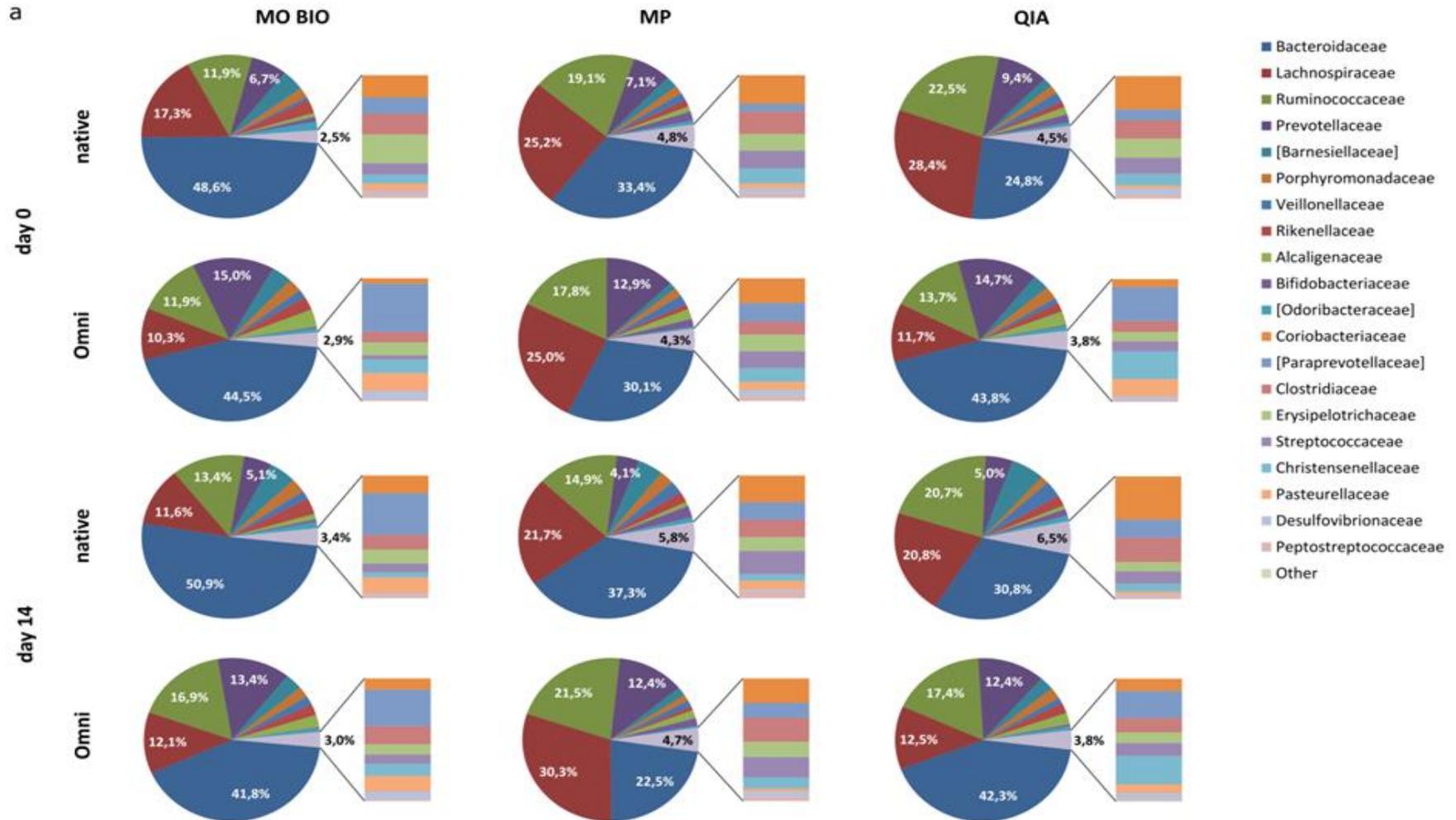
a



b

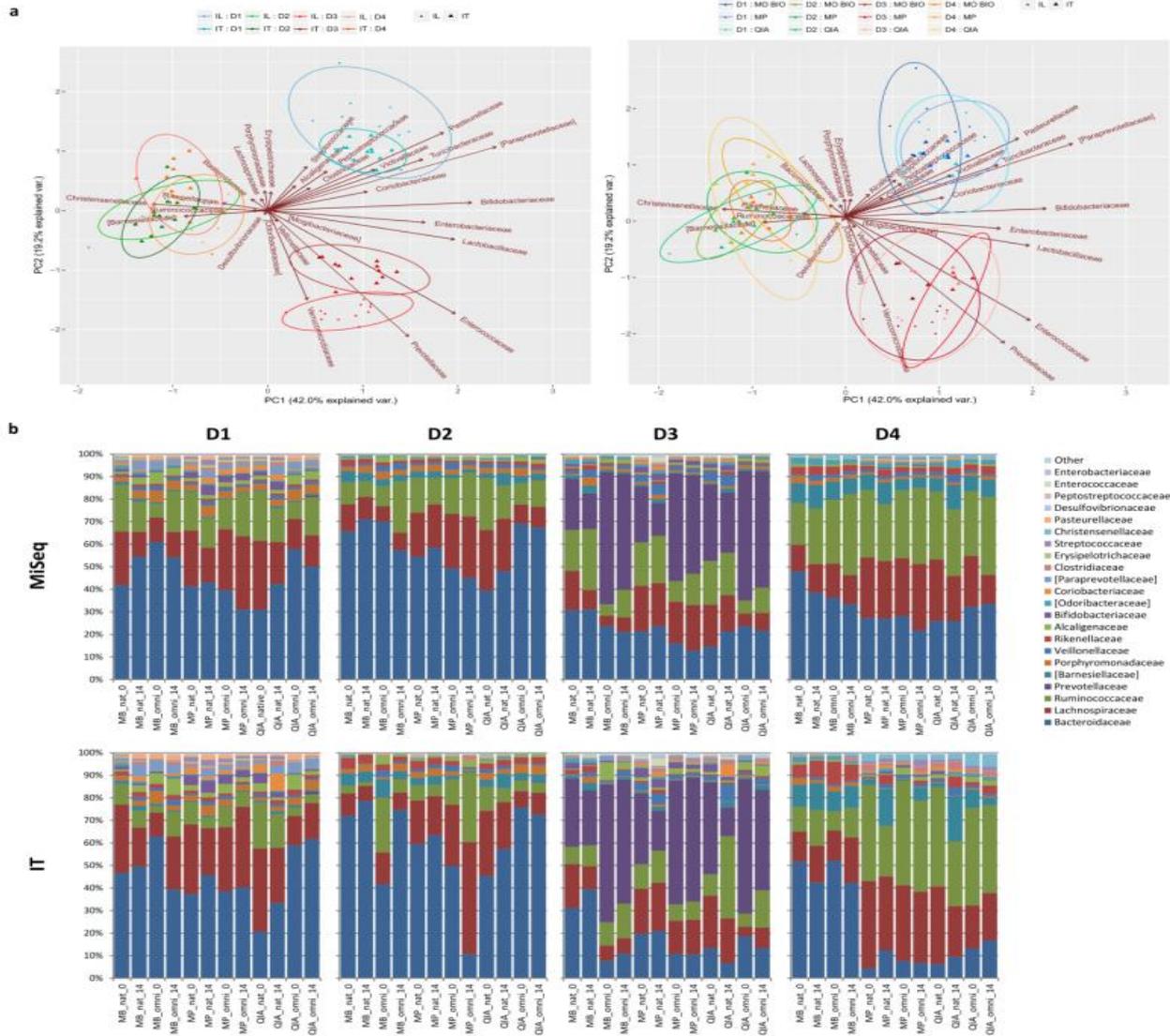


Usporedba kitova za izolaciju DNA – filogenetska analiza na razini razreda



- Rezultati su sumirani ovisno o načinu prikupljanja, izolacije DNA
Svi parametri unutar promatranog kriterija su sumirani

