CUMHURİYET'İN 100. YILI KİTAPLIĞI

100th ANNIVERSARY OF THE REPUBLIC BOOKS

MİKROBİYOTANIN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

EFFECTS OF MICROBIOTA ON HUMAN HEALTH

Editörler / Editors: Mustafa Oral ÖNCÜL, Zerrin AKTAŞ



İSTANBUL UNIVERSITY PRESS

MİKROBİYOTANIN İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

EFFECTS OF MICROBIOTA ON HUMAN HEALTH

Editörler / Editors

Prof. Dr., Mustafa Oral ÖNCÜL

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Prof. Dr., Zerrin AKTAŞ

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

İSTANBUL UNIVERSITY PRESS

Yayıncı / *Published by*
İstanbul Üniversitesi Yayınevi / *Istanbul University Press*
İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Türkiye

https://iupress.istanbul.edu.tr

Mikrobiyotanın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri / *Effects of Microbiota on Human Health*
Editörler / *Editors*: Mustafa Oral ÖNCÜL, Zerrin AKTAŞ

E-ISBN: 978-605-07-1598-9

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011

İstanbul Üniversitesi Yayın No / *Istanbul University Publication No*: 5344

Online Yayın, Nisan 2024 / *Published Online in April 2024*

Kapak Görselinin Tasarımı / *Cover Image Design:* Ceylin ERZEN

Bu çalışmaya atıfta bulunurken, referansa DOI numarasının dahil edilmesi önerilir.
It is recommended that a reference to the DOI is included when citing this work.

Bu çalışma Creative Commons Atıf-GayrıTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı altında online olarak yayındadır.
This work is published online under the terms of Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0)
https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Kitabın telif hakkı bulunmaktadır. Online olarak yayınlanan Creative Commons versiyonu haricinde, yasal istisnalar ve geçerli lisans sözleşmelerinin koşulları dikkate alınmalıdır.
This work is copyrighted. Except for the Creative Commons version published online, the legal exceptions and the terms of the applicable license agreements shall be taken into account.

Bu kitap İstanbul Üniversitesi Yayınevi'nin, Cumhuriyet'in 100. Yılı kitap projesi kapsamında yayınlanmıştır. ***/ This book was published as part of the Istanbul University Press' 100th Anniversary of the Republic book project.***

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ÖN SÖZ / PREFACE
Oral ÖNCÜL, Zerrin AKTAŞ vii

1. BÖLÜM / CHAPTER 1
BAĞIRSAK MİKROBIYOTASININ BESLENME VE SAĞLIKTAKİ ROLÜ
GUT MICROBIOTA IN HUMAN METABOLIC HEALTH AND DISEASE
Mustafa Oral ÖNCÜL, Zerrin AKTAŞ 1

2. BÖLÜM / CHAPTER 2
VİROBİYOTA VE VİROM
VIROBIOTA AND VIROME
Gülşah TUNÇER 49

3. BÖLÜM / CHAPTER 3
İNSAN MİKROBİYOTASINDAKİ MANTARLAR: ROLLERİ VE ÖNEMİ
FUNGI IN THE HUMAN MICROBIOTA: THEIR ROLE AND IMPORTANCE
Dilek ŞATANA 75

4. BÖLÜM / CHAPTER 4
İNSAN ÜROGENİTAL SİSTEM MİKROBİYOMU
HUMAN GENITOURINARY TRACT MICROBIOME
Fatma ERDEM 117

5. BÖLÜM / CHAPTER 5
PROBİYOTİK, PREBİYOTİK VE SİNBİYOTİKLERİN MİKROBİYOTA ÜZERİNE ETKİLERİ
EFFECTS OF PROBIOTICS, PREBIOTICS AND SYNBIOTICS ON MICROBIOTA
Lütfiye ÖKSÜZ 135

6. BÖLÜM / CHAPTER 6
FEKAL MİKROBİYOTA TRANSPLANTASYONUNUN ÇOCUK HASTALARDA KULLANIMI
THE USE OF FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION IN PEDIATRIC PATIENTS
Tuğçe Göksu YILMAZ, Elif TÜRKMEN 179

7. BÖLÜM / CHAPTER 7
PARKİNSON HASTALIĞINDA DEĞİŞMİŞ MİKROBİYOTA PROFİLİ
ALTERED MICROBIOTA PROFILE IN PARKINSON'S DISEASE
Gülsen BABACAN YILDIZ 191

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

8. BÖLÜM / CHAPTER 8
MİKROBİYOTA, AŞILAR VE PATOJENLERE KARŞI KORUYUCU BAĞIŞIKLIĞI ETKİLER Mİ?
DOES IT AFFECT PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST MICROBIOTA, VACCINES AND PATHOGENS?
Oral ÖNCÜL, Zerrin AKTAŞ..... 209

9. BÖLÜM / CHAPTER 9
DOĞAL MINERALLI SULARIN BAĞIRSAK İNFLAMASYONU VE BAĞIRSAK MUKOZASI İLE İLİŞKiLİ MİKROBİYOTA ÜZERİNE FAYDALI ETKİLERİ
BENEFICIAL EFFECTS OF NATURAL MINERAL WATERS ON INTESTINAL INFLAMMATION AND THE MUCOSA-ASSOCIATED MICROBIOTA
Sevinç BABA 231

10. BÖLÜM / CHAPTER 10
MİKROBİYOM ANALİZİ
MICROBIOME ANALYSIS
Uğur SEZERMAN, Ali ARSLAN, Pınar ONAT, Berkay Yekta EKREN 247

ÖN SÖZ / PREFACE

Mikrobiyota, insan vücudunda yaşayan tüm mikroorganizmalar (yaklaşık 90 trilyon bakteri, arkea, ökaryotik mikroorganizma ve virus) olarak tanımlanabilir; mikrobiyom ise yerleşik mikrobiyal topluluklar tarafından üretilen genler ve gen ürünlerinden (nükleik asitler, proteinler, metabolitler) oluşur. Yüksek verimli DNA ve RNA dizileme teknolojilerinin ve hesaplama metadolojilerinin ortaya çıkışı, bilim adamlarının küresel mikroorganizma serisini sistematik olarak sınıflandırmasına olanak sağlamıştır. Farklı vücut habitatları, mikrobiyal bileşimlere ve işlevlere (metabolik modüller ve yollar) göre farklılık gösteren mikrobiyal topluluklar (bakteriler ve diğer mikrobiyal taksonlar) içerir. Mikrobiyal bileşimdeki farklılıklar, insan mikrobiyotasının metabolik kapasitesinde ve toplam işlevinde farklılıklara yol açar. Örneğin intestinal mikrobiyota, metabolik, sistemik ve immünolojik birçok olayda önemli rol oynayan bir organ gibi davranmaktadır. Mikrobiyotanın, fonksiyonel bağırsak hastalıkları, inflamatuar bağırsak hastalıkları, obezite, metabolik sendrom, diyabetes mellitus, ateroskleroz, gibi hem GİS hem de GİS dışı birçok farklı sistemi ilgilendiren hastalıklarla yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Bağırsak mikrobiyotası ayrıca doğal bir adjuvan görevi görmekte, konağın bağışıklık tepkilerini düzenleyebilmekte ve çapraz reaksiyonu tetiklemek ve aşının etkinliğini arttırmak için aşı antijenlerine benzer epitoplar taşıyabilmektedir.

Bu kitabın birinci bölümünde; bağırsak mikrobiyotasının beslenme ve sağlıktaki rolü, mikrobiyotanın bağışıklık sistemine etkileri, güncel literatürler eşliğinde anlatılmıştır. İkinci bölümde; bağırsak viromuyla hastalıkların ilişkisi, virom değişikliği ile inflamatuar barsak hastalığı, tip 1 ve 2 diyabetes mellitus, obezite, HIV enfeksiyonu, karaciğer hastalıkları, malignite ve COVID-19 ilişkisine değinilmiştir. Üçüncü bölümde; mantarların (özellikle *Candida* ve *Saccharomyces spp*) konak bağışıklığı ile etkileşimleri ele alınmıştır. Dördüncü bölümde; ürogenital mikrobiyom dağılımı değerlendirilmiş, mikrobiyomun hastalıklarla ilişkisi, mikrobiyota içerikli biyolojik terapotiklerin (probiyotikler vb.) ürogenital sistem hastalıklardan korunma ve mevcut tedavilere (antimikrobiyal, antikanser tedaviler) katkısı değerlendirilmiştir. Beşinci bölümde; mikrobiyotayı düzenlemek için kullanılan probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler güncel bilgiler ışığında ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Altıncı bölümde; pediatrik yaş grubunda fekal mikrobiyota transplantasyonunun (FMT) önemine değinilmiş, klinik uygulamalar ve FMT uygulamasının pediatrik ve erişkin yaş grubundaki farklılıkları klinik tecrübelerle anlatılmıştır. Yedinci bölümde; alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığında görülen mikrobiyota değişiklikleri ve bunun hastalığın etiyopatogenezindeki olası etkileri, güncel klinik deneyimler ışığında tartışılmıştır. Sekizinci bölümde; mikrobiyotanın, aşılara ve patojenlere karşı bağışıklığı etkileyip etkilemediği sorusuna bilimsel verilerle cevap aranmaya çalışılmıştır. Dokuzuncu bölümde; minerallerin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Onuncu bölümde; örnek alımından veri analizine kadar kullanılan moleküler yöntemler, uyulması gereken kurallar, laboratuvar çalışmaları ve yöntemlerde karşılaşılan sorunlar, dizileme teknolojileri, biyoenformatik analiz yöntemleri, analiz temelli problemler ve kalite çalışmaları ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Bu kitabın oluşturulmasında katkıda bulunan yazarlarımızın her birine, benzersiz uzmanlıklarını, tecrübelerini, kişisel deneyimlerini paylaştıkları ve kıymetli zamanlarını ayırdıkları için çok teşekkür ediyoruz. Ayrıca kitabın kapak sayfası tasarımını yapan, İstanbul Tıp Fakültesi, İngilizce Tıp Bölümü beşinci sınıf öğrencisi Ceylin Erzen'e katkılarından dolayı çok teşekkür ediyoruz. Son olarak, İstanbul Üniversitesi ve İstanbul Üniversitesi Yayınevine kitabın basımı aşamasında gösterdiği büyük emek ve katkılarından ötürü teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Bilim alanındaki her bir bireyin yetişmesini ve bugünlere gelmesini sağlayan Cumhuriyetimizin kuruluşunun 100. yılı nedeniyle hazırladığımız bu kitabın, mikrobiyota alanındaki temel bilgileri, mevcut araştırmaları, klinik uygulamaları, güncel teknolojileri ve ortaya çıkan eğilimleri keyifle okumaya yardımcı olacağını umuyoruz. Saygılarımızla.

Prof. Dr. Oral ÖNCÜL

Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ

1. BÖLÜM / CHAPTER 1

BAĞIRSAK MİKROBIYOTASININ BESLENME VE SAĞLIKTAKİ ROLÜ

GUT MICROBIOTA IN HUMAN METABOLIC HEALTH AND DISEASE

Mustafa Oral ÖNCÜL[1], Zerrin AKTAŞ[2]

[1]Prof. Dr. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: oraloncül@istanbul.edu.tr

[2]Prof. Dr. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: zaktas@istanbul.edu.tr

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.001

ÖZ

Mikrobiyota bakterileri, arkeleri, virüsleri, fajları ve mantarları içerir. Bugünkü bilgilerimize göre, bakteriler, özellikle türler açısından en belirgin mikrobiyota olma özelliğindedir. Mikrobiyomlar, insanın incelenen her ekolojik nişinde, yani ağız boşluğunda, cilt yüzeyinde, bağırsak yolunda, yemek borusunda, akciğerlerde ve diğer bölgelerinde mevcuttur. Tahminler değişiklik göstermekle birlikte insan mikrobiyotasını oluşturan 1000'den fazla farklı mikroorganizma türü olabilir. Bağırsak mikrobiyomunun bakteri türleri, vücudun diğer bölgelerindeki mikrobiyomlardan daha fazla çeşitlilik gösterir. Bağırsak mikrobiyotası, konakçı sindirimi ve beslenmesinin ayrılmaz bir parçasıdır ve substratlardan besin üretebilirler. Bağırsak mikrobiyotası, bağışıklık sisteminin gelişimini şekillendirerek, diyetteki besinleri (yağ asitleri, glikoz ve safra asitleri gibi) ve ilaçları metabolize ederek, karmaşık sindirilmeyen polisakkaritleri sindirerek ve vitaminleri ve biyoaktif molekülleri sentezleyerek konak sağlığında önemli bir rol oynar. Bu simbiyotik ilişki, vücut sağlıklı olduğu sürece mikroorganizmalara ve konakçılarına yarar sağlar. Bağırsak mikrobiyomunun bileşimi ve işlevindeki değişkenlik, bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliği veya belirli taksonların varlığı, yokluğu veya miktarı gibi özellikleri ile konakçı sağlığı arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma vardır. Bağırsak mikroorganizmalarının bağırsak ve ekstraistestinal bozukluklar da dahil olmak üzere çok çeşitli insan hastalıklarında rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bağırsak mikrobiyotası, disbiyozis, mikrobiyota etkileşimleri, mikrobiyota ilişkili hastalıklar

ABSTRACT

The human microbiome comprises of collective genomes of microbiota inhabiting us, namely protozoa, archaea, eukaryotes, viruses and predominantly bacteria that live symbiotically on and within various sites of the human body. According to our current knowledge, bacteria tend to be the most prominent microbiota, particularly in terms of species. Microbiomes exist in every human ecological niche that has been examined, the oral cavity, skin surface, intestinal tract, oesophagus, lungs and other. Estimates vary, but there could be over 1,000 different species of microorganisms making up the human microbiota. The bacterial species of the gut microbiome present a greater degree of diversity than microbiomes at other body sites. The gut microbiota are integral to host digestion and nutrition, and they can generate nutrients from substrates. The gut microbiota plays a major role in host health by shaping the development of the immune system, metabolizing dietary nutrients (such as fatty acids, glucose and bile acids) and drugs, digesting complex indigestible polysaccharides and synthesizing vitamins and bioactive molecules. This symbiotic relationship benefits microbes and their hosts as long as the body is in a healthy state. There are numerous studies investigating the relationship between the variability in the composition and function of the gut microbiome, the diversity of the gut microbiota, or the presence, absence or quantity of certain taxa, and host health. Various studies have shown that intestinal microorganisms play a role in a wide variety of human diseases, including intestinal and extra-intestinal disorders.

Keywords: Gut microbiota, dysbiosis, microbiota interactions, host disease

Extended Abstract

The gut microbiome includes the collective genes and genome of all microorganisms residing in the gastrointestinal tract (GIT). There are over 100 trillion microbes residing in the human GIT, and majority of them are located in the colon. Recent studies indicated that the human body accommodates approximately 3.8×10^{12} bacterial cells, with a wide range of them colonizing in the human intestinal tract. An enormous variety of bacteria has been seen among healthy individuals. However, some bacterial phyla dominate the vast microbial community, for example, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, and Verrucomicrobia. Metagenomic studies demonstrate that there are ~1,952 uncultured bacterial species in the human gut, and many remain unclassified to date. However, the composition tends to be dynamic and less diverse during early-life infancy to toddler age and in elderlies This contributes to substantial diversity within the microbial ecosystem. The host-microbe relationship can be symbiotic or pathogenic. The microbiome's diversity and precise composition differ depending on factors, including human genetics and immune interactions during early development, lifestyle, food, and antibiotics' use. Dietary fibers, microbiota accessible carbohydrates (MAC), and certain plant-based proteins are metabolized to short chain fatty acids (SCFAs). SCFAs exhibit anti-inflammatory properties, maintain mucosal integrity, and retain microbial diversity. Gut microbiota also plays an important role in the co-metabolism of bile acids with the host.Besides SCFA, bile acids gut microbiota-synthesized micronutrients such as vitamins exhibit beneficial value for both microbial and

host metabolisms. Vitamin-K-producing gut bacteria namely *Bacteroides fragilis, Eubacterium lentum, Enterobacter agglomerans, Serratia marcescens,* and *Enterococcus faecium*) anaerobically synthesize vitamin K2 (menaquinone) which is essential in decreasing vascular calcification, elevating HDL and lowering cholesterol levels, contributing to lower risk of cardiovascular disorders such as atherosclerosis and coronary heart disease. Gut microbiota also serves as an important source of vitamins B for the host. Among them, vitamins B5 and B12, which are exclusively synthesized by intestinal microbiota, act as coenzyme for extensive range of host biochemical processes including production of acetylcholine and cortisol which are required for normal functioning of the nervous system. Deficiency of vitamins B5 and B12 have been linked to several disorders such as gastrointestinal discomfort, insomnia, neuropsychological and hematological disorders.

Gut barrier which is composed of mucus layer and epithelial layer (containing several junctional protein structures that regulate barrier integrity and paracellular permeability), serves as the interface between the outside world and host internal environment. Another important role of human microbiota is colonization resistance where indigenous microbiota confers protection to host against colonization of pathogenic invader and prevention against overgrowth of pathogenic microbiota members (pathobionts). Dysbiosis refers to a reduction in microbial diversity, combined with a loss of beneficial taxa, and an increase in pathogenic microorganisms. Indeed, dysbiosis of gut microbiota is associated not only with intestinal disorders but also with numerous extra-intestinal diseases such as metabolic and neurological disorders. *C. difficile* is a classic example of pathobiont, it is also one of the *Firmicutes* members in normal gut microbiota. Catalytic activity of *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) damages cytoskeleton and colonic epithelial barrier integrity, thereby inducing aberrant inflammatory response and cell death. *C. difficile* infection (CDI)-associated symptoms include diarrhea, pseudo-membranous colitis, sepsis and death in severe cases. Another example of gut microbiome-associated disease is Inflammatory Bowel Disease (IBD) . IBD is a group of multifactorial, idiopathic, persistent and recurring gastrointestinal inflammations.

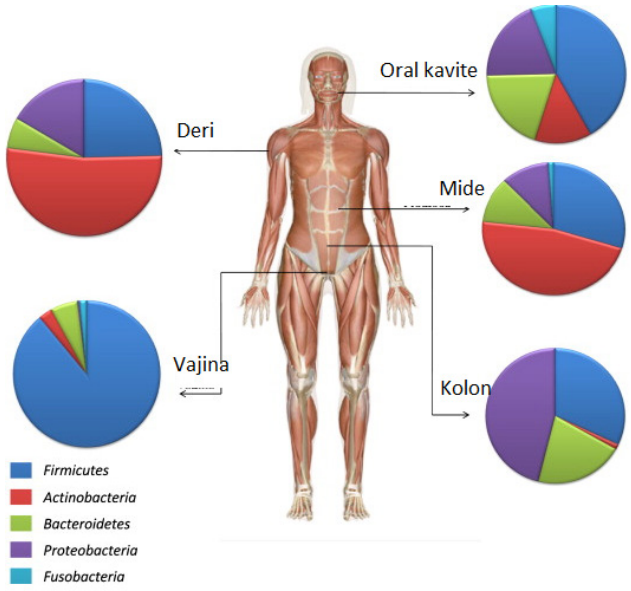
The complexity of the gut microbiome is daunting, and the global intestinal microbiome is far more than bacteria and archaea. It also includes fungi, bacteriophages and eukaryotic virus. Future, sequencing-based and culture-based gut microorganism surveys combined with mechanistic exploitations of the gut bacteriome, archaeome, phageome, virome and mycobiome will exponentially expand our knowledge about the interactions within the global intestinal microbial community.

1. Mikrobiyota Tanımı ve İnsan vücudunda bulunan bakterilerin filum düzeyinde sınıflandırılmaları

Mikrobiyomlara ilişkin bilgimizi geliştirmek, özellikle yeni tıbbi tedaviler için büyük umut vaat eden bir alan olarak son yirmi yılda yalnızca bilim camiasında değil, aynı zamanda genel halk arasında da popüler bir konu haline geldi. İnsan mikrobiyomu artık "son organımız" olarak kabul edilmektedir. Mikrobiyal topluluklar genellikle bir arada yaşayan mikroorganizmaların topluluğu olarak tanımlanır. Daha spesifik olarak, mikrobiyal topluluklar, mikroorganizmaların bitişik bir ortamda birbirleriyle etkileşime girdiği çok türlü topluluklar olarak tanımlanır. Ekolojik bir bağlamda mikrobiyom, bir vücut alanı veya başka bir ortamda ortakçı, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmalardan oluşan bir topluluk olarak tanımlanmaktadır. Bakteriler, arkeler, mantarlar, algler ve küçük protistler mikrobiyotanın üyeleri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca fajların, virüslerin, plazmitlerin ve hareketli genetik elemanların entegrasyonu ile mikrobiyom tekrar tanımlanmıştır. Mikrobiyota, lokalize bölgelere bağlı olarak, göz, solunum, sindirim, ürogenital sistem ve deri mikrobiyotası olarak sınıflandırılabilir (Şekil 1). Mikrobiyal topluluklar konakçıyla simbiyoz halindedir, homeostazise katkıda bulunur ve bağışıklık fonksiyonunu düzenler. Bununla birlikte, mikrobiyota disbiyozu, vücut fonksiyonlarının düzensizliğine, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, solunum hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilir.

İnsan bağırsağı mikrobiyotası 100 trilyona kadar mikroorganizma içerir (Qin et al., 2010). Bakteriyel topluluklar, konak faktörleri (pH, geçiş süresi, safra asitleri, sindirim enzimleri, mukus, bağışıklık sistemi), konak dışı faktörler (besinler, ilaçlar ve çevresel faktörler) ve bakteriyel faktörler nedeniyle gastrointestinal sistem (GİS) uzunluğu boyunca niceliksel ve niteliksel (yapışma kapasitesi, enzimler, metabolik kapasite ve ayrıca mikrobiyal birlikte evrim, etkileşimler ve rekabet) farklılıklar gösterir. Bireyler arasındaki spesifik mikrobiyal toplulukların ve genlerin dağılımı, çalışılan bireylerin coğrafi kökeni, yaşı ve diyetinin yanı sıra antibiyotik veya probiyotik alımı dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir. Mideden kolona bakteri biyokütlesi $10^{2–3}$ ile 10^{11}–10^{12} hücre/ml arasında değişir, yaklaşık %95'i anaerobik bakterilerdir ve bugüne kadar en az 1000 farklı tür listelenmiştir.

Bağırsak mikrobiyotasında 30'un üzerinde bakteri şubesi (filum) bulunmaktadır. Firmicutes (Bacillota), Bacteroidetes (Bacteroidota), Actinobacteria (Actinomycetota), Proteobacteria (Pseudomonadota), Fusobacteria, ve Verrucomicrobia (Verrucomicrobiota) şubeleri dominant şubeler (filum) olmakla birlikte, mikrobiyotanın %90'nını Firmicutes ve Bacteroidetes filumları oluşturmaktadır (Qin et al., 2010);(Zhou et al., 2022);(Arumugam et al., 2011; Raethong et al., 2021).



Şekil 1: Mikrobiyotanın insan vücudu habitatlarında filum düzeyinde dağılımı (Sankar, Lagier, Pontarotti, Raoult, & Fournier, 2015).

Firmicutes filumu hem zorunlu hem de fakültatif anaerobik bakterilerden oluşur. Çoğu üye Gram-pozitiftir ve olumsuz koşullar altında hayatta kalmak için ekolojik bir avantaj sağlayan endosporlar oluşturabilir. Bu filumda *Lachnospiraceae, Ruminococcaceae* aileleri bulunur ve 200'den fazla cins içerir. *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus, Ruminicoccus* en yaygın olarak rastlanılan cinslerdir ve bu filumunun yaklaşık %95'ini temsil eder. Bu filumdaki Clostridia sınıfı, ayrıca kümelere ayrılabilen oldukça heterojen bir bakteri grubunu içerir. Clostridium kümesi XIVa ve IV'ün üyeleri, bağırsak sisteminde bulunan mikrorganizmaların çoğunu temsil eder ve bir dizi faydalı görevleri vardır. Bu bakterilerin, bireyi korumaya yardımcı olmak için bağırsak epitel hücreleri ile yakın bir ilişki kurmak için tercihen mukozal kıvrımlar arasında kolonize olduğu düşünülmektedir (Nava, Friedrichsen, & Stappenbeck, 2011). Bununla birlikte, Clostridia sınıfının diğer kümeleri, küme I, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium tetani*'nin yanı sıra küme XI'in bir üyesi olan *Clostridium difficile (Clostridioides difficile*) türleri dahil olmak üzere, insanda hastalığa neden olan önemli patojenleri içerir (M. D. Collins et al., 1994).

Bacteroidetes filumu *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* ve *Rikenellaceae* ailelerini içerir, *Bacteroides* ve *Prevotella* predominant cinslerdir. Actinobacteria filumu, aerobik ve anaerobik bakterilerden oluşur. Firmicutes gibi, bu filum da Gram-pozitif bakterilerden oluşur, ancak DNA'larında yüksek bir G+C içeriğine sahip olmaları açısından farklılık gösterirler.

Bifidobacteriaceae ve *Coriobacteriaceae* ailelerini içerir, orantılı olarak daha az bulunur ve esas olarak *Bifidobacterium* cinsi tarafından temsil edilir (Tablo 1). *Bifidobacterium longum* da dahil olmak üzere bu cins içindeki belirli türlerin probiyotik etkilere sahip olduğu kabul edilmiştir. Rekabetçi dışlama, safra tuzu hidrolaz aktivitesi, bağışıklık modülasyonu, mukus veya bağırsak epitelyumuna yapışma yeteneği dahil olmak üzere çeşitli işlemler yoluyla patojenlere karşı koruma sağladığı belirtilmiştir (Buffie & Pamer, 2013; Picard et al., 2005).

Pseudomonadota (Gram negatif bakteriler) filumunun üyeleri çeşitli sınıflarda (alfa-, beta-, gama- ve epsilon proteobakteriler) bulunur. Proteobacteria filumu, çok çeşitli Gram-negatif bakterileri kapsar. Bağırsaktaki bakterilerin çoğu zorunlu anaerop iken, Pseudomonadota filumunun üyeleri fakültatif anaeroplardır. Bu bakteriler bağırsağın doğal üyeleri olmalarına rağmen, normalde sağlıklı, homeostatik bir mikrobiyotada küçük bir azınlık oluştururlar. Bazı araştırmalar, mikrobiyal toplulukta Pseudomonadota prevalansının artmasının, disbiyoz ve hastalık riskinin potansiyel bir tanısal imzası olarak hizmet edebileceğini düşündürmektedir (Shin, Whon, & Bae, 2015). Spesifik olarak, Gamma-proteobacteria sınıfı içindeki *Enterobacteriaceae* familyası, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. dahil olmak üzere çeşitli patojenleri içerir. Normalde düşük miktarda bulunurlar, ancak disbiyoz sırasında aşırı üreme ve bağırsak hakimiyeti potansiyeline sahiptirler (Taur et al., 2012) (Taur & Pamer, 2013).

Verrucomicrobia (Verrucomicrobiota), yalnızca birkaç tanımlanmış türü içeren Gram-negatif bakterilerin bir şubesidir. Tespit edilen türler daha çok tatlı su, deniz ve toprak ortamlarından ve insan dışkısından izole edilmiştir. Verrucomicrobiota nispeten aktif olmasa da çevrede bol miktarda bulunur.

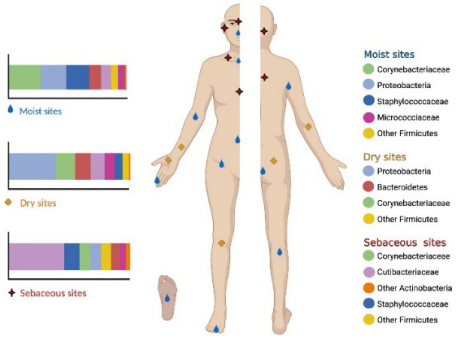
Bakterilerinn şube, sınıf, takım, aile, cins ve tür düzeyinde yapılan sınıflandırılmalarına örnekler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Bakterilerin şube, sınıf, takım, aile, cins ve tür düzeyinde yapılan sınıflandırılmalarına örnekler (Rinninella et al., 2019).



1.1.Mikrobiyom: Bir bireyin bağırsak mikrobiyotasının kapsadığı kolektif genler, mikrobiyom olarak bilinir. Üç milyondan fazla genle insan genomunun kodlama kapasitesini ezici bir şekilde aşar (Qin et al., 2010). Konağın mikrobiyotasını oluşturan bakteri türlerinde bireyler arası büyük değişkenlik olmasına rağmen, birçok mikrobiyal gen, mikrobiyomlar arasında yüksek işlevsellik ile sonuçlanan fonksiyonları paylaşır. Bu örtüşen işlevler, sağlıklı bireyler arasında paylaşılan temel mikrobiyom olarak kabul edilebilir (Lozupone, Stombaugh, Gordon, Jansson, & Knight, 2012). Buna, konakçı tarafından sindirilemeyen diyet kompleks şekerlerinin ve glikanların biyolojik bozunmasında, temel amino asitlerin ve vitaminlerin sentezinde ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda yer alan genler de dahildir (Gill et al., 2006; Kurokawa et al., 2007). Ayrıca insan bağırsağındaki yüksek mikroorganizma konsantrasyonu, lateral gen transferini (LGT), kromozomal yeniden düzenlemeleri, gen kopyalarını ve değişen ortama adaptasyonu kolaylaştırarak prokaryotik evrim ve çeşitlendirmede rol oynar.

