

ИНСТИТУТ  
БИОИНФОРМАТИКИ



# Изучение микробиоты кишечника в норме и при патологиях

**Студент:** Петр Козырев

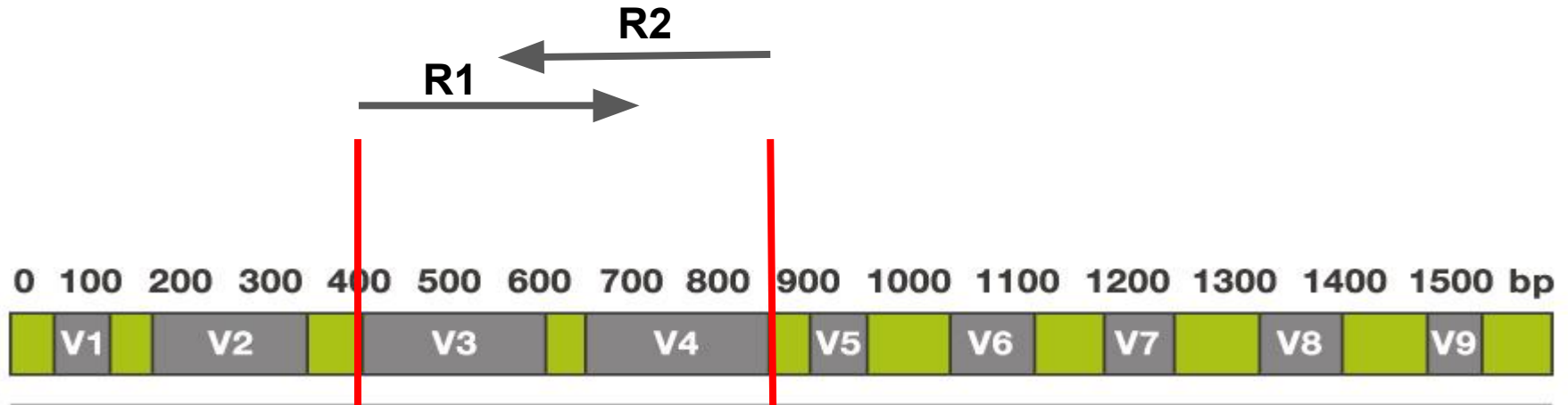
**Научный руководитель:** Алла Львовна Лapidус, профессор кафедры Цитологии и гистологии СПбГУ, Центр Алгоритмической Биотехнологии

# Кишечная микробиота и её значение

Микробиота кишечника участвует в регуляции метаболизма, а также гормонального и иммунологического статуса своего хозяина

В результате различных стрессовых воздействий может наступать дисбиоз - состояние снижения разнообразия кишечной микробиоты и экспансии отдельных бактериальных таксонов

# Секвенирование гена 16s рРНК



**CONSERVED REGIONS:** unspecific applications

**VARIABLE REGIONS:** group or species-specific applications

# Цель

На модели кишечного дисбиоза у животных отобрать наиболее перспективные виды/консорциумы бактерий, пригодные для персонафицированной терапии дисбиотических состояний на фоне приёма антибиотиков

Исследовать влияние данных препаратов на людях, больных СРК (синдром раздраженного кишечника), и сделать вывод о наиболее перспективном варианте аутопробиотического лечения



# Глобальные задачи

- Выбор программ для анализа 16S данных
- На модели крыс оценить изменение микрофлоры на различных стадиях эксперимента
- Провести исследование образцов людей, больных СРК, и предположить возможный путь лечения

