

3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi-2015

18-22 Kasım 2015



20.11.2015

16:00:24

3. Ulusal
Klinik Mikrobiyoloji
Kongresi-2015



18-22 Kasım 2015
Titanic Kongre Merkezi
Belek, Antalya

Non-Alkolik Karaciğer Yağlanması Olan Hastalarda Barsak Mikrobiyotası

Ceren Erdoğan¹ , Meltem Yalınay², Tarkan Karakan³

1 GÜTF Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2 GÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji, 3 GÜTF Gastroenteroloji



TÜBİTAK



İnsan Mikrobiyom Projesi

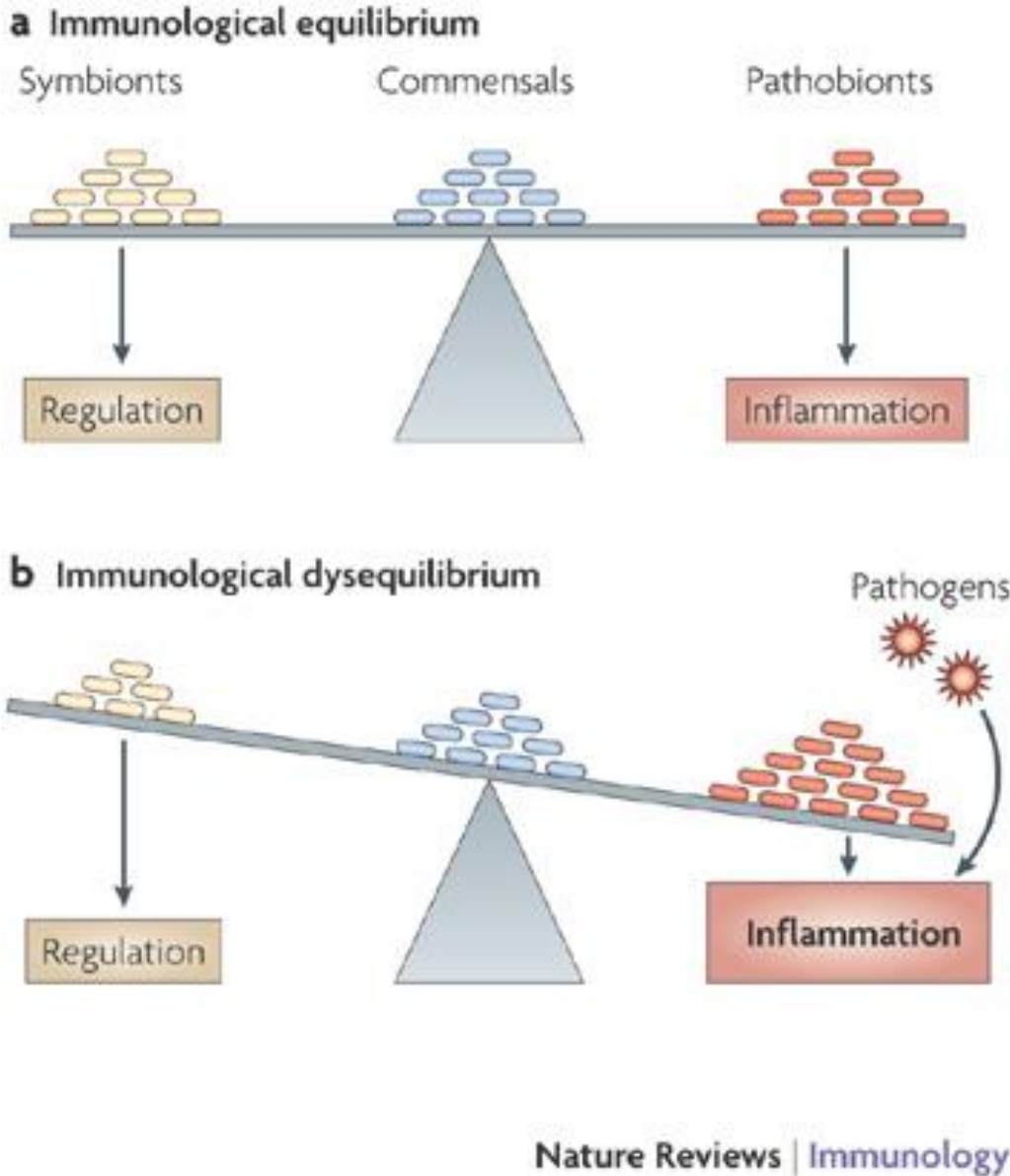
300 sağlıklı insanın 15 farklı vücut bölgesinden alınan örnekler değerlendirilerek 35 trilyon okumadan oluşan 2.3 terabayt büyüklüğünde bir metagenomik veri bankası