1.1.3.Deri mikrobiyotası: İnsan derisi mikrobiyomu, mikroorganizmaları, bunların genetik öğelerini ve çevresel etkileşimlerini içerir. Çeşitli çalışmalara göre, kutanöz mikrobiyotadaki değişiklikler birçok dermatolojik hastalığın patofizyolojisinde yer almaktadır. Actinobacteria (%36-51), Firmicutes (%24-34), Proteobakteriler (%11-16) ve Bacteroidetes ciltte bulunan dört ana bakteri şubesidir (%6-9) (Gallo, 2017); (Byrd, Belkaid, & Segre, 2018); (McLoughlin, Wright, Tagg, Jain, & Hale, 2022). Nemli bölgelerde en çok bulunan bakteriler *Staphylococcus* (Firmicutes) ve *Corynebacterium* (Actinobacteria) cinsi bakterilerdir. Yağlı alanlar, *Cutibacterium* (Actinobacteria) türlerinin en yaygın izolatlar olduğu ve en az çeşitliliğe sahip popülasyonu barındırır. Derinin kuru bölgeleri, dört filumun farklı kolonizasyonuyla en büyük çeşitliliği gösterir (**Şekil 2).** Derinin nemli bölgeler arasında koltuk altı, antekübital fossa, göbek, kasık, popliteal fossa ve ayak tabanları bulunur. Yağlı bölgeler arasında alın, alın kırışıklıkları, retroauriküler kırışıklıklar ve sırt yer alır. Cildin kuru bölgeleri arasında önkollar, eller, kalçalar ve bacaklar bulunur (Carmona-Cruz, Orozco-Covarrubias, & Sáez-de-Ocariz, 2022).



Şekil 2: Derinin farklı bölgelerinde bulunan mikrobiyota dağılımına bir örnek gösterilmektedir (Carmona-Cruz et al., 2022)

1.1.4.Bağırsak Mikrobiyotası: Mikrobiyota ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu gastrointestinal sistemde (GİS) bulunan mikrobiyota üzerine yoğunlaşmıştır. Bağırsakta en yaygın bakteri cinsleri; *Bacteroides, Clostridium, Faecalibacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Peptidococcus*, *Peptidostreptococcus* ve *Bifidobacterium*'dur. İntestinal mikrobiyotanın barındırdığı baskın türe göre yapılan bir sınıflandırmada; Bacteriodetes filumu (enterotip 1), Prevotella (enterotip 2) ve Ruminococcus (enterotip 3) olarak üç farklı enterotiop grubu tanımlanmıştır. Enterotip 1 grubu; yüksek sakkarolitik aktivite gösteren ve karbonhidratların fermantasyonundan enerji sağlayan özellikte bakteri türlerinden oluşurken, enterotip 2 grubu; bakteriler barsak mukozasının üzerindeki müsini parçalama özelliğine sahiptir. Enterotip 1 biyotin, riboflavin, pantotenat ve askorbik asid sentezinde görev alırken, enterotip 2 grubundaki bakteriler ise tiamin ve folat üretir. Enterotip 3'deki *Ruminococcus* ve *Akkermansia* gibi bakteriler; müsinlere bağlanabilir ve karbonhidratların parçalanması ve transportunda etkilidir. Enterotipler yaş, cinsiyet, ırk, vücut ağırlığı gibi konakçı faktörlerinden etkilenmezken, uzun dönem diyet içeriği (protein, hayvansal yağ veya karbonhidrat) enterotipin oluşmasına katkıda bulunmaktadır.

2. Bağırsak Mikrobiyotası ile Konak Arasındaki İletişim

Barsak mikrobiyomu, epitel ve bağışıklık hücreleriyle etkileşime girer ve metabolizmayı düzenler. Bu şekilde, immün sistemin gelişimi ve homeostazında çok önemli bir rol oynar. Barsak mikrobiyotasının gastrointestinal kanal üzerine etkileri ve bu iki sistemin karşılıklı etkileşimi metabolik, koruyucu ve yapısal olmak üzere üç ana kategoride incelenebilir (Tablo 2) (Ramirez et al., 2020).

Tablo 2. İnsan bağırsak mikrobiyotasının işlevleri.

1.Metabolik	**2.Kolonizasyon direnci ve savunma**	**3. Yapısal**
• Kısa zincirli yağ asidi (KZYA) sentezi • Vitamin sentezi (K, B12) • Kalsiyum manganez ve demir absorbsiyonunu kolaylaştırır • Polifenollerin parçalanması • Safra asidi metabolizması • Kolin ve aminoasitlerin parçalanması • Poliaminlerin üretimi • Ksenobiyotik metabolizması • Polisakkaritlerin parçalanması	• Besinler ve kolonizasyon ile patojenlerle rekabet • Antimikrobiyal bileşiklerin (bakteriyosinler, laktat) salgılanması • Antimikrobiyal protein sentezinin indüklenmesi (Katelisidinler, C tipi lektinler, defensinler) • Salgısal IgA üretiminin uyarılması	• Bağırsak epitel gelişiminin düzenlenmesi (kripta oluşumu, anjiyogenez) • Bağırsak epitel bütünlüğünün korunması (sıkı bağlantılar, desmozomlar) • Bağışıklık sistemi gelişiminin ve işlevinin düzenlenmesi • Peristaltizm uyarımı • Uzak organlar üzerindeki etkiler (merkezi sinir sistemi, karaciğer) • İmmun sistemin gelişmesi • Patojenlere immun yanıt

2.1. Metabolik etkileşim: Gastroitestinal (GI) mikrobiyal bileşimin, insan sağlığı üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu, yararlı veya olumsuz etkilere neden olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, insan bağırsağı, mikroorganizmaların aktif katılımıyla karmaşık kimyasal sıvıları içeren, sindirim sürecinde çok önemli bir rol oynayan metabolik bir organ olarak kabul edilir (Sankar et al., 2015). Bakteriyel bileşim, konakçının diyetlerinden enerji absorbsiyonunu ve yağ dokularında tutma kapasitesini arttırabilir (Turnbaugh et al., 2006). Bağırsakta, dallanmış zincirli amino asitler, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), indol, süksinat ve imidazol, anaerobik fermantasyon sırasında bağırsakta bulunan mikroorganizmalar tarafından üretilen metabolitlerdir. Bu metabolitler, beyin-bağırsak ekseninin sinyal yollarında anahtar sinyal bileşenleri olarak görev görür (Roy, Kien, Bouthillier, & Levy, 2006). Bu metabolitleri üreten üyeler; *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia* ve *Streptococcus* cinslerinde bulunan türlerdir *(Cunningham, Stephens, & Harris, 2021)*. Bağırsak mikrobiyotası ve intestinal epitel hücreleri (İEH'ler) arasındaki iletişim, GİS homeostazında çok önemli bir rol oynar. Bazı patojen türler ve bunların metabolitleri mikrobiyotanın bileşenlerini değiştirebilir, epitel bariyerini tahrip edebilir ve GİS'te bazı enfeksiyöz hastalıklara neden olabilir. Örneğin *Clostridioides difficile* (*Clostridium difficile*) enfeksiyonu (CDI), antibiyotikle ilişkili ishalin ana nedeni olarak kabul edilmektedir ve CDI için risk faktörleri arasında antibiyotikler, proton pompası inhibitörleri ve yaş bulunmaktadır. Bu risk faktörleri, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozunu indükler, *C. difficile*'nin kolon epiteli üzerinde kolonizasyonunu destekler ve epitel hücrelerinin apoptozu ve nekrozuna yol açar (Sayin et al., 2013); (Fan & Pedersen, 2021).

Yaşamın ilk üç yılındaki çevre ve diyet, yetişkin benzeri bir mikrobiyotanın kazanılması ve bağışıklık ve nörolojik sistemlerin gelişimini etkileyen bakteri-konak simbiyozunun kurulması için çok önemlidir. İnsan bağırsak mikrobiyotası, 2 ila 5 yaşları arasında yetişkin bir mikrobiyotanın özelliklerine ulaşır (Rodríguez et al., 2015). Bağırsakta bulunan mikroorganizmalar metabolik işlevi ve enerji dengesini düzenler; değiştirilmiş bir mikrobiyal ekolojinin bazı metabolik hastalıkların gelişimine katkıda bulunduğuna inanılmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasının nispi tür bolluğu ve metabolik özellikleri, obez olanlarda veya başka metabolik bozuklukları olanlarda, alınan besinlere veya terapötik ajanlara yanıt olarak önemli ölçüde değişir. Bağırsak mikrobiyotası ve metabolitlerinin konak homeostazını etkilediği mekanizmalar yeni yeni anlaşılmaya başlamıştır. Bağırsak mikrobiyotası, mukus tabakası, safra asitleri ve mukozal bağışıklık tepkileri arasındaki etkileşimlerle birlikte bu ilişkiler, mikrobiyotanın metabolizmayı etkilediği potansiyel mekanizmaları ortaya çıkarır. Bağırsak mikrobiyotası, di-

yet ve metabolik sonuçlar arasında açık bir ilişki vardır. Yüksek lifli bir diyetin inflamasyonu azalttığı, insülin duyarlılığını arttırdığı ve dislipidemileri azalttığı, yağ ve şekerden yüksek bir diyetin ise dislipidemiye, insülin direncine ve düşük dereceli inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir. Bağırsak mikrobiyotası, obezite ve tip 2 diyabet (T2D) gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Diyette bulunan liflerden dirençli nişasta, nişasta dışı polisakkaritler, frukto-oligosakkaritler ve galakto-oligosakkaritler GİS enzimleri tarafından sindirilemez ve kolona geçerler. Sindirilmeyen bu kompleks şekerler kolondaki bakteriler tarafından glikozidaz, glikozil transferaz, polisakkarid lizaz ve karbonhidrat esteraz enzimleri yardımıyla parçalanır. Kolondaki bakteriler diyetle gelen lifin tümünü fermente ederler. Diyet liflerinin bağırsak bakterileri tarafından fermantasyonu sonucunda gazların (metan, hidrojen ve karbondioksit) salınımı, kısa zincirli yağ asitleri (format, asetat, propriyonat, bütirat, valerat, izovalerat ve hekzanoat) sentezi ve düşük oranlarda organik asit (laktat, süksinat) ve alkol (metanol, etanol) sentezi gerçekleşir. Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) vücudun enerji ihtiyacının %10'unu karşılar. *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium* group IV ve *Clostridium group* XIVa KZYA'lerini esas üreten bakterilerdir. Öte yandan, KZYA'leri gibi bağırsak mikrobiyotasından gelen metabolitler de enterik patojen enfeksiyonuyla mücadelede çok önemli bir rol oynar. Örneğin, KZYA'leri, intestinal epitel hücreleri (İEH) tarafından oksijen tüketimini artırabilir ve bariyer işlevi ve IEH'lerinin metabolizması için önemli olan bağırsak hipoksisine katkıda bulunabilir (Pral, Fachi, Corrêa, Colonna, & Vinolo, 2021). Önceki çalışmalar, bütiratın İEH'lerde hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) ekspresyonunu düzenleyebileceğini ve sıkı bağlantı proteinlerinin üretimini destekleyebileceğini ve HIF-1 sinyalinin *C. difficile* kaynaklı kolitte koruma sağladığını bildirmiştir (Hirota et al., 2010) (Yin et al., 2020). Son kanıtlar, bütirat ile yapılan müdahalelerin, HIF-1 yolu yoluyla *C. difficile* kaynaklı koliti rahatlattığını göstermiştir (Fachi et al., 2019).

Asetat ve propriyonat periferik dokular için eneri kaynağıdır ve karaciğerde lipogenez ve kolesterol sentezine katılır. Bütirat ise kolonositlerin enerji kaynağı olmasının yanında, entero-endokrin hücreleri uyararak adipositlerden leptin ve L hücrelerinden glukagon-benzeri peptid 1 (GLP1) salgılanmasını sağlar. Ayrıca safra asitleri ve fenollerin zararlı metabolitlerinin etkisini azaltır. Bakterilerce ortaya çıkan protein katabolizma ürünleri GABA (γ-aminobutirik asid) (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. ve *Lactococcus lactis*), norepinefrin (*Escherichia* spp. ve *Bacillus* spp.), dopamin (*Bacillus* spp.), histamin ve serotonin (*Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. ve *Enterococcus* spp.) beyin-barsak ekseninin iletişiminde ve konakçı nitrojen dengesinin sağlanmasında etkilidir.

Bağırsak mikrobiyotası, bağırsak endokrin fonksiyonlarında, bağışıklık hücrelerinin olgunlaşmasında ve patojenlerin aşırı çoğalmasına karşı korumada kritik bir rol oynar. (Gomaa, 2020; Lynch & Pedersen, 2016; Milani et al., 2017). Paneth hücreleri, emilim yapan epitel hücreleri ve goblet hücreleri dahil olmak üzere IEC'ler, homeostazı sürdürmek ve GİS'de inflamasyonu önlemek için bağışıklık hücrelerini ve bağırsak mikrobiyotasını ayıran iki tip mukozal bariyer oluşturur. Ek olarak, bağırsak mikrobiyotası epitelyal savunma mekanizmasını artırabilir ve mukozal bir bariyer oluşturmak için bağırsak geçirgenliğini azaltabilir.

2.1.2. Bağırsak Mikrobiyotasından İEH'lere Sinyaller

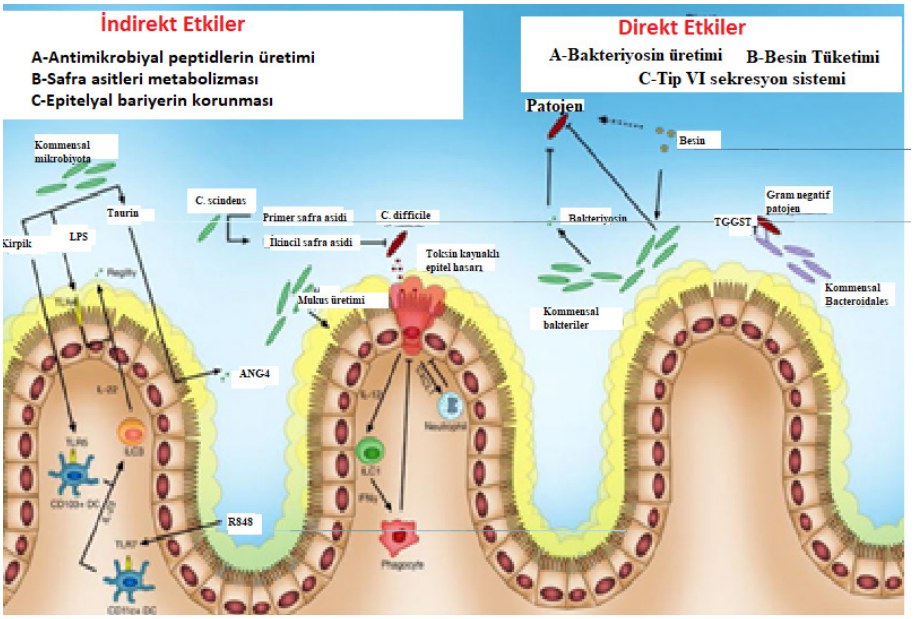
Eksojen kaynaklı mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar, bağırsak mikrobiyotası ve İEH'lerin rahatsızlıkları dahil olmak üzere GİS'in mikro-ortamını değiştirebilir. Bu durumda, bağırsak mikrobiyotası bazı ilişkili sinyalleri İEH'lere iletir ve enfeksiyona karşı savunmaya katkıda bulunur. Örneğin, yakın tarihli bir araştırma sonuçları, yeni bir bağırsak antibakteriyel proteini olan prolin açısından zengin küçük protein 2A'nın (SPRR2A), bağırsak bariyerlerinin helmint kaynaklı bakteriyel istilasına karşı koruyabileceğini gösterdi. (Hu et al., 2021). Paneth hücreleri ve goblet hücrelerinden salgılanan SPRR2A, bağırsak mikrobiyotası tarafından indüklenir ve selektif olarak hücre membranlarını tahrip ederek Gram pozitif bakterileri öldürür (Hu et al., 2021). Ek olarak, segmentli filamentöz bakteriler (SFB), *Citrobacter rodentium* gibi bazı patojenlere karşı koruma sağlayan kommensal bağırsak mikrobiyotasıdır (H. Chung et al., 2012). *Clostridia* cinsine ait endojen bağırsak mikrobiyotasının, IEC'lerde retinol dehidrogenaz 7 (Rdh7) ekspresyonunu baskılayarak ve *Salmonella* Typhimurium kolonizasyonunu önleyerek, GİS'deki retinoik asit (RA) konsantrasyonunu düzenleyebileceği öne sürülmüştür (Grizotte-Lake et al., 2018). Bir başka çalışmada, önceki enfeksiyonların, bağırsak mikrobiyotasının sonraki enfeksiyonlara karşı direncinde bir artışa yol açtığı öne sürülmüştür. (Stacy et al., 2021).

2.1.3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Enfeksiyondan Koruyan İEH'ler Arasındaki Etkileşimler

Bağırsak mikrobiyotası, patojen bakterilerin kolonize olmasında ve bağırsakta kommensal endojen mikrobiyotada bulunan azınlık bakterilerinin aşırı üremesinin önlenmesinde kritik bir rol oynar. Doğrudan kolonizasyon direnci mekanizmaları; kommensal endojen mikrobiyotanın, eksojen mikrobiyal kolonizasyonu kısıtlama veya konakçı ile herhangi bir etkileşimden bağımsız olarak, bakteriyel faktörler yoluyla endojen mikrobiyal üyelerin patojenik aşırı büyümesini önleme yeteneği ile karakterizedir. Kommensal bakteri türleri ve ürünleri; antimikrobiyal peptitler üreterek, epitel bariyerini koruyarak ve safra asitlerini modüle ederek,

dolaylı kolonizasyon direnci sağlamak için konakçı faktörlerle etkileşime girer. Rejenere adacıktan türetilen protein IIIγ (RegIIIγ) ve anjiogenin-4 (ANG4), konakçı tarafından üretilen ve mikrobiyota tarafından düzenlenen antimikrobiyal proteinlerdir (Şekil 3). Mikrobiyota, Toll benzeri reseptörleri (TLR'ler) uyararak, RegIIIγ ifadesini artırabilir. Lipopolisakarit (LPS), TLR-4'ü büyük olasılıkla bağırsak epitel hücrelerinde uyarır ve bu da Paneth hücreleri tarafından RegIIIγ üretimi ile sonuçlanır. Flagellin, TLR5+CD103+ dendritik hücrelerde (DC'ler) TLR-5'i uyarır ve TLR-7 agonisti resikimod (R484), TLR7+CD11c+ DC'lerde TLR-7'yi uyarır. Aktive edilmiş dentritik hücreler (DC'ler), IL-22'yi salgılaması için grup 3 doğal lenfoid hücrelerini (ILC3) uyaran IL-23'ü serbest bırakır, bu da daha sonra Paneth hücrelerinin RegIIIγ üretmesiyle sonuçlanır. Mikrobiyal metabolit olan taurin, bağırsak epitel hücresindeki bir enflamasyon kompleksi aracılığıyla sinyal verebilir. Enflamasyon, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD), lösin açısından zengin tekrar (LRR) içeren protein (NLR) aile üyesi NLRP6 ve kaspaz-1 içerir. İnflamasyon yoluyla sinyal verme, IL-18 de dahil olmak üzere proinflamatuar sitokinlerin aşağı akış üretimiyle sonuçlanır. IL-18, ANG4 dahil olmak üzere antimikrobiyal peptitlerin üretimini arttırır. *Clostridium scindens* gibi bazı kommensal bakteriler, *C. difficile*'nin vejetatif formlarının üremesini engelleyen 7α-hidroksisteroid dehidrojenaz enzimini kullanarak, birincil safra asitlerini ikincil safra asitlerine dehidroksile edebilir. Mikrobiyota ayrıca apoptozu geciktirmek ve dokuyu onarmak için mukus üretimini ve epitel hücreleri içindeki nükleer faktör-κB'nin (NF-κB) transkripsiyonel aktivasyonunu indükleyerek epitel bariyerini korur. Patojenler, epitel hücresinin nötrofilleri toplayan kemokin CXCL1'in aşağı akış ifadesi ve ayrıca fagosit alımı için IFNy salgılamak üzere ILC1'leri aktive eden interlökin 12'nin (IL-12) ifadesi ile epitel hasarı bölgelerinde kısıtlanır.

Doğrudan kolonizasyon direnci mekanizmaları arasında; bakteriyosin üretimi, besin tüketimi ve tip VI salgılama sistemleri yer alır. Endojen mikrobiyota üzerinde minimum etki ile belirli patojenleri inhibe eden dar bir aktivite spektrumuna sahip bakteriyosinler üreten birkaç kommensal bakteri tanımlanmıştır. Ek olarak, mikrobiyota, patojen kolonizasyonunda bir azalmaya neden olan süksinat gibi mikrobiyal metabolitlerin yanı sıra, diyet ve konakçıdan türetilen karbonhidratlar dahil olmak üzere çeşitli besinler için patojenlerle rekabet eder. Mikrobiyotadaki Bacteroidales takımı gibi Gram-negatif bakteriler, tip VI sekresyon sistemi yoluyla temasa bağlı bir şekilde toksinleri patojenlere iletebilir (Şekil 3).



Şekil 3: Bağırsak Mikrobiyotası ve Enfeksiyondan Koruyan İEH'ler Arasındaki Etkileşimler; Kommensal bakteri türleri ve ürünleri; antimikrobiyal peptitler üreterek, epitel bariyerini koruyarak ve safra asitlerini modüle ederek, dolaylı kolonizasyon direnci sağlamak için konakçı faktörlerle etkileşime girer. Rejenere adacıktan türetilen protein IIIγ (RegIIIγ) ve anjiogenin-4 (ANG4), konakçı tarafından üretilen ve mikrobiyota tarafından düzenlenen antimikrobiyal proteinlerdir. Mikrobiyota, Toll benzeri reseptörleri (TLR'ler) uyararak, RegIIIγ ifadesini arttırabilir.

Örneğin koleraya neden olan ve mikrobiyatanın normal üyesi olmayan *Vibrio cholerae*, su ortamında çoğalabilir ve kontamine yiyecek ve başta su olmak üzere içeceklerle insanlara bulaşabilir. Toksin coregülated pilus (TCP) yardımıyla ince bağırsak villus yüzeyinde kolonize olur ve daha sonra kolera toksini (CT) salgılayarak şiddetli dehidrasyona ve hatta ölüme yol açan sulu ishale ve kusmaya neden olur (S. H. Yoon & Waters, 2019). İnsan gastrointestinal sisteminde bulunan çok yüksek sayıdaki mikroorganizmalar, antimikrobiyal peptit üretimi, besin rekabeti ve bağırsak bariyeri gibi "kolonizasyon direnci" mekanizmaları yoluyla *V. cholerae*'nin istilasına anında yanıt veren özel bir mikroekolojik sistem oluşturur. Ancak, *V. cholerae* bu sinyalleri hızlı bir şekilde algılayabilir ve enfeksiyon sırasında bu stresleri atlatmak için ilgili genlerin ekspresyonunu modüle ederek, ince bağırsak epitel hücrelerinin yüzeyinde başarılı kolonizasyona neden olabilir. Tip VI Salgı Sistemi (T6SS), Quarium sensing (QS), Reaktif Oksijen Türleri (ROS)/pH stresi ve biyoaktif metabolitler bu bakterinin başlıca virülans faktörleridir. Bu mekanizmalar, konakçıdaki diğer patojenlerin moleküler bakteriyel patogenezine de uyarlanabilir. T6SS, şırınga benzeri bir protein aparatıdır, prokaryotlar ve ökaryotlar dahil olmak üzere hücrelere toksik efektörler enjekte ederek ve hatta duyarlı hücreleri parçalayarak duyarlı hücrelerin fizyolojik işlevini etkiler (Pukatzki et

al., 2006; Schwarz et al., 2010); (Basler, Pilhofer, Henderson, Jensen, & Mekalanos, 2012); (Shneider et al., 2013); (Cianfanelli et al., 2016). Günümüze kadar, *V. cholerae*'de karşılık gelen işlevlere sahip, altı T6SS efektörü rapor edildi; bunların arasında, TleV1 (lipaz), TseH (amidaz), VgrG-3'ün C-terminal domain (lizozim), prokaryotik hücreleri hedefleyen, C-terminali domain VgrG-1 (aktin-çapraz bağlama) ökaryotları hedef alır ve VasX (por oluşumu), TseL (lipaz) hem prokaryotik hem de ökaryotik hücreler üzerinde etkili olur (Pukatzki, Ma, Revel, Sturtevant, & Mekalanos, 2007; Russell et al., 2011; Russell et al., 2013). Duyarlı suşlar, toksik efektörleri ile T6SS tarafından saldırıya uğrayabilir, bu nedenle aynı kökenli immün proteinlerin veya hücre dışı polisakkaritlerin üretimi gibi bir dizi koruyucu mekanizma geliştirmişlerdir. (Dong, Ho, Yoder-Himes, & Mekalanos, 2013)((Fu, Waldor, & Mekalanos, 2013); (Toska, Ho, & Mekalanos, 2018) (Fast, Kostiuk, Foley, & Pukatzki, 2018). Bağırsak mikrobiyotası, safra asitlerini safra tuzu hidrolaz (BSH) üretimi yoluyla de-konjuge safra asitlerine dönüştürerek *V. cholerae* T6SS'nin ekspresyonunu baskılayabilir. Bağırsak mikroorganizmalarının *V. cholerae* T6SS ile antagonistik etkileşimi, fare, tavşan veya Drosophila modelinde gösterilmiştir. *V. cholerae*'nin virülansını arttırırken, aynı zamanda, bağırsak hücresinin rejeneratif işlevi ve hücre farklılaşması inhibe edilir ve massif bağırsak hücrelerinin dökülmesine ve ardından kolera semptomlarının alevlenmesine neden olur. (Alavi et al., 2020; Bachmann et al., 2015). (Zhao, Caro, Robins, & Mekalanos, 2018): (Fu, Ho, & Mekalanos, 2018); (Fast et al., 2020), (Fast et al., 2020).

2.1.4. Quarium Sensing (QS) ve GİS Mikrobiyotası

Quorum sensing (QS) bakterinin çevresinde bulunan kendi türüne ait popülasyon yoğunluğunu saptamasını sağlayan bir sistemdir. Bağırsak mikrobiyotasnın farklı üyelerıı, farklı algılama molekülleri üretir. Örneğin, otoindükleyici molekül olarak Asil-homoserin lakton (AHL), Gram-negatif bakteriler tarafından üretilir. Küçük moleküllü polipeptitler, Gram pozitif bakteriler tarafından üretilir. Her iki grupta bulunan bakteriler, furanil dibazik bileşik (2S, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetra-hidroksi-tetra-hidrofuran boratı (AI-2) üretebilir. Ayrıca bağırsak mikrobiyotası QS sinyalleri aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarak, bağırsaktaki komensal bakterileri patojenik bakterilere dönüştürür ve böylece konakçı sağlığını etkiler (E. K. Kim et al., 2020). Örneğin patojen olan *V. cholerae*, türler arası iletişimde, otoindükleyici AI-2 dahil olmak üzere üç farklı QS sinyal molekülü üretebilir.(Schauder, Shokat, Surette, & Bassler, 2001). Tür içi özgül otomatik indüleyiici (S)-3-hydroxytridecan-4-1 (CAI-1)(Kelly et al., 2009) ve 3,5-dimethylpyrazin-2-ol (DPO) (Kelly et al., 2009); (Beyhan, Bilecen, Salama, Casper-Lindley, & Yildiz, 2007; Jemielita, Wingreen, & Bassler, 2018)). Diğer taraftan, *V. cholerae* tarafından üretilen QS sinyalleri diğer mikroorganizmaların fizyolojik fonksiyonları

üzerinde de etkili olabilir. Bu bakteri tarafından üretilen CAI-1, enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC) E2348/69'un T3SS virülansını ve ardından konakçıda ishali arttırır (Gorelik et al., 2019). QS, bakteriler arası iletişimde kritik bir rol oynadığından *V. cholerae* enfeksiyonlarının tespiti, önlenmesi ve tedavisi için bağırsak probiyotiklerini modifiye etmeye yönelik QS sinyali ve sentetik biyoteknoloji yöntemlerinin kombinasyonu yeni bir terapötik yaklaşım olarak gündeme gelmektedir. Genetik yapısı değiştilmiş *Escherichia coli* Nissle1917, *V. cholerae* kolonizasyonunu azaltmak için *V. cholerae*'den türetilmiş CAI-1 üretebilir (Duan & March, 2008, 2010). *V. cholerae*, bağırsakta elektrolit dengesizliğine neden olarak ishale yol açan ve böylece bağırsak komensal bakterilerinin yapısını bozan bir kolera toksini (CT) üretebilir. Ayrıca, enflamatuar koşullarda NO-3 konsantrasyonu artar ve mevcut demir konsantrasyonu azalırken, *V. cholerae* NO-3'ü elektron solunum zinciri için bir reseptör olarak daha iyi kullanabilir ve böylece daha hızlı çoğalır ve ekolojik bir niş işgal eder. *V. cholerae* ayrıca bağırsak mikrobiyotası ve konakçı ile demir ile rekabet ederek kendi çoğalmasını teşvik edebilir (Rivera-Chávez & Mekalanos, 2019).