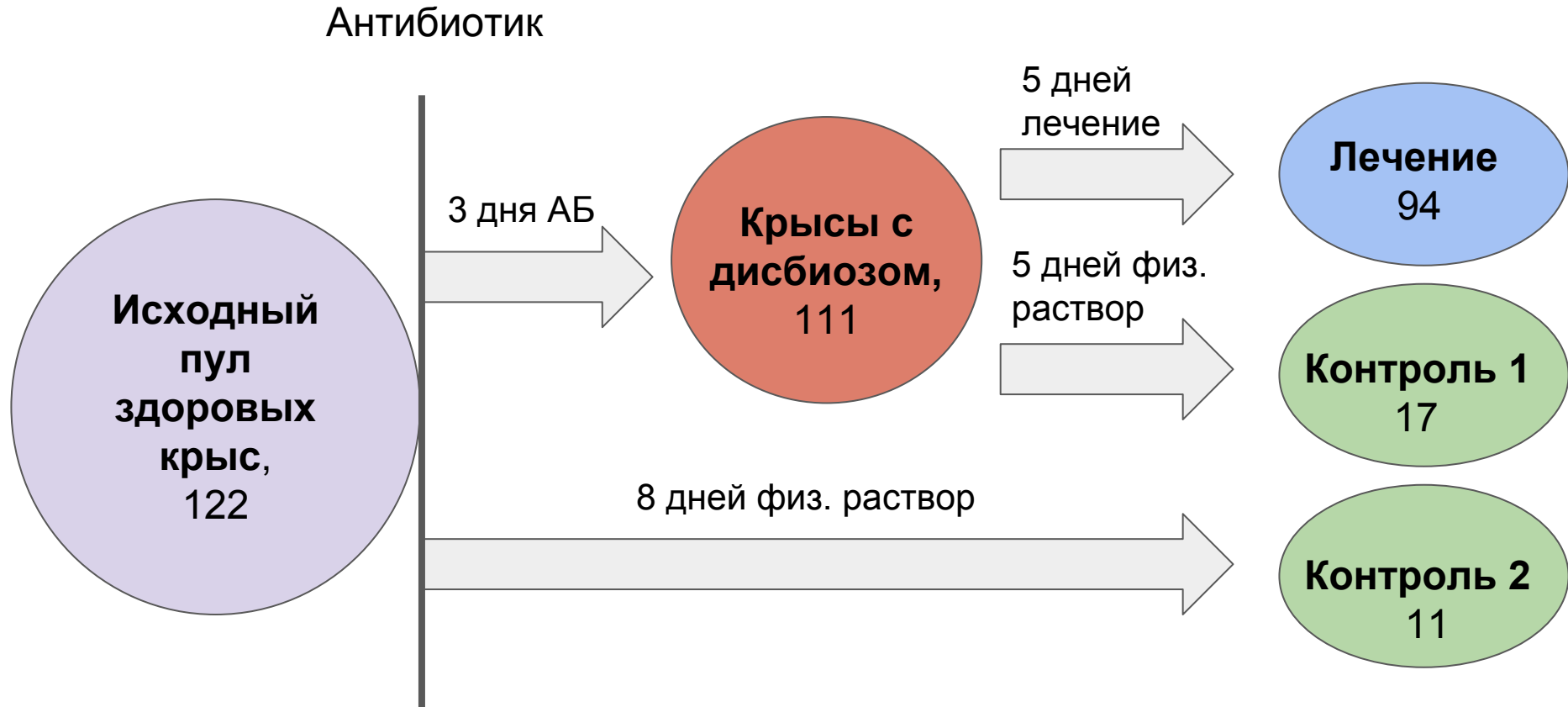
# Группы животных

<b>start</b>	проба до воздействия
<b>AB</b>	3 дня АП*
<b>K1</b>	3 дня АП, 5 дней физ. раствор
<b>K2</b>	8 дней физ. раствор
<b>lacto</b>	3 дня АП, 5 дней аутопробиотические лактобациллы
<b>cocc</b>	3 дня АП, 5 дней аутопробиотические энтерококки
<b>bifido</b>	3 дня АП, 5 дней аутопробиотические бифидобактерии
<b>auto</b>	3 дня АП, 5 дней аутопробиотические лактобациллы, энтерококки, бифидобактерии
<b>feces</b>	3 дня АП, 5 дней в 100 раз разведенные фекалии
<b>anaero</b>	3 дня АП, 5 дней бактерий выращенных на фекалиях
<b>L3</b>	3 дня АП, 5 дней пробиотические энтерококки