(NIH Human Microbiome Project, 2013)

- hastalık ve sağlıkta mikrobiyotadaki değişiklikleri
- çeşitli hastalıkların patogeneğinde mikrobiyotanın etkisini
- probiyotik tedavisi gibi tedavilerle mikrobiyotanın modifikasyonunu

Fekal Mikrobiyota

- Barsak mikrobiyotası temel olarak 7 bakteriyel şubenin elemanlarını içermektedir:
 - *Firmicutes*
 - *Bacteroidetes*
 - *Actinobacteria*
 - *Proteobacteria*
 - *Fusobacteria*
 - *Verromicrobia*
 - *Cyanobacteria*



- 10-100 trilyon arası mikroorganizma ve 500-1000 farklı tür
- Konak-mikrobiyota ilişkisi arasındaki denge!
 - Barsak duvarı geçirgenliğinin korunması
 - İmmünolojik denge
 - Patojenlere karşı antagonistik etki
 - Besinlerden enerji eldesi (karbonhidratların SCFA-kısa zincirli yağ asitlerine parçalanması)
- Mikrobiyotanın %80'den fazlası kültüre edilemiyor → moleküler yöntemler!

DİSBIYOZİS

Karaciğer
Yağlanması

Obezite

İnflamatuvar
Barsak Hastalığı

Metabolik
sendrom

Diyabet

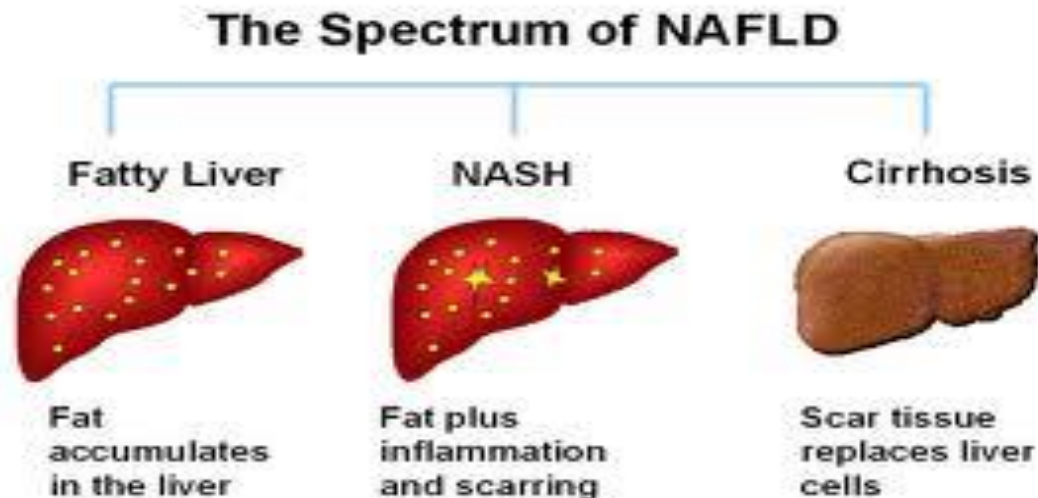
İnsülin direnci



NAFLD

(Non-alcoholic fatty liver disease)

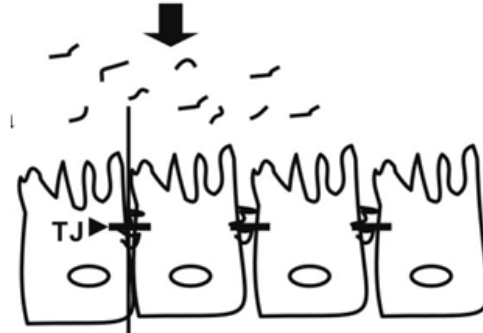
- NAFLD hepatik steatozdan NASH (non-alkolik steatohepatit) ve siroza kadar ilerleyebilen bir seri hepatik patolojiyi kapsar.
- Diyet, genetik yatkınlık, obezite risk faktörleri