3.1.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)/pH Aracılığı ile Bağırsak Mikrobiyotası İletişimi

Bağırsak ortamını istila eden patojenler, öncelikle reaktif oksijen türleri (ROT/ROS) ve düşük pH içeren bağırsağın doğal bağışıklığına meydan okur. Bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğinin ROS seviyesi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Yardeni et al., 2019). Bağırsak mikrobiyotası kendi başına ROT üretebilir (D. Chen, Wu, Jin, Wang, & Cao, 2019). Örneğin *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen L-laktat, ya NOX enzimleri tarafından NADH tüketimine aracılık edebilir ya da bağırsakta ROT seviyelerini artırarak piruvat üretimi yoluyla mitokondride metabolize edilebilir (Iatsenko, Boquete, & Lemaitre, 2018). Bunun aksine bağırsak mikrobiyotası, N-butirat gibi kısa zincirli yağ asitlerini metabolize ederek ROT üretimini de azaltabilir. (Iatsenko et al., 2018) (M. Y. Yoon et al., 2016).

ROT dışında, konakçı bağırsak ortamı da düşük pH değerine sahiptir. pH, bağırsakta bakteri üremesi için önemli bir faktördür. Bağırsak mikrobiyotası örneğin *V. cholerae*'nin istilasına karşı direnç geliştirmek için pH'ı değiştirebilir. Bir çalışmada sağlıklı çocukların dışkılarından izole edilen *Lactobacillus lactis*'in kültür süpernatanlarının, *V. cholerae*'nin biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kaur et al., 2018). Başka bir çalışmada, sağlıklı insan gönüllülerin bağırsağından izole edilen *Escherichia coli* 40 ve Nissle 1917, glikoz içeren LB ortamında *V. cholerae* N16961 ile birlikte kültürü yapılmış ve her ikisinin de besiyerindeki pH değerini düşürdüğü ve *V. cholerae*'nin yaşama oranını etkilediği tespit edilmiştir. (Sengupta et al., 2017). Zebra balığı modelinde, *Escherichia coli* 40 veya Nissle 1917 ile glikoz kombinas-

yonu, bağırsaktaki pH'ı değiştirerek *V. cholerae* N16961 kolonizasyonunu azaltmıştır. (Nag et al., 2018). Bu, kolera tedavisi sırasında probiyotik *Escherichia coli* ile glikoz bazlı oral rehidrasyon (ORS) kombinasyonunun kullanılmasıyla tutarlıdır. Bunlar, bağırsak mikrobiyotasının ve bileşimlerinin, pH'ı değiştirerek *V. cholerae* kolonizasyonunu engelleyebileceğini düşündürmektedir. Ancak, alkalen koşullar altında *V. cholerae*, ilgili asit tolerans genlerini OmpR aracılığıyla baskılayabilir ve kondisyonunu arttırabilir (Kunkle, Bina, & Bina, 2020). Aslında, *V. cholerae*'nin kendisi, glikoza bağlı olarak, farklı pH fermantasyon modellerine sahiptir. El Tor N16961, ortamın asitlenmesini önlemek için nötr fermantasyon ürünü olarak 2,3-butandiol üretebilir. Bunun aksine, klasik biyotip O395, 2,3-bütandiol sentezleyemez, bu nedenle ortamın sentetik organik asitlerle asitleştirilmesi nedeniyle glikoz ile karışık fermantasyon sırasında canlılığı azalır.(Lee et al., 2020).

3. Biyoaktif Metabolitler ve Bağırsak Mikrobiyotası arasında iletişim

Biyoaktif metabolitler, ayrıca bağırsak mikrobiyotasının birbiriyle iletişim kurmasının önemli bir yoludur. Ana biyoaktif metabolitler arasında kısa zincirli yağ asitleri, antimikrobiyal peptidler/bakteriyosinler, defensinler ve safra asitleri bulunur. Bağırsak mikroorganizmaları karmaşık bir bileşime sahiptir ve dış çevrenin bozulmasına göre dinamik olarak ayarlanan karmaşık bir mikro-ekolojik sistemdir. Bu nedenle, bağırsak mikroorganizmalarının ve patojen etkileşimlerinin araştırılması, büyük veri analizi, yeni nesil dizileme, laboratuvar otomatik sistemleri dahil olmak üzere çok disiplinli teknoloji platformları gerektirir. Kommensal bağırsak bakterileri ve enterik patojenler arasındaki moleküler seviyede veri elde edilmesine ilişkin ayrıntılı bilgi, tüm bulaşıcı hastalıkların önlenmesine ve kontrolüne ışık tutacaktır.

3.1. Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA)

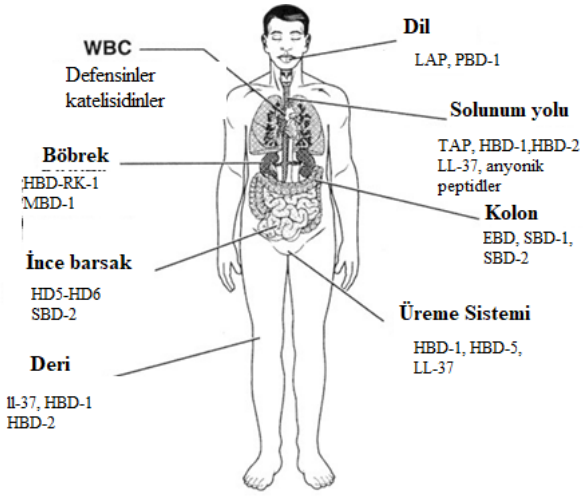
KZYA'leri bağırsak lümeninde, sindirilmemiş diyet karbonhidratları gibi çeşitli maddelerin bakteriyel fermentasyonuyla üretilen organik asitlerdir. Fermente edilebilir karbonhidrattan kolonik kısa zincirli yağ asitleri oluşumu, kolonik epitelyumun morfolojik ve işlevsel bütünlüğünün korunması gibi birçok fonksiyon için önemlidir. Kısa zincirli yağ asitlerinin insanların toplam kalorik gereksinimlerinin yaklaşık %5-15' ine katkıda bulunabileceği tahmin edilmektedir. Kısa zincirli yağ asitleri ph değeri ≤ 4,8 olan zayıf asitlerdir ve gastrointestinal sistemin pH değeri neredeyse nötürdür. Kısa zincirli yağ asitlerinin %90-99' u serbest asitlerden ziyade, anyonlar olarak gastrointestinal sistemde bulunur. KZYA'leri 1 ila 6 karbon atomlu organik yağ asitleridir. Farklı karbon zincir uzunluklarına sahip olan asetat (C2), propiyonat (C3), bütirat (C4), valerat (C5) ve kaproat (C6)) diyet ve bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonuna bağlı olarak değişik miktarlarda üretilmektedir. Asetat birçok bakteri tarafın-

dan üretilir, ancak propiyonat ve bütirat genellikle spesifik bakteriler tarafından üretilir. Bütirik asit (bütirat) sütte doğal olarak bulunan bir maddedir. Kısa zincirli yağ asitleri üretiminin oranı ve miktarı, kolondaki mikroflora türü ve miktarlarına, substrat kaynağına ve bağırsaktan geçiş süresine bağlıdır. KZYA'lerinin konsantrasyonu, konakçının proksimal kolonunda nispeten daha fazladır. KZYA'leri, bağırsak mikrobiyotasının metabolitleridir ve çeşitli konakçı fizyolojik süreçlerin düzenlenmesine katılırlar. (Dalile, Van Oudenhove, Vervliet, & Verbeke, 2019). Propiyonik ve bütirik asit üretimi, özel bakteri gruplarının faaliyeti sonucu oluşmaktadır. KZYA'lerinin büyük bir kısmını oluşturan asetat ise pek çok bakteri grubu tarafından üretilmektedir. Ayrıca, üretilen bu asetat bağırsak bakterileri tarafından bütirat üretimi için kullanılmaktadır. Gastrointestinal ortamda baskın bütirat üreticileri, bazı *Lachnospiraceae* ve ayrıca *Faecalibacterium prausnitzii* dahil olmak üzere Firmicutes'tir. Propiyonat ise *Bacteroides* türleri, *Negativicutes* ve ayrıca bazı *Clostridium* türleri tarafından üretilir (Louis & Flint, 2017). Bununla birlikte, bazı bakteriler, fermantasyonlarını değiştirebilir ve farklı substrata bağlı üreme koşulları altında farklı KZYA'leri üretebilir. *Roseburia inulinivorans* bir bütirat üreticisidir, ancak fukoz üzerinde üreme esnasında, gen ekspresyon modelini tamamen değiştirebilir, fukozu bir enerji kaynağı olarak kullanabilen bir dizi geni aktif hale getirebilir ve bir propandiol kullanım yolu yoluyla propiyonat ve propanol üretebilir (Scott, Martin, Campbell, Mayer, & Flint, 2006). *Ruminococcus obeum*, saf kültürde glikoz varlığında üremesi sırasında asetat, format ve laktat üretir, ancak ek olarak, yine propandiol kullanım yolunu kullanarak fukoz üzerinden üreme sırasında propiyonat üretir (Reichardt et al., 2014). Patojen bakterilerle ilişkilerinde, bir örnek vermek gerekirse, *V. cholerae* enfeksiyonunda, konakçıdaki KZYA'lerinin içeriğinin azaldığı ve *V. cholerae* enfeksiyonundan sonra *Bifidobacterium* bolluğunun azaldığı tespit edilmiştir. *Bifidobacterium* içeren probiyotiğin tedavi amacıyla kullanılmasıyla, tedavi ilerledikçe KZYA'lerinin bolluğunun normal seviyelere döndüğü bildirilmiştir (Monira et al., 2010). Bir çalışmada, klindamisin ile tedavi edilen farelerde, *V. cholerae*'nin kolonizasyon kabiliyetini arttırmak için, *Bacteroides* bolluğunu ve KZYA'lerinin içeriğini azaltmışlardır (You et al., 2019). Bu tür çalışmalar, konakçıdaki probiyotiklerin, KZYA'lerini salgılayarak *V. cholerae* kolonizasyonunu antagonize edebildiğini göstermektedir. Ancak, *V. cholerae* bağırsak ortamında kendini koruyabilmek için iki bileşenli sistem CrbRS yoluyla asetil-CoA sentaz-1'in (ACS-1) transkripsiyonunu da etkinleştirebilir, böylece *V. cholerae* asetatın içindeki asetatı tüketecek şekilde dönüşümünü düzenleyebilir. Bu asetatın yokluğu, konağın insülin sinyal iletim yolunun bloke olmasına ve lipidlerin birikmesine neden olarak konağın sağlığını etkileyecektir (Hang et al., 2014).

3.2. Antimikrobiyal peptitler (AMP)/Bakteriyosinler

AMP'ler (yaklaşık olarak <100 amino asit boyutunda) doğuştan bağışıklık sisteminin bir parçası olup, genlerle kodlanan doğal antibiyotiklerdir. Bağırsak ortamında iki kategoriye ayrılabilen, antibakteriyel aktiviteye sahip peptit türüdür. Antimikrobiyal peptitler, sentezlendikleri bölge, elde edildikleri biyolojik kaynak, hidrofobik karakterleri, moleküler hedefleri, sekonder yapıları ve net yüklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Bu moleküller konakçı kaynaklı antimikrobiyal peptitler ve mikrobiyal kaynaklı antimikrobiyal peptitler (bakteriyosinler) olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Antimikrobiyal peptitler, geniş spektrumlu mikrobisidal aktiviteye sahiptir. İnsanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler ve protozoa gibi çok çeşitli organizmalarda tanımlanmıştır ve immün sistemin doğal savaşçılarıdır. Hücresel kökenleri arasında; granülositler, trombositler, özelleşmiş epitelyal bezler, bağırsak Paneth hücreleri dahil olmak üzere ıslak mukozal epitel, fetal membranlar, yapraklar, çiçekler ve tohumlar bulunur.

AMP'ler; antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiparazitik, insektisidal, kemotaktik, yara iyileşmesi ve büyüme uyarıcı olarak, pek çok etkiye sahip olabilmektedirler. AMP'lerin, proinflamatuvar yanıttaki potansiyel etkileri üzerine yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Antimikrobiyal peptitler temelde iki etki mekanizmasına sahiptir; bunlardan birincisi hücresel membran yapısını bozmak, ikincisi ise hücre içindeki çeşitli biyosentez basamaklarını inhibe etmek olarak açıklanabilmektedir. Laktik asit bakterileri, antimikrobiyal peptit (AMP) üretici mikroorganizmalar arasında yer almaktadır.



Şekil 4: Konak kaynaklı antimikrobiyal peptitler (L. K. Chung & Raffatellu, 2019).

Bakterilerden türetilen antimikrobiyal peptitler veya bakteriyosinler, bakteri tipine göre Gram pozitif bakteriyosin ve Gram negatif bakteriyosin olarak ayrılabilir. Örneğin streptokok cinsi tarafından üretilen nisin nispeten yaygındır (Hammami et al., 2013). Bir çalışmada, *Pediococcus acidilacticii* QC38 kültür süpernatanı, *V. cholerae*'nin *in vitro* üremesi üzerinde inhibe edici aktivite göstermiştir (Morales-Estrada et al., 2016). Daha önce, gıdadan izole edilen *Lactobacillus casei* OGM12, bakteriyosini kazein A üreten *V. cholerae*'ya karşı da inhibitör aktivite göstermiştir (Olasupo et al., 1995). Yine *Streptococcus lactis* 11451 tarafından üretilen bakteriyosin *in vitro* olarak *V. cholerae*'ye karşı inhibitör aktivite göstermiştir. (Spelhaug and Harlander, 1989) (Bina, Provenzano, Nguyen, & Bina, 2008).

3.3. Defensinler

Bu moleküllerin birçok bakteri, mantar, protozoa ve bazı zarflı virüsleri öldürme ve/veya inaktive etme yetenekleri bulunmaktadır**,** mikroorganizmaların membranlarındaki negatif yüklü moleküllere etkileşime girer ve bunların yapısını bozarak hücre ölümünr neden olurlar.

Bugüne kadar, ekspresyon modellerine ve gen yapılarına göre iki ana sınıfa ayrılan altı insan alfa-defensini tanımlanmıştır; miyeloid defensinler veya insan nötrofil peptitleri (HNP'ler) 1 ila 4 ve insan (enterik) defensinler (HD'ler) 5 ve 6 (Porter ve diğerleri, 1998) ve HD-6 (Jones & Bevins, 1993). Son zamanlarda, HD-5'in dişi üreme sistemi, plasenta ve cenin zarları içindeki birçok bölgede de eksprese edildiği gösterilmiştir (Porter et al., 1998); (Jones & Bevins, 1993); (Chairatana & Nolan, 2017; Shirin et al., 2011); (Diamond & Bevins, 1998). Genel olarak, insan a-defensinleri, β-defensinlerden daha az katyonik fakat daha hidrofobiktir ve bakterilerin öldürülmesinde mekanik olarak farklılık gösterebilirler. Defensinler, mikobakteriler dahil Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir ve hem hücre içinde hem de hücre dışında aktiftir. İnce bağırsağın lümen yüzeyindeki HD5 konsantrasyonunun 50-250 μg/ml kadar yüksek olduğu tahmin edilirken, sekresyonun uzaklığı nedeniyle kolonik mukozal yüzeyde önemli ölçüde daha düşüktür. Sağlıklı kadınların vajinal sıvısında 1 ila 50 μg/ml arasında değişen HD5 de bulunur ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlara yanıt olarak erkek ve dişi üreme sisteminde indüklenir. Defensinler ayrıca salgılanan toksini nötralize ederek bakteriyel enfeksiyonu azaltabilir. Defensinler, çeşitli virüslerin replikasyonunu da doğrudan etkisiz hale getirir ve inhibe eder, bunların çok yönlü etki mekanizmaları aydınlatılmıştır. Defensin kemotaktik aktivitesinin, bağışıklık tepkisini başlatma ve düzenlemedeki rolü artık iyi bilinmektedir. Geniş antimikrobiyal aktiviteleri ve çok yönlü immünomodülatör fonksiyonları, bakteriyel, viral ve mantar enfeksiyonlarına karşı temel bir konak koruyucu bileşen olarak doğuştan gelen bağışıklıktaki rollerini pekiştirerek kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bunun yanı sıra monositler, polimorfonükleer lökositler ve T hücreleri için kemotaktik etki

gösterirler ve edinsel immun cevabı güçlendirirler. İnsan a-defensin ailesi kemo-makrofajları çeker. β-defensinler arasında, kemokin reseptörü CCR6 yoluyla olgunlaşmamış bellek T hücreleri ve dendritik hücreler için kemotaktik aktivitelere sahiptirler (Gabay et al., 1989; Harwig, Park, & Lehrer, 1992; Rice et al., 1987); (Selsted, Miller, Henschen, & Ouellette, 1992); (Porter, Liu, Oren, Anton, & Ganz, 1997).

Beta-defensinler, üç korunmuş intra-moleküler disülfid bağı ile stabilize edilmiş bir β-yaprak çekirdek yapısına sahip küçük (2-5 kDa), katyonik konak savunma peptidlerinin bir ailesidir.α-defensinlerin aksine, β-defensinler büyük ölçüde epitel dokularında eksprese edilir. İnsan β-defensin 1 (HBD-1), ürogenital sistem ve solunum yolu dahil olmak üzere bir dizi vücut sistemi tarafından yapısal olarak ifade edilir. İnsan beta defensin 1 (HBD1) ve HBD2, tercihen Gram-negatif bakterilere karşı aktifken, bunların önemli ölçüde daha katyonik muadili olan HBD3, hem Gram-pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkilidir ve potansiyel olarak bakterisidaldir. İnsan β-defensinleeri membran lizisine aracılık ederek antimikrobiyal aktivite gösterirler ve ayrıca kendi ağlarını ve nötrofil hücre dışı tuzaklarını indükleyerek bakterileri yakalayabilir veya öldürebilir. (Álvarez Á, Martínez Velázquez, & Prado Montes de Oca, 2018).

Defensinlerin ekspresyonu ve üretimi, LPS gibi patojenle ilişkili moleküler modellerin (PAMP'ler) TLR tarafından doğrudan tanınması dahil olmak üzere bir dizi yolla aktive edilir. Bu, kendileri de defensin sekresyonunu indükleme kapasitesine sahip olan sitokinlerin, kemokinlerin ve defensinlerin salgılanmasını içeren bir proinflamatuar yanıtla sonuçlanan MAPK- veya NF-κB'ye bağlı kaskadları başlatır. Ekspresyonları, ayrıca NOD2 dahil olmak üzere TLR'ler dışındaki reseptörler tarafından aracılık edilir. Böylece hücrelerin canlı mikobakterilerle enfeksiyonu, TNFa ve HBD-2'nin indüklenmesine yol açar. Antibakteriyel etkinin ana mekanızması, bakteriler hücre dışında iken veya fagositozdan sonra hücre zarlarının geçirgenleştirilmesi yoluyla mikroorganizmaların doğrudan parçalanmasıdır. Defensinlerin yüksek konsantrasyonlarda bulunabileceği bölgeleri kolonize eden patojenler, antibakteriyel aktivitelerine karşı direnç sağlamak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Akciğer tüberkülozu olan hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) örneklerinde ve plevral sıvıda yüksek konsantrasyonda α-defensinler tespit edilmiştir ve *M. avium*-intracellulare enfeksiyonu olan hastalardan alınan BAL sıvısında ise önemli seviyelerde β-defensinler tespit edilmiştir.

3.4. Safra asitleri

Safra asitleri, karaciğer-bağırsak ekseninin düzenlenmesinde yer alan önemli bir bileşiktir. Safra asitleri karaciğerde kolesterolden sentezlenir ve farnesoid X reseptörü (FXR) ve

G-protein bağlı BA reseptörü 1 (GPBAR1/TGR5) tarafından modüle edilebilir. Safra asitleri besinlerin, lipitlerin ve vitaminlerin bağırsak emilimini ve taşınmasını sağlayan fizyolojik deterjanlar olarak görev yapar. Bu nedenle, safra asitlerinde bakteri kaynaklı değişiklikler, konakçı metabolizmasını etkileyebilir. Safra asitleri ve bağırsak mikrobiyotası çeşitli şekillerde etkileşime girebilir ve bu fizyolojik etkileşimlerdeki kesintiler, çeşitli hastalıklara neden olabilir. Bağırsak mikrobiyotasının ve/veya intralüminal metabolomun bileşimi, çeşitli bozuklukların nedeni veya sonucu olabilir; ancak ilişkileri tam olarak aydınlatılmamıştır. Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalar, dislipidemi, insülin direnci (IR) ve diyanetes mellitus (DM) ile safra asitleri metabolizmasının düzensizliği ve bağırsak mikrobiyotasının değişmesi arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Bağırsak mikrobiyal ve safra asitleri aktivitesi insan metabolizmasını etkileyebilir ve bu nedenle metabolik yolların değişmesine ve DM, obezite/hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik hastalıkların/sendromların ortaya çıkmasına neden olabilir (Sah, Arjunan, Park, & Jung, 2022). Ayrıca safra asitlerindeki değişiklikler hepatik metabolik homeostazı etkileyebilir ve karaciğer kanserinin patogenezine katkıda bulunabilir. Artan kanıtlar, bakteriyel mikrobiyotanın karaciğer kanserinin ilerlemesi ve gelişmesinde anahtar rolüne işaret etmektedir. Son dönemlerde, safra asidi bileşiminin farklılıkları, farklı organlarda safra asidi sinyal ağlarının nasıl etkilendiği ve bu ağların bulaşıcı, metabolik ve neoplastik hastalıkları nasıl etkilediğini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu ilerlemeler, mikrobiyota ile ilişkili safra asidi profillerindeki dengesizlikleri hedefleyen terapötiklerin geliştirilmesini sağlamıştır. (S. L. Collins, Stine, Bisanz, Okafor, & Patterson, 2022; Ridlon, Kang, Hylemon, & Bajaj, 2014). Bakteriyel enzimler karakterize edildikçe ve yeni safra asitlerini tanımlamak için kullanılan araçlar giderek daha hassas hale geldikçe, bakteriler tarafından metabolize edilen ve/veya sentezlenen safra asitlerinin repertuarı genişlemeye devam etmektedir.

Birincil safra asitleri, kolesterolü bir substrat olarak kullanarak karaciğerde üretilir, ardından safra bağırsak boşluğuna boşaltılır ve daha sonra ikincil olarak bağırsak mikrobiyotası tarafından terminal jejunumda veya ileumda portal vende yeniden emilim yoluyla karaciğere geri metabolize edilir. İnsan vücudunda, karaciğer tarafından üretilen birincil safra asitleri esas olarak kolik asit (CA) ve kenodeoksikolik asit (CDCA) içerir ve daha sonra safra kesesine girmek ve ince bağırsağa taşınmak için taurin veya glisin ile konjuge safra asidi (CBA) oluşturur. (Ridlon, Harris, Bhowmik, Kang, & Hylemon, 2016). Safra tuzlarının çoğu vücut tarafından terminal ileumdan emilir, ancak bazı safra tuzları ikincil safra tuzları üretmek için bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilir. (Wahlström, Sayin, Marschall, & Bäckhed, 2016). Safranın patojen bakteriler üzerine etkisine bir örnek vermek gerekirse, kolera

hastalığına neden olan ve bağırsakta biyofilm oluşturmuş *V. cholerae*, biyofilm matrisini değiştirerek ve biyofilm parçalanmasını teşvik ederek taurokolat tarafından bozulur. Ayrıca taurokolat, TcpP molekülleri arasında C207-C207 disülfit bağlarının oluşumunu uyarır, böylece virülans geni toxT'nin ekspresyonunu aktive eder (Yang et al., 2013). Müsinle aktive olan *V. cholerae* T6SS ekspresyonu durumunda, konjuge deoksikolik asitteki taurin ve glisin grupları, *V. cholerae* T6SS'nin intestinal komensal bakteriler üzerindeki öldürme etkisini arttıracaktır. Böylece, konjuge sekonder safra asitleri *V. cholerae* biyofilm oluşumunu inhibe ederken, *V. cholerae* ayrıca T6SS ve virülansı artırarak ekolojik niş kazanmak için bağırsak mikrobiyotasını da öldürebilir. Bağırsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilen serbest deoksikolik asit, *V. cholerae* T6SS'nin toksisitesini engeller. Bu nedenle bağırsak mikrobiyotası, safra asidi metabolizmasını ayarlayarak patojenik bakterilerin öldürücü etkisine karşı koyabilir (Bachmann et al., 2015). Ancak *V. cholerae* hücre zarı geçirgenliğini azaltarak ve *in vitro* olarak safra asidi uyarımını algıladıktan sonra, hücre içi safra asitlerinin birikim toksisitesinden kaçınmak için RND ailesi çıkış pompasını kodlamak üzere acrAB gen ekspresyonunu yukarı regüle eder ve safrayı dışarı pompalayarak safra asidlerinin etkisine karşı direnç geliştirir (Chatterjee, Chaudhuri, Saha, Gupta, & Chowdhury, 2004).

3.5. Vitaminler

Vitaminler hem mikrobiyal hem de konakçı metabolizmaları için faydalı moleküllerdir. K vitamini üreten bağırsak bakterileri (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium lentum*, *Enterobacter agglomerans, Serratia marcescens* ve *Enterococcus faecium*) vasküler kalsifikasyonun azaltılması, HDL'nin yükseltilmesi ve kolesterol seviyelerinin düşürülmesi için gerekli olan K2 vitaminini (menakinon) anaerobik olarak sentezleyerek, ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı gibi kardiyovasküler bozuklukların önlenmesi veya riskin azaltılmasına katkıda bulunur. Bağırsak mikrobiyotası aynı zamanda konakçı için önemli bir B vitamini kaynağı olarak da hizmet eder. Bunlar arasında, özellikle bağırsak mikrobiyotası tarafından sentezlenen B5 ve B12 vitaminleri, sinir sisteminin normal işleyişi için gerekli olan asetilkolin ve kortizol üretimi de dahil olmak üzere çok çeşitli konak biyokimyasal süreçleri için koenzim görevi görür. B5 ve B12 vitaminlerinin eksikliği gastrointestinal rahatsızlık, uykusuzluk, nöropsikolojik ve hematolojik bozukluklar gibi çeşitli bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Andrès et al., 2004);(Degnan, Taga, & Goodman, 2014).

4. Antimikrobiyallerin Mikrobiyota Üzerine Etkisi

Yaş, diyet ve coğrafik dağılım, mikrobiyomu şekillendiren ve kompozisyon değişkenliğini kısmen açıklayan önemli faktörlerdir. Benzer şekilde, bazı ilaçlara maruz kalma, yapı ve

kompozisyonda önemli değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Antimikrobiyal maruziyet, mikrobiyom yapısını derinden etkileyerek bakteri çeşitliliğinde azalmaya ve belirli taksonların hem azalmasına, hem de çoğalmasına yol açar (Tosh & McDonald, 2012);(S. Kim, Covington, & Pamer, 2017). Her bir antibiyotik sınıfının farklı özellikleri ve vücuttan farklı şekilde atılma yolları vardır, bu da mikrobiyom bileşiminde farklı değişiklik modelleriyle sonuçlanır (Dethlefsen & Relman, 2011; Iizumi, Battaglia, Ruiz, & Perez Perez, 2017; Lozupone et al., 2012). Geniş spektrumlu antibiyotikler, Firmicutes ve Bacteroidetes arasında bir dengesizliğe yol açar. Bakteriyel çeşitlilik azalır ve tedaviler sırasında bu bakterilerin bolluğu da azalır. Mikrobiyom bileşimindeki değişiklik, antibiyotik sınıfına, doza, maruz kalma süresine, farmakolojik etkiye ve hedef bakterilere bağlıdır (Iizumi et al., 2017) (Guh & Kutty, 2018). Bağırsak mikrobiyota bileşimi antibiyotikten az ya da çok etkilenebilir. Antibiyotikler, türlerin çeşitliliğinin azalması, metabolik aktivitenin değişmesi ve antibiyotiğe dirençli organizmaların seçilmesi gibi bağırsak mikrobiyotası üzerinde çeşitli olumsuz sonuçlara yol açabilir, bu da antibiyotikle ilişkili ishal ve tekrarlayan *Clostridioides difficile* enfeksiyonları gibi olumsuz yönlü etkilere neden olabilir (Pérez-Cobas et al., 2013). Hastalık hafif ishalden ölüme kadar değişir (Guh & Kutty, 2018).

