

**Academia
Oamenilor de Știință
din România**



**Academy
of Romanian
Scientists**

Add: Str. Ilfov nr. 3 sector 5, 050045, București, ROMANIA, Cod Fiscal: 5091859
Tel. 00-4021/314.74.91; Fax. 00-4021/314.75.39, Web-site: www.aosr.ro, E-mail: aosromania@yahoo.com

**COMPETIȚIA DE PROIECTE DE CERCETARE A
ACADEMIEI OAMENILOR DE ȘTIINȚĂ DIN ROMÂNIA
DESTINATĂ TINERILOR CERCETĂTORI
“AOSR-TEAMS” EDIȚIA 2022-2023**

B.1. Propunerea de proiect

Domeniul 22 - Monitorizarea sechelelor postinfecție acută cu SARS-CoV-2

**Evaluarea microbiomului și a profilului inflamator la pacienții diabetici postinfecție
acută cu SARS-CoV-2**

Cuvinte cheie: SARS-CoV-2, microbiota, diabet, biomarkeri

Introducere

Diabetul este una dintre cele mai frecvente comorbidități la pacienții cu COVID-19, cu o prevalență care variază între 7 și 30% (Zheng, 2020). Luând în considerație faptul că pandemia COVID-19 continuă în întreaga lume, a devenit evidentă necesitatea cunoașterii interacțiunilor dintre aceste două patologii, ambele implicând o fiziopatologie extrem de complexă (Azar, 2020). Pacienții diabetici infectați cu SARS-CoV-2 au rate mai mari de spitalizare și mortalitate și dezvoltă mai frecvent pneumonie severă comparativ cu subiecții non-diabetici (Wang, 2020; Azar, 2020; Huang, 2020). Pe de altă parte, s-a sugerat și o implicare COVID-19 în exacerbarea complicațiilor metabolice acute ale diabetului, inclusiv hiperglicemia și cetoacidoza (Rubino, 2020). Hiperglicemia cronică poate afecta imunitatea înăscută și umorală favorizând dezvoltarea unui răspuns inflamator exagerat și ulterior a sindromului de detresă respiratorie acută (Hodgson, 2015). Aceste complicații se pot datora faptului că receptorul pentru virusul SARS-CoV-2 - receptorul enzimei de conversie a angiotensinei 2 (ACE2) este exprimat în organe metabolice cheie, cum ar fi pancreasul, în special în celulele β

pancreatice. Prin urmare, tropismul SARS-CoV-2 pentru celulele β pancreatice ar putea promova deteriorarea celulelor și afectarea ulterioară a secreției de insulină, culminând cu hiperglicemie și cetoacidoză (Gazzaz, 2021).

Cunoașterea mecanismelor și a factorilor de risc care joacă un rol în creșterea severității COVID-19 la pacienții diabetici reprezintă o provocare esențială pentru sănătatea publică și practica clinică, fiind absolut necesară pentru a proteja și gestiona persoanele cu diabet sau cu risc crescut de disfuncție metabolică (Mehta, 2020); aceasta va permite, de asemenea, **identificarea unor biomarkeri pentru a îmbunătăți gestionarea COVID-19 la pacienții diabetici**. Scopul acestui proiect este design-ul unui panel de markeri de microbiom și profil inflamator pentru prognosticul și tratamentul personalizat al pacienților diabetici post COVID-19.

Mai multe studii au raportat deja biomarkeri proteomici, metabolomici și celulari pentru COVID-19, care includ produsele de degradare a glucozei, glucuronatului și bilirubinei (Shen, 2020; Lin, 2020). Pe lângă acestea, indicatorii clinici alternativi furnizați de tehnologiile omice, ar putea fi foarte utili pentru dezvoltarea unor instrumente noi pentru managementul COVID-19 (Gupta, 2020).

Disbioza intestinală (perturbarea microbiotei) **este un numitor comun pentru diabet și inflamație**, ambele agravând evoluția pacienților cu COVID-19 (Silan, 2020). Frecvent, sunt raportate simptome gastrointestinale la pacienții cu COVID-19, cum ar fi diareea, vărsăturile și durerile abdominale, ceea ce a condus la formularea ipotezei implicării disbiozei în geneza și severitatea simptomelor (Villapol, 2020). S-a demonstrat într-adevăr că infecția cu SARS-CoV-2 afectează nu doar imunitatea gazdei, ci și homeostazia intestinală, determinând scăderea diversității microbiomului precum și creșterea abundenței microorganismelor oportuniste (Enterobacteriaceae, *Candida* sp.). Pe lângă microbiota intestinală, microbiomul pulmonar are un rol major în infecțiile respiratorii virale. De asemenea, studii recente indică existența unei axe de comunicare între microbiomul intestinal și cel pulmonar (*gut-lung axis*). Axa intestin-plămân este bidirecțională, microbiota intestinală și pulmonară fiind interconectată prin eliberarea endotoxinelor, metaboliților microbieni, citokinelor și chemokinelor în fluxul sanguin (Dang și Marsland, 2019). Modificările de la nivelul microbiomului intestinal afectează răspunsul imun și homeostazia căilor respiratorii, iar inflamația de la nivel pulmonar induce modificări sistemice, precum și modificări la nivelul microbiotei intestinale.

Imunitatea afectată a gazdei și apariția disbiozei pot împiedica reasamblarea microbiomului intestinal după COVID-19. Aceste modificări de microbiom persistă la un subgrup semnificativ de pacienți cu COVID-19, chiar și după vindecare și coincid cu „long COVID” (COVID persistent) (fenomen cunoscut și **ca sechele post-acute ale COVID-19**). Astfel, **sunt necesare studii pentru a aprofunda rolul microbiomului intestinal în imunitatea gazdei împotriva infecției cu SARS-CoV-2**, precum și efectul pe termen lung asupra microbiomului intestinal în relație cu starea de sănătate a pacienților post-COVID-19.

Premisele proiectului

Corelațiile dintre microbiomul intestinal, nivelurile de citokine și markerii inflamatori la pacienții cu COVID-19 pledează pentru un **rol al microbiotei în amploarea severității**

COVID-19, probabil prin modularea răspunsului imun al gazdei. Mai mult, disbioza declanșată de infecția cu SARS-CoV-2 ar putea duce la simptome persistente, sugerând astfel necesitatea de a înțelege modul în care microbiota intestinală este implicată în inflamație și COVID-19, în special la gazdele susceptibile (pacienții cu diabet zaharat).

Rezultate preliminare

Datele noastre preliminare indică faptul că COVID-19 declanșează o disbioză severă (pierderea diversității, îmbogățirea în Proteobacterii) la pacienții cu diabet în comparație cu alți indivizi, fără comorbidități asociate. Mai mult, studii recente evidențiază importanța semnăturilor microbiomului în ghidarea stratificării pacienților într-o gamă largă de afecțiuni, inclusiv COVID-19.

Scopul proiectului constă în corelarea profilurilor microbiotei intestinale și respiratorii cu profilul inflamator și gradul de severitate al infecției COVID-19 în vederea stabilirii unui panel de diagnostic care ar putea fi utilizat de clinicieni pentru predicția și monitorizarea severității infecției SARS-CoV-2 la pacienții diabetici (Figura 1). **Noutatea abordării** constă în dezvoltarea unui instrument inovator de prognostic clinic care ar putea fi utilizat pentru alte boli inflamatorii sau alte infecții virale.