NAFLD

- Mikrobiyotanın rolü?
- Karaciğer portal ven aracılığıyla barsaktan geçen ürünlere maruz kalır.
- Barsak duvarı geçirgenliğinin artması → bakteriyel ürünlerin translokasyonu → lokal (karaciğer) ve sistemik inflamasyon → fibrozis → NAFLD

- ✓ Barsak mikrobiyotasında değişiklikler
- ✓ Bakteriyel aşırı üreme
- ✓ Barsak duvarı geçirgenliğinde artış

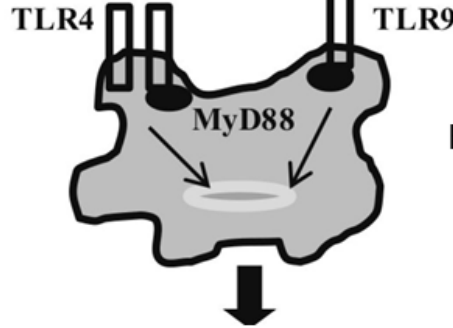


Bakteriyel ürünlerin translokasyonu
Endotoksemi

Portal ven

LPS ▲

DNA vb. diğer bakteriyel ürünler ●



Kupffer hücrelerinde TLR'lerin özellikle TLR4/MyD88 ve TLR9/MyD88'in sitokin ve kemokinlerin salınımı ile sonuçlanan aktivasyonu

Sitokin ve kemokinler

(TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-10, CCL2, CCL5, CXCL8)

Karaciğerde inflamasyon, fibrozis, steatoz

NAFLD

NAFLD

- NAFLD olan hastalarda sağlıklı kontrollerden farklı olarak hangi bakteriler kantitatif olarak farklı?
- Beklenildiği gibi endotoksin seviyesi bu hastalarda yüksek mi?
- Hastalarda artmış inflamasyon var mı?

Mikrobiyota-Moleküler Yöntemler

1. Hibridizasyon
2. PCR (**qPCR ile 16S rRNA kantitasyonu**)
3. DNA Parmak izi analizleri
 1. Denatüre edici gradient jel elektroforezi
 2. SSCP
 3. T-RFLP
4. Gen kütüphanesi oluşturulması ve 16S rRNA sekans
 1. Amplifikasyon ürünlerinin plazmid aracılığı ile transformasyonu → dizi analizi
 2. Yeni nesil dizileme

Amaç

Nonalkolik karaciğer yağlanması olan hastalar ve sağlıklı bireylerde barsak mikrobiyotasının genomik analizlerle karşılaştırılması, inflamasyona yönelik bazı belirteçlerin araştırılması

Tübitak Proje No: 114S099 "Nonalkolik Karaciğer yağlanması olan hastalar ve sağlıklı bireylerde barsak mikrobiyotasının moleküler yöntemlerle karşılaştırılması"

MAMSEL

Yöntem

- Kantitatif gerçek zamanlı PCR

Akkermansia muciniphila ATCC BAA-835,
Faecalibacterium prausnitzii ATCC 27766,
Bifidobacterium breve ATCC 15700,
Lactobacillus acidophilus ATCC 4356,
Bacteroides fragilis ATCC 25285,
Escherichia coli ATCC 25922

- ELISA
 - Inflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-6)
 - Hs (high sensitivity) - CRP
- Kromojenik LAL (Limulus Amebocyte Lysate) Testi (Endotoksin)

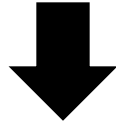
NAFLD (n=52)
Histoloji, NAS Skoru (n=42)
US, KC enzimleri (n=10)

KONTROL (n=38)



