



## Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2017 – 2020, 1. odpiranje, za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

### 1. Polni naslov projekta: Debelost in mikrobiota med nosečnostno sladkorno boleznijo

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni KLASIUS-P se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovu (neustrezno področje izbršite):

4 - Naravoslovje, matematika in računalništvo

### 2. V sodelovanju z:

**Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, podjetja Omega d.o.o. in Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana**

### 3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

V svetu smo pričeli pandemiji debelosti, zato so nujni pravočasni in učinkoviti ukrepi za njeno preprečevanje. Nosečnostna sladkorna bolezen (NSB) je znan dejavnik tveganja za pojav debelosti in sladkorne bolezni tipa 2 pri potomcih. NSB je v Evropi prisotna pri 2 do 6 % vseh nosečnic. Pojavnost NSB narašča in je tesno povezana z naraščanjem debelosti in pomikanjem nosečnosti v kasnejša leta življenja. Posebej veliko tveganje za pojav debelosti je prisotno pri potomcih mater z NSB in pridruženo debelostjo. Pri tem predstavlja dejavnik tveganja tako debelost matere, ki je prisotna ob vstopu v nosečnost, kot tudi prevelik porast telesne teže med nosečnostjo.

Na projektu smo se posvečali naslednjim vsebinam:

- primerjava življenjskega sloga in prehrane nosečnic z NSB pred in med nosečnostjo ter prenosom morebitnih sprememb v življenjskem slogu v obdobje po rojstvu otroka,
- opredelitvijo sestave mikrobiote pri nosečnicah z NSB,
- genetsko opredelitvijo sevov bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*), izoliranih iz blata nosečnic z NSB,
- bakteriocinogenostjo in lizogenostjo zbranih sevov *E. coli*
- raziskavami prisotnosti bakteriofagov in plazmidov, ki prenašajo zapise za odpornost proti nekaterim antibiotikom, v sevih *E. coli*, ki so bili izolirani iz blata ter v samem blatu žensk z NSB,
- metaboliti črevesne mikrobiote, ki igrajo pomembno vlogo za zdravje, vključno s preprečevanjem sladkorne bolezni in debelosti (kratkoveržne maščobne kisline in indol).

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

Na projektu smo najprej zbirali udeleženske študije v Diabetološki ambulanti UKC Lj. V tem delu smo sodelovali pri edukaciji na uvodni uri nosečnic s sladkorno boleznijo, izvajanju 75 g oralnega glukoza tolerančnega testa. Zbirali smo vse potrebne podatke o nosečnicah (podatki treh vprašalnikov - življenjski slog pred, med in po nosečnosti, podatke zdravniških pregledov pri diabetologu, podatke iz materinske knjižice, odpustnice, zdravstvene izvide), jih vpisovali v tabele in analizirali s pomočjo SPSS-a. Uporabljali smo tudi Persona test za hitro oceno tipa osebnosti.

Z metodo ERIC-PCR smo pregledali zbirko izolatov bakterije *E. coli* iz blata nosečnic in izključili klonalne seve na podlagi profilov ERIC-PCR. Vse pridobljene seve smo razdelili v 8 skupin glede na telesno težo nosečnic, prirast telesne teže in trimesečje nosečnosti. Zbranim sevom smo s filogenetskim PCR določili filogenetske skupine. Prav tako smo preverili bakteriocinogenost sevov in poskusili inducirati lizogene bakteriofage. Za zbrane seve smo s PCR ugotavljali prisotnost genov

iz nabora genov za virulentne dejavnike (*sfa*, *afa*, *cnf1*, *hlyA*, *papC*, *ibeA*, *iroN*) ter prisotnost regij RepFIA in RepFIB, značilnih za F-plazmid, ter regijo *tra* (*traJ*).

S komercialnim kompletom smo izolirali plazmidno DNA in jo uporabili za transformacijo s temperaturnim šokom (vodna kopel) oziroma električnim tokom (elektroporator) v laboratorijski sev *E. coli* za preverjanje možnosti transformacije genov za odpornost proti antibiotikom. Pripravljali smo tudi fagne lizate in preverjali možnosti za transdukcijo genov za odpornost proti antibiotikom.

Uvedli smo postopek za izolacijo kratkoverižnih maščobnih kislin iz blata nosečnic za analizo s HPLC in postopek za izolacijo indola iz blata nosečnic za spektrofotometrično kvantifikacija indola.

V podjetju Omega je potekal del projekta, ki se je navezoval na metagenomsko analizo. S kompletom reagentom Ion 16S Metagenomics Kit smo pripravili knjižnice za naslednjo generacijo sekveniranja (NGS). Knjižnice smo analizirali z različnimi metodami, med katerimi je bila najpomembnejša analiza na mikrofluidnem čipu s pomočjo instrumenta Labchip GX. Pripravo predloge za sekveniranje (emulzijski PCR) smo izvedli s pomočjo instrumenta Ion OneTouch 2, t.i. obogatitev sferic za sekveniranje pa z instrumentom Ion OneTouch ES. Sekveniranje smo izvedli na instrumentu Ion Torrent PGM, osnovno analizo s programsko opremo Torrent Suite, napredno analizo metagenomskih podatkov pa s programsko opremo Ion Reporter. Na ta način smo pridobili zelo podrobne podatke o sestavi mikrobiote v blatu izbranih nosečnic.

- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

Analiza podatkov nosečnic je pokazala, da tip osebnosti nosečnice pomembno vpliva na izide zdravljenja NSB, predvsem v smislu uživanja zdrave prehrane. Ugotavljamo, da so ženske z NSB med nosečnostjo pomembno spremenile svoj življenjski slog in prehrano. Njihova prehrana je bila bolj zdrava, opuščale so nezdrave vedenjske vzorce (npr. kajenje), redkeje uživale manj zdrave oblike ogljikovih hidratov, redkeje uživale ocvrto hrano, v povprečju so zaužile en obrok na dan več kot pred nosečnostjo in se pogosteje gibale. Rezultati kažejo tudi na nekatere razlike med skupinami nosečnic glede na demografske podatke (npr. bolj izobražene ženske manj spijo med nosečnostjo; pripadnice muslimanske veroizpovedi se manj gibajo in pogosteje kadijo). Te rezultate lahko diabetolog izkoristi pri svojem delu, saj bo lahko v prihodnje bolj pozoren na rizične skupine.

Izmed 146 pregledanih izolatov *E. coli* je bilo 64 različnih sevov, ki so bili uporabljeni za nadaljnje raziskave. Vse zbrane seve smo razvrstili v 8 skupin glede na nosečnice. Z ugotavljanjem filogenetskih skupin 64 sevov nosečnic, ki smo jih razdelili v različne kategorije, smo ugotovili, da pri nosečnicah z normalno telesno težo v 2. trimesečju nosečnosti in normalnim prirastom telesne teže med nosečnostjo prevladujeta filogenetski skupini A (23 %) in B2 (71 %), medtem ko so pri nosečnicah s prekomernim prirastom telesne teže filogenetske skupine bolj raznolike. Pri sevih nosečnic s prekomerno telesno težo, tako v 2. kot 3. trimesečju nosečnosti prevladuje filogenetska skupina A. Na področju bakteriocinogenosti smo ugotovili, da pri nosečnicah z normalno telesno težo prevladujejo kolicinogeni sevi, medtem ko pri nosečnicah s prekomerno telesno težo prevladujejo nekolicinogeni sevi. Lizogenih bakteriofagov nismo uspeli inducirati pri nobenem od sevov. Analiza prisotnosti genskih zapisov virulentnih dejavnikov (VD) med zbranimi 64 sevi je pokazala, da sta *iroN* in *sfa* bila najpogostejša zapisa pri suhih ženskah, med tem ko smo pri debelih ženskah najpogosteje zasledili *iroN*, *ibeA*, *papC* ter *hlyA*. Gen *traJ* smo zasledili pri 10 % sevov, izoliranih iz blata suhih žensk, in pri 20 % sevov, izoliranih iz blata debelih žensk. RepFIA in RepFIB smo zasledili samo pri suhih ženskah in to le v primeru normalnega prirast telesne teže. Dobljeni rezultati so lahko pokazatelj potencialne patogenosti sicer komenzalnih sevov *E. coli* prisotnih v spodnjem prebavilu nosečnic. Spremembe prevalence teh genov skozi čas nosečnosti bi lahko bile posledica razmer v telesu torej odziv mikrobiote. Poznavanje prevalenc pomembnih genov povezanih s patogenostjo sevov *E. coli* je še en pomemben aspekt razumevanja tesne povezanosti mikrobiote in človeškega organizma v času nosečnosti, ki vodi v odkritje novih medicinsko pomembnih korelacij.

Ker uporaba antibiotikov vpliva tako na nastanek spremenjene mikrobne združbe, kakor tudi na pojav/raznos rezistenčnih genov smo želeli opredeliti breme teh dogodkov v blatu žensk z nosečnostnim diabetesom. V ta namen smo pripravili modificirane/optimizirane protokole za pripravo poskusov horizontalnega prenosa genov. Naši rezultati prispevajo k

poznavanju/ovrednotenju možnosti prenosa genov z rezistenco proti antibiotikom med bakterijskimi sevi v humanem blatu, še posebej z običajno manj izpostavljeni mehanizmom – transdukcijo, to je prenosom s pomočjo bakterijskih virusov ali bakteriofagov.

Vpeljali smo metodi kvantifikacije produktov/metabolitov črevesne mikrobiote, indola in kratkoverižnih maščobnih kislin, ki vplivajo na zdravje svojega gostitelja. Vpeljali smo kvantifikacijo indola iz vzorcev blata preiskovanih nosečnic s Kovascovim reagentom, kratkoverižnih maščobnih kislin s HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti). Določene skupine bakterij proizvajajo večje količine metabolitev. Ker igrajo omenjeni metaboliti bakterij pomembne vloge za zdravje, vključno s preprečevanjem sladkorne bolezni in debelosti, bodo podatki o njihovih koncentracijah omogočili nove pristope, npr. pripravo za posameznika specifične probiotike.

V delu projekta, ki smo ga izvajali v podjetju Omega, d.o.o., smo uspešno določili sestavo bakterijske mikrobiote v blatu izbranih nosečnic. Z možnostmi vpliva na sestavo mikrobiote pa računamo, da bomo v prihodnosti lahko tudi neposredno vplivali na zdravljenje in dobrobit pacientov.

#### 4. Priloge:

Slike, ki študentov pri delu na projektu:



