



XXXVII. Türk
Mikrobiyoloji
Kongresi

Nonalkolik Karaciğer Yağlanması Olan Hastalar ve Sağlıklı Kontrollerde Bağırsak Mikrobiyotasının Yeni Nesil Dizi Analizi İle Karşılaştırılması

Erdogdu C, Yalinay M, Karakan T, Battaglia T, Blaser MJ

Ceren Erdogdu

17.11.2016



Hipotez – Arařtırma sorusu

- NAFLD ve sağlıklı kontroller arasında bağırsak mikrobiyotası içerik ve yapı bakımından farklıdır.
 - Mikrobiyal eřitlilik iki grupta farklı mı?
 - Mikrobiyota yapısı karaciğer hasarının Őiddetine gore değişiyor mu?
 - Hastalık ve sağlığa etkisi olan spesifik gruplar hangileri?



Metod



NAFLD (n=43)

KONTROL (n=23)



- NAFLD - biyopsi ile doğrulanmış hastalar
 - ✓ ≥ 18 yaşında olan,
 - ✓ artmış serum aminotransferaz seviyeleri gözlenen ,
 - ✓ alkol tüketimi < 20 gr/hafta olan,
 - ✓ son 6 ay içerisinde herhangi bir kortikosteroid, antibiyotik, prebiyotik, probiyotik tedavisi almamış olan,
 - ✓ eş zamanlı başka bir hastalığı olmayan hastalar dahil edilmiştir
- Fibrozis skoru
 - F0-F1 orta dereceli fibrozis
 - F2 şiddetli fibrozis

Metod

Örneklerin toplanması

- NAFLD, kontrol

DNA İzolasyonu

- Homojenizasyon+İzolasyon

Amplikon Kütüphanesi Oluşturulması

- PCR-16S V4 barkod işaretli primerler - 254 bç
- Örneklerin havuzlanması, saflaştırma, kalite kontrol

Sekans

- Illumina Miseq – çift yönlü 2X150 bç

Ön işlemler

- 'chimeric' okumaların filtrelenmesi
- Çift yönlü okumaların birleştirilmesi
- 'Demultiplexing' – okumaların ilgili barkoda atanması
- 'Quality Filtering' – barkod ile eşleşmeyen okumaların elenmesi
- 'OTU Picking' (open reference) – okumalara uygun OTU'ların kümelendirilmesi - % 97 benzerlik
- OTU'lara taksa atanması

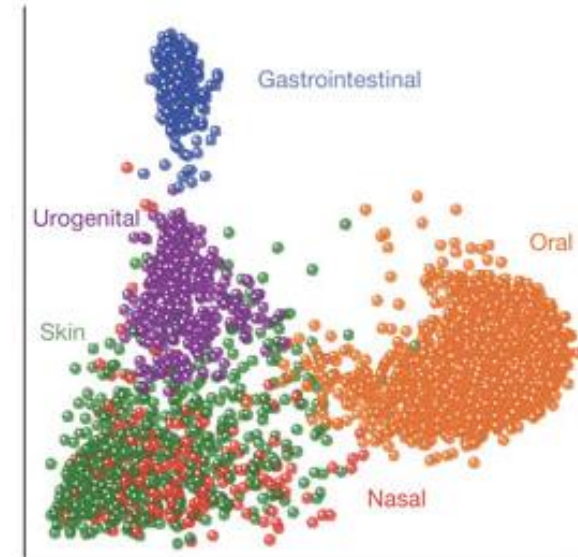
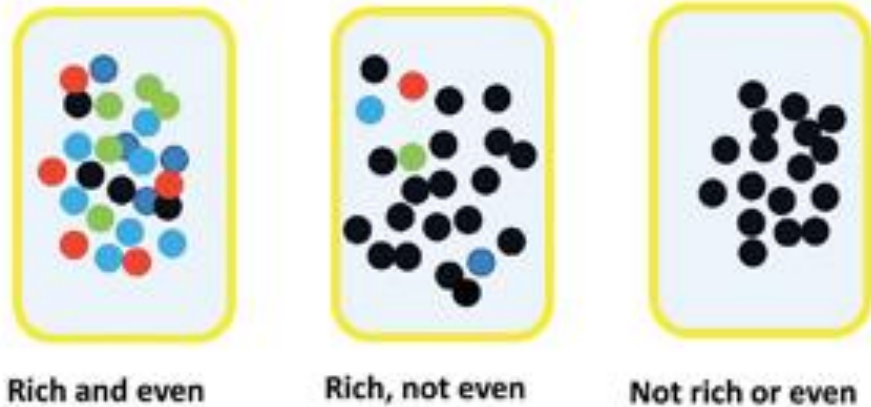
Mikrobiyota çeşitlilik analizleri

- Alpha Çeşitlilik
- Beta Çeşitlilik
- Relatif taksa dağılımı
- Lefse Analizleri

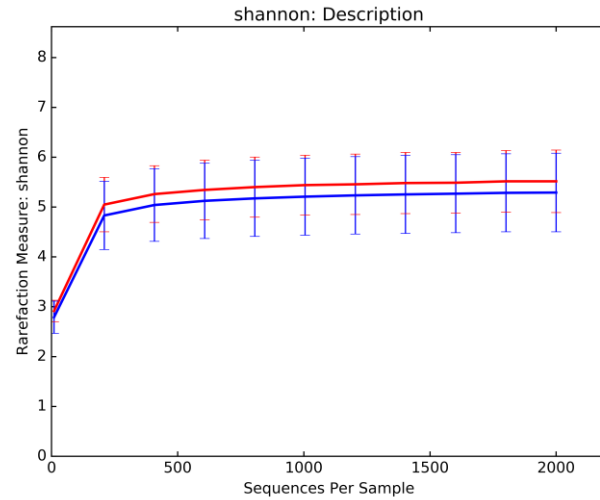
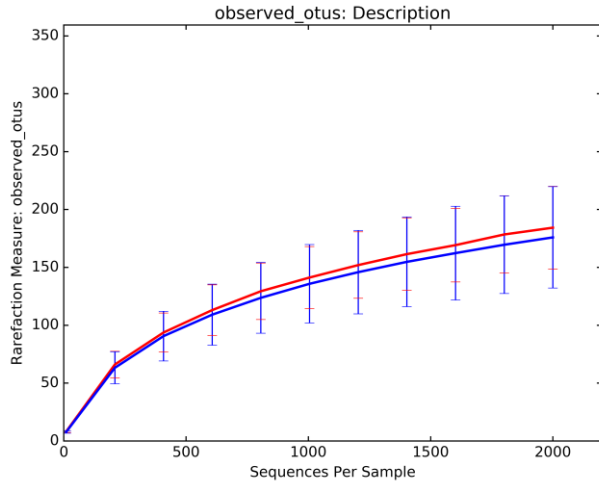
Alfa çeşitlilik vs. Beta çeşitlilik

- Örneğin kendi içerisindeki farklılık
 - Zenginlik(richness)-farklı OTU'ların sayısı
 - Dağılım- (Evenness)-farklı OTU'ların dağılımı
 - Filogenetik çeşitlilik (pd_whole_tree)
- Örnekler arasındaki benzerlik derecesi (uzaklık)
- Kullanılan metrikler
 - Unweighted UniFrac - OTU'ların varlığı ve filogeni
 - Weighted UniFrac – OTU'ların baskınlığı ve filogeni

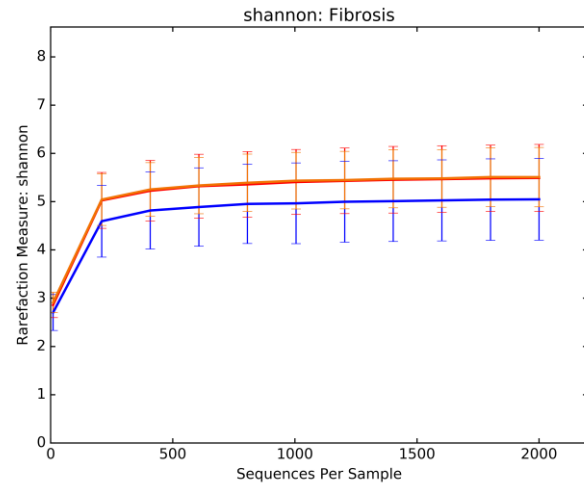
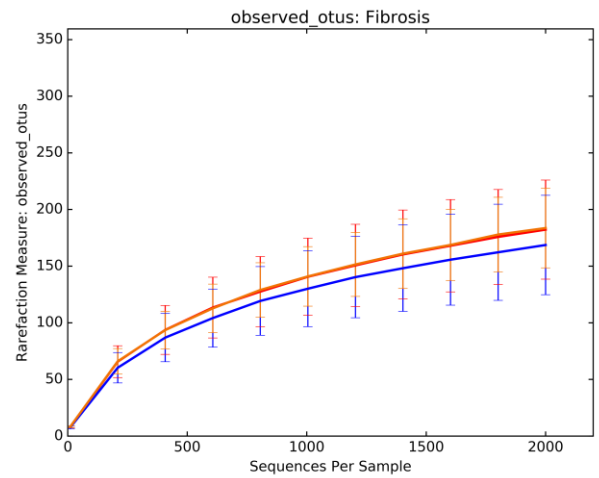
Alpha diversity



Gruplar arası alfa çeşitlilik (gözlenen OTU, dağılım)

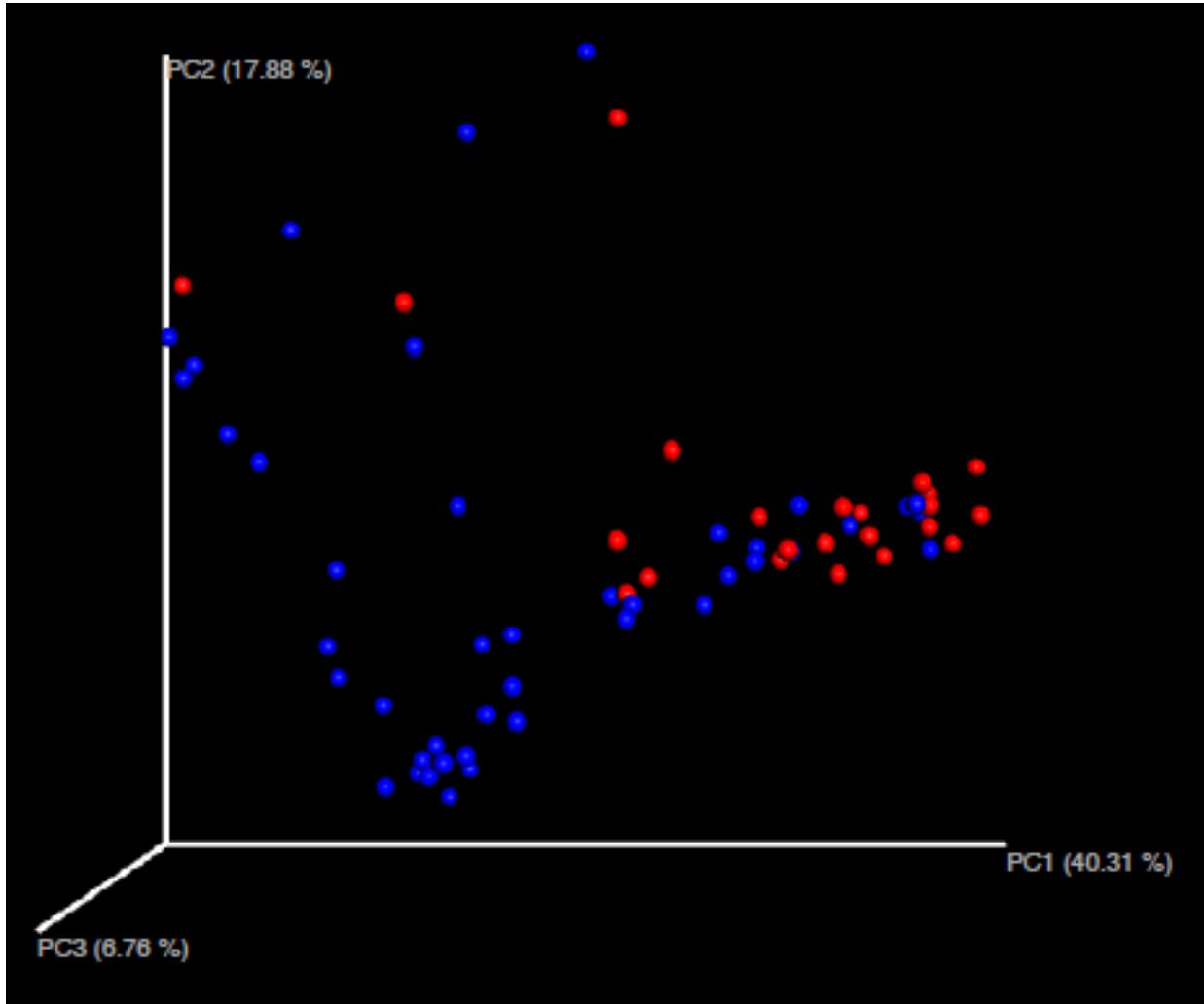


■ Kontrol
■ Hasta



■ F0-F1
■ F2

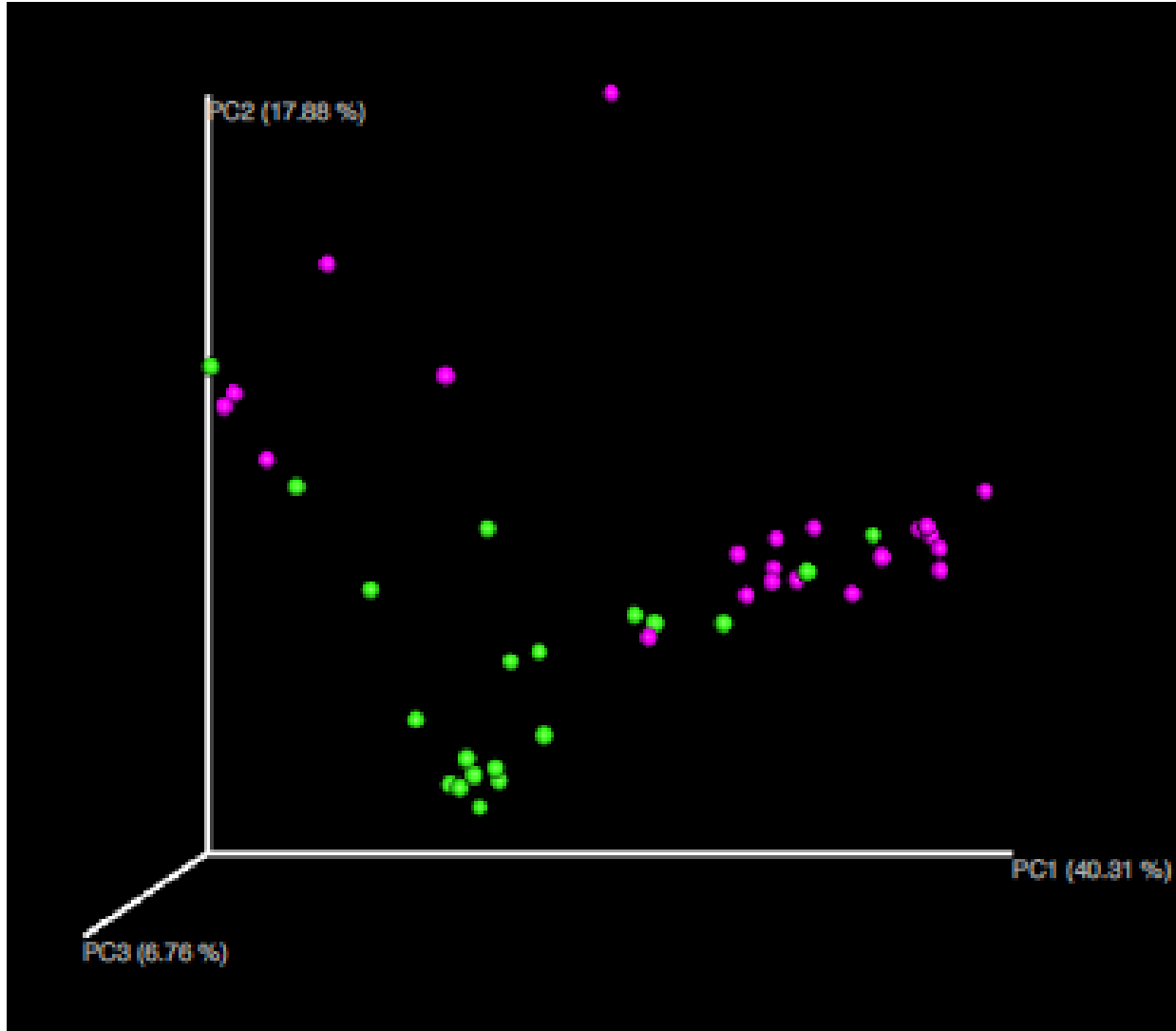
NAFLD ve kontrol grubunda beta çeşitlilik



■ Kontrol (n=23)
■ NAFLD (n=43)

P=0.004, method ANOSIM

Fibrozis derecelerine göre beta çeşitlilik



- F0-F1 (mild fibrosis) n=23
- F2 (severe fibrosis) n=20

P=0.005, method ANOSIM

NAFLD ve kontrol grubunda relatif dağılımlar



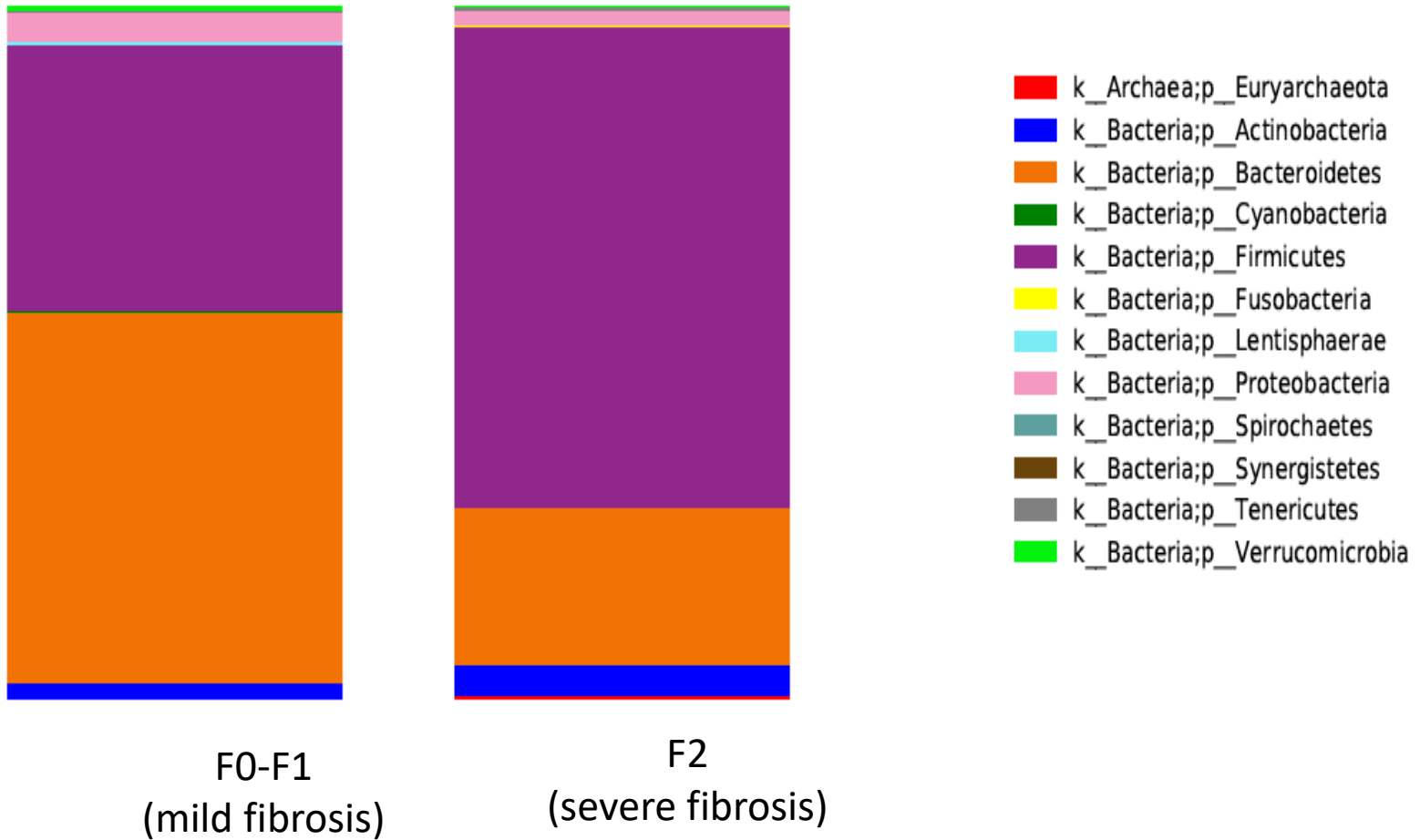
Kontrol



NAFLD

Legend	Taxonomy	Total %	Control %	NAFLD %
	k_Archaea;p_Euryarchaeota	0.3%	0.1%	0.5%
	k_Bacteria;p_Actinobacteria	3.3%	3.2%	3.4%
	k_Bacteria;p_Bacteroidetes	44.4%	55.2%	33.6%
	k_Bacteria;p_Cyanobacteria	0.2%	0.2%	0.2%
	k_Bacteria;p_Firmicutes	46.4%	34.7%	58.2%
	k_Bacteria;p_Fusobacteria	0.3%	0.6%	0.0%
	k_Bacteria;p_Lentisphaerae	0.2%	0.1%	0.3%
	k_Bacteria;p_Proteobacteria	3.6%	4.0%	3.1%
	k_Bacteria;p_Spirochaetes	0.6%	1.2%	0.0%
	k_Bacteria;p_Synergistetes	0.1%	0.0%	0.1%
	k_Bacteria;p_Tenericutes	0.4%	0.4%	0.4%
	k_Bacteria;p_Verrucomicrobia	0.4%	0.4%	0.4%

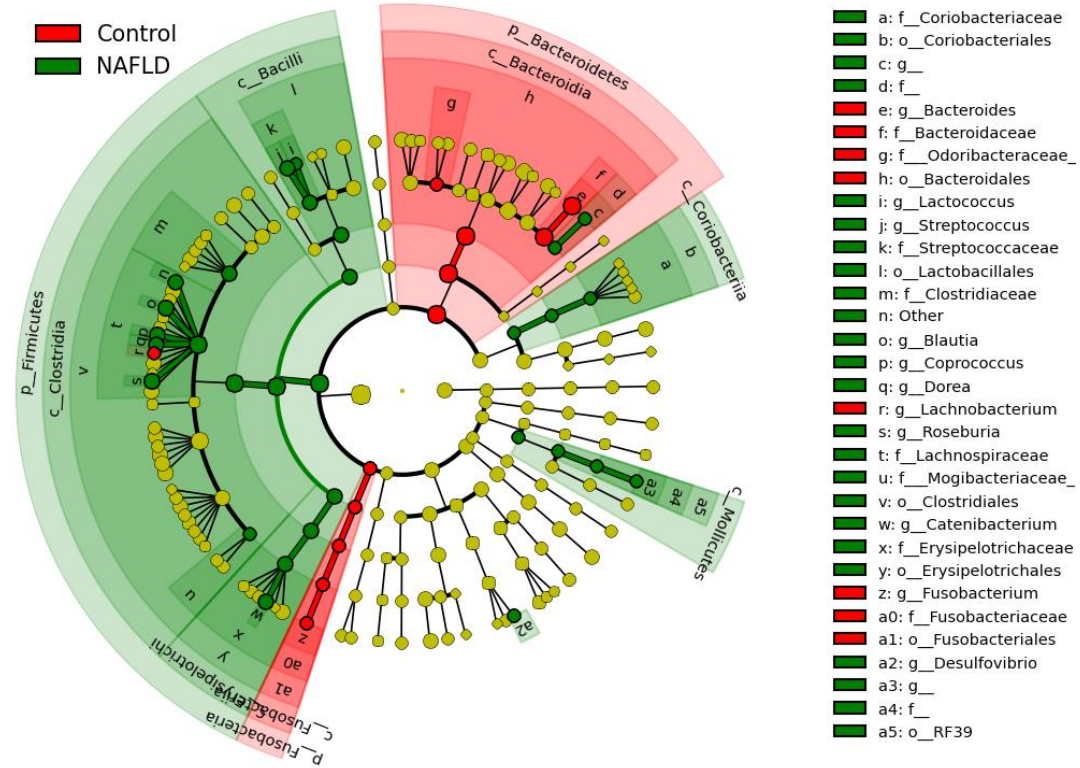
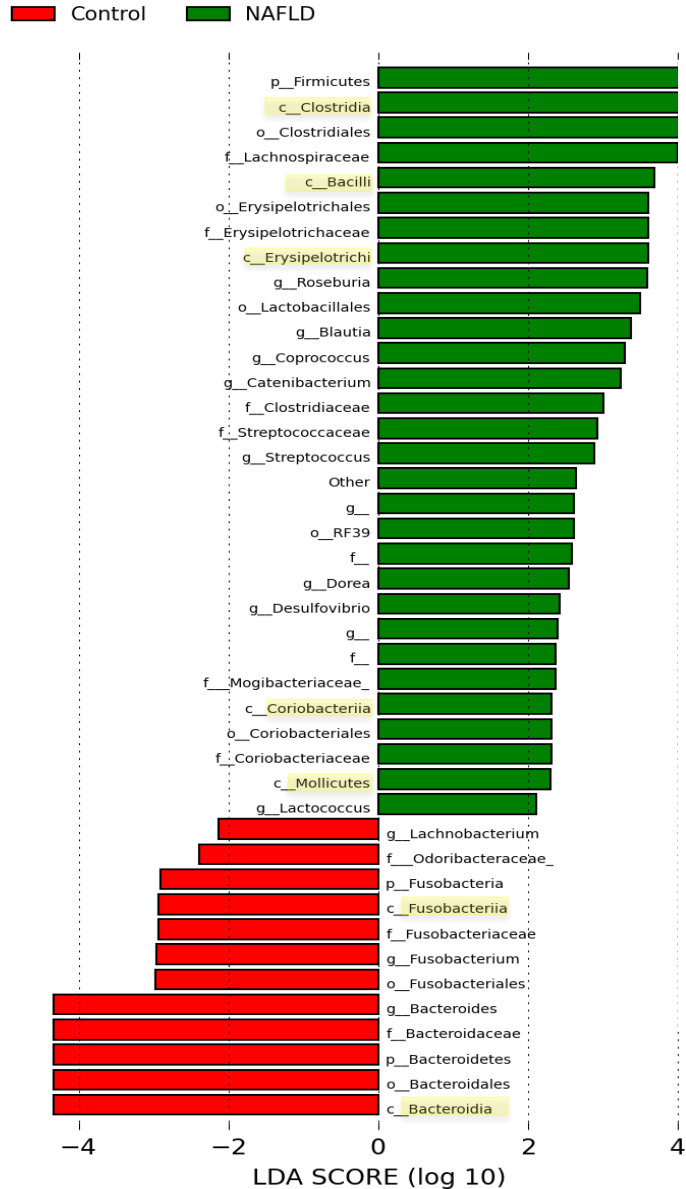
Fibrosis derecesine göre relatif dağılımlar



LefSe

- LefSe Analizi– *Linear discrimination effect size*
 - Relatif dağılımlar üzerinden farklı standart istatistiksel testler yardımıyla iki grupta anlamlı olarak farklı bakteri gruplarını belirler.
 - LDA etki derecesini gösteren grafik ve kladogramı verir.

NAFLD ve kontrol grubuna anlamlı olarak etki eden bakteri grupları



Sonuç

- Metagenomik yöntemler mikrobiyom çalışmaları için altın standarttır.
- Karaciğer patolojisi mikrobiyotada dağılım ve zenginlik olarak farklılığa neden olmuyor ancak mikrobiyota kompozisyonu gruplar arasında farklı.

Sonuç

- Bacteroidetes/Firmicutes oranı;
 - Hasta grubunda daha düşük.
 - Şiddetli fibrozis olan hastalarda daha düşük.

-Bacteroidetes/Firmicutes oranı sağlıklı mikrobiyota belirteci
-Obezite

1. Firmicutes grubu – besinlerden enerji eldesinde artış
2. Kolitojenik bakteriler — artmış translokasyon — inflamasyon artışı

Sonuç

- NAFLD
 - Clostridia
 - Bacilli
 - Erysipelotrichi
 - Coriobacteriia
 - Mollicutes

 - Roseburia
 - Desulfovibrio

 - Lactobacillales

- Kontrol
 - Fusobacteria
 - Bacteroidetes



Lactic Acid Bacteria

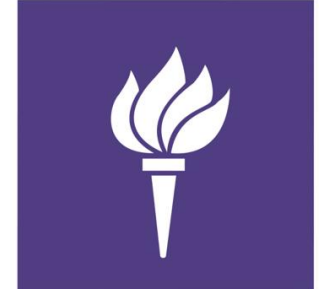


Teşekkürler,

Blaser Lab

NYU Langone Biyoistatistik Bölümü

NYU Langone Genom Merkezi



Funding

T-RO1DK090989/NIH