Antimikrobiyallerin etkileri uzun süreli olabilir (Dethlefsen, Huse, Sogin, & Relman, 2008). Lipofilik antibiyotiklerde (florokinolonlar, glisilsiklinler, linkozamidler, makrolidler, metronidazol, streptograminler, tetrasiklinler) hepatik yoldan atılma daha yaygındır. Oral yoldan alınan ve bağırsaktan absorbe edilen antibiyotikler, bağırsak lümeninde daha düşük bir nihai konsantrasyona neden olarak, mikrobiyota maruziyetini azaltır. Örneğin, oral olarak uygulanan metronidazol neredeyse tamamen ince bağırsakta emilir ve sonuç olarak, metronidazolün bağırsak konsantrasyonları gastrointestinal sistem boyunca önemli ölçüde azalır ve minimal miktarlarda kolona ulaşır (Levison & Levison, 2009). Tersine, vankomisin gibi zayıf emilen antibiyotikler, oral uygulandığında, GI kanalının uzunluğu boyunca yüksek konsantrasyonları muhafaza eder. Bu, gastrointestinal sistem boyunca, oral metronidazolün, en azından kısmen bağırsak tarafından emilmesinden dolayı, mikrobiyota üzerinde oral vankomisine göre daha az etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bir antibiyotiğin veriliş yolu, atılım mekanizması ve bağırsak geçirgenliğinin, antibiyotiği doğrudan veya dolaylı olarak bağırsak lümenine taşıyıp taşımadığının dikkate alınması, mikrobiyota üzerinde bir etkisinin olup olmayacağını tahmin etmeye yardımcı olabilir. Örneğin, *C. difficile*'yi tedavi etmek için kullanılan iki antibiyotik, metronidazol ve vankomisin farelerde karşılaştırıldı ve farklı etkiler sergiledikleri gösterildi (Lewis et al., 2015).Vankomisin seçici olarak Gram-pozitif bakterileri öldürürken, metronidazol ağırlıklı olarak anaerobik bakterileri hedefler. Bir antibiyotiğin etki spektrumu, patojenik bakterilerin bağırsakta kolonize olup artmasında da önemli bir rol

oynayabilir. Örneğin, metronidazol tedavisi intestinal enterokokkal yayılma riskini üç kat arttırırken, intravenöz vankomisin ve beta-laktam uygulaması bu riski artırmaz (Taur et al., 2012). Bir çalışma sonuçları, beş günlük bir siprofloksasin kürünün beş aya kadar mikrobiyom disbiyozuna neden olabileceğini gösterdi. Başka bir çalışmada, yedi günlük klaritromisin, metronidazol ve omeprazol küründen sonra dört yıla kadar mikrobiyom bileşiminde önemli değişiklikler olduğu saptandı (Jakobsson et al., 2010; S. Kim et al., 2017). Mikrobiyota ve bulaşıcı hastalıklara karşı korumadaki rolü, hastanede yatan bağışıklığı baskılanmış hastalarda özellikle önemlidir. Bağışıklığı baskılanmış bu kişiler, özellikle kemoterapi alan veya hematopoietik kök hücre nakli geçirenler, gastrointestinal sistemden kaynaklanan enfeksiyon riski altındadır (Velasco et al., 2006). Profilaktik antibiyotik uygulaması bu enfeksiyonları önleyebilir. Bununla birlikte, antibiyotikler, aynı anda antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olurken, bağırsak mikrobiyotasını tehlikeye atabilir. Örneğin *C. difficile* ile kolonizasyon bağırsak hastalığına neden olabilir (Abt, McKenney, & Pamer, 2016), ikinci olumsuz etkide diğer yaygın nozokomiyal bakteriyel patojenler gastrointestinal kanalda çoğalabilir ve kan dolaşımına geçerek sistemik hastalığa neden olabilir (Taur & Pamer, 2016). En yaygın bakteriler, viridans streptokoklar, vankomisine dirençli *Enterococcus* spp., *E. coli* ve *Klebsiella* türleri gibi oksijene toleranslı patojenlerdir.

Ayrıca, antibiyotik kullanımı ile obezite arasında bir bağlantı olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir ((Del Fiol, Balcão, Barberato-Fillho, Lopes, & Bergamaschi, 2018). Bazı çalışmalar, Firmicutes'in Bacteroidetes'e belirli seviyelerden ziyade, oranının artmasının obezite ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Kasai et al., 2015)), (Duncan et al., 2008);(Schwiertz et al., 2010)). Araştırmacılar, 96 kişide (48 antibiyotik grubu ve kontrol) yapılan bir çalışmada vankomisin ve gentamisin ile tedavi edilen hastalarda enfeksiyöz endokardit atağından sonra önemli ve kalıcı kilo artışı bildirdiler (Thuny et al., 2010). Yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yatan hastalarda geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi ile yaygın olarak gözlemlenen bağırsak mikrobiyom disbiyozları, hastane kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (McDonald et al., 2016); (Meng, Klingensmith, & Coopersmith, 2017; Ojima et al., 2016). Bir araştırmanın sonuçları, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan kısa süreli antibiyotik kürlerinin, sağlıklı insan gönüllülerde hem kısa hem de uzun vadeli bozulmalara ve mikrobiyomda skarlaşmaya neden olabileceğini ve sağlıklı mikrobiyomlarda AR'de uzun süreli artışa neden olabileceğini göstermektedir (Anthony et al., 2022). *Escherichia coli, C. difficile* and *C. perfringens* gibi bazı patojenlerin entrotoksinleri, sıkı bağlantılı bariyer fonksiyonlarını zayıflatır. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, oral antibiyotik kullanımının kolon kanseri riskinde artış ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır (S. Zhang & Chen, 2019).

5. Koruyucu Fonksiyonları

Mikrobiyota GİS yapısı ve fonksiyonlarının devamlılığında önemli rol oynar. İntestinal epitel, birbirine sıkıca bağlı tek sıra kolumnar hücrelerden oluşur. Epitel hücreleri arasından geçiş ise zonula okludens (tight junction), zonula adherens ve desmozomlar ile olmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası, bağırsakta açlıkla indüklenen yağ faktörünü (FIAF) ve beyin ve kas gibi çeşitli organlarda monofosfatla aktive edilen protein kinazı (AMPK) inhibe eder, bu da yağ birikiminin artmasına neden olur. Polisakkaritlerden bakteriler tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), bağırsak hareketliliğini ve konakçının bağışıklığını uyaran G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler; GPR41, GPR43 ve GPR109A) ile etkileşime girer. Bağırsak mikrobiyotası aynı zamanda safra asidi sentezinin ve hepatik trigliserit birikiminin düzenlenmesinden sorumlu safra asidi reseptörü olan farnesoid X reseptörünün (FXR) düzenlenmesi yoluyla yağ birikmesine de katkıda bulunur. Bağırsak mikrobiyotası, kolini trimetilamin'e dönüştürür, böylece kolinin konakçı kullanımı için biyoyararlanımını etkiler ve dolaylı olarak çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL'ler) yoluyla fosfatidilkolin üretimini ve hepatik trigliserit taşınmasını etkiler. Aslında beş filum, bağırsak mikrobiyotasını oluşturan bakterilerin çoğunluğunu temsil eder. Herhangi bir bireyin kalın bağırsağında yaklaşık 160 tür bulunur ve bunların çok azı akraba olmayan bireyler arasında paylaşılır. *Bacteroides. thetaiotaomicron*, genel bağırsak topluluğunun %5 ila %50'sini oluşturan, insan bağırsağında en belirgin fermente edicilerden biridir. *B. thetaiotaomicron* desmozomların fonsiyonlarının sürdürülmesinde etkilidir. *B. thetaiotaomicron*, genel bir fermenterdir: nişasta gibi diyet bitkisi polisakkaritlerinin yanı sıra heparin gibi mukozal glikanları tüketir ve hidrojen, karbon dioksit, format, asetat ve süksinat gibi fermantasyon ürünleri üretir (Wexler, 2007)). İnsan hücrelerinin parçalayamadığı polisakkaritleri kısmen parçalayarak çok önemli bir sindirim rolü oynar ve insan ve mikrobiyal tüketim için kısa zincirli yağ asitleri (asetat, süksinat, propiyonat, laktat) üretir. Bu süreçte, doğrudan etkileşimler yoluyla ve diğer bakterilerle rekabet ederek konakçının bağışıklık savunmasını etkinleştirerek bağırsakları enfeksiyona karşı korur (Buffie & Pamer, 2013; Catlett et al., 2022). Sıkı bağların devamlılığının sağlanmasında ise mikrobiyal hücre duvarı peptidolikanlarınca uyarılan TLR2 ilişkili yolak etkin rol oynar. *Methanobrevibacter smithii*, insan bağırsağındaki baskın metanojendir ve metanojenin %1 ila %10'unu oluşturur. Bebeklik döneminde insan bağırsağında kolonize olur ve çoğu insanda varlığını sürdürür. yetişkinliğe kadar bireylerin %95,7'sine kadar tespit edilmiştir. Dengesizlik *M. smithii* gut popülasyonlarında obezite ve yetersiz beslenmeyle ilişkili sindirim sistemi ile ilişkilendirilmiştir.

Akkermansia muciniphila'nın metabolik endotoksemiyi azaltarak intestinal bariyer fonksiyonlarını kontrol eden endo-kannabinoid düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli *Lactobacillus* cinsinde bulunan bakteriler, epitelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantıları güçlendirerek, epitelyal geçirgenliği azaltır. Geleneksel olarak *Lactobacillus* türleri metabolizmalarına göre üç gruba ayrılabilir. 1.grup Zorunlu homofermentatif grup; ana yan ürün olarak laktik asit üretmek üzere karbonhidratları fermente ederler (örn. *L. acidophilus* ve *L. salivarius*). 2. Grup Fakültatif heterofermentatif grup; belirli koşullar altında veya belirli substratlarla karbonhidratları laktik asit, etanol üretmek üzere fermente ederler. Yan ürünler olarak /asetik asit ve karbondioksit (örn. *L. casei* ve *L. plantarum*) üretirler. 3. Grup heterofermentatif grup; yan ürünler olarak laktik asit, etanol/asetik asit ve karbon dioksit üretmek için her zaman karbonhidratları fermente ederler (e.g. *L. reuteri* ve *L. Fermentum* (Dempsey & Corr, 2022).

6. Sağlık ve Hastalıkta Bağırsak Mikrobiyotası Varyasyonları

Mikrobiyom yapısındaki değişiklikler olan disbiyoz, bağırsak bariyerini, bağışıklık sistemini, metabolik işlevleri ve bakteriyel metabolit üretimini (ör. kısa zincirli yağ asitleri) ve ayrıca merkezi sinir sisteminin işlevini/gelişmesini bozar ve çeşitli hastalıklara neden olur (Şekil 5). Disbiyoz, inflamatuar bağırsak hastalığı (örn. Crohn hastalığı, ülseratif kolit), irritabl (huzursuz) bağırsak sendromu ve kolorektal kanser gibi çeşitli bağırsak bozukluklarının yanı sıra bağırsak dışı bozukluklar (örn. obezite, tip 2 diyabet, artrit ve depresyon) ile ilişkilendirilmiştir. Bağırsak mikrobiyotası, özellikle santral sinir sistemi ve immün sistemle etkileşim halindedir. Bu etkileşim çift yönlü bir etkileşim olup, insan fizyolojisinde çeşitli uyaranlara yol açabiliyorken, mikrobiyotada değişikliklerle sonuçlanabilmektedir. Bu bölümde GİS'deki bozukluklar, Santral Sinir Sistemi, immün sistem ve mikrobiyota arasındaki ilişki ve hastalıklar anlatılacaktır.



Şekil 5: Mikrobiyom yapısındaki değişiklikler olan disbiyoz, bağırsak bariyerini, bağışıklık sistemini, metabolik işlevleri ve bakteriyel metabolit üretimini ve ayrıca merkezi sinir sisteminin işlevini/gelişmesini bozar ve çeşitli hastalıklara neden olur.

6.1. Bağırsak Bozuklukları

6.1.1 İrritabl (Huzursuz) Bağırsak sendromu (IBS): IBS hastalarının mikrobiyal topluluklarının kontrollere kıyasla Proteobacteria ve Firmicutes açısından zenginleştiğini, ancak Actinobacteria ve Bacteroidetes açısından azaldığını göstermiştir. Özellikle, Firmicutes filumu içindeki *Lachnospiraceae* familyasına ait bakteriler daha fazla bulunur (Krogius-Kurikka et al., 2009). Diğer çalışmalar (Bhattarai, Muniz Pedrogo, & Kashyap, 2017; Salonen, de Vos, & Palva, 2010) sağlıklı kontrollere kıyasla IBS hastalarında, bazı filum ve cins varyasyonlarını doğruladı ve ortaya çıkardı; Firmicutes-Bacteroidetes-oranında artış, bazı Firmicutes ailelerinde (*Lactobacilli, Faecalibacterium*) ve Actinobacteria popülasyonunda (*Bifidobacteria, Collinsella*) azalma ve bazı Firmicutes ailelerinde (*Veillonella, Streptococci* ve *Ruminococcus* spp.) ve Proteobacteria'da (*Enterobacteriaceae* spp.) artış olduğunu gösterdi. Bu bulgular, amino asit sentezinde, hücresel bağlantıların bütünlüğünde ve enflamatuar yanıtta yer alabilecek mikrobiyal zenginlik kaybını göstermiştir ve bu da, IBS semptomlarını kısmen açıklayan epitelyal bariyer fonksiyonlarının zayıflığını düşündürmektedir.

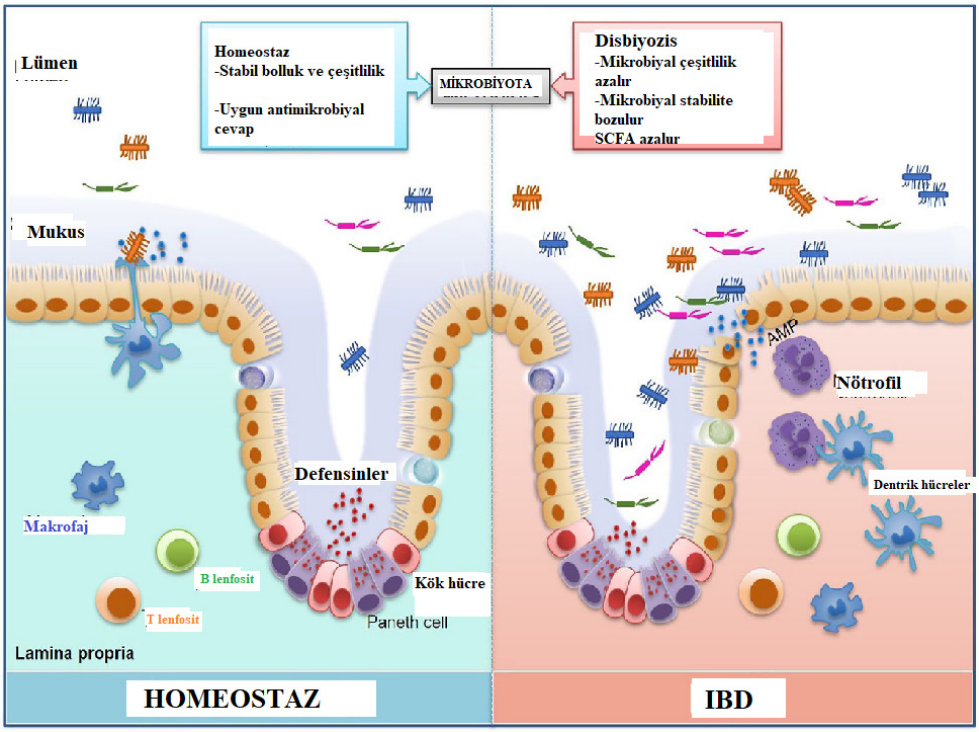
6.1.2. İnflamatuar bağırsak hastalığı (IBD)

İnflamatuar barsak hastalıkları (IBD), ülseratif kolit (UC) ve Crohn hastalığı (CRD) dahil olmak üzere gastrointestinal sistemin idiyopatik, kronik ve tekrarlayan inflamatuar durumlarını bir araya getirir. İnflamatuar barsak hastalığı patogenezinde üç ana bileşen olarak genler (predispozisyon), immünite (doku hasar mekanizması) ve mikrobiyota (çevresel stimülus) sayılabilir (Şekil 6). Bu üçü arasındaki moleküler mekanizmaların açığa çıkarılması ile hastalık patogenezi açısından değerli bilgiler ortaya konulmuştur. Araştırmlar, IBD hastalarında, kontrol grubunun bağırsak mikrobiyotasına kıyasla *Lachnospiraceae* ve *Bacteroidetes* mikrobiyal popülasyonlarının azaldığını ve Proteobacteria ailelerinin arttığını göstermiştir (Andoh, Benno, Kanauchi, & Fujiyama, 2009; Frank et al., 2007).

Bağırsak mikrobiyota varyasyonları, UC ve CRD arasında farklı görünmektedir. Ülseratif kolit (UC) hastalarında kontrollere göre bütirat üreten *Roseburia hominis* ve *Faecalibacterium prausnitzii* türlerinin bolluğunun azaldığı gözlemlenmiştir (Machiels et al., 2014). Genel çeşitliliğin azalmasına ek olarak artan *F. prausnitzii* düzeyleri sağlanan Crohn (CRD) hastalarında bunun tersi gözlemlenmiştir.(Hansen et al., 2012), Başka bir çalışmada, CRD hastalarında *Clostridium* spp.'nin karakterize edilmemiş bir türü olan *Dialister invisus*, *F. prausnitzii* ve *Bifidobacterium adolescentis*'de azalma, buna karşın *Ruminococcus gnavus*'ta artış gösterilmiştir (Joossens et al., 2011) (Rinninella et al., 2019). Sokol ve arkadaşları, CRD hastalarında *F. prausnitzii*'nin azaldığını doğruladı ve ayrıca canlı *F. prausnitzii'*nin oral yoldan uygulanmasının kolitin şiddetini azalttığını ve disbiyozu düzeltme eğiliminde olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar, aynı zamanda probiyotik olarak *F. prausnitzii* kullanılarak disbiyozun dengelenmesinin CRD tedavisinde umut verici bir strateji olduğunu göstermektedir(Sokol et al., 2008).

Son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalar, primer sklerozan kolanjit- inflamatuar barsak hastalığı (PSC-IBD) ve inflamatuar barsak hastalığı (IBD) olan hastaların, azalmış biyolojik çeşitlilik ve değişen kompozisyon ile karakterize edilen, bozulmuş bir bağırsak mikrobiyotasına sahip olduğunu gösterdi (Şekil (Quraishi et al., 2017). Nakamoto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada [8], kolon biyopsisi mikrobiyota analizlerinde PSC-IBT ve IBT hastalarında, özellikle üç farklı bakterinin artan bolluğuyla karakterize edilen bakteriyel bir disbiyoz sergilediğini doğruladı: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Enterococcus gallinarum*. Bu sonuçlar, 18 Japon PSC hastasından oluşan bir popülasyonda gözlemlendi ve 27 Japon ve 44 Avrupalı PSC hastasından oluşan iki bağımsız kohortta doğrulandı (Nakamoto et al., 2019). Kolon biyopsisi mikrobiyotasının analizi, primer sklerozan (PSC-IBD ve IBD'si olan

hastalarda, kontrollere kıyasla *Prevotella* ve *Roseburia*'nın (bir bütirat üreticisi) bolluğunun azaldığını gösterdi. PSC-IBD hastalarında, IBD hastaları ve kontrol hastalarıyla karşılaştırıldığında *Bacteroides* neredeyse hiç yoktu ve *Escherichia*, *Lachnospiraceae* ve *Megasphaera*'da önemli artışlar vardı (Quraishi et al., 2017).



Şekil 6: Normal insan ve IBD'larında bağırsak mikrobiyotası ile konakçı bağışıklık tepkisi arasındaki etkileşim. Bağırsak mikrobiyotası sağlam bağırsak mukozal bariyerinin korunması ve antijenlere karşı orta derecede bağışıklık tepkisi de dahil olmak üzere, bağırsak mukozal bağışıklık homeostazisinin korunmasında önemli bir rol oynar. Bağırsak mikroorganizmalarının bolluğu ve çeşitliliğindeki bozukluklar, konakçının bağırsak bağışıklık sisteminin bozulmuş fonksiyonuna neden olur ve dolayısıyla İBH'ler de dahil olmak üzere bir dizi bağırsak ve sistemik hastalığın potansiyel nedeni haline gelir (H. Chen, Li, & Liu, 2020).

6.1.3. Çölyak hastalığı

Çölyak hastalığı (ÇH), genetik olarak yatkın bireylerde diyetteki glüten proteinlerine karşı anormal bir bağışıklık tepkisinden kaynaklanan kronik bir bağırsak iltihabı bozukluğudur. GI mikrobiyota varyasyonları, ÇH'nın patogenezinde önemli bir rol oynayabilir; gerçekten de disbiyoz, çölyak hastalarında inflamatuar bir ortamla bağlantılıdır (Caio et al., 2020). Çölyak hastalığı, glüten, genetik faktörler ve bağırsak mikrobiyotası gibi çevresel faktörler arasındaki etkileşimden kaynaklanır (Chander, Yadav, Jain, Bhadada, & Dhawan, 2018).

Çalışmalarda, çocuklarda intestinal dsibiyozis ve azalmış immünoglobulin kaplı bakteriler çölyak hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (De Palma et al., 2010). ÇH'larının duodenal mikrobiyotasında *Enterobacteriaceae* hakimiyeti ve *Bacteroidetes/Streptococcus* alt hakimiyeti görülmüştür. Dışkı mikrobiyotası, sağlıklı kontrollere kıyasla, ÇH'larında daha düşük miktarda *Bacteroides-Prevotella*, *Akkermansia* ve *Staphylococcaceae* gösterdi. (Di Biase et al., 2021; Nadal, Donant, Ribes-Koninckx, Calabuig, & Sanz, 2007). Başka bir çalışmada, toplam *Bifidobacterium* ve *B. longum* popülasyonlarındaki azalmalar, kontrollerle karşılaştırıldığında hem aktif hem de aktif olmayan ÇH'ları ile ilişkilendirildi. Bu bakteri grupları, adjuvan diyet tedavileri için yeni hedefler oluşturabilir denilmektedir (Collado, Donat, Ribes-Koninckx, Calabuig, & Sanz, 2008). Diğer bir çalışmada, *Bacteroides* ve *Clostridium leptum* grupları, hastalığın evresinden bağımsız olarak ÇH'larının dışkı ve biyopsi örneklerinde kontrollere göre daha boldu. *E. coli* ve *Staphylococcus* cinsi bakteri sayıları da tedavi edilmemiş ÇH'larının dışkı ve biyopsi örneklerinde, kontrollere göre daha yüksekti, ancak seviyeleri GFD ile tedaviden sonra normale döndü. *Bifidobacterium* seviyeleri, her iki ÇH grubunun dışkısında ve tedavi edilmemiş ÇH'larının biyopsi örneklerinde kontrollere kıyasla daha düşüktü. Benzer bakteri grupları, biyopsi örnekleri ve dışkıda ÇH ile ilişkiliydi; bu, fekal mikrobiyotanın ÇH'larındaki ince bağırsağı kısmen yansıttığını ve bu bozukluğun uygun bir biyolojik indeksini oluşturabileceğini gösteriyor sonucuna varılmıştır (Collado et al., 2008).

Bifidobacterium spp. *B. longum*, *Clostridium histolyticum*, *C. lituseburense* ve *F. prausnitzii* grup oranlarının tedavi edilmemiş CH'larında sağlıklı kontrollere göre daha az olduğunu göstermiştir. Gerçekten de, ÇH'ları, sağlıklı deneklerle karşılaştırıldığında faydalı türlerde (*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*) bir azalma ve potansiyel olarak patojenik olanlarda (*Bacteroides* ve *E. coli*) bir artış göstermektedir (Nadal et al., 2007).

ÇH'larının GİS mukozal tabakası, bağırsak mikrobiyotasını stabilize etmekte başarısız olması durumunda, konağın zararlı antijenler ve patojenlerin istilasını önlemede başarısız olur. Bu disbiyoz, glütensiz bir diyetten sonra azalır, ancak yine de kalabilir (Marasco et al., 2016);.(De Palma et al., 2010).

6.1.4. Kolorektal Kanser (KRK)

Kolorektal kanser, dünyada kansere bağlı ölümlerin üçüncü en yaygın nedenidir (Jemal et al., 2011). KRK hastaları ve sağlıklı gönüllüler arasındaki yapısal fekal bakteriyel segregasyonlar gösterilmiştir (T. Wang et al., 2012). KRK hastalarının bağırsak mikrobiyotası, *Bacteroides fragilis, Enterococcus, Escherichia/Shigella, Klebsiella, Streptococcus* ve *Peptostreptococcus* açısından zenginleştirilmiş ve *Roseburia* ve *Lachnospiraceae* familyasının

diğer bütirat üreten bakterileri açısından fakirleştirilmiştir (T. Wang et al., 2012). Sağlıklı gönüllülerin bağırsak mikrobiyotası, *Bacteroides vulgatus* ve *Bacteroides uniformis* ile zenginleştirilmiştir. Bu nedenle, bütirat üreticilerinin azalması ve fırsatçı patojenlerin artması gibi bağırsak mikrobiyota varyasyonları, KRK hastalarında bağırsak mikrobiyotasının önemli bir yapısal dengesizliğini oluşturur. Shen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kontrollere kıyasla KRK vakalarında daha yüksek bir Proteobacteria bolluğu ve daha düşük bir Bacteroidetes bolluğu gösterilmiştir. KRK vakalarında, kontrollere kıyasla *Dorea* spp. ve *Faecalibacterium* spp. bolluğunun arttığı; *Bacteroides* spp. ve *Coprococcus* spp. cinslerinin daha düşük oranlarda olduğu gösterildi (Shen et al., 2010). Genomik analizler, kolorektal kanserle *Fusobacterium* spp ile ilişki olduğunu gösterdi (Kostic et al., 2012). KRK hastalarının mikrobiyotası *Fusobacterium* spp. açısından zenginleşirken, Bacteroidetes ve Firmicutes filumları azalmıştır. Ayrıca, *Fusobacterium* spp. enflamatuar aracılı bir mekanizma ile tümör oluşumuna katkıda bulunabilir, ancak kolorektal karsinom patogenezindeki kesin rolü daha fazla araştırmayı gerektirir. Mikrobiyal biyobelirteçleri tanımlamak için LEfSe, rastgele orman (RF) ve birlikte oluşum ağı yöntemlerini kullanıldığı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, KRKveri kümelerinden tahmin edilen metabolitlerin analizi, KRK ile ilişkili bakteriler; *Peptostreptococcus stomatis*, *Gemella morbillorum*, *Bacteroides fragilis*, *Parvimonas* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Solobacterium moorei*, ve *Clostridium symbiosum* ve kontrolle ilişkili bakterilerle negatif korelasyona sahiptir. Tersine, bütirat, nikotinamid, kolin, triptofan ve 2-hidroksibütanoik asit, kontrolle ilişkili mikroorganizmalarla pozitif korelasyonlar göstermiştir (Avuthu & Guda, 2022). Yetişkin özofagus mikrobiyomu büyük ölçüde *Streptococcus* ve *Prevotella* cinsleri arasında bir denge içerir. Bununla birlikte, adenokarsinom gibi yaş ve hastalık durumuna bağlı değişikliklerin, özellikle adenokarsinom gelişiminin erken evrelerinde *Haemophilus*, *Veillonella* ve *Rothnia* cinsleri gibi Gram-negatif bakterilerle zenginleşmeye neden olduğu gösterilmiştir (Deshpande, Riordan, Castaño-Rodríguez, Wilkins, & Kaakoush, 2018).

6.2. Bağırsak Dışı Bozuklukları

Bağırsak-beyin ekseni boyunca iletişimin, sempatik ve parasempatik sistemleri içeren otonom sinir sistemi aracılığıyla gerçekleştiği öne sürülmüştür. Bağışıklık sistemi ve enterik sinir sistemi diğer iki ek iletişim hatları olarak önerilmiştir. Araştırmalardaki son gelişmeler, bağırsak mikrobiyota-konak ilişkisinin, "bağırsak-beyin ekseni" etkileşimleri olan metabolik hastalıklar ve nörolojik bozukluklar gibi birçok bağırsak dışı hastalık için kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Aynı zamanda "bağırsak-retina ekseni" etkileşimleri ile yaşa bağlı makula dejenerasyonu

gibi karmaşık çok faktörlü hastalıklar da mikrobiyota ile ilşkilendirilmiştir (Mayer, Nance, & Chen, 2022; Rinninella et al., 2018).

6.2.1. Obezite

Son yıllarda, obezitenin bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili olduğu konusunda çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bağırsak mikrobiyota yönetimi, obezite tedavisinde yeni bir yöntem haline gelmekle birlikte, genetik, çevre, bağırsak mikrobiyotası ve obezite arasındaki karmaşık etkileşimler tam olarak anlaşılamamıştır.