Dışkı

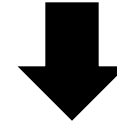
Serum



DNA Ekstraksiyonu

qPCR

A. muciniphila
F. prausnitzii
Lactobacillus spp.
Bifidobacterium spp.
B. fragilis group
Enterobacteriaceae



ELISA (TNF- α , IL-6)
Hs (high sensitivity) -
CRP

Kromojenik LAL (Limulus
Amebocyte Lysate) Testi
(Endotoksin)

qPCR-Mutlak Kantitasyon

Akkermansia muciniphila ATCC BAA-835,
Faecalibacterium prausnitzii ATCC 27766,
Bifidobacterium breve ATCC 15700,
Lactobacillus acidophilus ATCC 4356,
Bacteroides fragilis ATCC 25285,
Escherichia coli ATCC 25922



Kültür



0,5 Mc Farland Süspansiyon
cfu sayım



Ekstraksiyon



Nanodrop Ölçüm



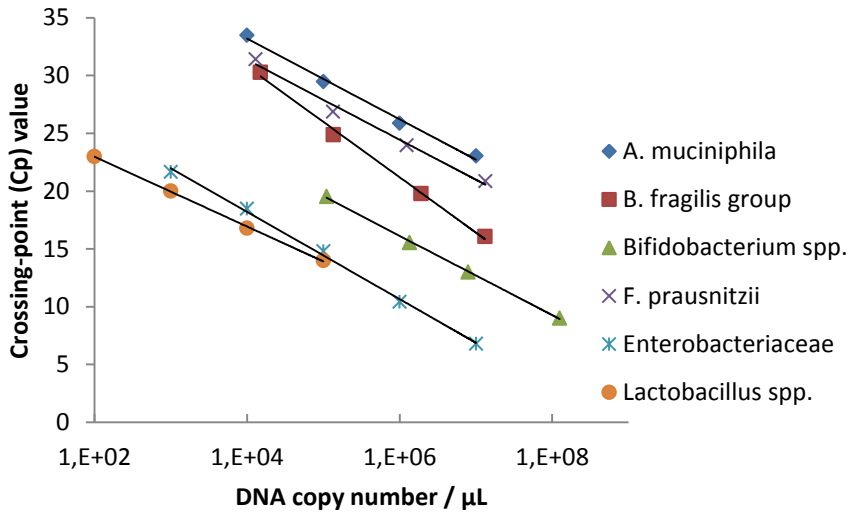
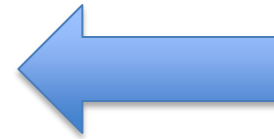
$$Kopya\ sayısı/\mu L = \frac{6 \times 10^{23} (kopya/mol) \times konsantrasyon(gr/\mu L)}{MA (gr/mol)}$$



1/10 dilüsyon



Standart eğri
(internal Kontrol)