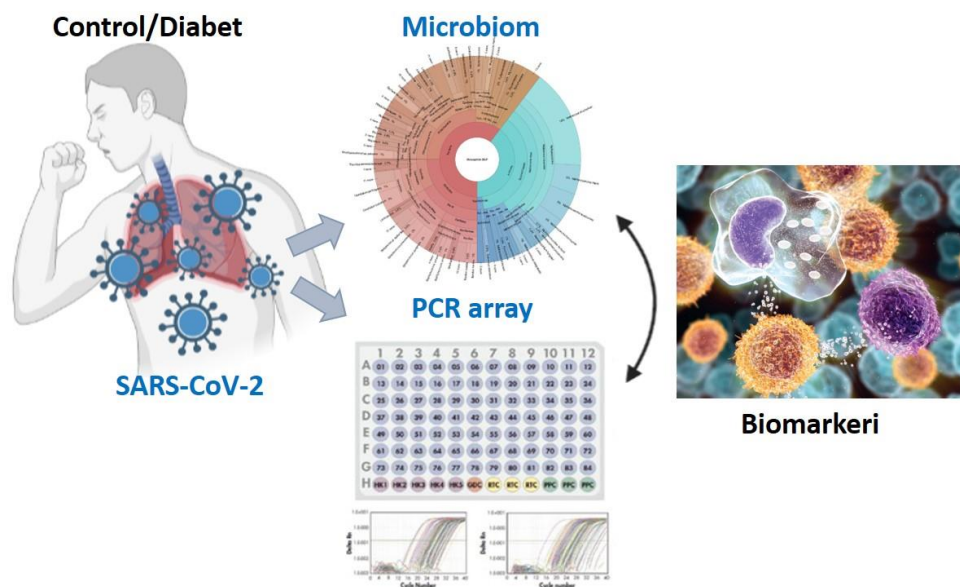


Figura 1. Prezentarea schematică a ideii de proiect- analize moleculare ale microbiomului intestinal și pulmonar pentru identificarea unor semne microbiene la pacienții cu diabet zaharat în contextul infecției SARS-CoV-2

Obiective

Pentru atingerea scopului propus vom urmări următoarele obiective:

O1. Analiza microbiotei prin secvențiere de ultimă generație pentru stabilirea profilurilor specifice la pacienții diabetici post COVID-19

O2. Evaluarea profilului antiviral și inflamator la pacienții diabetici după COVID-19, pentru analiza inter-relației microbiom-inflamație

O3. Corelarea microbiotei intestinale și respiratorii cu modificările statutului inflamator pentru a propune un panel pentru predicția severității COVID-19 la pacienții diabetici

O4. Management de proiect și diseminarea rezultatelor

Directorul de proiect (Grațiana Grădișteanu) a coordonat proiecte de cercetare în domeniul analizei microbiomului (PN-III-P1-1.1-PD-2019-0499 - Analiza integrativă a profilului multi omic și a NADPH oxidazelor în diabetul zaharat de tip 2-proiect în derulare până la 30.12.2022) cât și în diagnosticul SARS-CoV-2 (Proiect Soluții -Tehnici avansate și creșterea performanței în detecția precoce a virusului SARS-CoV-2, proiect încheiat la 15.12.2021). În cadrul acestor proiecte s-a constituit o biobancă cu probe de scaun, spută și probe de sânge de la indivizi sănătoși și pacienți cu diabet zaharat de tip 2. Datele preliminare din aceste proiecte evidențiază faptul că microbiota intestinală este foarte asemănătoare între pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și controlul sănătos în ceea ce privește beta diversitatea și abundența filumurilor majore (Figura 2).