Hayvan çalışmaları, mikrobiyal bileşimdeki değişiklikleri obeziteye bağlayan nedensel kanıtların çoğunu oluştururken, insanlarda veriler daha değişkendir. 16S rRNA gen dizilimi, obezitenin iki baskın bakteri şubesi (Firmicutes ve Bacteroidetes) ile ilişkili olabileceğini gösterdi. Obez farelerin bağırsak mikrobiyotası, Bacteroidetes bolluğunda %50 azalma ve Firmicutes'ta orantılı bir artış gösterdi (Ley et al., 2005). Leptine dirençli obez (leptini teşvik eden tokluk) ve diyabetik farelerde daha fazla sayıda *Ruminococcaceae* ve Rikenellaceae gözlemlenmiştir (Geurts et al., 2011). Ek olarak, yüksek yağlı bir diyetle beslenen farelerde *Ruminococcaceae* ve *Rikenellaceae*'nin daha yüksek bolluğu, yalnızca alınan diyete bağlı değildir, aynı zamanda obezite ve tip 2 diyabet ile yakından bağlantılıdır (K. A. Kim, Gu, Lee, Joh, & Kim, 2012). Ayrıca, *Desulfovibrionaceae* bolluğu ile obezite ve tip 2 diyabet arasındaki ilişki gösterilmiştir (Cani, 2013) (Zhang et al., 2010). Diğer çalışmalar, lipopolisakkaritler gibi proinflamatuar moleküller üreterek ve enerji sağlamaya ve konakçı yağ depolamasını arttırmaya yardımcı olarak Proteobacteria'nın obezitedeki rolünü doğrulamıştır. Yakın zamanda, mukus tabakasında yaşayan müsin parçalayıcı bir bakteri olan *Akkermansia muciniphila*'nın hem genetik hem de diyete bağlı obez farelerde azaldığını gösterilmiştir (Derrien, Vaughan, Plugge, & de Vos, 2004).

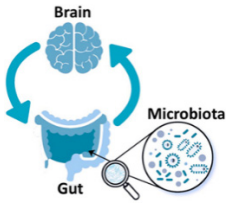
Tüm bu çalışmalar, obezitenin, daha düşük tür çeşitliliği ve metabolizmaya dahil olan genlerin bolluğundaki kaymalar dahil olmak üzere, bağırsak mikrobiyotasının bileşimindeki değişikliklerle ilişkili olduğunu vurgulamaktadır. Bağırsak mikrobiyotası, obezite patofizyolojisine katkıda bulunan bir faktör olarak kabul edilebilir ve potansiyel terapötik etkileri olabilir (Turnbaugh et al., 2006).

6.2.2.Tip 2 Diyabet (T2D)

Bağırsak mikrobiyotası çeşitli konakçı algılama ve sinyal yolları ile etkileşime girerek endokrin sistemin modülasyonuna, bağışıklık tepkilerine, sinir sistemi aktivitesine ve dolayısıyla metabolik hastalıklara yatkınlığa yol açar (X. Li, Watanabe, & Kimura, 2017). Bağırsak

mikrobiyota disbiyozu, diyabet ve ilgili metabolik hastalıklar için yeni tedavi stratejilerini yönlendirir. Çeşitli çalışmalar, T2D'den muzdarip hastalarda bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun değiştiğini göstermiştir, ancak bu değişikliklerin, bozukluğun bir nedeni mi yoksa sadece bir sonucu mu olduğu açık değildir (Larsen et al., 2010) (Walsh, Guinane, O'Toole, & Cotter, 2014). Bir çalışmada, Firmicutes ve Clostridia filumlarının oranlarının, sağlıklı grupla karşılaştırıldığında T2D hastalarında önemli ölçüde azaldığı gösterildi. Ayrıca Bacteroidetes'in Firmicutes'e oranı, Bacteroides-Prevotella ve Betaproteobakteri oranları T2D hastalarında sağlıklı hastalara kıyasla oldukça yüksektir ve plazma glukozu ile pozitif korelasyon gösterir (Larsen et al., 2010). T2D Çinli hastaların bağırsak mikrobiyotasına ilişkin metagenom bazında bir ilişkilendirme çalışması, tip 2 diyabetli hastaların *Roseburia* spp. gibi bütirat üreten bakterilerde azalma ile karakterize olduğunu gösterdi. Aynı çalışma, çeşitli fırsatçı patojenlerde (*Clostridium* spp., *Bacteroides caccae*) bir artışın yanı sıra, sülfat azaltımı sağlayan diğer mikrobiyal fonksiyonlarda bir zenginleşme (*Desulfovibrionaceae* spp.) olduğunu gösterdi (Qin et al., 2012).

6.2.3. Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ile İlgili Bozuklukları



Şekil 7: Bağırsak beyin ekseni ve mikrobiyota.

Beyin ve bağırsak, merkezi sinir sistemi, enterik sinir sistemi ve gastrointestinal sistem arasındaki çift yönlü etkileşimlerle bağırsak-beyin ekseni yoluyla bağlanır (Şekil 7). Bu çift yönlü etkileşimler beynin, bağışıklık fonksiyonlarının yanı sıra gastrointestinal fonksiyonları da etkilemesini sağlar (Sasso et al., 2023).

6.2.3.1. Alzheimer Hastalığı (AH) ve Parkinson Hastalığı (PH)

Alzheimer hastalığı (AD), bilişsel işlevlerde bozulma ve amiloid-beta peptidlerinin serebral birikimi ile ilişkili, kronik, hızla ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır (Cattaneo et al., 2017). Cattaneo ve arkadaşları, *Escherichia/Shigella* bolluğunda bir artışın ve *Eubacterium rectale* bolluğunda bir azalmanın, muhtemelen bilişsel bozukluğu ve beyin amiloidozu olan hastalarda periferik bir inflamatuar durumla ilişkili olduğunu gösterdi (Cattaneo et al., 2017). Diğer bir çalışmada, AD tanısı olan ve olmayan hastaların bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu karşılaştırılmış ve AD mikrobiyomunda Firmicutes, Bifidobacterium bolluğunda bir

azalma ve Bacteroidetes bolluğunda bir artışla birlikte, kontrol yaşı ve cinsiyet uyumlu bireylerden bileşimsel olarak farklı olarak daha düşük bir mikrobiyal çeşitlilik ortaya çıkarılmıştır (Vogt et al., 2017).

Bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıklar da Parkinson hastalığının (PH) patogenezinde rol oynar. Yirmidokuz PH vakasında ve 29 yaş uyumlu kontrolde bağırsak mikrobiyomunu, 16S rRNA geninin yeni nesil dizilimi ile analiz edildiği ve vakalar ve kontroller arasındaki çeşitlilik indekslerini ve bakteri bolluğunu karşılaştırıldığı bir çalışmada, alfa çeşitliliği ölçümleri ve ana filumların bolluğu, vakalar ve kontroller arasında farklılık göstermediği bildirildi. Ancak bakteri ailesi düzeyindeki beta çeşitlilik analizleri ve analizler, dört bakteri ailesi için vakalar ve kontroller arasında önemli farklılıklar ortaya çıkardı. Yakın zamanda yayınlanan çalışmalara uygun olarak *Lactobacillaceae* bolloğunda artış daha fazla görüldüğü, *Barnesiellaceae* ve *Enterococcacea* ailelerinin daha fazla görüldüğünü, ancak literatürle uyumlu olmadığını vurgulamışlardır (Hopfner et al., 2017); (Scheperjans et al., 2015) Başka bir çalışmada, PH'larında *Bifidobacteriaceae*, *Christensenellaceae*, *Tissierellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae, Pasteurellaceae* ve *Verrucomicrobiaceae* familyalarının bolluklarının önemli ölçüde değişiklik saptandığı bildirildi. Yine aynı çalışmada, bitki kaynaklı bileşiklerin metabolizması ve ksenobiyotiklerin bozunması da dahil olmak üzere çok sayıda yolaktaki değişiklikleri ortaya çıkardığını vurgulamışlardır (Hill-Burns et al., 2017). PH'larının mukozal ve dışkı mikrobiyal topluluğu, kontrol deneklerinden önemli ölçüde farklı olduğu; dışkı örnekleri, sigmoid mukozadan daha belirgin farklılıklar gösterdiği saptandı. Cinsin taksonomik seviyesinde, *Blautia*, *Coprococcus* ve *Roseburia* cinslerinden varsayılan "anti-inflamatuar" bütirat üreten bakteriler, kontrollerin dışkısında Parkinson hastalarına göre önemli ölçüde daha fazla bulunduğu bildirildi. *Faecalibacterium* cinsinden bakteriler, kontrollerin mukozasında PD'ye göre önemli ölçüde daha fazlaydı. *Ralstonia* cinsinin varsayılan "proinflamatuar" Proteobakterileri, PD'nin mukozasında kontrollere göre önemli ölçüde daha fazla miktarda bulunuyordu. Tahmine dayalı metagenomik analizler, metabolizmaya dahil olan çok sayıda genin PD dışkı mikrobiyomunda anlamlı derecede düşük olduğunu, lipopolisakkarit biyosentezinde ve tip III bakteri salgılama sistemlerinde rol oynayan genlerin PD hastalarında anlamlı derecede daha yüksek olduğunu gösterdi (Keshavarzian et al., 2015).

6.3.2.3. Hepatik Ensefalopati (HE)

Hepatik ensefalopati (HE), sirozun bir komplikasyonudur ve karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda görülen bir dizi nöropsikiyatrik anormallik olarak tanımlanır (Campion et al., 2019) (Luo et al., 2023). Bajaj ve arkadaşları, HE'de bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu bilişim ve enflamasyon ile ilişkilendirdi. HE hastalarının dışkı mikrobiyotası, kontrollerle

karşılaştırıldığında *Enterobacteriaceae*, *Alcaligenaceae* ve *Fusobacteriaceae* anlamlı derecede yüksek, *Ruminococcaceae* ve *Lachnospiraceae*'de ise daha düşüktü. Ayrıca HE hastalarında, HE olmayan sirozlulara kıyasla daha yüksek *Veillonellaceae* seviyeleri bulundu. Siroz grubunda *Alcaligenaceae* ve *Porphyromonadaceae* kognitif bozuklukla pozitif korelasyon gösterdi. *Fusobacteriaceae*, *Veillonellaceae* ve *Enterobacteriaceae* pozitif, *Ruminococcaceae* ise inflamasyonla negatif ilişkiliydi. Bu nedenle siroz, özellikle HE ile komplike olduğunda, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında bağırsak mikrobiyotasında önemli değişikliklerle ilişkilidir. Spesifik bakteri aileleri (*Alcaligenaceae*, *Porphyromonadaceae* ve *Enterobacteriaceae*), HE'de bilişim ve inflamasyonla güçlü bir şekilde ilişkilidir. (Bajaj et al., 2012). Rifaximin-α, tekrarlayan hepatik ensefalopatinin (HE) önlenmesinde etkili bir moleküldür, ancak etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Patel et al., 2022). Rifaximin-α'nın kullanıldığı bir çalışmada, müsin parçalayan sialidaz açısından zengin türlerin, *Streptococcus* spp., *Veillonella* atypica, *Veillonella parvula*, *Akkermansia* ve *Hungatella* cinslerinin düzeylerini azaltarak, bağırsakta ağız yoluyla alımı baskıladığı bildirilmiştir. Rifaximin-α, aynı zamanda TNF-α- ve interlökin-17E ile zenginleştirilmiş bir bağırsak mikro ortamını desteklediği, istilacı patobiontlara karşı antibakteriyel tepkileri arttırdığı ve bağırsak bariyeri onarımını teşvik ettiği saptanmıştır (Patel et al., 2022).

6.3.2.4. Otizm

Otizmi olmayan çocukların bağırsak mikrobiyotası ile karşılaştırıldığında, otizmli çocukların bağırsak mikrobiyotası daha az çeşitlilik gösterir ve daha düşük düzeylerde *Bifidobacterium* ve Firmicutes ve daha yüksek düzeylerde *Lactobacillus, Clostridium*, Bacteroidetes, *Desulfovibrio*, *Caloramator* ve *Sarcina cinslerini* gösterir (Finegold et al., 2002); (Finegold, 2011); (Finegold, Downes, & Summanen, 2012) (Q. Li, Han, Dy, & Hagerman, 2017). Bir araştırma sonuçları, kontrol denekleriyle karşılaştırıldığında. otizmli deneklerin bağırsak mikrobiyotasındaki mukolitik bakteriler *Akkermansia muciniphila* ve *Bifidobacterium* spp.'de azalma gösterdi (L. Wang et al., 2011). Başka bir çalışmada, Firmicutes-Bacteroidetes oranında bir artış ve kontrollerdeki bolluğa kıyasla *Sutterella*'da önemli bir artış olduğu bildirildi (Williams, Hornig, Parekh, & Lipkin, 2012). Bu bulgular, bağırsak mikrobiyota disbiyozunun otizmin gastrointestinal ve davranışsal belirtileriyle yakın ilişkileri olduğunu göstermektedir. Bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıklar bu nörolojik bozuklukların başlangıcıyla yakından ilişkilidir ve bağırsak bakteri toplulukları terapötik müdahalelerin hedefi olabilir.

Kaynakça / References

Akers, K. G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A. P., De Cristofaro, A., Hsiang, H. L. ... Frankland P. W. (2014). Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science, 344*(6184), 598–602.

Bauer, P. J. (2015). A complementary processes account of the development of childhood amnesia and a personal Past. *Psychological Review, 122*(2), 204–231.

Abt, M. C., McKenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol, 14*(10), 609-620. doi:10.1038/nrmicro.2016.108

Alavi, S., Mitchell, J. D., Cho, J. Y., Liu, R., Macbeth, J. C., & Hsiao, A. (2020). Interpersonal Gut Microbiome Variation Drives Susceptibility and Resistance to Cholera Infection. *Cell, 181*(7), 1533-1546.e1513. doi:10.1016/j.cell.2020.05.036

Álvarez Á, H., Martínez Velázquez, M., & Prado Montes de Oca, E. (2018). Human β-defensin 1 update: Potential clinical applications of the restless warrior. *Int J Biochem Cell Biol, 104*, 133-137. doi:10.1016/j.biocel.2018.09.007

Andoh, A., Benno, Y., Kanauchi, O., & Fujiyama, Y. (2009). Recent advances in molecular approaches to gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des, 15*(18), 2066-2073. doi:10.2174/138161209788489186

Andrès, E., Loukili, N. H., Noel, E., Kaltenbach, G., Abdelgheni, M. B., Perrin, A. E., . . . Blicklé, J. F. (2004). Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Cmaj, 171*(3), 251-259. doi:10.1503/cmaj.1031155

Anthony, W. E., Wang, B., Sukhum, K. V., D'Souza, A. W., Hink, T., Cass, C., . . . Kwon, J. H. (2022). Acute and persistent effects of commonly used antibiotics on the gut microbiome and resistome in healthy adults. *Cell Rep, 39*(2), 110649. doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110649

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., . . . Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature, 473*(7346), 174-180. doi:10.1038/nature09944

Avuthu, N., & Guda, C. (2022). Meta-Analysis of Altered Gut Microbiota Reveals Microbial and Metabolic Biomarkers for Colorectal Cancer. *Microbiol Spectr, 10*(4), e0001322. doi:10.1128/spectrum.00013-22

Bachmann, V., Kostiuk, B., Unterweger, D., Diaz-Satizabal, L., Ogg, S., & Pukatzki, S. (2015). Bile Salts Modulate the Mucin-Activated Type VI Secretion System of Pandemic Vibrio cholerae. *PLoS Negl Trop Dis, 9*(8), e0004031. doi:10.1371/journal.pntd.0004031

Bajaj, J. S., Ridlon, J. M., Hylemon, P. B., Thacker, L. R., Heuman, D. M., Smith, S., . . . Gillevet, P. M. (2012). Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 302*(1), G168-175. doi:10.1152/ajpgi.00190.2011

Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G. P., Jensen, G. J., & Mekalanos, J. J. (2012). Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature, 483*(7388), 182-186. doi:10.1038/nature10846

Beyhan, S., Bilecen, K., Salama, S. R., Casper-Lindley, C., & Yildiz, F. H. (2007). Regulation of rugosity and biofilm formation in Vibrio cholerae: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of vpsT, vpsR, and hapR. *J Bacteriol, 189*(2), 388-402. doi:10.1128/jb.00981-06

Bhattarai, Y., Muniz Pedrogo, D. A., & Kashyap, P. C. (2017). Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 312*(1), G52-g62. doi:10.1152/ajpgi.00338.2016

Bina, X. R., Provenzano, D., Nguyen, N., & Bina, J. E. (2008). Vibrio cholerae RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun, 76*(8), 3595-3605. doi:10.1128/iai.01620-07

Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol, 13*(11), 790-801. doi:10.1038/nri3535

Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol, 16*(3), 143-155. doi:10.1038/nrmicro.2017.157

Caio, G., Lungaro, L., Segata, N., Guarino, M., Zoli, G., Volta, U., & De Giorgio, R. (2020). Effect of Gluten-Free Diet on Gut Microbiota Composition in Patients with Celiac Disease and Non-Celiac Gluten/Wheat Sensitivity. *Nutrients, 12*(6). doi:10.3390/nu12061832

Campion, D., Giovo, I., Ponzo, P., Saracco, G. M., Balzola, F., & Alessandria, C. (2019). Dietary approach and gut microbiota modulation for chronic hepatic encephalopathy in cirrhosis. *World J Hepatol, 11*(6), 489-512. doi:10.4254/wjh.v11.i6.489

Cani, P. D. (2013). Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. *Brief Funct Genomics, 12*(4), 381-387. doi:10.1093/bfgp/elt014

Carmona-Cruz, S., Orozco-Covarrubias, L., & Sáez-de-Ocariz, M. (2022). The Human Skin Microbiome in Selected Cutaneous Diseases. *Front Cell Infect Microbiol, 12*, 834135. doi:10.3389/fcimb.2022.834135

Catlett, J. L., Carr, S., Cashman, M., Smith, M. D., Walter, M., Sakkaff, Z., . . . Buan, N. R. (2022). Metabolic Synergy between Human Symbionts Bacteroides and Methanobrevibacter. *Microbiol Spectr, 10*(3), e0106722. doi:10.1128/spectrum.01067-22

Cattaneo, A., Cattane, N., Galluzzi, S., Provasi, S., Lopizzo, N., Festari, C., . . . Frisoni, G. B. (2017). Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging, 49*, 60-68. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019

Chairatana, P., & Nolan, E. M. (2017). Human α-Defensin 6: A Small Peptide That Self-Assembles and Protects the Host by Entangling Microbes. *Acc Chem Res, 50*(4), 960-967. doi:10.1021/acs.accounts.6b00653

Chander, A. M., Yadav, H., Jain, S., Bhadada, S. K., & Dhawan, D. K. (2018). Cross-Talk Between Gluten, Intestinal Microbiota and Intestinal Mucosa in Celiac Disease: Recent Advances and Basis of Autoimmunity. *Front Microbiol, 9*, 2597. doi:10.3389/fmicb.2018.02597

Chatterjee, A., Chaudhuri, S., Saha, G., Gupta, S., & Chowdhury, R. (2004). Effect of bile on the cell surface permeability barrier and efflux system of Vibrio cholerae. *J Bacteriol, 186*(20), 6809-6814. doi:10.1128/jb.186.20.6809-6814.2004

Chen, D., Wu, J., Jin, D., Wang, B., & Cao, H. (2019). Fecal microbiota transplantation in cancer management: Current status and perspectives. *Int J Cancer, 145*(8), 2021-2031. doi:10.1002/ijc.32003

Chen, H., Li, H., & Liu, Z. (2020). Interplay of intestinal microbiota and mucosal immunity in inflammatory bowel disease: a relationship of frenemies. *Therap Adv Gastroenterol, 13*, 1756284820935188. doi:10.1177/1756284820935188

Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Edelman, S. M., Troy, E. B., . . . Kasper, D. L. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell, 149*(7), 1578-1593. doi:10.1016/j.cell.2012.04.037

Chung, L. K., & Raffatellu, M. (2019). G.I. pros: Antimicrobial defense in the gastrointestinal tract. *Semin Cell Dev Biol, 88*, 129-137. doi:10.1016/j.semcdb.2018.02.001

Cianfanelli, F. R., Alcoforado Diniz, J., Guo, M., De Cesare, V., Trost, M., & Coulthurst, S. J. (2016). VgrG and PAAR Proteins Define Distinct Versions of a Functional Type VI Secretion System. *PLoS Pathog, 12*(6), e1005735. doi:10.1371/journal.ppat.1005735

Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2008). Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. *BMC Microbiol, 8*, 232. doi:10.1186/1471-2180-8-232

Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., . . . Farrow, J. A. (1994). The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol, 44*(4), 812-826. doi:10.1099/00207713-44-4-812

Collins, S. L., Stine, J. G., Bisanz, J. E., Okafor, C. D., & Patterson, A. D. (2022). Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. *Nat Rev Microbiol*. doi:10.1038/s41579-022-00805-x

Cunningham, A. L., Stephens, J. W., & Harris, D. A. (2021). Gut microbiota influence in type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Gut Pathog, 13*(1), 50. doi:10.1186/s13099-021-00446-0

Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 16*(8), 461-478. doi:10.1038/s41575-019-0157-3

De Palma, G., Nadal, I., Medina, M., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2010). Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol, 10*, 63. doi:10.1186/1471-2180-10-63

Degnan, P. H., Taga, M. E., & Goodman, A. L. (2014). Vitamin B12 as a modulator of gut microbial ecology. *Cell Metab, 20*(5), 769-778. doi:10.1016/j.cmet.2014.10.002

Del Fiol, F. S., Balcão, V. M., Barberato-Fillho, S., Lopes, L. C., & Bergamaschi, C. C. (2018). Obesity: A New Adverse Effect of Antibiotics? *Front Pharmacol, 9*, 1408. doi:10.3389/fphar.2018.01408

Dempsey, E., & Corr, S. C. (2022). Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front Immunol, 13*, 840245. doi:10.3389/fimmu.2022.840245

Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol, 54*(Pt 5), 1469-1476. doi:10.1099/ijs.0.02873-0

Deshpande, N. P., Riordan, S. M., Castaño-Rodríguez, N., Wilkins, M. R., & Kaakoush, N. O. (2018). Signatures within the esophageal microbiome are associated with host genetics, age, and disease. *Microbiome, 6*(1), 227. doi:10.1186/s40168-018-0611-4

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol, 6*(11), e280. doi:10.1371/journal.pbio.0060280

Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108 Suppl 1*(Suppl 1), 4554-4561. doi:10.1073/pnas.1000087107

Di Biase, A. R., Marasco, G., Ravaioli, F., Dajti, E., Colecchia, L., Righi, B., . . . Colecchia, A. (2021). Gut microbiota signatures and clinical manifestations in celiac disease children at onset: a pilot study. *J Gastroenterol Hepatol, 36*(2), 446-454. doi:10.1111/jgh.15183

Diamond, G., & Bevins, C. L. (1998). beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin Immunol Immunopathol, 88*(3), 221-225. doi:10.1006/clin.1998.4587

Dong, T. G., Ho, B. T., Yoder-Himes, D. R., & Mekalanos, J. J. (2013). Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(7), 2623-2628. doi:10.1073/pnas.1222783110

Duan, F., & March, J. C. (2008). Interrupting Vibrio cholerae infection of human epithelial cells with engineered commensal bacterial signaling. *Biotechnol Bioeng, 101*(1), 128-134. doi:10.1002/bit.21897

Duan, F., & March, J. C. (2010). Engineered bacterial communication prevents Vibrio cholerae virulence in an infant mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(25), 11260-11264. doi:10.1073/pnas.1001294107

Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond), 32*(11), 1720-1724. doi:10.1038/ijo.2008.155

Fachi, J. L., Felipe, J. S., Pral, L. P., da Silva, B. K., Corrêa, R. O., de Andrade, M. C. P., . . . Vinolo, M. A. R. (2019). Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell Rep, 27*(3), 750-761.e757. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.054

Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol, 19*(1), 55-71. doi:10.1038/s41579-020-0433-9

Fast, D., Kostiuk, B., Foley, E., & Pukatzki, S. (2018). Commensal pathogen competition impacts host viability. *Proc Natl Acad Sci U S A, 115*(27), 7099-7104. doi:10.1073/pnas.1802165115

Fast, D., Petkau, K., Ferguson, M., Shin, M., Galenza, A., Kostiuk, B., . . . Foley, E. (2020). Vibrio cholerae-Symbiont Interactions Inhibit Intestinal Repair in Drosophila. *Cell Rep, 30*(4), 1088-1100.e1085. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.094

Finegold, S. M. (2011). Desulfovibrio species are potentially important in regressive autism. *Med Hypotheses, 77*(2), 270-274. doi:10.1016/j.mehy.2011.04.032

Finegold, S. M., Downes, J., & Summanen, P. H. (2012). Microbiology of regressive autism. *Anaerobe, 18*(2), 260-262. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.12.018

Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M. L., Bolte, E., . . . Kaul, A. (2002). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis, 35*(Suppl 1), S6-s16. doi:10.1086/341914

Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(34), 13780-13785. doi:10.1073/pnas.0706625104

Fu, Y., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2018). Tracking Vibrio cholerae Cell-Cell Interactions during Infection Reveals Bacterial Population Dynamics within Intestinal Microenvironments. *Cell Host Microbe, 23*(2), 274-281.e272. doi:10.1016/j.chom.2017.12.006

Fu, Y., Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (2013). Tn-Seq analysis of Vibrio cholerae intestinal colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host. *Cell Host Microbe, 14*(6), 652-663. doi:10.1016/j.chom.2013.11.001

Gabay, J. E., Scott, R. W., Campanelli, D., Griffith, J., Wilde, C., Marra, M. N., . . . Nathan, C. F. (1989). Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A, 86*(14), 5610-5614. doi:10.1073/pnas.86.14.5610

Gallo, R. L. (2017). Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *J Invest Dermatol, 137*(6), 1213-1214. doi:10.1016/j.jid.2016.11.045

Geurts, L., Lazarevic, V., Derrien, M., Everard, A., Van Roye, M., Knauf, C., . . . Cani, P. D. (2011). Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol, 2*, 149. doi:10.3389/fmicb.2011.00149

Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., . . . Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science, 312*(5778), 1355-1359. doi:10.1126/science.1124234

Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek, 113*(12), 2019-2040. doi:10.1007/s10482-020-01474-7

Gorelik, O., Levy, N., Shaulov, L., Yegodayev, K., Meijler, M. M., & Sal-Man, N. (2019). Vibrio cholerae autoinducer-1 enhances the virulence of enteropathogenic Escherichia coli. *Sci Rep, 9*(1), 4122. doi:10.1038/s41598-019-40859-1

Grizotte-Lake, M., Zhong, G., Duncan, K., Kirkwood, J., Iyer, N., Smolenski, I., . . . Vaishnava, S. (2018). Commensals Suppress Intestinal Epithelial Cell Retinoic Acid Synthesis to Regulate Interleukin-22 Activity and Prevent Microbial Dysbiosis. *Immunity, 49*(6), 1103-1115.e1106. doi:10.1016/j.immuni.2018.11.018

Guh, A. Y., & Kutty, P. K. (2018). Clostridioides difficile Infection. *Ann Intern Med, 169*(7), Itc49-itc64. doi:10.7326/aitc201810020

Hang, S., Purdy, A. E., Robins, W. P., Wang, Z., Mandal, M., Chang, S., . . . Watnick, P. I. (2014). The acetate switch of an intestinal pathogen disrupts host insulin signaling and lipid metabolism. *Cell Host Microbe, 16*(5), 592-604. doi:10.1016/j.chom.2014.10.006

Hansen, R., Russell, R. K., Reiff, C., Louis, P., McIntosh, F., Berry, S. H., . . . Hold, G. L. (2012). Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased Faecalibacterium prausnitzii and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol, 107*(12), 1913-1922. doi:10.1038/ajg.2012.335

Harwig, S. S., Park, A. S., & Lehrer, R. I. (1992). Characterization of defensin precursors in mature human neutrophils. *Blood, 79*(6), 1532-1537.