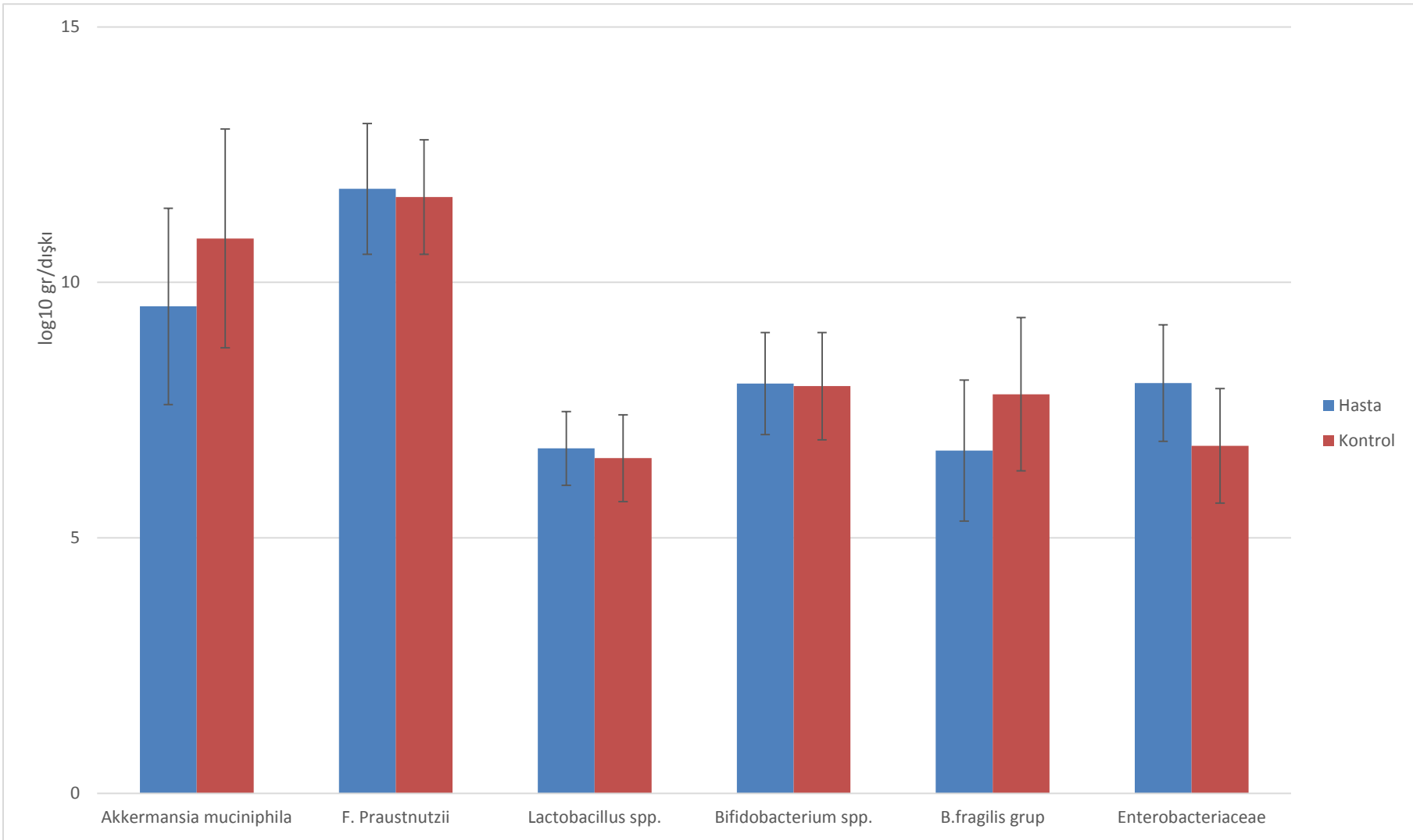


Sonuçlar

	Hasta (n=52) Ort±SD	Kontrol (n=38) Ort±SD	p*
Erkek (%)	48.1	32.4	0.100
Yaş (Yıl)	48 ± 12	36 ± 10	<0.001
BMI (kg/m ²)	29 ± 4	22 ± 2	<0.001
Bel çevresi (cm)	94 ± 9	83 ± 6	0.001
ALT (U/L)	50 ± 41	20 ± 11	<0.001
AST (U/L)	36 ± 18	21 ± 4	<0.001
ALP (U/L)	105 ± 38	62 ± 18	<0.001
Total kolesterol (mg/dL)	202 ± 43	207 ± 43	0.613
HDL (mg/dL)	45 ± 9	57 ± 10	<0.001
LDL (mg/dL)	122 ± 39	140 ± 38	0.065
Trigliserid (mg/dL)	184 ± 80	96 ± 46	<0.001
Glukoz (açlık, mg/dL)	105 ± 29	87 ± 12	<0.001
NAS Skoru**	5.7 ± 1.12	NA	NA