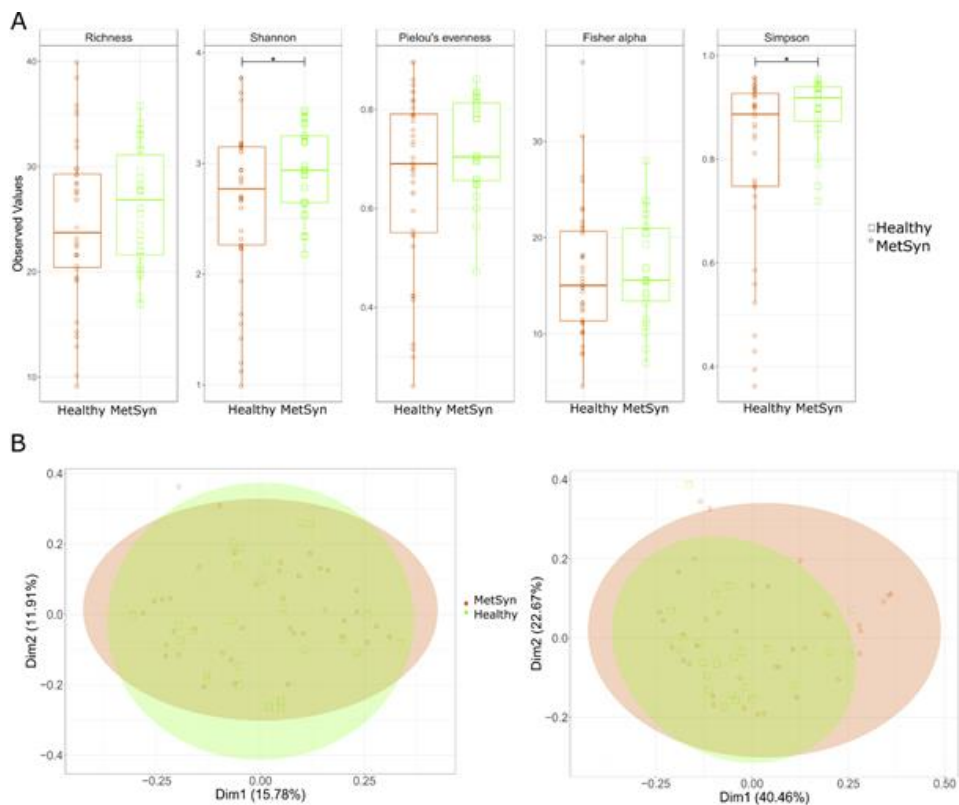


Figura 2. Analiza microbiotei la pacienți cu sindrom metabolic și diabet zaharat de tip 2 (MetSyn) și lotul control. A. Alfa diversitate – număr de specii (*Richness*), analiza de diversitate Fisher, Shannon, Pielou și Simpson. B. Beta diversitatea microbiomului -analiza Bray Curtis (stanga) și wUnifrac (dreapta). (Date nepublicate)

Interesant însă, microbiomul intestinal este semnificativ diferit după infecția cu SARS-CoV-2 la pacienții diabetici și se caracterizează prin pierderea diversității microbiene, precum și prin creșterea abundenței de Enterobacteriaceae, un taxon cunoscut pentru asocierea sa cu inflamația (Figura 3, date nepublicate). Aceste date preliminare evidențiază necesitatea de a investiga mai detaliat răspunsul gazdei după infecția SARS-CoV-2 la pacienții cu diabet

zaharat, pentru a identifica noi biomarkeri si algoritmi de predicție pentru optimizarea gestionării terapeutice a acestor pacienți.