Hill-Burns, E. M., Debelius, J. W., Morton, J. T., Wissemann, W. T., Lewis, M. R., Wallen, Z. D., . . . Payami, H. (2017). Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord, 32*(5), 739-749. doi:10.1002/mds.26942

Hirota, S. A., Fines, K., Ng, J., Traboulsi, D., Lee, J., Ihara, E., . . . Beck, P. L. (2010). Hypoxia-inducible factor signaling provides protection in Clostridium difficile-induced intestinal injury. *Gastroenterology, 139*(1), 259-269.e253. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.045

Hopfner, F., Künstner, A., Müller, S. H., Künzel, S., Zeuner, K. E., Margraf, N. G., . . . Kuhlenbäumer, G. (2017). Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort. *Brain Res, 1667*, 41-45. doi:10.1016/j.brainres.2017.04.019

Hu, Z., Zhang, C., Sifuentes-Dominguez, L., Zarek, C. M., Propheter, D. C., Kuang, Z., . . . Hooper, L. V. (2021). Small proline-rich protein 2A is a gut bactericidal protein deployed during helminth infection. *Science, 374*(6568), eabe6723. doi:10.1126/science.abe6723

Iatsenko, I., Boquete, J. P., & Lemaitre, B. (2018). Microbiota-Derived Lactate Activates Production of Reactive Oxygen Species by the Intestinal NADPH Oxidase Nox and Shortens Drosophila Lifespan. *Immunity, 49*(5), 929-942.e925. doi:10.1016/j.immuni.2018.09.017

Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V., & Perez Perez, G. I. (2017). Gut Microbiome and Antibiotics. *Arch Med Res, 48*(8), 727-734. doi:10.1016/j.arcmed.2017.11.004

Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J. K., & Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One, 5*(3), e9836. doi:10.1371/journal.pone.0009836

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin, 61*(2), 69-90. doi:10.3322/caac.20107

Jemielita, M., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2018). Quorum sensing controls Vibrio cholerae multicellular aggregate formation. *Elife, 7*. doi:10.7554/eLife.42057

Jones, D. E., & Bevins, C. L. (1993). Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett, 315*(2), 187-192. doi:10.1016/0014-5793(93)81160-2

Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., . . . Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut, 60*(5), 631-637. doi:10.1136/gut.2010.223263

Kasai, C., Sugimoto, K., Moritani, I., Tanaka, J., Oya, Y., Inoue, H., . . . Takase, K. (2015). Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol, 15*, 100. doi:10.1186/s12876-015-0330-2

Kelly, R. C., Bolitho, M. E., Higgins, D. A., Lu, W., Ng, W. L., Jeffrey, P. D., . . . Bassler, B. L. (2009). The Vibrio cholerae quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nat Chem Biol, 5*(12), 891-895. doi:10.1038/nchembio.237

Keshavarzian, A., Green, S. J., Engen, P. A., Voigt, R. M., Naqib, A., Forsyth, C. B., . . . Shannon, K. M. (2015). Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord, 30*(10), 1351-1360. doi:10.1002/mds.26307

Kim, E. K., Lee, K. A., Hyeon, D. Y., Kyung, M., Jun, K. Y., Seo, S. H., . . . Lee, W. J. (2020). Bacterial Nucleoside Catabolism Controls Quorum Sensing and Commensal-to-Pathogen Transition in the Drosophila Gut. *Cell Host Microbe, 27*(3), 345-357.e346. doi:10.1016/j.chom.2020.01.025

Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H., & Kim, D. H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One, 7*(10), e47713. doi:10.1371/journal.pone.0047713

Kim, S., Covington, A., & Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev, 279*(1), 90-105. doi:10.1111/imr.12563

Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., . . . Meyerson, M. (2012). Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Res, 22*(2), 292-298. doi:10.1101/gr.126573.111

Krogius-Kurikka, L., Lyra, A., Malinen, E., Aarnikunnas, J., Tuimala, J., Paulin, L., . . . Palva, A. (2009). Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol, 9*, 95. doi:10.1186/1471-230x-9-95

Kunkle, D. E., Bina, X. R., & Bina, J. E. (2020). Vibrio cholerae OmpR Contributes to Virulence Repression and Fitness at Alkaline pH. *Infect Immun, 88*(6). doi:10.1128/iai.00141-20

Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., . . . Hattori, M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res, 14*(4), 169-181. doi:10.1093/dnares/dsm018

Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., . . . Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One, 5*(2), e9085. doi:10.1371/journal.pone.0009085

Lee, D., Kim, E. J., Baek, Y., Lee, J., Yoon, Y., Nair, G. B., . . . Kim, D. W. (2020). Alterations in glucose metabolism in Vibrio cholerae serogroup O1 El Tor biotype strains. *Sci Rep, 10*(1), 308. doi:10.1038/s41598-019-57093-4

Levison, M. E., & Levison, J. H. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am, 23*(4), 791-815, vii. doi:10.1016/j.idc.2009.06.008

Lewis, B. B., Buffie, C. G., Carter, R. A., Leiner, I., Toussaint, N. C., Miller, L. C., . . . Pamer, E. G. (2015). Loss of Microbiota-Mediated Colonization Resistance to Clostridium difficile Infection With Oral Vancomycin Compared With Metronidazole. *J Infect Dis, 212*(10), 1656-1665. doi:10.1093/infdis/jiv256

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(31), 11070-11075. doi:10.1073/pnas.0504978102

Li, Q., Han, Y., Dy, A. B. C., & Hagerman, R. J. (2017). The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci, 11*, 120. doi:10.3389/fncel.2017.00120

Li, X., Watanabe, K., & Kimura, I. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases. *Front Immunol, 8*, 1882. doi:10.3389/fimmu.2017.01882

Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol, 19*(1), 29-41. doi:10.1111/1462-2920.13589

Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature, 489*(7415), 220-230. doi:10.1038/nature11550

Luo, M., Xin, R. J., Hu, F. R., Yao, L., Hu, S. J., & Bai, F. H. (2023). Role of gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of minimal hepatic encephalopathy via the gut-liver-brain axis. *World J Gastroenterol, 29*(1), 144-156. doi:10.3748/wjg.v29.i1.144

Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med, 375*(24), 2369-2379. doi:10.1056/NEJMra1600266

Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijs, I., Eeckhaut, V., . . . Vermeire, S. (2014). A decrease of the butyrate-producing species Roseburia hominis and Faecalibacterium prausnitzii defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut, 63*(8), 1275-1283. doi:10.1136/gutjnl-2013-304833

Marasco, G., Di Biase, A. R., Schiumerini, R., Eusebi, L. H., Iughetti, L., Ravaioli, F., . . . Festi, D. (2016). Gut Microbiota and Celiac Disease. *Dig Dis Sci, 61*(6), 1461-1472. doi:10.1007/s10620-015-4020-2

Mayer, E. A., Nance, K., & Chen, S. (2022). The Gut-Brain Axis. *Annu Rev Med, 73*, 439-453. doi:10.1146/annurev-med-042320-014032

McDonald, D., Ackermann, G., Khailova, L., Baird, C., Heyland, D., Kozar, R., . . . Wischmeyer, P. E. (2016). Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. *mSphere, 1*(4). doi:10.1128/mSphere.00199-16

McLoughlin, I. J., Wright, E. M., Tagg, J. R., Jain, R., & Hale, J. D. F. (2022). Skin Microbiome-The Next Frontier for Probiotic Intervention. *Probiotics Antimicrob Proteins, 14*(4), 630-647. doi:10.1007/s12602-021-09824-1

Meng, M., Klingensmith, N. J., & Coopersmith, C. M. (2017). New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure. *Curr Opin Crit Care, 23*(2), 143-148. doi:10.1097/mcc.0000000000000386

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J., . . . Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev, 81*(4). doi:10.1128/mmbr.00036-17

Monira, S., Hoq, M. M., Chowdhury, A. K., Suau, A., Magne, F., Endtz, H. P., . . . Alam, N. H. (2010). Short-chain fatty acids and commensal microbiota in the faeces of severely malnourished children with cholera rehydrated with three different carbohydrates. *Eur J Clin Nutr, 64*(10), 1116-1124. doi:10.1038/ejcn.2010.123

Nadal, I., Donant, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2007). Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol, 56*(Pt 12), 1669-1674. doi:10.1099/jmm.0.47410-0

Nakamoto, N., Sasaki, N., Aoki, R., Miyamoto, K., Suda, W., Teratani, T., . . . Kanai, T. (2019). Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nat Microbiol, 4*(3), 492-503. doi:10.1038/s41564-018-0333-1

Nava, G. M., Friedrichsen, H. J., & Stappenbeck, T. S. (2011). Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon. *Isme j, 5*(4), 627-638. doi:10.1038/ismej.2010.161

Ojima, M., Motooka, D., Shimizu, K., Gotoh, K., Shintani, A., Yoshiya, K., . . . Shimazu, T. (2016). Metagenomic Analysis Reveals Dynamic Changes of Whole Gut Microbiota in the Acute Phase of Intensive Care Unit Patients. *Dig Dis Sci, 61*(6), 1628-1634. doi:10.1007/s10620-015-4011-3

Patel, V. C., Lee, S., McPhail, M. J. W., Da Silva, K., Guilly, S., Zamalloa, A., . . . Shawcross, D. L. (2022). Rifaximin-α reduces gut-derived inflammation and mucin degradation in cirrhosis and encephalopathy: RIFSYS randomised controlled trial. *J Hepatol, 76*(2), 332-342. doi:10.1016/j.jhep.2021.09.010

Pérez-Cobas, A. E., Artacho, A., Knecht, H., Ferrús, M. L., Friedrichs, A., Ott, S. J., . . . Gosalbes, M. J. (2013). Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS One, 8*(11), e80201. doi:10.1371/journal.pone.0080201

Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther, 22*(6), 495-512. doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x

Porter, E. M., Liu, L., Oren, A., Anton, P. A., & Ganz, T. (1997). Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infect Immun, 65*(6), 2389-2395. doi:10.1128/iai.65.6.2389-2395.1997

Porter, E. M., Poles, M. A., Lee, J. S., Naitoh, J., Bevins, C. L., & Ganz, T. (1998). Isolation of human intestinal defensins from ileal neobladder urine. *FEBS Lett, 434*(3), 272-276. doi:10.1016/s0014-5793(98)00994-6

Pral, L. P., Fachi, J. L., Corrêa, R. O., Colonna, M., & Vinolo, M. A. R. (2021). Hypoxia and HIF-1 as key regulators of gut microbiota and host interactions. *Trends Immunol, 42*(7), 604-621. doi:10.1016/j.it.2021.05.004

Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(39), 15508-15513. doi:10.1073/pnas.0706532104

Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., . . . Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103*(5), 1528-1533. doi:10.1073/pnas.0510322103

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., . . . Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature, 464*(7285), 59-65. doi:10.1038/nature08821

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., . . . Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature, 490*(7418), 55-60. doi:10.1038/nature11450

Quraishi, M. N., Sergeant, M., Kay, G., Iqbal, T., Chan, J., Constantinidou, C., . . . Hirschfield, G. M. (2017). The gut-adherent microbiota of PSC-IBD is distinct to that of IBD. *Gut, 66*(2), 386-388. doi:10.1136/gutjnl-2016-311915

Raethong, N., Nakphaichit, M., Suratannon, N., Sathitkowitchai, W., Weerapakorn, W., Keawsompong, S., & Vongsangnak, W. (2021). Analysis of Human Gut Microbiome: Taxonomy and Metabolic Functions in Thai Adults. *Genes (Basel), 12*(3). doi:10.3390/genes12030331

Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V. L., & Cohen, H. (2020). Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol, 10*, 572912. doi:10.3389/fcimb.2020.572912

Reichardt, N., Duncan, S. H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K. P., . . . Louis, P. (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *Isme j, 8*(6), 1323-1335. doi:10.1038/ismej.2014.14

Rice, W. G., Ganz, T., Kinkade, J. M., Jr., Selsted, M. E., Lehrer, R. I., & Parmley, R. T. (1987). Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood, 70*(3), 757-765.

Ridlon, J. M., Harris, S. C., Bhowmik, S., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes, 7*(1), 22-39. doi:10.1080/19490976.2015.1127483

Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol, 30*(3), 332-338. doi:10.1097/mog.0000000000000057

Rinninella, E., Mele, M. C., Merendino, N., Cintoni, M., Anselmi, G., Caporossi, A., . . . Minnella, A. M. (2018). The Role of Diet, Micronutrients and the Gut Microbiota in Age-Related Macular Degeneration: New Perspectives from the Gut–Retina Axis. *Nutrients, 10*(11). doi:10.3390/nu10111677

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms, 7*(1). doi:10.3390/microorganisms7010014

Rivera-Chávez, F., & Mekalanos, J. J. (2019). Cholera toxin promotes pathogen acquisition of host-derived nutrients. *Nature, 572*(7768), 244-248. doi:10.1038/s41586-019-1453-3

Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., . . . Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis, 26*, 26050. doi:10.3402/mehd.v26.26050

Roy, C. C., Kien, C. L., Bouthillier, L., & Levy, E. (2006). Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutr Clin Pract, 21*(4), 351-366. doi:10.1177/0115426506021004351

Russell, A. B., Hood, R. D., Bui, N. K., LeRoux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature, 475*(7356), 343-347. doi:10.1038/nature10244

Russell, A. B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D. M., Ishikawa, T., Wiggins, P. A., . . . Mougous, J. D. (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature, 496*(7446), 508-512. doi:10.1038/nature12074

Sah, D. K., Arjunan, A., Park, S. Y., & Jung, Y. D. (2022). Bile acids and microbes in metabolic disease. *World J Gastroenterol, 28*(48), 6846-6866. doi:10.3748/wjg.v28.i48.6846

Salonen, A., de Vos, W. M., & Palva, A. (2010). Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology (Reading), 156*(Pt 11), 3205-3215. doi:10.1099/mic.0.043257-0

Sankar, S. A., Lagier, J. C., Pontarotti, P., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2015). The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Syst Appl Microbiol, 38*(4), 276-286. doi:10.1016/j.syapm.2015.03.004

Sasso, J. M., Ammar, R. M., Tenchov, R., Lemmel, S., Kelber, O., Grieswelle, M., & Zhou, Q. A. (2023). Gut Microbiome-Brain Alliance: A Landscape View into Mental and Gastrointestinal Health and Disorders. *ACS Chem Neurosci, 14*(10), 1717-1763. doi:10.1021/acschemneuro.3c00127

Sayin, S. I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H. U., Bamberg, K., . . . Bäckhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab, 17*(2), 225-235. doi:10.1016/j.cmet.2013.01.003

Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., & Bassler, B. L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol, 41*(2), 463-476. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., . . . Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord, 30*(3), 350-358. doi:10.1002/mds.26069

Schwarz, S., West, T. E., Boyer, F., Chiang, W. C., Carl, M. A., Hood, R. D., . . . Mougous, J. D. (2010). Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog, 6*(8), e1001068. doi:10.1371/journal.ppat.1001068

Schwiertz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring), 18*(1), 190-195. doi:10.1038/oby.2009.167

Scott, K. P., Martin, J. C., Campbell, G., Mayer, C. D., & Flint, H. J. (2006). Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium "Roseburia inulinivorans". *J Bacteriol, 188*(12), 4340-4349. doi:10.1128/jb.00137-06

Selsted, M. E., Miller, S. I., Henschen, A. H., & Ouellette, A. J. (1992). Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol, 118*(4), 929-936. doi:10.1083/jcb.118.4.929

Shen, X. J., Rawls, J. F., Randall, T., Burcal, L., Mpande, C. N., Jenkins, N., . . . Keku, T. O. (2010). Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes, 1*(3), 138-147. doi:10.4161/gmic.1.3.12360

Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol, 33*(9), 496-503. doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.011

Shirin, T., Rahman, A., Danielsson, Å., Uddin, T., Bhuyian, T. R., Sheikh, A., . . . Hammarström, M. L. (2011). Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to Vibrio cholerae O1 or enterotoxigenic Escherichia coli infection. *Microbes Infect, 13*(12-13), 1111-1120. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.014

Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., & Leiman, P. G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature, 500*(7462), 350-353. doi:10.1038/nature12453

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J., . . . Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(43), 16731-16736. doi:10.1073/pnas.0804812105

Stacy, A., Andrade-Oliveira, V., McCulloch, J. A., Hild, B., Oh, J. H., Perez-Chaparro, P. J., . . . Belkaid, Y. (2021). Infection trains the host for microbiota-enhanced resistance to pathogens. *Cell, 184*(3), 615-627. e617. doi:10.1016/j.cell.2020.12.011

Taur, Y., & Pamer, E. G. (2013). The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis, 26*(4), 332-337. doi:10.1097/QCO.0b013e3283630dd3

Taur, Y., & Pamer, E. G. (2016). Microbiome mediation of infections in the cancer setting. *Genome Med, 8*(1), 40. doi:10.1186/s13073-016-0306-z

Taur, Y., Xavier, J. B., Lipuma, L., Ubeda, C., Goldberg, J., Gobourne, A., . . . Pamer, E. G. (2012). Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis, 55*(7), 905-914. doi:10.1093/cid/cis580

Thuny, F., Richet, H., Casalta, J. P., Angelakis, E., Habib, G., & Raoult, D. (2010). Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS One, 5*(2), e9074. doi:10.1371/journal.pone.0009074

Tosh, P. K., & McDonald, L. C. (2012). Infection control in the multidrug-resistant era: tending the human microbiome. *Clin Infect Dis, 54*(5), 707-713. doi:10.1093/cid/cir899

Toska, J., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2018). Exopolysaccharide protects Vibrio cholerae from exogenous attacks by the type 6 secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A, 115*(31), 7997-8002. doi:10.1073/pnas.1808469115

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature, 444*(7122), 1027-1031. doi:10.1038/nature05414

Velasco, E., Byington, R., Martins, C. A., Schirmer, M., Dias, L. M., & Gonçalves, V. M. (2006). Comparative study of clinical characteristics of neutropenic and non-neutropenic adult cancer patients with bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 25*(1), 1-7. doi:10.1007/s10096-005-0077-8

Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., . . . Rey, F. E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep, 7*(1), 13537. doi:10.1038/s41598-017-13601-y

Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H. U., & Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab, 24*(1), 41-50. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.005

Walsh, C. J., Guinane, C. M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2014). Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett, 588*(22), 4120-4130. doi:10.1016/j.febslet.2014.03.035

Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2011). Low relative abundances of the mucolytic bacterium Akkermansia muciniphila and Bifidobacterium spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol, 77*(18), 6718-6721. doi:10.1128/aem.05212-11

Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., . . . Zhao, L. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *Isme j, 6*(2), 320-329. doi:10.1038/ismej.2011.109

Wexler, H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev, 20*(4), 593-621. doi:10.1128/cmr.00008-07

Williams, B. L., Hornig, M., Parekh, T., & Lipkin, W. I. (2012). Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of Sutterella species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio, 3*(1). doi:10.1128/mBio.00261-11

Yang, M., Liu, Z., Hughes, C., Stern, A. M., Wang, H., Zhong, Z., . . . Zhu, J. (2013). Bile salt-induced intermolecular disulfide bond formation activates Vibrio cholerae virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(6), 2348-2353. doi:10.1073/pnas.1218039110

Yardeni, T., Tanes, C. E., Bittinger, K., Mattei, L. M., Schaefer, P. M., Singh, L. N., . . . Wallace, D. C. (2019). Host mitochondria influence gut microbiome diversity: A role for ROS. *Sci Signal, 12*(588). doi:10.1126/scisignal.aaw3159

Yin, J., Zhou, C., Yang, K., Ren, Y., Qiu, Y., Xu, P., . . . Yang, H. (2020). Mutual regulation between butyrate and hypoxia-inducible factor-1α in epithelial cell promotes expression of tight junction proteins. *Cell Biol Int, 44*(6), 1405-1414. doi:10.1002/cbin.11336

Yoon, M. Y., Min, K. B., Lee, K. M., Yoon, Y., Kim, Y., Oh, Y. T., . . . Yoon, S. S. (2016). A single gene of a commensal microbe affects host susceptibility to enteric infection. *Nat Commun, 7*, 11606. doi:10.1038/ncomms11606

Yoon, S. H., & Waters, C. M. (2019). Vibrio cholerae. *Trends Microbiol, 27*(9), 806-807. doi:10.1016/j.tim.2019.03.005

You, J. S., Yong, J. H., Kim, G. H., Moon, S., Nam, K. T., Ryu, J. H., . . . Yoon, S. S. (2019). Commensal-derived metabolites govern Vibrio cholerae pathogenesis in host intestine. *Microbiome, 7*(1), 132. doi:10.1186/s40168-019-0746-y

Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., . . . Zhao, L. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *Isme j, 4*(2), 232-241. doi:10.1038/ismej.2009.112

Zhao, W., Caro, F., Robins, W., & Mekalanos, J. J. (2018). Antagonism toward the intestinal microbiota and its effect on Vibrio cholerae virulence. *Science, 359*(6372), 210-213. doi:10.1126/science.aap8775

Zhou, A., Yuan, Y., Yang, M., Huang, Y., Li, X., Li, S., . . . Tang, B. (2022). Crosstalk Between the Gut Microbiota and Epithelial Cells Under Physiological and Infectious Conditions. *Front Cell Infect Microbiol, 12*, 832672. doi:10.3389/fcimb.2022.832672

2. BÖLÜM / CHAPTER 2

VİROBİYOTA VE VİROM

VIROBIOTA AND VIROME

Gülşah TUNÇER[1]

[1]Uzm. Dr., Bilecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Bilecik, Türkiye

E-mail: gulsahtuncer40@gmail.com

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.002

ÖZ

Mikrobiyota, insan vücudunda yaşayan tüm mikroorganizmalar (yaklaşık 90 trilyon bakteri, arkea, ökaryotik mikroorganizma ve virus) olarak tanımlanabilir. Konakta yer alan virus topluluğu "virobiyota" ve virobiyotadaki tüm gen kümesi "virom" olarak tanımlanmasına karşın, bu tanımlamalar kimi zaman birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. İnsan viromu, endojen viral elementler, bakteri, mantar ve arkea gibi ökaryotik hücreleri infekte eden ökaryotik viruslar, prokaryotik viruslar (bakteriyofaj) ve öncelikle çevre ve diyetten türetilen bitki viruslarından oluşur. Bakteriye spesifik viruslar olan bakteriyofajlar viromun asıl bileşenidir. Ökaryotik viruslar, barsak viromunun küçük bir kısmını oluşturur. İnsan vücudunda özellikle barsakların bulunduğu bölgeler en yüksek virus yüküne sahiptir. Bununla birlikte, ağız boşluğu, burun ya da vagina gibi mukozaların bulunduğu bölgelerde miktar daha düşük, ancak önemli bir grubu oluşturmaktadır. Barsak viromu; toksik maddelerin ve besinlerin metabolizması, metabolik yollar, barsak bariyerinin sağlanması, immün regülasyonda görev alır. Barsak viromuyla hastalıkların ilişkisi; ortamda belirli virotiplerin yoğun olması ve çeşitlilikte değişiklikle açıklanabilir. Barsak virom değişikliği ile inflamatuar barsak hastalığı, tip 1 ve 2 diyabetes mellitus, obezite, HIV infeksiyonu, karaciğer hastalıkları, malignite ve COVID-19 ilişkisini gösteren pek çok araştırma yayınlanmıştır. Son zamanlarda, yeni nesil dizileme, metagenomik dizileme yöntemlerinin uygulanması sayesinde, "karanlık alan" olarak adlandırılan barsak viromu açığa çıkmaya başlamıştır. Bu gelişmeler, insan viromunun hastalıklardaki rolünü tam anlamıyla ortaya çıkarmaya yönelik çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Virom, virobiyota, disbiyoz, bakteriyofaj, ökaryotik virus

ABSTRACT

The microbiota can be defined as all microorganisms living in the human body, including approximately 90 trillion bacteria, archaea, eukaryotic microorganisms, and viruses. While the term "virobiota" refers to the community of viruses within a host, and "virom" refers to the entire set of genes from this virobiota, these definitions are sometimes used interchangeably. The human virome consists of endogenous viral elements, eukaryotic viruses that infect eukaryotic cells such as bacteria, fungi, and archaea, prokaryotic viruses, and primarily plant-derived viruses obtained from the environment and diet. Bacteriophages, which are viruses specific to bacteria, are the primary

components of the virome. Eukaryotic viruses constitute a small fraction of the gut virome. Particularly, regions of the human body, especially where the gut is present, carry the highest viral load. The gut virome plays a role in the metabolism of toxins and nutrients, metabolic pathways, maintenance of the gut barrier, and immune regulation. The relationship between the gut virome and diseases can be explained by the prevalence of specific virotypes in the environment and changes in diversity. Numerous studies have been published demonstrating the connection between changes in the gut virome and inflammatory bowel disease, type 1 and 2 diabetes mellitus, obesity, HIV infection, liver diseases, malignancy, and COVID-19. In recent years, with the implementation of next-generation sequencing and metagenomic sequencing methods, the "dark matter" of the gut virome has started to be uncovered. These advancements have led to intensified research efforts to fully uncover the role of the human virome in diseases.

Keywords: Viroma, virobiota, dysbiosis, bacteriophage, eukaryotic virus

Extended Abstract

The microbiota can be defined as all microorganisms living in the human body, including approximately 90 trillion bacteria, archaea, eukaryotic microorganisms, and viruses. On the other hand, the microbiome consists of genes and gene products produced by resident microbial communities. Over the last decade, advancements in metagenomic sequencing, bioinformatics analysis, and molecular biology techniques have led to an increased understanding of the human gut bacteriome. However, specific investigations into the gut virome, an integral component of the gut microbiome, have been delayed. Since the initial glimpse into the diversity and richness of the human gut virome in 2003, there has been rapid growth in research focused on the community composition and genetic makeup of the human gut virome. While the term "virobiota" refers to the viral community within a host and "virom" refers to the entire set of genes derived from virobiota, these terms are sometimes used interchangeably. Recently, the development of DNA sequencing and the application of next-generation sequencing methods have facilitated the rapid and efficient identification of pathogens. In this context, the evolution of sequencing techniques has enabled the unveiling of the human virome. Factors such as the genetic presence of DNA or RNA, the heterogeneity of virome elements, the challenge of working with low-biomass samples, the risk of contamination with host DNA, and the absence of a universally conserved sequence, similar to the 16S rRNA in bacteria or the internal transcribed spacer (ITS) region in fungi, have hindered the analysis of the human virome. The human virome is composed of three components: endogenous viral elements (endogenous retroviruses), eukaryotic virome (viruses that infect eukaryotic cells), and prokaryotic virome (bacteriophages). Endogenous retroviruses, which can integrate into the genome and constitute approximately 8% of the human genome, are remnants of retroviral genes. These often defective viruses can sometimes lead to the formation of functional proteins upon transcription. While they are mostly considered non-

pathogenic, some endogenous retroviruses have been suggested to be associated with certain autoimmune diseases, type 1 diabetes mellitus, HIV infection, neurodegenerative disorders, chronic inflammation, and malignancies. Bacteriophages, known as bacterium-specific viruses, are the main components of the human virome. Humans serve as important reservoirs for bacteriophages, which are active regulators of bacterial ecosystems. Bacteriophages, found in many biomes of the human body, are approximately 20 times more abundant in the gut mucosa and lungs than bacteria. Intestinal bacteriophages mostly consist of single-stranded and double-stranded DNA phages. The most common bacteriophages are double-stranded DNA viruses in the *Caudovirales* order and single-stranded DNA viruses in the *Microviridae* family. Unlike eukaryotic viruses, gut bacteriophage density and diversity peak at birth and decrease with age. The amounts of *Microviridae* and *Caudovirales* bacteriophages show a negative correlation. The presence of *Microviridae* family members is rare before the age of two, while CrAssphage reaches its highest levels in the gut virome at later ages. Eukaryotic viruses, which are part of the human genome, can infect human cells, small eukaryotes (protozoa, fungi), plants, and animals. Eukaryotic viruses represent a small fraction of the gut virome. The virome includes single-stranded DNA viruses (circovirus and anellovirus) and double-stranded DNA viruses (polyomavirus, adenovirus, and papillomavirus). The number and diversity of both DNA and RNA eukaryotic virus populations increase with age in the human gut virome. Numerous eukaryotic viruses, including families *Herpesviridae*, *Phycodnaviridae*, *Poxviridae*, *Mimiviridae*, and *Iridoviridae*, have been identified in infant feces. Regions of the human body with high viral loads primarily include the gut regions. However, mucosal areas such as the oral cavity, nose, or vagina have lower amounts of viruses but still form an important group. The gut microbiome interacts with epithelial and immune cells and regulates metabolism, thus playing a crucial role in the development and homeostasis of the immune system. In addition to bacteria, the gut contains a significant amount of viruses (approximately 1:1 to 10:1 ratio compared to bacteria). The healthy gut virome, especially the bacteriophage component, has a significant influence on maintaining the functions and homeostasis of the gut microbiome. Virome members might play a role in the pathogenesis of certain diseases by causing dysbiosis. There is increasing evidence that the gut microbiome affects the onset and development of both gut and extraintestinal diseases. The relationship between the gut virome and diseases can be explained by the prevalence of specific virotypes in the environment and changes in diversity. Several studies have been published that demonstrate the connection between changes in the gut virome and inflammatory bowel disease, type 1 and 2 diabetes mellitus, obesity, HIV infection, liver diseases, malignancy, and COVID-19. With the implementation of next-generation sequencing and metagenomic

sequencing methods, the “dark matter” of the gut virome has started to be uncovered. These developments have spurred intensified research efforts to fully elucidate the role of the human virome in disease.