Usporedba platformi za sekvenciranje- Illumina vs Ion Torrent

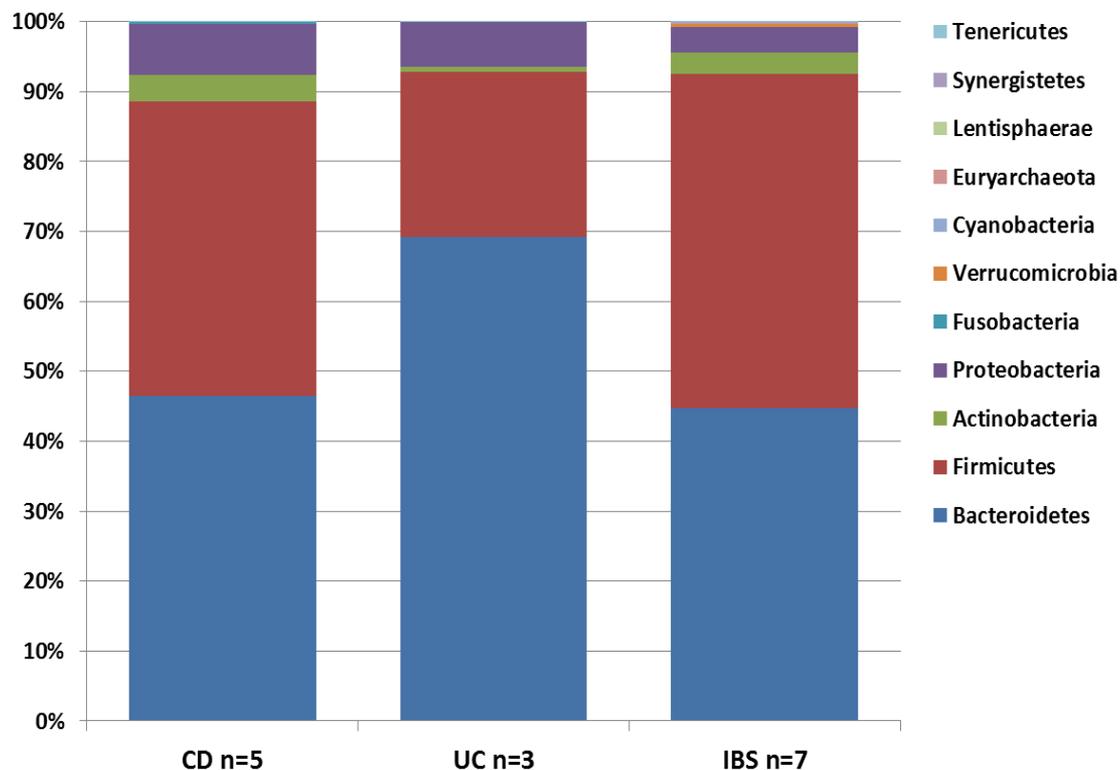


Dosadašnji rezultati

- Do sada je regrutirano **76 ispitanika** (Crohn-ova bolest, ulcerozni kolitis, sindrom iritabilnog crijeva i ostale dijagnoze)
- Analiza rezultata sekvenciranja **uzoraka fecesa** na Illumina platformi je provedena
- Pilot analiza sekvenciranja **uzoraka tkiva** ukazuje na razlike u relativnoj zastupljenosti pojedinih bakterijskih razreda kod oboljelih u odnosu na kontrolne ispitanike
- Preliminarne **analize upalnih biomarkera** iz seruma upućuju na postojanje značajnih razlika među grupama