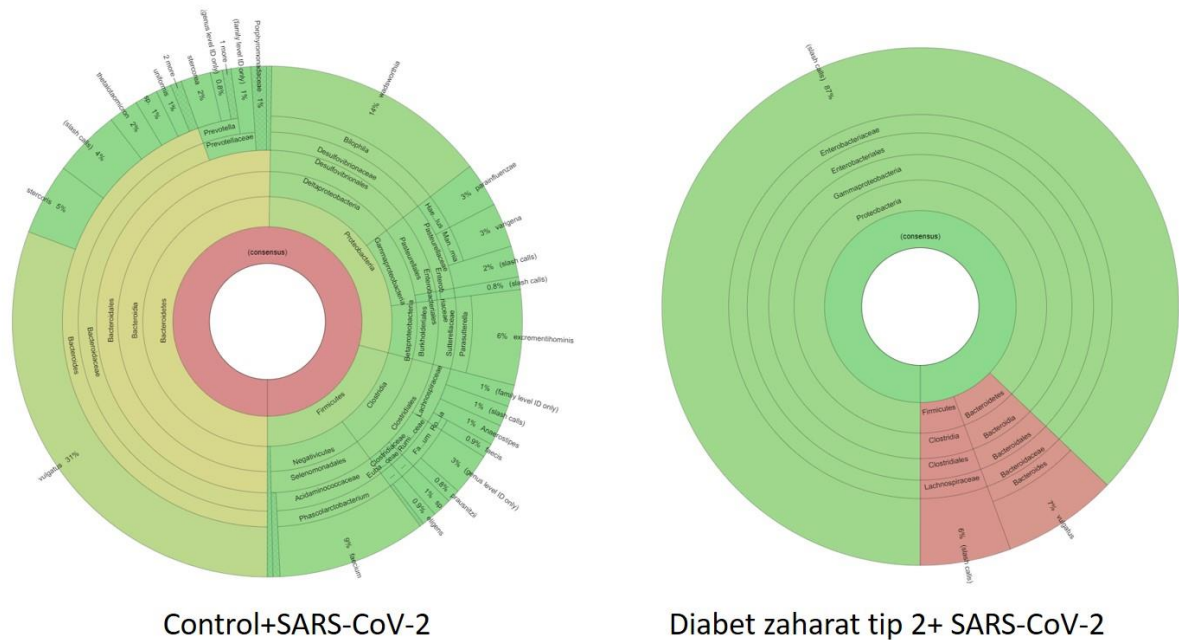


Figura 3. Analiza microbiomului intestinal post infecție SARS-CoV-2 (secvente consens, tehnologie de secvențiere IonTorrent).

Metodologie cu indicarea gradului de originalitate

Participanții incluși studiu vor fi grupul de pacienți diabetici (n=30), recrutați la Institutul National de Endocrinologie C.I.Parhon și respectiv grupul control de indivizi sănătoși (n=30). Pentru toți participanții la studiu se va obține consimțământul informat, formular aprobat de comisia de etică a Institutului de Cercetări al Universității din București (CEC 57/06.09.2021).

Analiza microbiotei la pacienții diabetici după COVID-19 se va analiza prin **secvențiere de ultima generație** (*Next Generation Sequencing*). Secvențele ARNr 16S vor fi amplificate din ADN extras de la pacienți (probe de scaun și secreții respiratorii -spută/salivă) folosind perechi de primeri care vizează regiunea hipervariabilă V3 sau V4 a genei ARNr 16S. Produsele PCR derivate din amplificarea regiunilor hipervariabile ale genei ARNr 16S specifice vor fi purificate prin separare electroforetică urmată de de purificare cu bile magnetice. Secvențierea bibliotecilor de ampliconi va fi efectuată pe un cip 318 utilizând sistemul Ion Torrent PGM și kitul Ion Sequencing 400 urmând instrucțiunile producătorului. Analiza secvențelor obținute se va realiza prin intermediul software-ului Ion Reporter.

Datele de secvențiere obținute vor fi procesate folosind *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) și pentru a calcula măsurile de diversitate (analiza Unifrac), unitățile taxonomice operaționale 16S rRNA fiind definite la $\geq 97\%$ omologie de secvență. Toate citirile vor fi clasificate la cel mai mic rang taxonomic posibil folosind QIIME și un set de date de referință (the Ribosomal Database Project).

Se va realiza izolarea de PBMC (celule mononucleare din sânge periferic) prin metoda centrifugării în gradient de densitate cu Ficoll urmată de extractia ARN (pe baza utilizării unui kit . Pentru investigarea raspunsului inflamator și antiviral la pacienții cu diabet se vor utiliza paneluri de **PCR array** disponibile comercial (PAHS-011Z, - PAHS-122Z). Astfel, se va cuantifica expresia genică, în format *high throughput*, pentru peste 150 de gene implicate în raspunsul antiviral și inflamator: *L18, IL1B, C5, CCL1, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL17, CCL2, CCL20, CCL22, CCL23, CCL24, CCL26, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CX3CR1, CXCR1, CXCR2, IKK α , FOS, IKK β , IRAK1, IRF3, IRF5, IRF7, JUN, MAP2K1, MAP2K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK14, MAPK3, MAPK8, MYD88, NFKB1, NFKBIA, RELA, RIPK1, SPP1, TBK1, TICAM1, TNF, TRAF3, TRAF6, CCL3, CCL5, CD40, CD80, CD86, CXCL10, IFNA1, IFNA2, IFNB1, IL12A, IL12B, IL15, IL1B, IL6.*

Pentru atingerea obiectivelor asumate, fluxul de implementare a proiectului este divizat în 2 etape de lucru cu activități specifice și livrabilele asociate (Tabelul 1, figura 4-Diagrama Gantt).