1. Giriş

Mikrobiyota, insan vücudunda yaşayan tüm mikroorganizmalar (yaklaşık 90 trilyon bakteri, arkea, ökaryotik mikroorganizma ve virus) olarak tanımlanabilir; mikrobiyom ise yerleşik mikrobiyal topluluklar tarafından üretilen genler ve gen ürünlerinden (RNA, proteinler, metabolitler) oluşur. Yüksek verimli DNA ve RNA dizileme teknolojilerinin ve hesaplama metadolojilerinin ortaya çıkışı, bilim adamlarının küresel mikroorganizma setini (kültürlü ve kültürsüz) şimdiye kadar benzersiz bir şekilde sistematik olarak kataloglamasına olanak sağlamıştır. Farklı vücut habitatları, mikrobiyal bileşim ve işleve (metabolik modüller ve yollar) göre farklılık gösteren mikrobiyal topluluklar içerir. Sonuç olarak, her bir vücut habitatı, her bir vücut bölgesine adapte olmuş karakteristik bakteri türlerinden ve diğer mikrobiyal taksonlardan oluşur. Mikrobiyal bileşimdeki farklılıklar, insan mikrobiyomunun metabolik kapasitesinde ve toplam işlevinde farklılıklar sağlar.

Geleneksel kavramlar, Koch'un postülatlarında öne sürülen ilk fikirler gibi, mikroorganizmaların yalnızca patojen olarak görüldüğü ve infeksiyöz hastalıkların tek etyolojik ajanlar olarak kabul edildiği fikirler gibi sorgulanmıştır. Bu tür bir "düşman" bakış açısı, Anton van Leeuwenhoek'un mikroskoplarıyla yapılan ağız ve dışkı mikroorganizmalarının erken gözlemlerini gözardı etmektedir. Son zamanlarda, mikrobiyal genomunun insan genomunu en az 250 kat aştığı ve yerleşik mikrobiyotanın hücre sayısının insan hücre sayısına eşit ya da sayısını hafifçe aştığı tahmin edilmektedir (Sender, Fuchs, & Milo, 2016). Çeşitli insan patojenlerinin nispeten bol miktarda ve yaygın olarak bulunduğu konusundaki görüşler, insan mikrobiyomunun bilimindeki ilerlemelerle daha da artmaktadır. Bolluk, her bireyin veya vücut bölgesinin içindeki hücre sayısını; yaygınlık ise aynı mikroorganizmaların farklı bireylerde bulunma durumunu ifade eder. Sağlıklı bireylerde her bölgeye özgü mikrobiyal toplulukların yapısının, işlevinin ve çeşitliliğinin tanımlanması önemlidir. Böylece disbiyoz durumuna yol açan bozulmalar tanınabilir ve daha sonra önlenebilir ve/veya tedavi edilebilir. İnsan viromu, endojen viral elementler, bakteri, mantar ve arkea gibi ökaryotik hücreleri infekte eden ökaryotik viruslar, prokaryotik viruslardan ve öncelikle çevre ve diyetten türetilen bitki viruslarından oluşur (Liang, & Bushman, 2021). Metagenomik dizilemenin (bir numunedeki tüm genetik materyalleri yüksek verimli bir şekilde aynı anda dizileyen yeni nesil dizileme yaklaşımı), biyoinformatik analizlerin ve moleküler biyoloji tekniklerinin hızlı gelişimi nedeniyle son on yılda insan barsağı bakteriyomunun genel olarak anlaşılması artmıştır. Bununla birlikte, barsak mikrobiyomunun önemli bir bileşeni olarak barsak viromunun spesifik çalışmaları gecikmiştir. 2003 yılında insan barsağı viromunun çeşitliliğine ve zenginliğine ilk göz atılmasından bu yana, insan barsak viromunun

topluluk bileşimi ve genetik bileşimi üzerine hakemli araştırmalarda hızlı bir artış olduğu gözlenmektedir (Breitbart et al., 2003).

Ocak 2022 tarihinden itibaren 11.551'den fazla viral genom dizisi ve 4507 viral tür, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) GenBank ve Refseq veritabanlarına depolanmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 189.680 viral taslak genomu ve tahmini 54.118 viral türü kataloglayan Metagenomik Bağırsak Virusu (MGV) başlıklı, güncellenmiş barsak viral soyları koleksiyonu rapor edilmiştir (Nayfach et al., 2021). Yapılan çalışmalarda, fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT), fekal virom transplantasyonu (FVT) ve fajterapi gibi tedavilerin, antibiyotiklerin neden olduğu barsak disbiyozu, tekrarlayan *Clostridioides difficile* infeksiyonu, obezite ve bakteriyel infeksiyon hastalıklarının tedavisinde oldukça etkili olduğu rapor edilmiştir (Ott et al., 2017; Draper et al., 2020; Rasmussen et al., 2020; Galtier et al., 2017; Cepko et al., 2020). Bu çalışmalar, barsak viromunun hastalık patogenezi ve tedavisi açısından kritik olduğunu, barsak viromunu temel alan yeni terapötik stratejilere ilham verebileceğini göstermiştir.

2. Tanımlamalar

Konakta yer alan virus topluluğu ''virobiyota'' ve virobiyotadaki tüm gen kümesi ''virom (viral metagenom)'' olarak tanımlanmasına karşın, bu tanımlamalar kimi zaman birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. Kısaca, insan mikrobiyomunun viral bileşenidirler. Latent, akut veya kalıcı infeksiyona sebep olan viruslar ve insan genomuna entegre edilmiş endojen retroviruslar gibi viruslar da dahil olmak üzere insanlarda veya insanlar üzerinde bulunan bütün virusların toplamı viromu oluşturur (Wylie, Weinstock, & Storch, 2012).

Disbiyoz herhangi bir nedenle mikrobiyotanın dengesinin bozulmasıdır. Buna ek olarak, mikrobiyota bileşenlerinin değişmesi ya da bozulması hallerinde buna bağlı olarak fonksiyonlarını yitirmesi şeklinde tanımlanır.

3. Virom Çalışmalarının Zorlukları

Son zamanlarda, DNA dizilerinin geliştirilmesi ile yeni nesil sekanslama yöntemlerinin uygulana gelmesi, patojenlerin etkin ve kısa sürede tanımlanmasını sağlamıştır (Chen, Miller, DeRisi, & Chiu, 2011). Bu kapsamda bahsedilen dizileme yöntemlerindeki gelişim, insan viromunun açığa çıkarılmasına imkân tanımıştır. Hal böyleyken, mikrobiyomun bakteriyel olmayan bileşenlerini konu alan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Viruslar; genetik olarak DNA veya RNA içermesi, virom elementlerinin heterojen olması, düşük biyokütle örnekleri ile çalışma güçlüğü, konak DNA arka planı ile karıştırılma riski, bakterilerde kul-

lanılan 16S rRNA ve mantarlarda kullanılan internal transcribed spacer (ITS) bölgesi gibi tek bir korunmuş dizi taşımaması gibi etmenler insan virobiyotasının analizini geri planda bırakmıştır (Wang, 2020; Virgin, Wherry, & Ahmed, 2009; Zou, Caler, Colombini-Hatch, Glynn, & Srinivas, 2016; Woolhouse et al., 2008). Bu nedenle viral metagenomik çalışmalardan elde edilen dizilerin yaklaşık %60-99'ı tanımlanamamış, sınıflandırılmamış veya fonksiyonel tanımlaması yapılmamış durumdadır (Beller, & Matthijnssens, 2019).

4. İnsan Viromunun Bileşenleri

İnsan viromu, endojen viral elementler (endojen retroviruslar), ökaryotik virom (ökaryotik hücreleri infekte eden viruslar) ve prokaryotik virom (bakteriyofaj; faj) olmak üzere üç bileşenden oluşur (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019).

4.1. İnsan Endojen Retroviruslar

Genoma integre olabilen ve insan genomunun yaklaşık %8'ini oluşturan endojen retroviruslar, retroviral gen kalıntılarıdır (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019). Genellikle defektif olan bu virusların transkripsiyonu fonksiyonel proteinlerin oluşumuna sebep olabilir. Çoğunlukla patojen olmadıkları düşünülse de, bazı otoimmün hastalıkların, tip 1 diyabetes mellitusun, HIV infeksiyonunun, nörodejeneratif bozuklukların, kronik inflamasyonun ve malignitelerin (melanom, meme ve over CA gibi) belli endojen retroviruslarla bağlantılı olabileceği düşünülmüştür (Küry et al., 2018; Li et al., 2015; Nexø et al., 2016; Gonzalez-Cao et al., 2016). Yüksek plazma RNA düzeyleri ve endojen retrovirus transkripsiyonunun olduğu saptanan bu tabloların, virus replikasyonunu uyarabileceği belirtilmiştir (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019). Bu etyolojik ajanın gösterilmesi endojen retrovirus genlerini hedefleyen immünomodülatör ilaç gibi tedavi yaklaşımının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

4.2. Prokaryotik Virom (Bakteriyofajlar=Fajlar)

Bakteriye spesifik viruslar olan bakteriyofajlar, insan viromunun asıl bileşenidir. Ekosistemlerdeki bakterilerin aktif düzenleyicileri olan bakteriyofajlar için insanlar önemli bir rezervuardır (Huh, Wong, St Jean, & Slavcev, 2019). İnsan vücudunun birçok biyomunda saptanan fajlar barsak mukozası ve akciğerlerde bakterilerden yaklaşık olarak 20 kat daha fazla bulunmaktadır. Barsakta yaklaşık 10^{15} kopya bakteriyofaj olduğu tespit edilmiştir (Neil, & Cadwell, 2018).

Barsak bakteriyofajları çoğunlukla tek ve çift sarmallı DNA fajlarından oluşur. En çok bulunan bakteriyofajlar; *Cauduvirales* takımında yer alan çift sarmallı DNA virusları ve *Microviridae* ailesinde yer alan tek sarmallı DNA viruslarıdır (Matijašić et al., 2020; Lopetuso,

Laniro, Scaldaferri, Cammarota, & Gasbarrini, 2016). DNA fajı olan CrAssphage (Cross-Assembled phage) insan barsak viromunda en yoğun bulunan virustur (Guerin et al., 2018; Koonin, & Yutin, 2020).

Barsak bakteriyofaj yoğunluğu ve çeşitliliği, ökaryotik viruslardan farklı olarak, doğumda pik yaparken, yaşla birlikte azalır (Li et al., 2015). *Microviridae* ve *Caudovirales* bakteriyofaj gruplarının miktarı da negatif korelasyon gösterir. İki yaşından önce *Microviridae* ailesi sık bulunmaz. CrAssphage ise ileri yaşlarda barsak viromunda en yüksek seviyeye ulaşır (Siljiander, Honkanen, & Knip, 2019). Barsak viromunda DNA bakteriyofajları çoğunluktadır. Barsak ekosisteminde litik fajlara ılımlı fajlara göre daha az olarak bulunur (Garmaeva et al., 2019; Maurice, 2109). Çoğunun, antibiyotik direnci ve metabolizma için gerekli enzimleri kodlayan genleri transdüksiyon ve lizojeni yoluyla aktararak bakteri hücresine fayda sağladığına inanılmaktadır. Bu genetik transfer, barsak mikrobiyotasının değişen ortam ve besin koşullarına adapte olmasına ve antibiyotik etkisinden korunmasına olanak sağlar.

Bakteriyofajlar, Ig benzeri protein domainleri aracılığıyla müsin glikoproteinleriyle etkileşerek mukozaya bağlanır ve içeri gömülür. Bu adımın da bakterilere karşı immünitenin ilk basamağını oluşturduğu söylenebilir (Carding, Davis, & Hoyles, 2017; Ghose et al., 2019; Ma, You, Mai, Tokuyasu, & Liu, 2018). Bakteriyofajların çeşitliliği ve sayısındaki değişiklikler bakteri yoğunluğunu etkileyebilir. Bunun sonucu olarak disbiyoz oluşur ve intestinal homeostazisi bozacak türden etkilerle karşılaşılabilir (Siljiander et al., 2019).

4.3. Ökaryotik Viruslar

İnsan genomunun bir parçası olan ökaryotik viruslar, insan hücrelerini, küçük ökaryotları (protozoon, mantar), bitki ve hayvanları infekte edebilir (Santiago-Rodriguez, 2019). Ökaryotik viruslar, barsak viromunun küçük bir kısmını oluşturur (Lopetuso et al., 2016). Viromda, tek sarmallı DNA virusları (circovirus ve anellovirus) ve çift sarmallı DNA virusları (polyomavirus, adenovirus ve papillomavirus) bulunmaktadır (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019). Bazı ökaryotik viruslar kommensal bakterilere benzer şekilde mukozal immüniteyi sağlayabilir (Siljiander, et al., 2019). Genellikle sağlıklı kişilerde uzun süre latent olarak kalabilen ökaryotik viruslar, semptomatik hastalıklara da neden olabilir (Ungaro, Massimino, D'Alessio, & Danese, 2019). Yeni dizileme teknikleriyle yeni ve var olan ökaryotik virusların tanımlanmasıyla hastalıklarda yeni ökaryotik viruslar etyolojik ajan olarak tespit edilebilir (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019).

İnsan barsak viromunda, yaşla birlikte hem DNA hem de RNA ökaryotik virus popülasyonlarının sayısı ve çeşitliliğinde artış saptanır. *Herpesviridae, Phycodnaviridae, Poxviridae,*

Mimiviridae ve *Iridoviridae* ailelerini içeren çok sayıda ökaryotik virus, bebeklerin dışkısında belirlenmiştir (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019). Sağlıklı çocukların dışkılarında *Picornavirus* ve *Anellovirus* en çok bulunan ökaryotik viruslardır (Lopetuso et al., 2016). Ökaryotik virom, diğer bebeklerde ikiz bebeklerle karşılaştırıldığında çok daha az benzerlik gösterir. Anne sütüyle bebeğin dışkısında benzer virusler belirlendiği için anneden bebeğe viromdaki üyelerin doğrudan geçişi olduğu kabul edilmektedir (Pannaraj et al., 2018).

5. Farklı Vücut Bölgelerine Göre Virom

İnsan vücudunda özellikle barsakların bulunduğu bölgeler en yüksek virus yüküne sahiptir. Bununla birlikte, ağız boşluğu, burun ya da vagina gibi mukozaların bulunduğu bölgelerde miktar daha düşük, ancak önemli bir grubu oluşturmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. İnsan viromu; farklı vücut bölgerine göre izole edilen viruslar

Bölge	Aile	Genom	Cins
Deri	*Papilloviridae*	DNA	*Betapapillomavirus* (tip 5, 9, 49) *Gamapapillomavirus (*tip 4, 48, 50, 60, 88)
	Circoviridae		*Gyrovirus*
	Polyomaviridae		Merkel hücreli polyoma virus (MCPyV), HPyV6, HPyV7, HPyV9
	Anelloviridae		*Torque teno virus* (TT, TTV)
	Parvoviridae		*Parvovirus* B19
	Poxviridae		*Vaccinia* virus
	Herpesviridae		*Human herpesvirus-7* (HHV7)
Gastrointestinal sistem	*Adenoviridae*	DNA	*Adenovirus* grup C ve F
	Anelloviridae		TT, TT mini virüs, TT midi virüs
	Circoviridae		İnsan gyrovirus
	Herpesviridae		*Cytomegalovirus* (CMV)
	Papillomaviridae		*Human papillomavirus-6* (HPV6)
	Polyomaviridae		BK virus
	Caliciviridae	RNA	*Norovirus*
	Reoviridae		*Rotavirus*
	Picornaviridae		*Enterovirus, Parechovirus, Aichivirus*
	Picobirnaviridae		*Picobirnavirüs*
	Astroviridae		*Astrovirus*

Solunum sistemi	*Adenoviridae*	DNA	*Adenovirus* türleri
	Anelloviridae		*Torque teno virus* (TTV)
	Herpesviridae		*Herpes simplex virus-1* (HSV1)
	Papillomaviridae		*Human papillomavirus-11* (HPV11)
	Polyomaviridae		*KI polyomavirus* (KIPyV)
	Parvoviridae		*Bocavirus*
	Coronaviridae	RNA	*Coronavirus* OC43
	Orthomyxoviridae		*Influenza* virus
	Pneumoviridae		*Respiratory syncytial virus* (RSV)
	Picornaviridae		*Rhinovirus*
Genitoüriner sistem	*Adenoviridae*	DNA	*Adenovirus* türleri
	Anelloviridae		*Torque teno virus* (TTV)
	Herpesviridae		*Herpes simplex virus*-2 (HSV2)
	Papillomaviridae		*Human papillomavirus*-16 (HPV16)
	Polyomaviridae		BK virus
Sistemik (kan)	*Adenoviridae*	DNA	*Adenovirus* türleri
	Anelloviridae		*Torque teno virus* (TTV), TT-like mini virus
	Herpesviridae		Nöronlarda HSV, VZV; dolaşımdaki lenfositlerde CMV, EBV, HHV6, HHV7
	Parvoviridae		*Parvovirus* B19
	Polyomaviridae		BK virus
	Bornaviridae	RNA	*Bornavirus*
	Flaviviridae		*Hepatitis G virus* (GB virus C or HGV)
	Retroviridae		Endojen retroviruslar

5.1. Deri

Deri viromu, kalıcı ve geçici viruslardan oluşur. Deri bariyerinde bulunan karmaşık yapıdaki ekosistem kommensal türler arasındaki rekabette, patojen türlerin yapışmasını önlemede kritik bir rol oynamaktadır. Deride baskın olan üç ailenin *Papilloviridae, Circoviridae* ve *Polyomaviridae* olduğu yeni nesil dizileme yöntemleriyle ortaya konmuştur (Foulongne et al., 2012) Bu da aslında HPV'nin deride asemptomatik olarak taşınabileceğini göstermiştir. Buna ek olarak, bu yeni yöntemlerle 13 yeni HPV ve dört tane yeni polyomavirus suşu tanımlanmıştır.

5.2. Solunum Sistemi

Kistik fibrozlu hastalarla yapılan çalışmalar solunum sisteminde yer alan virusların tanımlanmasını sağlamıştır. Çoğunlukla bakteriler kolonize olmakla birlikte var olan virusların çoğu

bakteriyofajlardır (*Pseudomonas* phi KZ, *Staphylococcus* phi Twort, *Haemophilus influenzae* phi HP1, *Mycobacterium* phi Bxz1 gibi).

5.3. Genitoüriner Sistem

Genital bölgede *Adenoviridae*, *Herpesviridae* ve *Papillomaviridae* ailelerinin baskın olduğu bilinmektedir (Delwart, 2016).

5.4. Sistemik (kan)

Anelloviruslar son zamanlara kadar patojen olarak kabul edilmese de sağlıklı bireylerin en az %70'sinde plazmada saptanırlar (Hino, & Miyata, 2007; Wyle, Mihindukulasuriya, Sodergren, Weinstock, & Storch, 2012). Bununla birlikte kalıcı viremiye neden olabildikleri bilinmektedir. *Anellovirus* dışında plazmada çok az miktarda virus bulunmaktadır. CMV, HSV1, HSV2, HHV6, HHV8 ve EBV virusları dokularda yüksek miktarda saptanabilir. Lökotropik virus olan EBV, HHV6, CMV ve HHV7 dolaşımdaki insan lökositlerinde bulunabilir. Kişi, bağışıklık durumu ve eşlik eden komorbiditesiyle birlikte bir bütün olarak değerlendirilmelidir. Homeostatik dengede insan viromasında patojenik olmayan bu virusların çoğu primer infeksiyon esnasında akut infeksiyon veya bağışıklığın baskılandığı durumlarda latent virus replikasyonuyla ilişkili olabilir (Cadwell et al., 2010).

5.5. Gastrointestinal Sistem-Barsak Viromu

İnsan gastrointestinal sistemi, ağız boşluğundan anüse kadar uzanır ve çok sayıda mikroorganizmayı barındırır. Gastrointestinal sistemde bulunan mikroorganizma toplulukları ve onları oluşturan genomlar/genler, ince barsak, kalın barsak, rektum gibi farklı bölgelere göre değişir. Barsak mikrobiyomu, epitel ve bağışıklık hücreleriyle etkileşime girer ve metabolizmayı düzenler. Bu şekilde, immün sistemin gelişimi ve homeostazında çok önemli bir rol oynar. Barsakta, bakterilere ek olarak, önemli miktarda virus (1:1-10:1 oranında bakterilerden daha fazladır) bulunur. Barsak viromu, barsak mikrobiyomunun viral bileşeni olarak tanımlanır. Barsak viromu, insan hücrelerinde replike olabilen ökaryotik viruslardan (ökaryotik DNA viruslarından anellovirus; ökaryotik RNA viruslarından ise *Parechovirus, Tombamovirus, Sapovirus* ve *Enterovirus* cinsleri (Silijander et al., 2019) ve barsak bakterilerinde replike olan bakteriyofajlardan oluşur, ki bunlar en yaygın olanlardır. Ökaryotik viruslar ayrıca bitki (Shkporov, & Hill, 2019) ve hayvan (Liang, & Bushman, 2021) virusları gibi gıda alımıyla da gelirler. Barsak viromunun ana bileşeni yaklaşık %90'lık bir oranla bakteriyofajlardır (Tablo 2, 3, 4).

Tablo 2. Barsak viromunun ökaryotik virom bileşeni		
Ökaryotik virom	**Aile**	**Cins**
	Picornaviridae	*Enterovirus*
		Parechovirus
		Cardiovirus
		Salivirus
	Caliciviridae	*Norovirus*
		Sapovirus
	Cycloviridae	*Circovirus*
		Cyclovirus
	Picobirnaviridae	*Picobirnavirus*
	Astroviridae	*Astrovirus*
	Reoviridae	*Rotavirus*
	Adenoviridae	*Mastadenovirus* C, F, diğerleri
	Anelloviridae	*Anellovirus*
	Parvoviridae	*Bocavirus*

Tablo 3. Barsak viromunun prokaryotik virom bileşeni		
Prokaryotik virom (Bakteriyofaj)	Tek sarmallı DNA fajları (dsDNA)	**Aile**
		Microviridae
		Inoviridae
	Çift sarmallı DNA fajları (ssDNA) *Cauduvirales* takımında yer alırlar.	*Siphoviridae*
		Podoviridae
		CrAssphage
		Podoviridae

Tablo 4. Barsak viromunun fekal-oral yolla bulaşan hayvan virusları		
Kontamine gıdaların tüketilmesiyle ağız yoluyla bulaşan hayvan virusları	*Hepatitis E virus* (HEV), genotip 3, 4	Domuz
	Aile	**Cins**
	Circoviridae	*Gyrovirus (*HGyV, AGV2) Tavuk ve insan dışkısında *Cyvlovirus*

Barsak viromu erken yaşlarda kazanılır. Anne sütünde bulunan bazı viral bileşenlerin barsak viromunda bulunması nedeniyle, barsak viromunun beslenme alışkanlığına göre değiştiği söylenebilir. İnfantlarda barsak viromunun oluşmasında anne sütünde yer alan viruslar rol oynar. Emzirmeyle bebeğe geçen viromlar, immünitenin gelişiminde kritik rol oynayabilir (Mohandas, & Pannaraj, 2020). Süt ve gıda ürünleri, endojen viromu etkileyebilecek prokaryotik viruslar (*Listonella*, *Weisella, Escherichia, Leuconostoc* ve *Staphylococcus* cinslerinde

bulunan türleri infekte eden bakteriofajlar) içermektedir. Bu durum, virom içeriğindeki çeşitlilikte diyetin önemli bir yeri olduğunu desteklemektedir (Minot, Sinha, & Chen, 2019). Aynı gıdalarla beslenen kişilerde benzer barsak virom komponentlerinin olduğu da yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Minot et al., 2019).

Günümüze kadar, insan barsak ökaryotik viruslarının tarihi, genellikle geçici ve semptomatik infeksiyonlara yol açan patojen virusların (*Enterovirus, Rotavirus, Norovirus* cinsleri dahil) keşfiyle domine edilmiştir. Bununla birlikte, bazı ökaryotik viruslar insan barsağının yerleşik sakinleri gibi görünmektedir. Çoğu barsak virusu kültüre edilemez ve bu nedenle geniş yelpazeli metagenomik çalışmalar, son zamanlarda onların daha iyi karakterize edilmesine katkıda bulunmuştur. Ökaryotik viromun yaşla birlikte aşamalı olarak kazanıldığı görünmektedir, bu bakteriyofaj zenginliğiyle zıtlaşır. Bu yerleşik virusların edinilmesi, sağlıklı bebeklerde herhangi bir açıklayıcı akut veya kronik hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Barsak mikrobiyotasının üyelerinden biri olan virusların vücuda bazı yararlı etkilerinin olduğunun gösterilmesi, virusların barsak mikrobiyomu için önemli olduğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir (Lopetuso, Laniro, Scaldaferri, Cammarota, & Gasbarrini, 2016). Antibiyotik uygulanmış farelerde persistan norovirus infeksiyonunun intestinal fonksiyonunu düzelttiğinin gösterilmesi, ökaryotik virusların barsakta faydalı işler yapan kommensal bakteriler gibi etki gösterebildiğini düşündürmüştür (Beller, & Matthijnssens, 2019).

5.5.1. Barsak Viromu ve İmmün Sistem Arasındaki Etkileşim

Barsak viromu, kommensal bakteriler ve barsak bariyeriyle etkileşime girerek, barsak fonksiyonlarına katkı sağlar. Barsak viromu; toksik maddelerin ve besinlerin metabolizması, metabolik yollar, barsak bariyerinin sağlanması, immün regülasyonda görev alır (Lopetuso et al., 2016). Sağlıklı barsak viromunun (özellikle bakteriyofajom), barsak mikrobiyomunun fonksiyonlarının devam ettirilmesinde ve homeostazında önemli etkisi vardır. Virom üyeleri, disbiyoza sebep olarak kimi hastalıkların patogenezinde rol oynuyor olabilir. Barsak bariyerinde bozulma ve çeşitlilikte azalmaya neden olan barsak virom değişiklikleri; infeksiyöz, metabolik bozukluklar, otoimmün hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklara neden olabilir (Carding, Davis, & Hoyles, 2017).

Virom ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşim henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bakteriyofaj ve ökaryotik virus partikülleri yer değiştirir ve replikasyondan bağımsız olarak doğuştan kazanılan bağışıklığı aktive edebilir. Bununla birlikte, ökaryotik insan virusları üzerindeki fajların fiziksel bolluğu, bu tür bir aktivasyonun esas olarak fajlar tarafından yürütüldüğünü düşündürmektedir. RNA Reseptör retinoik asit indüklenebilir gen-1 (RIG-I) ve Toll benzeri

reseptörler (TLR7 ve TLR8) ve DNA (TLR9, siklik-GMP-AMP) için çeşitli örüntü tanıma reseptörleri aracılığıyla hücreler içindeki karşılık gelen viral nükleik asitlerin saptanması, pleiotropik aktivitelere sahip interferon (IFN) -α ve -β ve interlökin 1 ve 6 gibi inflamatuar sitokinlerin ekspresyonuna yol açmaktadır. Doğuştan kazanılan bağışıklığın bu tür aktivasyonunun, sistemik kalıcı CMV infeksiyonunda gösterildiği gibi, patojenik infeksiyonlara karşı olumlu bir etkiye sahip olabileceği öne sürülmüştür (Duerkop, & Hooper, 2013; Barton et al., 2007). Çeşitli çalışmalar, fajların sitokinlerin salınımını düzenleyerek, opsonizasyonu ve bakterilerin tanınmasını artırarak, T ve B hücre aktivitelerini düzenleyerek insan bağışıklık sistemini etkilediğini ortaya koymuştur. Öte yandan, son zamanlarda oldukça şaşırtıcı bir şekilde virusların barsak inflamasyonunun kontrolünde de faydalı bir rol oynayabileceği gösterilmiştir. TLR3 ve TLR7 tarafından tanınan yerleşik viruslar, esas olarak plazmasitoid dendritik hücreler tarafından salgılanan IFN-β gibi antiinflamatuar sitokinler aracılığıyla barsak homeostazını destekler (Yang et al, 2016). Bağışıklığın bozulmasının barsak viromunu değiştirdiği gösterilmiştir (Handley et al, 2012; Handley et al., 2016). Barsak ökaryotik virom, rhesus makaklarının patojenik SIV infeksiyonu sırasında genişler (Handley et al., 2012). HIV ile infekte hastalarda, düşük periferik CD4 T hücre sayıları ile viromun değişmesi arasında bir ilişki vardır (Monaco et al., 2016). Enterik adenovirus ile hem ileri HIV/AIDS tanılı hastalarla (Monaco et al., 2016) hem de SIV ile infekte makaklar (Handley et al., 2012; Handley et al., 2016) arasında olan ilginç bir ilişki gösterilmiştir. Adenovirus replikasyonunun mukozal lezyonları ve kronik bağışıklık uyarımını destekleyen bakteriyel ve bakteriyofaj translokasyonuna yol açan enteropatiyi uyardığı bir mekanizmayla açıklanabilir. Bağışıklığı baskılanmış hastaların barsakta patojenik ve fırsatçı virusları ne ölçüde barındırdığı şu anda bilinmemektedir**.** Bununla birlikte, çok sayıda viral türün bir arada var olması ve devam etmesi muhtemeldir. Koruyucu bağışıklığın yokluğunda daha sonra yeniden ortaya çıkmak üzere geçici olarak bu türler temizlenebilir.