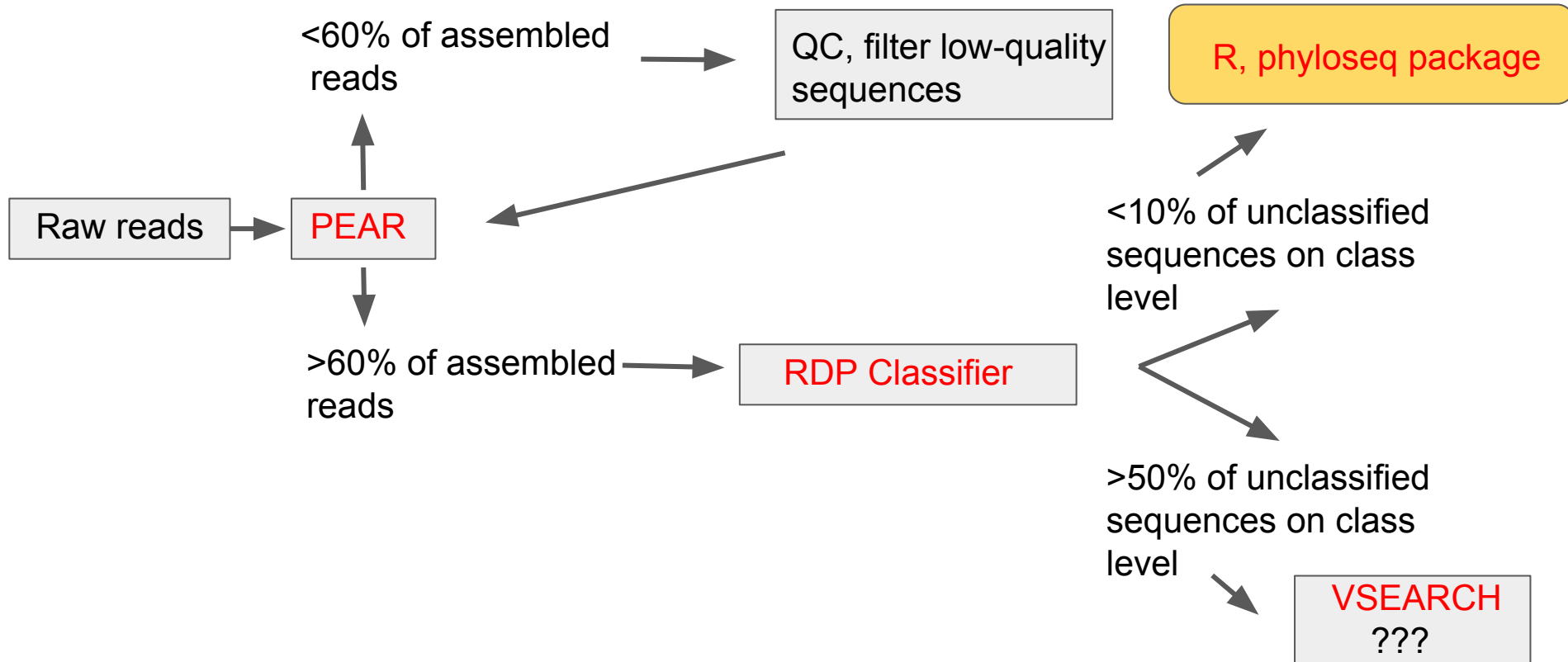
**\*АП -- антимикробные препараты**



# Схема эксперимента

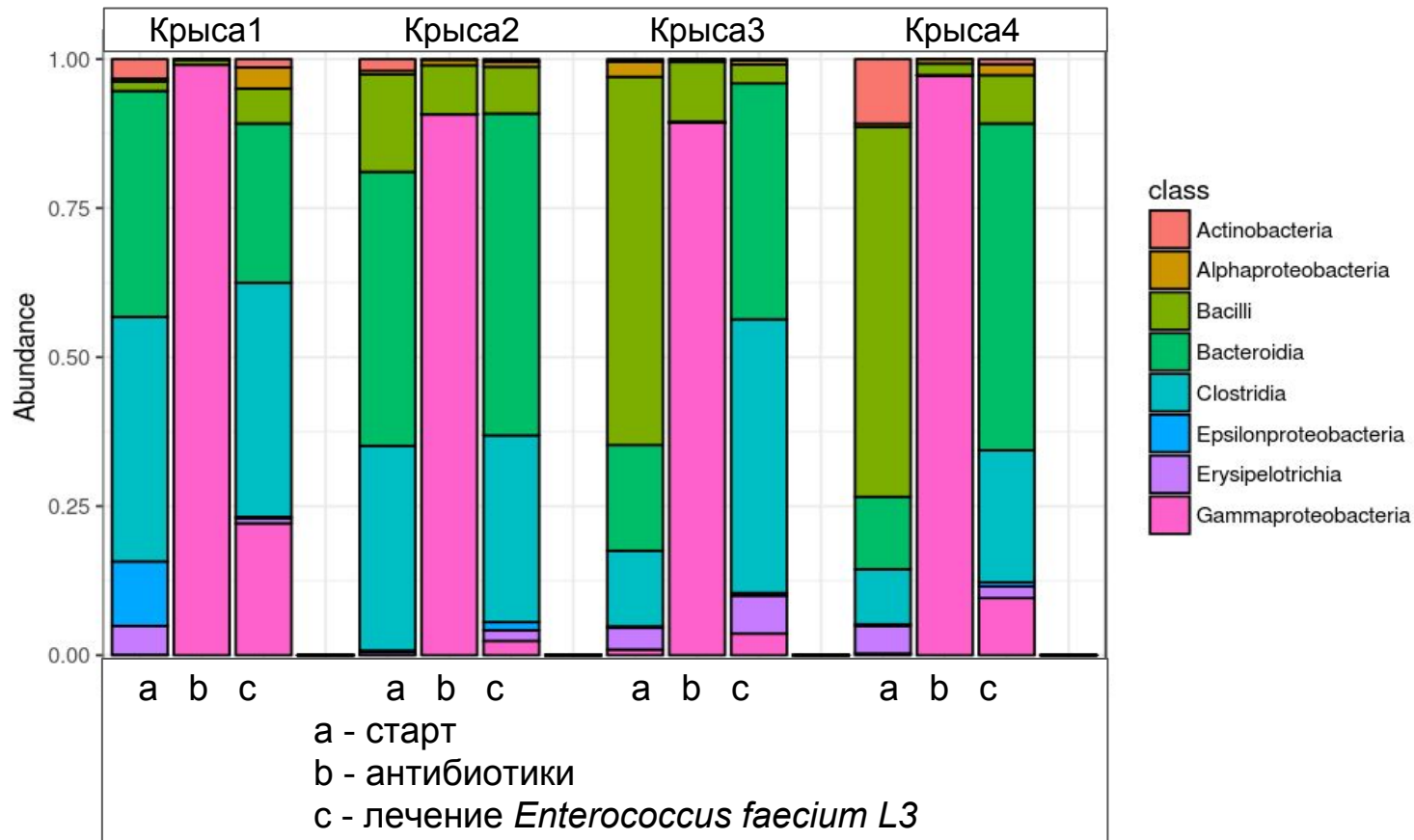


# Ход работы





# Лечение *Enterococcus faecium* L3 приводит к восстановлению разнообразия микробиоты у 4 разных крыс



# В чём может быть причина такой плохой классификации?

- Проблема с ошибками из-за склеивания ридов не подтвердилась (web BLAST)
- Выравнивание на референс RDP не показало какой-то закономерности в выравнивании, некоторые последовательности выравнивались неплохо (blast+)



На данный момент отсутствуют данные для выводов об эффективности различных аутопробиотиков

Была поставлена **ещё одна задача** - проанализировать разные пайплайны для метагеномных данных

# RDPipeline

- Не всё используем, а только классификатор (RDP Classifier)
- Наивный байесовский классификатор, написан на java
- Классификатор способен оценивать представленность таксона с учётом разного числа копий гена 16S у разных бактерий
- Есть веб-интерфейс и утилиты, запускаемые из командной строки



# QIIME vs mothur



QIIME

- Бывают проблемы с форматированием fasta файлов
- Обертка на Python для разных программ
- Много зависимостей
- Плохо с обновлениями
- Некоторые функции выглядят, как черный ящик