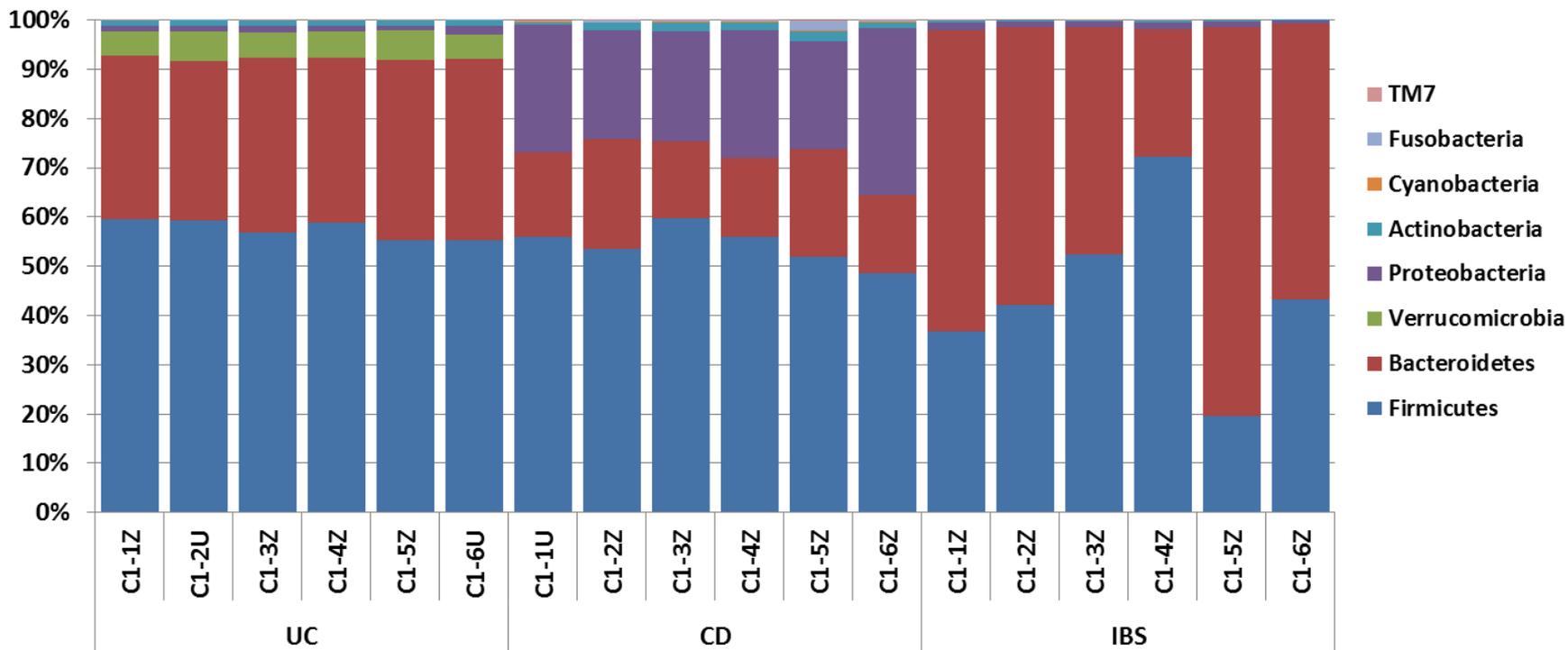
Analiza fecesa na razini razreda

- **Crohnova bolest (CD)** – povećanje u brojnosti razreda *Proteobacteria* i *Actinobacteria*
- **Ulcerozni kolitis (UC)** – povećanje u brojnosti razreda *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*, a smanjenje u brojnosti *Firmicutes* i *Actinobacteria*



Analiza tkivnih uzoraka na razini razreda

- **Crohnova bolest (CD)** – smanjena brojnost razreda *Bacteroidetes* i povećanje brojnosti razreda *Proteobacteria*
- **Ulcerozni kolitis (UC)** – raste brojnost razreda *Verrucomicrobia*



1. terminalni ileum I caecum
2. colon ascendens
3. colon transversum
4. colon descendens
5. colon sigmoideum
6. rectum

Analiza biomarkera iz seruma

- Imunodetekcijska metoda (engl. Proximity Extension Assay-PEA) - pomoću specifičnih protutijela koja na sebi imaju vezane oligonukleotide detektira i vrlo male količine proteina
- Preliminarne statističke analize upućuju na postojanje značajnih razlika među grupama
- Specifične analize u tijeku

grupa 0 (n=17)

grupa 1 (n=38)