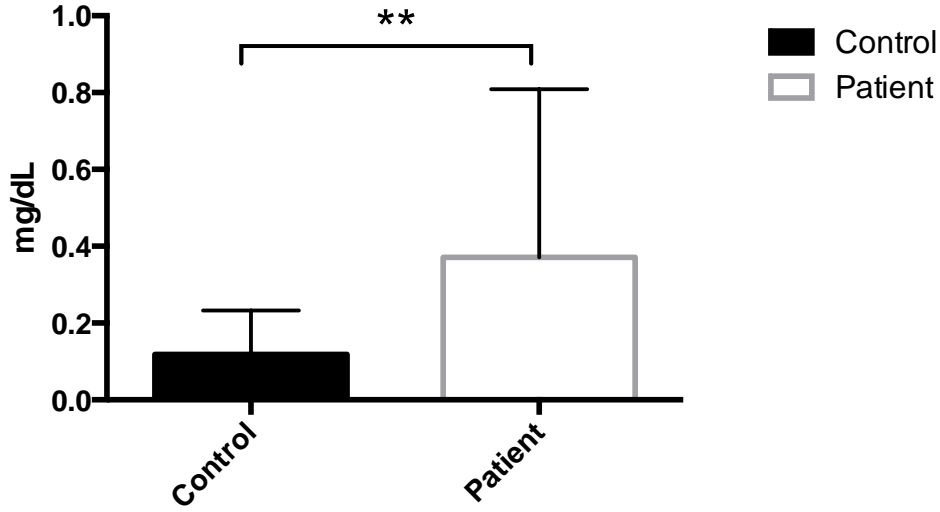
*Kleiner DE et al. "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease" Hepatology 2005; 41(6):1313–1321.

**NAS skoru: 0-2:steatohepatit; 3-4 olası steatohepatit, ≥5 steatohepatit steatozis (0–3), balonlaşma (0–2), and lobular inflamasyon (0–3)



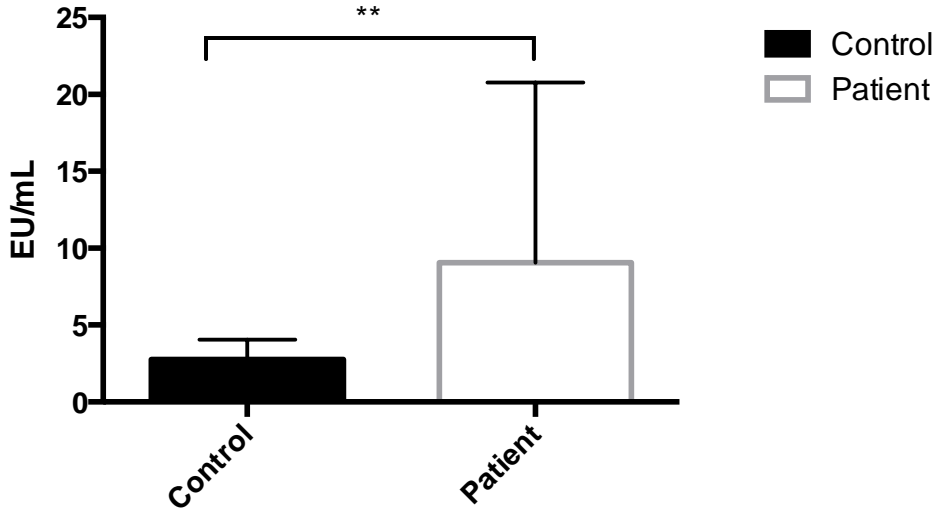
- *A. muciniphila* ve *B.fragilis* grubu bakteriler hasta grubunda anlamlı olarak **daha düşük**
- *Enterobacteriaceae* hasta grubunda **daha yüksek**

hs-CRP



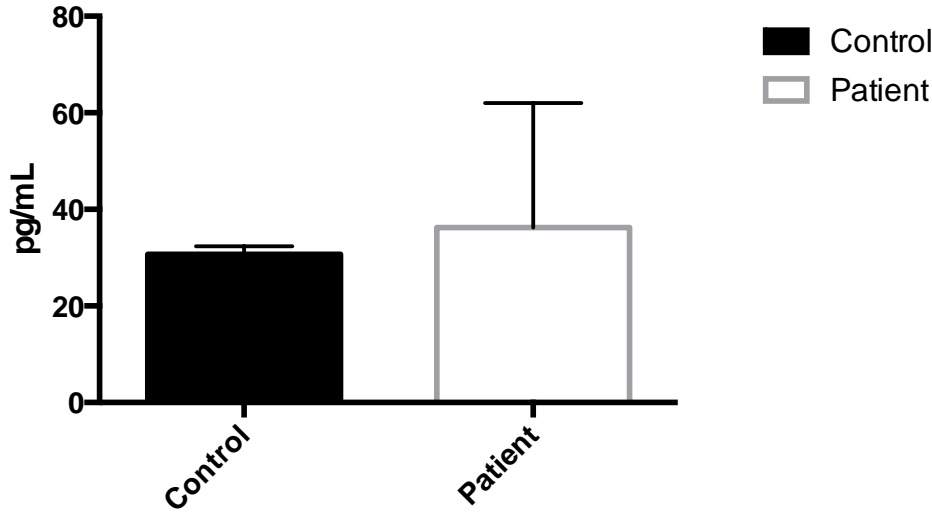
-hs-CRP (high sensitivity-CRP) özellikle karaciğerdeki inflamasyon için yüksek duyarlı bir belirteç
-Hasta grubunda artmış inflamasyona bağlı **yüksek serum hs-CRP seviyeleri**