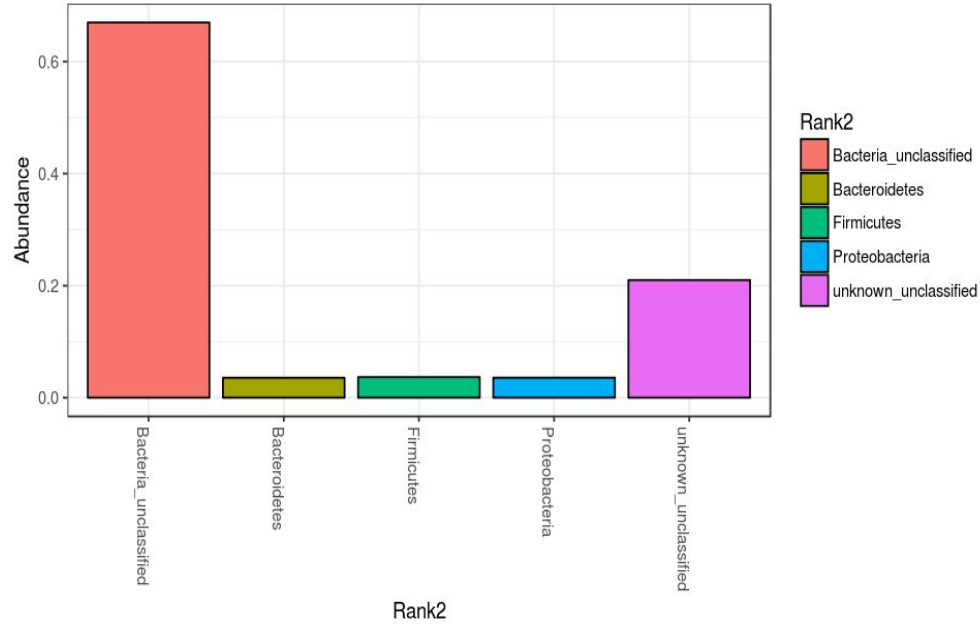


Mothur

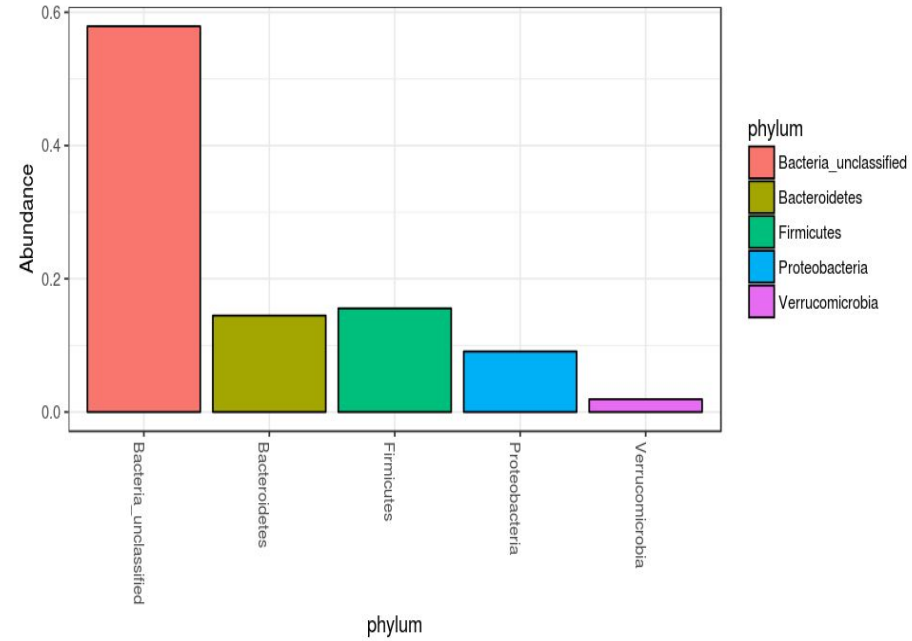
- Реализованы существующие алгоритмы
- Написан на C и C++
- Является самостоятельной программой
- Активный форум
- Кросс-платформенность
- Не подходит для большого объема данных

# Сравнение классификации RDP Classifier и mothur

## mothur

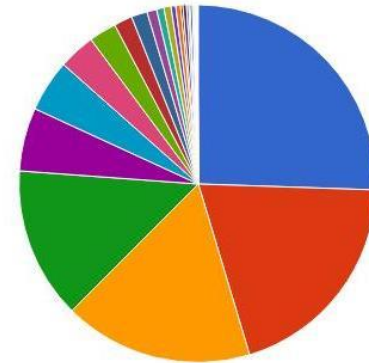


## RDP classifier



- Web-based
- Очень долго работает
- Не требует никаких биоинформатических навыков
- Мало настраиваемых параметров
- Интеграция с другими программами?

Class



Clostridia	- 848 (25.63%)
Bacteroidia	- 652 (19.70%)
unclassified (derived from Bacteria)	- 564 (17.04%)
unclassified (derived from Viruses)	- 454 (13.72%)
Bacilli	- 191 (5.77%)
Methanobacteria	- 153 (4.62%)
Gammaproteobacteria	- 110 (3.32%)
unclassified (derived from Streptophyta)	- 82 (2.48%)
Verrucomicrobiae	- 54 (1.63%)
unclassified (derived from Euryarchaeota)	- 51 (1.54%)
Alphaproteobacteria	- 28 (0.85%)
Negativicutes	- 21 (0.63%)
Actinobacteria (class)	- 20 (0.60%)
Deltaproteobacteria	- 16 (0.48%)

# Сравнение относительной скорости работы RDP Classifier, mothur и MG-RAST

RDP Classifier > mothur >> MG-RAST



# Результаты

- Подобраны программы для обработки и анализа данных 16S: PEAR, RDP Classifier, VSEARCH, phyloseq R package
- После приема антибиотиков один из вариантов лечения (*Enterococcus faecium* L3) в короткие сроки привел к восстановлению разнообразия микробиоты подопытных крыс
- Рассмотрены основные пайплайны для метагеномного анализа

# Планы на будущее

- Провести более детальный анализ изменения кишечной микробиоты на большей выборке животных
- Исследовать состав кишечной микробиоты в образцах людей, больных СРК
- Сделать вывод о наиболее перспективном варианте персонализированного лечения