IBD pacijenti:

kontrole:

6 UC

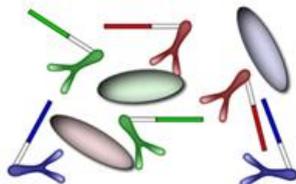
32 non-IBD ispitanika

4 CD

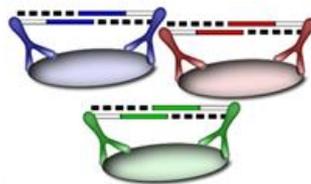
6 zdravih dobrovoljaca

6 duplikata

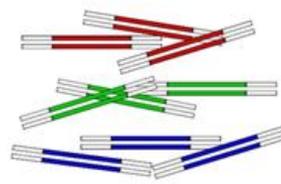
A inkubacija



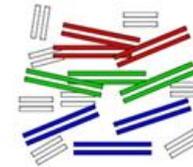
B Hibridizacija produljenje



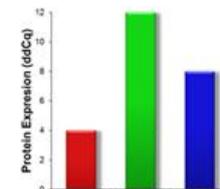
C Umnažanje



D Razgradnja



E qPCR



Assarsson et al., PLOS ONE 2014, 9(4)

Analiza biomarkera iz seruma

- Upalni panel - 92 proteinska markera (citokina, kemokina, transkripcijskih faktora, faktora rasta)
- Crohn (CD) n=4, ulcerozni kolitis (UC) n=6, IBS n=32, zdravi (H) n=6

	H v UC	H vs CD	H vs IBS	UC vs CD	UC vs IBS	CD vs IBS
IL-7			*			
AXIN	*	*	**			
TRAIL					*	*
CST-5						*
TNFSF14	****	***	****			
CXCL5	**				**	
MMP-10					*	
CCL23				*		*
CXCL10						*
EN-RAGE	*	**	**			
CASP-8		*	*			
TNFRSF9		**				
TWEAK						*
ST1A1	**	**	****			
ADA		*	*			

* <0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001

Ispitivanje nutritivnog statusa

- Nutritivni status - usporedba kakvoće prehrane IBD i kontrolne skupine analizom trodnevnog dnevnika prehrane
- Preliminarni rezultati
 - IBD skupina ima uvećan energetske unos, kao i veći unos vitamina K.
 - Ispitivanje kvalitete života pokazalo je da je 4 od 9 ispitanika iz IBD skupine ocijenilo kvalitetu života zadovoljavajućom, dok je isto učinilo 7 od 27 ispitanika iz kontrolne skupine.
 - Analiza dosadanih rezultata i daljnja ispitivanja su u tijeku

Ispitivanje endokrinološkog statusa

- Endokrinološki status
 - Odabrani su parametri i hormoni koji se prate:
 - Vrijednosti serumskih koncentracija Ca i P
 - Za endokrinološki status uzima se u obzir gonadalni status:
 - Određuje se i vrijednost vitamina 25(OH)D₃
 - analiza dosadašnjih rezultata

Projektni tim – MINUTE for IBD

- **Medicinski fakultet SuZ-** Mihaela Perić, Mario Matijašić, Hana Čipčić Paljetak, Marina Panek, Vera Kufner, Donatella Verbanac
- **Imperial College London, UK** - Anja Barešić
- **KBC Zagreb** - Željko Krznarić, Silvija Čuković Čavka, Darija Vranešić Bender, Ana Kunović, Marko Brinar, Mirjana Kalauz, Dora Grgić, Nikša Turk, Ivana Kraljević, Dunja Rogić, Dina Ljubas Kelečić
- **KB Dubrava** - Marija Crnčević Urek, Marko Banić
- **Poliklinika „Dr. Zora Profozić”** – Tomislav Meštrović
- **Fidelta d.o.o.** - Karmen Brajša
- **Xellia Pharmaceuticals** - Gabriijela Ergović

HVALA NA PAŽNJI !