Endotoxin

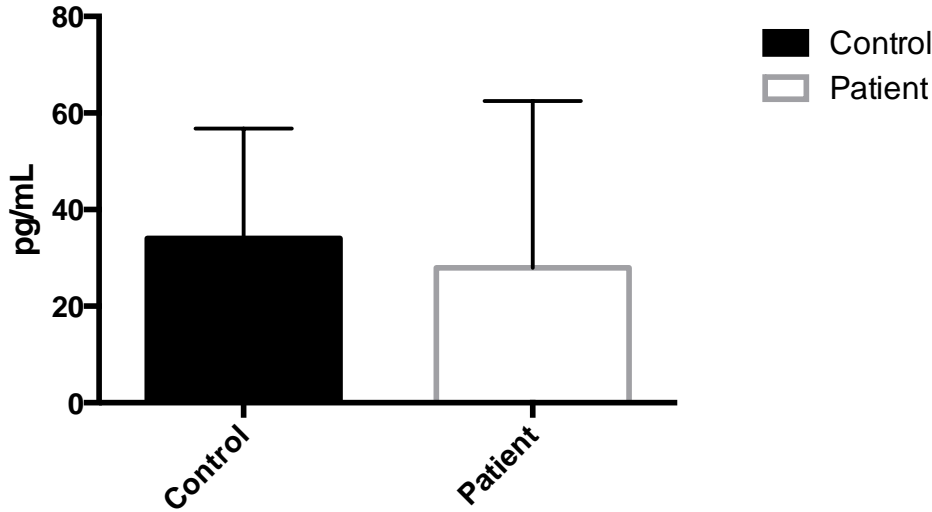


-Hasta grubunda yüksek Enterobacteriaceae düzeyi ile uyumlu olarak **yüksek endotoksin seviyesi**

TNF-alpha



IL-6



- TNF- α ve IL-6 seviyeleri bakımından fark yok.
- Serum yarı ömürleri kısa!
- İleri çalışmalarda qPCR ile gen ekspresyon analizi daha uygun bir yöntem olabilir!

Tartışma

- Bağırsak mikrobiyotasının NAFLD patogeneğinde rol oynamakta (Farrell, 2001)
- Endotoksinler inflamasyonu tetikleyen majör bileşikler olduğundan dolayı NAFLD gelişiminde önemli rolü (Harte ve ark., 2010)
- Obezite ve tip 2 diyabetle ilişkili bulunmuş olan *Akkermansia muciniphila* ve (Everard vd., 2013), *Fecalobacterium prostrnutzii*'nin (Machiels ve ark., 2013) antiinflamatuvar etkisi
- İmmün belirteç ilişkisi yok!

Endotoksemi

- Siroz hastalarında artmış endotoksin düzeyi ve artmış barsak duvarı geçirgenliği (Wiest ve ark., 2013).
- NAFLD olduğu bilinen 155 hasta ve 23 sağlıklı kontrolün serum örneklerinde endotoksin seviyesine bakılmış ve NAFLD olan hastalardaki endotoksin seviyesi sağlıklı kontrollere oranla yaklaşık 3 kat fazla bulunmuştur (Harte ve ark 2010) .

TLR-4

- TLR-4 ekspresyonunun, bununla bağlantılı olarak da serum TNF- α , IL-6 ve IFN- γ düzeylerinin, NAFLD ve siroz olan hayvan modellerinde artmış (Gao ve ark., 2011; Mueller ve ark., 2011).
- TLR-4 defekti olan ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen hayvan modellerinde azalmış hepatik steatoz (Liv ve ark., 2011).

Mikrobiyota

- Obez farelerde Gram negatif bir bakteri grubu olan Bacteroidetes oranının azaldığı (örn; Bacteroides, Prevotella)
- Gram pozitif Firmicutes grubu bakterilerin oranının arttığı (örn; Clostridium, Ruminococcus, Enterococcus, Lactobacillus) gösterilmiştir.
- Obez farelerdeki bağırsak mikrobiyotası germ-free (GF-tüm mikroorganizmalardan arındırılmış) farelere aktarıldığında vücut yağ oranının gittikçe arttığını ve vericinin fenotipik özelliklerini göstermeye başladığını göstermişlerdir (Ley ve ark., 2005).
- Firmicutes/Bacteroidetes oranındaki artış obezite ile yakından ilişkili
- Tür düzeyinde karşılaştırma yapılmamıştır!

- Kilo alımı ve yağ depolanmasının intestinal mikroflora ile ilişkisi gösterilmiş olsa da bağırsaktan köken alan faktörlerin (ör: bakteriyel endotoksinler) NAFLD seyrine etkisi ile ilgili yapılan çalışma çok azdır.
- NAFLD ile ince bağırsakta aşırı bakteri üremesi (SIBO-“small intestinal bacterial overgrowth) ve bağırsak duvarı geçirgenliğindeki artış anlamlı derecede ilişkili (Miele ve ark. 2009)
- Barsak geçirgenliğiyle birlikte endotoksin gibi bakteriyel ürünlerin portal ven yoluyla karaciğere geçişinin arttığını, portal endotoksemiye takiben karaciğer patolojilerine yol açtığını (Miele ve ark., 2009).

Akkermansia mucinophilia

- Obezite ve yağ depolanması ile yakından ilişkisi gösterilmiş olan *Akkermansia mucinophilia* bağırsak normal florasında bulunmaktadır, mün degrade eden ve besin bakımından zengin ortamlarda yüksek oranda bulunan bir bakteridir.
- Sağlıklı insanlarda normal bağırsak florasının %3-5'lik bir kısmını oluşturmakta ve sıklığının vücut ağırlığı ve yağ depolanmasıyla ters orantılı olduğu bilinmektedir (Santacruz vd., 2010).
- *Akkermansia muciniphilia*'nın obez farelerde 100 kat kadar azalmış (Everard ve ark. 2013).

LİTERATÜRE KATKI VE YENİLİKLER

- Obezite ile de ilişkilendirilen NAFLD etiyopatogenezine önemli katkısı olacak mikrobiyota bakterilerinin cins ve tür düzeyinde kantitatif olarak karşılaştırılması
- Bakteri kantitatif düzeyleri, immün belirteçler ve endotoksemi ilişkisi ve korelasyonunun ortaya konması
- *Akkermansia mucinophilia* ve *Faecalibacterium prausnitzii* bakterilerinin NAFLD ile ilişkisinin ortaya konması

Bildiđimiz kadarıyla gerek obezite gerekse karaciğer yağlanmaları üzerinde mikrobiyotanın etkisi ile ilgili ¼lkemizde yapılan ilk çalışmadır.

SONUÇLAR

- ✓ NAFLD olan hastalar ve sağlıklı kontrollerde barsak mikrobiyotası **kantitatif olarak farklıdır.**
- ✓ *A. muciniphila* ve *B. fragilis* grubu bakteriler hasta grubunda **daha düşük** oranlardadır.
- ✓ Hasta grubunda beklenildiği gibi serum endotoksin seviyeleri **daha yüksektir.**
- ✓ Barsaktaki endotoksinin birincil kaynağı olan Enterobacteriaceae hasta grubunda beklenildiği gibi **daha yüksektir.**
- ✓ İnflamasyon belirteçlerinden biri olan hs-CRP düzeyleri hasta grubunda **daha yüksektir.**

İleri çalışmalar

- Örneklerin Metagenomik Analizi (yapılıyor)
 - Roche Miseq (New York University Genome Center)
- In-vivo transfer çalışmaları
 - Germ-free farelere NAFLD fenotipinin fekal transplantasyonla aktarımı?
- Düşük düzeyde bulunan bakterilerin replasmanı?