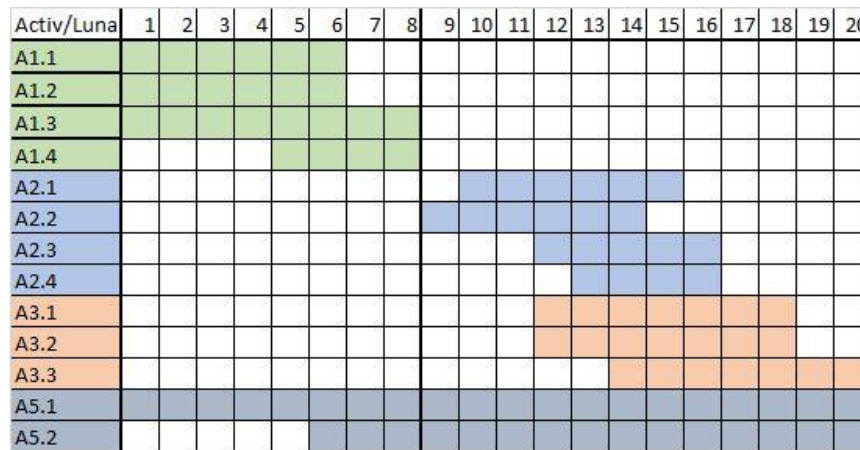


Figura 4. Diagram Gantt

Etapa I (8 luni)	Analiza modificărilor de microbiom post-SARS-CoV-2
Activitati	
Obiectivul 1 - Analiza microbiotei bazată pe secvențiere de ultima generație pentru stabilirea profilurilor specifice la pacienții diabetici post COVID-19	
Activitatea 1.1. Extracția de ADN din probele de scaun prelevate de la indivizi sănătoși și pacienți cu diabet zaharat tip 2 post infecție SARS-CoV-2	
Activitatea 1.2. Extracția de ADN din probele de secreții respiratorii prelevate de la indivizi sanatosi și pacienți cu diabet zaharat tip 2 post infecție SARS-CoV-2	
Activitatea 1.3. Secvențierea microbiotei intestinale la indivizi sănătoși și pacienți cu diabet zaharat tip 2 post infecție SARS-CoV-2	

Activitatea 1.4. Secvențierea microbiotei respiratorii la indivizi sănătoși și pacienți cu diabet zaharat tip 2 post infecție SARS-CoV-2	
Livrabile: date experimentale, 1 articol ISI, participare la 1 conferință internațională	
Etapa II (12 luni)	Analiza inter-relatiei microbiom-inflamație
Activități	
Obiectivul 2 - <i>Evaluarea profilului antiviral și inflamator la pacienții diabetici după COVID-19 pentru analiza inter-relatiei microbiom-inflamație</i>	
Activitatea 2.1. Izolarea de ARN din PBMC izolate de la indivizi sănătoși și pacienți cu diabet zaharat tip 2 post infecție SARS-CoV-2	
Activitatea 2.2. Evaluarea prin <i>PCR array</i> a profilului inflamator la indivizi sănătoși și pacienți cu diabet zaharat tip 2 post infecție SARS-CoV-2	
Activitatea 2.3. Corelarea datelor de microbiom cu gradul de severitate COVID-19 la indivizii sănătoși	
Activitatea 2.4. Corelarea datelor de microbiom cu gradul de severitate COVID-19 la indivizii diabetici	
Obiectivul 3- <i>Corelarea microbiotei intestinale și respiratorii cu modificările statutului inflamator pentru a propune un panel pentru predicția severității COVID-19 la pacienții diabetici</i>	
Activitatea 3.1. Corelarea statistică a datelor de microbiom intestinal cu datele de PCR Array -panel antiviral și inflamator	
Activitatea 3.2. Corelarea statistică a datelor de microbiom respirator cu datele de PCR Array -panel antiviral și inflamator	
Activitatea 3.3. Propunerea unui panel pentru predicția severității COVID-19 la pacienții diabetici	
Obiectivul 4 - <i>Management de proiect și diseminarea rezultatelor</i>	
Activitatea 4.1 - Management de proiect	
Activitatea 4.2 - Diseminarea rezultatelor	
Livrabile: date experimentale, 2 lucrări ISI, participare la 2 conferințe/ workshopuri	

În cadrul proiectului se vor utiliza **tehnici de analiză de ultima generație** (secvențiere Ion torrent, PCR array), fapt ce va facilita **publicarea rezultatelor obținute în reviste cotate ISI, cu factor de impact ridicat.**

Articole estimate a fi elaborate cu indicarea factorului de impact minim al revistei unde vor fi publicate. Rezultatele obținute în cadrul proiectului vor fi diseminate prin cel puțin 3 lucrări științifice publicate în reviste internaționale de specialitate (Frontiers in Endocrinology – factor impact 5.55, Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy-factor de impact 3.168 , Microorganisms -factor impact 3.86, International Journal of Molecular sciences- factor de impact 5.92) și prin participarea la cel puțin 3 congrese naționale și internaționale (InterDiab, European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Congresul European de Endocrinologie).

Suma solicitată – 60.000 lei

Bibliografie

1. Azar WS, Njeim R, Fares AH, et al. COVID-19 and diabetes mellitus: how one pandemic worsens the other. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020;21(4):451-463. doi:10.1007/s11154-020-09573
2. Dang AT, Marsland BJ. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis. *Mucosal Immunol.* 2019 Jul;12(4):843-850. doi: 10.1038/s41385-019-0160-6
3. Gazzaz ZJ. Diabetes and COVID-19. *Open Life Sci.* 2021 Mar 25;16(1):297-302. doi: 10.1515/biol-2021-0034
4. Gupta RK, Marks M, Samuels THA. Systematic evaluation and external validation of 22 prognostic models among hospitalized adults with COVID-19: an observational cohort study. *Eur Respir J.* 2020;56(6)
5. Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology.* 2015;144(2):171–
6. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497–506
7. Lin B, Liu J, Liu Y, Qin X. Progress in understanding COVID-19: insights from the omics approach. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2020;58(4):1–18
8. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020;395(10229):1033–4
9. Rubino F, Amiel SA, Zimmet P, et al. New-onset diabetes in COVID-19. *N Engl J Med.* 2020;383:789–790
10. Shen B, Yi X, Sun Y. Proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 patient sera. *Cell.* 2020;182(1):59–72. e15
11. Silan Gu, Yanfei Chen, Zhengjie Wu, Yunbo Chen et al., Alterations of Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza. *Clin. Infect. Dis.*, 2020 Jun 4: ciaa709
12. Villapol S. Gastrointestinal symptoms associated with COVID-19: impact on the gut microbiome. *Transl Res.* 2020;226:57-69. doi:10.1016/j.trsl.2020.08.004
13. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. 2020. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 395: 470-3
14. Zheng Y.Y., Muniyappa R, Gubbi S. COVID-19 pandemic, Corona viruses, and diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020;318:E736–41.

B.2. Titlu și rezumat în limba engleză

Evaluation of the microbiome and inflammatory profile in diabetic patients post acute SARS-CoV-2 infection

Diabetes is one of the most frequent comorbidities in COVID-19 patients with a prevalence that varies between 7 and 30%. Diabetic patients infected with SARS-CoV-2 have a higher rate of hospitalisation, severe pneumonia, and higher mortality rates compared to non-diabetic subjects. Hence, identification of reliable biomarkers to assist clinicians in the management of COVID-19 in high risk patients (i.e. diabetics) is a top research priority. We aim to design a panel of microbiome and inflammatory markers for the prognosis and personalized treatment of diabetic patients after COVID-19. The novelty of our approach consists in the correlation of intestinal and respiratory gut microbiota profiles, with inflammatory profiles in a panel that could be used by clinicians for predicting and monitoring the COVID-19 severity in diabetic patients.