Barsak mikrobiyomunun hem barsak hem de barsak dışı hastalıkların başlangıcını ve gelişimini etkilediğini doğrulayan kanıtlar artmaktadır. Barsak viromuyla hastalıkların ilişkisi; ortamda belirli virotiplerin yoğun olması ve çeşitlilikte değişiklikle açıklanabilir. Barsak virom değişikliklerinin; otoimmün, infeksiyöz, metabolik ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığı ve bu nedenle barsak mikrobiyomu araştırmalarında öncülerden birini temsil ettiği giderek daha fazla bildirilmektedir (Carding et al., 2017; Zuo et al. 2018; Yang et al., 2021; Liang et al., 2020; Zuo et al., 2020).

5.5.2. Barsak Viromunun Hastalık Tablolarıyla İlişkisi

5.5.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

Yapılan hayvan deneylerinde, *Coxsackie* B4 gibi enterovirusların langerhans pankreas adacık hücrelerine zarar verdiğinin gösterilmesi, patogenezde Tip 1 diyabetes mellitus (T1DM) ile virus birlikteliğini düşündürmüştür. T1DM'ye genetik yatkınlığı olan çocukların boylamsal örneklemesini içeren prospektif bir kohortta, enterovirus infeksiyonunun T1DM için bir risk faktörü olduğu bulunmuştur (Sadeharju et al., 2003). Daha sonra araştırmacılar, rotavirus ve enterovirus ile T1DM arasındaki ilişkiyi yaptıkları çalışmalarla da doğrulamışlardır (Rogers, Basu, & Kim, 2019; Oikarinen et al. 2012). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, pediatrik T1DM vakalarında otoimmün başlangıcın öncesinde barsak viromunda değişikliklerin olduğunu ortaya koymuştur. T1DM'li çocukların dışkı örneklerinde *Circoviridae* ve *Picornaviridae* genom dizilerinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bakteriyofajlar açısından sağlıklı kontrollerde çeşitlilik ve miktarın daha fazla olduğu belirlenmiştir (Zhao et al., 2017).

5.5.2.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus ve Obezite

Obezite ve Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), dünya genelinde yaygın olarak görülen iki farklı metabolik bozukluktur. Yapılan çalışmalarda, insanlarda obezite ve T2DM durumlarında barsak viromunda disbiyoz olduğu gösterilmiştir (Yang et al., 2021; Monaco et al., 2016). Obezitesi olanlarda, özellikle T2DM'li olanlar, zayıf kontrol grubuyla kıyaslandığında barsak viromunda viral zenginlik ve çeşitliliklerinde azalma olduğu gösterilmiştir (Yang et al., 2021). İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışma, T2DM hastalarında *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae* ve sınıflandırılmamış *Caudovirales* ailelerinin miktarının arttığını göstermiştir (Ma, You, Mai, & Tokuyasu, 2018). T2DM'li kişilerde; *Escherichia* ve *Clostridium* türü bakterileri infekte eden *Podoviridae* ailesine ait fajlarla; *Lactobacilllus Pseudomonas*, *Staphylococcus* türü bakterileri infekte eden *Siphoviridae* ailesine ait fajların arttığı gözlenmiştir (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019). Buna ek olarak, T2DM'li kişilerin barsak bakterileri ve fajların arasında belirlenen sinerjistik değişikliklerin olduğu keşfedilmiştir. *Enterobacteriaceae* bakteri ailelerinin ve onların avcı fajlarının arttığı gösterilmiştir (Chen et al., 2021). Bakteri ve fajların doğal "av-tavşan" ilişkisi ve karmaşık etkileşimleri göz önüne alındığında, bu hasta grubunda hem bakteriyom hem de fajomun aynı anda değiştiğini görmek şaşırtıcı değildir.

Batı tarzı beslenmeye dayalı obez farelerde yapılan bir çalışma, mukozal ve luminal viromlar arasında mekansal bölgeleme kaybı ile hem mukozal hem de luminal viromlarda *Caudovirales* takımına ait yüksek bir lizojenik faj zenginliği olduğunu ortaya çıkarmıştır (Kim, &

Bae, 2016). Yüksek yağ içerikli diyet (HFD) ile oluşturulan obez farelerde, dışkı viromunda *Siphoviridae* ailesinde önemli bir azalma ile *Microviridae, Phycodnaviridae* ve *Mimivirdae* virus ailelerinde bir artış olduğu görülmüştür. Çalışma, özellikle lizojenik bir yaşam tarzına sahip olduğu bilinen *Siphoviridae* ailesinde, HFD grubunda lizojenik fajlarda azalma olduğunu raporlamıştır (Schulfer et al., 2020). Zayıf fenotipli farelerden obez fenotipli farelere fekal virom transplantasyonunun, obez olanlarının kilo vermesini sağladığı ve T2DM'nin semptomlarını azaltarak kan glukoz düzeyini düzelttiği gösterilmiştir. Fekal viromun ise bu etkiyi gastrik mikrobiyotayı değiştirerek yağtığı düşünülmüştür (Monaco et al., 2016). Fajların T2DM ve obezite ile ilişkisinin ortaya çıkarılması, faj aracılı tanı ve tedavi araştırmalarının öncüsü olacaktır.

5.5.2.3. HIV İnfeksiyonu

İnflamasyon ve diyarenin HIV infeksiyonu tablosunda görülmesi, barsak mikrobiyom disbiyozunun bu tabloyu açıklayabileciğini düşündürmüştür (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019). İleri evre HIV infeksiyonunda görülen immünosüpresyon, barsak viromu ve bakteriomdaki değişikliklerle birliktedir. Bu durum, AIDS ile ilişkili enteropati ve hastalık ilerlemesiyle ilişkili olabilir (Monaco et al., 2016). *Adenoviridae* ailesi gen dizilerinin, CD4+T hücre sayısı 200'ün altında olan HIV ile yaşayan bireylerde anlamlı miktarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. CD4+T hücre sayısının düşük olduğu HIV ile yaşayan bireylerde gözlenen *Anellovirus* düzeylerindeki yüksekliğin, virus replikasyonu üzerindeki immünolojik kontrolün bozulmasıyla ortaya çıktığı düşünülebilir. *Anellovirus* yoğunluğu ile konak immün cevabı arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, *Anellovirus* viral yükünün saptanmasının HIV ile yaşayan bireylerde immünolojik yanıtın takibinde bir belirteç olarak kullanılabileciği fikrini ortaya çıkarmıştır (Monaco et al., 2016; Siqueira et al., 2019; Li et al., 2013).

5.5.2.4. İnflamatuar Barsak Hastalığı

İnflamatuar barsak hastalıkları (İBH) gastrointestinal kanalın kronik inflamatuar bir hastalığıdır. İBH'nin kesin nedeni bilinmemekle birlikte, ülseratif kolit (ÜK) ve crohn hastalığında (CH) etyolojinin belirlenmesi biyobelirteç ve tedavide hedef olarak kullanılabilmelerine olanak sağlar (Santiago-Rodriguez, & Hollister, 2019). İBH'de barsak viromunda hastalığa spesifik değişiklikler gözlenmiştir. Barsak viromunun bakteriyel mikrobiyomla etkileşime girerek inflamasyonu uyardığı ve bakteriyel disbiyoza neden olduğu tahmin edilmektedir (Norman et al., 2015). İBH'de *Caudovirales* bakteriyofajların düzeylerindeki anlamlı yükseklik en önemli değişikliktir. CH'de bakteri çeşitliliğindeki azalmanın bakteriyofajların

aşırı artışının bir sonucu olarak oluşmaktadır. ÜK tanılı çocuklarda *Caudovirales* fajları, CH tanılı çocuklarla karşılaştırıldığında daha az miktardandır. *Microviridae* faj ailesi CH bulunan çocukların dışkı örneklerinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (Fernandes et al., 2019). ÜK'li hastaların rektal mukoza örneklerinde *Myoviridae, Microviridae, Podoviridae* fajlarının daha yoğun olduğu gösterilmiştir (Zuo et al., 2019). Bu sonuçlarla İBH'si olan hastalardaki virom değişikliklerinin hastalığa özel olduğu belirtilmiştir (Norman et al., 2015). Fajlar gibi, ökaryotik viromdaki disbiyoz İBH patogenezine katkı sağlar (Zuo et al., 2019). ÜK'li hastalarda kontrol grubuna göre *Pneumoviridae* ailesinin daha fazla olduğu, *Anelloviridae* ailesinin ise daha az bulunduğu belirlenmiştir. ÜK'de mukoza virobiyotasında değişikliklerin belirlenmesi, mukozal viromun hastalık patogenezinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (Matijašić et al., 2020; Zuo et al., 2019).

İBH hastaları ve sağlıklı kontrollerinin barsak virom zenginliği arasında önemli farklılıklar olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Clooney et al., 2019). Bu çalışma, aynı zamanda İBH'li hastaların barsak viromunda ılıman viryonların (çoğunlukla *Caudovirales* taksonları) baskın olduğunu bildirmiştir. Bu durum da fajların lizojenik dönüşümünde bir artış olduğunu düşündürmektedir (Clooney et al., 2019). Yakın zamanda yapılan başka çalışmada ise, VLP'lerin ÜK hastalarının dışkısından insan mikrobiyota ile ilişkili (HMA) farelere nakledilmesinin, farelerde koliti önemli ölçüde şiddetlendirdiği ve İBH patogeneziyle ilişkili bakteri taksonlarını değiştirdiği gözlemlenmiştir (Sinha et al., 2022). Başka bir fare çalışmasında*, Caudovirales'*e ait çeşitli faj taksonlarının, IFN-g'nin TLR'ye bağımlı üretimini artırarak barsak inflamasyonunu şiddetlendirmek için CD4+T hücrelerinin TLR9'a bağımlı aktivasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Gogokhia et al., 2019). Bu sonuçlarla, fajların barsak mukozal bağışıklık yanıtlarını aktive etmede ve koliti şiddetlendirmede büyük rol oynadığı vurgulanmıştır.

5.5.2.5. Malignite

Karsinogenez üzerine viromun önceden sanılanın aksine daha fazla rolü olduğu bildirilmektedir. Viromda yer alan birçok virus doğrudan ve dolaylı yolla karsinogenezi tetikleyebilir. Son zamanlarda biriken kanıtlar, barsak viromunun özellikle gastrointestinal kanserlerin başlangıcına ve gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, barsak viromu ve bakteriyofajlar, kolorektal kanser tedavi geliştirilmesinde klinikte kullanılabilir (Emlet, Ruffin, & Lamendella, 2020). Kolorektal kanser hastalarından alınan dışkı örneklerinin metagenomik analizi, barsak viromunun zenginliği ve çeşitliliğinin arttığını bildiren belirgin bir fekal viromu göstermiştir. Kolorektal kanserli grubu sağlıklı kontrollerden ayıran enterik viruslar arasında *Orthobunyavirus*, *Tunavirus, Phikzvirus* ve 19 tane daha ökaryotik

virus cinsi bulunmaktadır. *Inovirus* ve *Tunavirus*'tan gelen faj zenginleşmesi de çalışmada belirlenmiştir (Nakatsu et al., 2018). Bazı *Inovirus* türlerinin bakteri biyofilmlerinin üretimini düzenlediği ve kolon kanserinin oluşumuna katkı sağladığı bildirilmiştir. EBV, HBV, HCV, HIV-1, HHV-8, HPV, HTLV-1 gibi DNA ve RNA viruslarından bazıları onkojeniktir. Bazı türleri hayvanlarda kanserle ilişkili olan (Simian virus 40; SV40) ve insanlarda da kanserle ilişkili olduğu düşünülen türleri bulunan (Merkel cell polyomavirus; MCV) diğer bir virus grubu ise insan polyomaviruslardır. Kolorektal kanser hastalarında barsak viromu üzerine yapılan başka bir araştırmada, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında bakteri çeşitliliğinin (özellikle bütirat üreten ve anti-inflamatuar mikroorganizmalar) ve *Enterobacteria* fajlar ile crAssfajların önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Gao et al., 2021). Ökaryotik viruslar, özellikle de insanlardaki onkojen viruslar açısından incelendiğinde ise, sağlıklı kontrole göre EBV, HPV, insan polyomavirus ve CMV prevalansının yüksek olduğu belirtilmiştir (Massimino, Lovisa, Antonio, Danese, & Ungaro, 2020). Kolorektal kanserde barsak fajomunda önemli değişiklikler belirlenmiştir, ancak bu değişikliklerin malign transformasyonda ne kadar etkili olduğu konusunda daha fazla araştırmayı gerektirmektedir. Ana görüş, fajların barsak bakteri kompozisyonunu düzenleyerek kolorektal kanser başlangıcında ve ilerlemesinde çift etkili bir rol oynadığıdır (Gogokhia et al., 2019). Kolorektal kanserli hastaların dışkı örneklerinde bakteriyofaj çeşitliliğinin anlamlı düzeylerde arttığı belirlenmiştir (Nakatsu et al., 2018). Başka bir hipotez ise, fajların barsak geçirgenliğini artırdığı, bu durumun da patojenlerin barsaklardan geçişini kolaylaştırarak kronik inflamasyonu tetiklediği yönündedir. Bir pilot çalışma, özellikle *Siphoviridae* ve *Myoviridae* ailelerine ait fajların, sağlıklı barsağın adenokarsinom ve kolorektal kansere dönüşümünde oluşan disbiyozun önemli tetikleyicisi olduğunu belirtmiştir (Tetz, & Tetz, 2016)

5.5.2.6. Karaciğer Hastalığı

Karaciğer, barsakla çift yönlü iletişimi sürdüren, konak metabolizması için önemli bir organdır. Alkolle ilişkili karaciğer hastalığı (ALD) olan hastalar üzerinde yakın zamanda yapılan bir araştırma, barsak viromunda hastalığa özgü değişiklik olduğunu belirterek, barsak viromunun ALD'nin güçlü etkenleri olduğunu bildirmiştir (Jiang et al., 2020). ALD'li hastalarda, özellikle alkolik hepatiti (AH) olan hastalarda barsak virom çeşitliliğinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, AH grubunda *Enterobacteria* fajları, *Escherichia* fajları ve *Enterococcus* fajları gibi barsak fajlarında artışın yanında *Parvoviridae* ve *Herpesviridae* gibi ökaryotik viruslarda da artış saptanmıştır. *Staphylococcus* fajları ve *Herpesviridae* üyeleri gibi çok sayıda virus soyunun, AH'nin şiddeti ve mortalitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jiang et al., 2020). Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) üzerine yapılan çalışmalarda ise,

hastalarda barsak virom çeşitliliğinde bir azalma ve NAFLD'nin şiddetiyle barsak faj miktarı düşüklüğü arasında bir ilişki olduğu bildirmiştir. Endojen adenovirusu önemli bir risk faktörü olarak tanımlamıştır (Lang et al., 2020). Karaciğer sirozunda barsak viromunda meydana gelen değişikliklerin sirozun ilerlemesiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Bajaj et al., 2021).

5.5.2.7. COVID-19

Coronavirus hastalığı 2019 (COVID-19), solunum hastalığına neden olan bir virus olan SARS-CoV-2 RNA virusundan kaynaklanır (Liang et al., 2019) COVID-19 hastalarında görülen gastrointestinal semptomlardan (ishal, bulantı ve kusma dahil) yola çıkarak COVID-19 ile infekte bireylerdeki mikrobiyom değişiklikleri ve bu disbiyoz tablosunun hastalık şiddeti ve belirtileriyle ilişkisini araştırmak amacıyla çalışmalar yapılmıştır (Zuo et al., 2020; Zuo et al., 2020; Yeoh et al., 2021). Yapılan çalışmalarda dışkıda saptanan transkripsiyonel olarak aktif SARS-CoV-2 tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, aktif SARS-CoV-2'nin barsakta kalabileceği ve SARS-CoV-2'nin fekal-oral yolla bulaşabileceği fikrini öne sürmektedir. Barsaklarında yüksek SARS-CoV-2 infektivitesine sahip hastalarda, *Collinsella aerofaciens, Streptococcus infantis, Collinsella tanakaei, Morganella morganii* bakteri türlerinin yüksek oranda baskın olduğu; yeni nükleotit biyosentezi, amino asit biyosentezi ve glikoliz için yüksek işlevsel kapasiteleri olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, COVID-19 hastalarının barsak viromunda 11 ökaryotik virus ve sekiz bakteriyofaj soyunun zenginliğinde artış tespit edilmiştir (Zuo et al., 2021). Beklenmedik bir şekilde incelenen hastaların hem barsak bakteriyomunda hem de barsak viromunda disbiyozun hastaneden taburcu olduktan sonra bile uzun süre devam ettiği belirlenmiştir (Zuo et al., 2020; Zuo et al., 2021). Bu veriler, SARS-CoV-2 infeksiyonunun barsak mikrobiyomunun genel konfigürasyonu ve konakçı fizyolojisi üzerinde zararlı etkileri olduğunu göstermektedir.

5.5.2.8. Bakteriyel Vaginoz

Bakteriyel vaginozu olan hastalardan alınan numunelerde, kontrol grubuna kıyasla ökaryotik ve prokaryotik (bakteriyofaj) viral toplulukların oldukça farklı olduğu gözlenmiştir. Vagendeki virom ile vaginal bakteriom ve bakteriyel vaginoz arasında mutlak bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Jakobsen et al., 2019).

6. Sonuç

Yeni nesil dizileme, metagenomik dizileme ve biyoinformatik teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması sayesinde, "karanlık alan" olarak adlandırılan barsak viromu açığa çıkmaya başlamıştır. Bu gelişmeler, insan viromunun hastalıklardaki rolünü tam anlamıyla ortaya

çıkarmaya yönelik çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır. Özellikle insan barsak virom içeriğinde hasta ve sağlıklı kişiler arasında gözlenen değişikliklerin hastalığın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu sorusu gündemdeki yerini korumaktadır. Homeostaz, bir kişinin sağlıklı bir barsak mikrobiyomunu devam ettirmesi için çok elzemdir; bunun aksine barsak viromu disbiyozu, bir kişiyi hastalığa yatkın hale getirebilir. Farklı hastalıklarda insan barsak viromunda meydana gelen değişiklikler üzerine yapılmış çalışmalar, barsak viromu disbiyozuyla hastalık patofizyolojisi arasında yakın bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Gelecekteki araştırmalarda ele alınması gereken çok sayıda önemli soru vardır. Barsak viromu disbiyozu ile hastalık arasındaki korelasyon veya nedensellik ilişkisi, farklı hastalıklarda büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır. Virom çalışmaları, hesaplamalı araçlar ve eksik referans veri tabanları nedeniyle halen sınırlıdır. Barsak viromunun tamamı önemli ölçüde yeterince araştırılmamıştır ve metagenomik dizilemeyle oluşturulan viral dizilerin %50'den fazlası sınıflandırılmamış olarak kalmıştır. Bu durum mevcut çalışmalardan elde edilen genellemelerin ve sonuçların doğruluğunu engellemektedir. İnsan barsağında bulunan RNA viromu genellikle DNA viromundan daha az araştırılmıştır. İnsan sağlığını iyileştirmek ve belirli bir hastalığı tedavi etmek için yeni terapötik yaklaşımlara (FVT ve rafine faj terapisi gibi) rehberlik etmek için barsak viromu derinlemesine araştırılmayı hak etmektedir. Dışkıdaki virom/fajom, hastalıkların non-invazif tanısında kulanımını sağlayabileceği için araştırılmaya değerdir.

Kaynakça / References

Bajaj, J.S., Sikaroodi, M., Shamsaddini, A., Henseler, Z., Santiago-Rodriguez, T., Acharya, C…Gillevet, P.M. (2021). Interaction of bacterial metagenome and virome in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Gut.* 70(6), 1162-1173. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322470.

Barton, E.S., White, D.W., Cathelyn, J.S., Brett-McClellan, K.A., Engle, M., Diamond, M.S…Virgin, H.W. (2007). Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature.* 447(7142), 326-9. doi: 10.1038/nature05762. PMID: 17507983.

Beller, L., & Matthijnssens, J. (2019). What is (not) known about the dynamics of the human gut virome in health and disease. *Curr Opin Virol.* 37, 52-7. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.05.013.

Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J. M., Nulton, J., Salamon, P., & Rohwer, F. (2003). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of bacteriology,* 185(20), 6220–6223. https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6220-6223.2003.

Cadwell, K., Patel, K.K., Maloney, N.S., Liu, T.C., Ng, A.C., Storer, C.E…Virgin, H.W. (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*. 141(7), 1135-45. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.009.

Carding, S.R., Davis, N., & Hoyles, L. (2017). Review article: the human intestinal virome in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 46(9):800-15. https://doi.org/10.1111/apt.14280.

Cepko, L. C. S., Garling, E. E., Dinsdale, M. J., Scott, W. P., Bandy, L., Nice, T…Mellies, J. L. (2020). Myoviridae phage PDX kills enteroaggregative Escherichia coli without human microbiome dysbiosis. *Journal of medical microbiology,* 69(2), 309–323. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001162.

Chen, E.C., Miller, S.A., DeRisi, J.L., & Chiu, C.Y. (2011). Using a pan-viral microarray assay (Virochip) to screen clinical samples for viral pathogens. *J Vis Exp*. (50), 2536. doi: 10.3791/2536.

Chen, Q., Ma, X., Li, C., Shen, Y., Zhu, W., Zhang, Y…Liu, C. Enteric Phageome Alterations in Patients With Type 2 Diabetes. *Front Cell Infect Microbiol.* 10, 575084. doi: 10.3389/fcimb.2020.575084.

Clooney, A.G., Sutton, T.D.S., Shkoporov, A.N., Holohan, R.K., Daly, K.M., O'Regan, O…Hill, C. (2019). Whole-Virome Analysis Sheds Light on Viral Dark Matter in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Host Microbe.* 26(6), 764-778.e5. doi: 10.1016/j.chom.2019.10.009.

Delwart, E. (2016). Viruses of the Human Body: Some of our resident virusesmay be benefical. *Scientist.* 30 (11), e47291.

Draper, L. A., Ryan, F. J., Dalmasso, M., Casey, P. G., McCann, A., Velayudhan, V…Hill, C. (2020). Autochthonous faecal viral transfer (FVT) impacts the murine microbiome after antibiotic perturbation. *BMC biology*. 18(1), 173. https://doi.org/10.1186/s12915-020-00906-0.

Duerkop, B.A., & Hooper, L.V. (2013). Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat Immunol.* 14(7), 654-9. doi: 10.1038/ni.2614. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318131.

Emlet, C., Ruffin, M., & Lamendella, R. (2020). Enteric virome and carcinogenesis in the gut. *Dig Dis Sci.* 65(3), 852- 64. https://doi.org/10.1007/s10620-020-06126-4.

Fernandes, M. A., Verstraete, S. G., Phan, T. G., Deng, X., Stekol, E., LaMere, B…Delwart, E. (2019). Enteric Virome and Bacterial Microbiota in Children With Ulcerative Colitis and Crohn Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *68*(1), 30–36. https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002140.

Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O, Cheval J, Gouilh M.A... Eloit, M. (2012). Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One.* 7(6), e38499. doi: 10.1371/journal.pone.0038499.

Galtier, M., De Sordi, L., Sivignon, A., de Vallée, A., Maura, D., Neut, C…Debarbieux, L. (2017). Bacteriophages Targeting Adherent Invasive Escherichia coli Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 11(7), 840–847. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw224.

Gao, R., Zhu, Y., Kong, C., Xia, K., Li, H., Zhu, Y…Qin, H. (2021). Alterations, Interactions, and Diagnostic Potential of Gut Bacteria and Viruses in Colorectal Cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 11, 657867. doi: 10.3389/fcimb.2021.657867.

Garmaeva, S., Sinha, T., Kurilshikov, A., Fu, J., Wijmenga, C., & Zhernakova, A. (2019). Studying the gut virome in the metagenomic era: challenges and perspectives. *BMC Biol*. 17(1), 84. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0704-y.

Ghose, C., Ly, M., Schwanemann, L. K., Shin, J. H., Atab, K., Barr, J. J…Pride, D. T. (2019). The Virome of Cerebrospinal Fluid: Viruses Where We Once Thought There Were None. *Frontiers in microbiology*, 10, 2061. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02061.

Guerin, E., Shkoporov, A., Stockdale, S. R., Clooney, A. G., Ryan, F. J., Sutton, T. D. S…Hill, C. (2018). Biology and Taxonomy of crAss-like Bacteriophages, the Most Abundant Virus in the Human Gut. *Cell host & microbe,* 24(5), 653–664.e6. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.002.

Gogokhia, L., Buhrke, K., Bell, R., Hoffman, B., Brown, D.G., Hanke-Gogokhia, C…Round, J.L. (2019). Expansion of Bacteriophages Is Linked to Aggravated Intestinal Inflammation and Colitis. *Cell Host Microbe.* 25(2), 285-299.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.008.

Gonzalez-Cao, M., Iduma, P., Karachaliou, N., Santarpia, M., Blanco, J., & Rosell, R. (2016). Human endogenous retroviruses and cancer. *Cancer Biol Med.* 13(4), 483-8. https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0080.

Handley, S.A., Thackray, L.B., Zhao, G., Presti, R., Miller, A.D., Droit, L…Virgin, H.W. (2012). Pathogenic simian immunodeficiency virus infection is associated with expansion of the enteric virome. *Cell.* 51(2), 253-66. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.024.

Handley, S.A., Desai, C., Zhao, G., Droit, L., Monaco, C.L., Schroeder, A.C… Virgin H.W. (2016). SIV Infection-Mediated Changes in Gastrointestinal Bacterial Microbiome and Virome Are Associated with Immunodeficiency and Prevented by Vaccination. *Cell Host Microbe.* 19(3), 323-35. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.010.

Hino, S., & Miyata, H. (2007). Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol.* 17(1), 45-57. doi: 10.1002/rmv.524. PMID: 17146841.

Huh, H., Wong, S., St Jean, J., & Slavcev, R. (2019). Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 145 (2019), 4-17. https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.003.

Jakobsen, R. R., Haahr, T., Humaidan, P., Jensen, J. S., Kot, W. P., Castro-Mejia, J. L…Nielsen, D. S. (2020). Characterization of the Vaginal DNA Virome in Health and Dysbiosis. *Viruses.* 12(10), 1143. https://doi.org/10.3390/v12101143.

Jiang, L., Lang, S., Duan, Y., Zhang, X., Gao, B., Chopyk, J…Schnabl, B. (2020). Intestinal Virome in Patients With Alcoholic Hepatitis. *Hepatology. 72*(6), 2182-2196. doi: 10.1002/hep.31459.

Kim, M.S., & Bae, J.W. (2016). Spatial disturbances in altered mucosal and luminal gut viromes of diet-induced obese mice. *Environ Microbiol.* 18(5), 1498-510. doi: 10.1111/1462-2920.13182.

Koonin, E.V., & Yutin, N. (2020). The crAss-like phage group: How metagenomics reshaped the human virome. *Trends Microbiol.* 28(5), 349-59. https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.01.010.

Küry, P., Nath, A., Créange, A., Dolei, A., Marche, P., Gold, J…Perron, H. (2018). Human Endogenous Retroviruses in Neurological Diseases. *Trends in molecular medicine,* 24(4), 379–394. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.007.

Lang, S., Demir, M., Martin, A., Jiang, L., Zhang, X., Duan, Y… Schnabl B. (2020). Intestinal Virome Signature Associated With Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 159(5), 1839-1852. doi: 10.1053/j.gastro.2020.07.005.

Li, L., Deng, X., Linsuwanon, P., Bangsberg, D., Bwana, M. B., Hunt, P…Delwart, E. (2013). AIDS alters the commensal plasma virome. *Journal of virology*, 87(19), 10912–10915. https://doi.org/10.1128/JVI.01839-13.

Li, W., Lee, M.H., Henderson, L., Tyagi, R., Bachani, M., Steiner, J… Nath, A. (2015). Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. *Sci Transl Med*. 7(307), 307ra153. doi: 10.1126/scitranslmed.aac8201.

Liang, W., Feng, Z., Rao, S., Xiao, C., Xue, X., Lin, Z…Qi, W. (2020). Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus. *Gut*. 69(6), 1141–1143. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-320832.

Liang, G., & Bushman, FD. (2021). The human virome: assembly, compositionand host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 19(8), 514-527. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5.

Lopetuso, L.R., Ianiro, G., Scaldaferri, F., Cammarota, G., & Gasbarrini, A. (2016). Gut virome and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 22(7), 1708-12. doi: 10.1097/MIB.0000000000000807.

Ma, Y., You, X., Mai, G., Tokuyasu, T., & Liu, C. A. (2018). Human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes. *Microbiome.* 6(1), 24. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0410-y.

Massimino, L., Lovisa, S., Antonio Lamparelli, L., Danese, S., & Ungaro, F. Gut eukaryotic virome in colorectal carcinogenesis: Is that a trigger? *Comput Struct Biotechnol J.* 19, 16-28. doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.055.

Matijašić, M., Meštrović, T., Paljetak, H.Č., Perić, M., Barešić, A., & Verbanac, D. (2020). Gut microbiota beyond bacteria- mycobiome, virome, archaeome, and eukaryotic parasites in IBD. *Int J Mol Sci.* 21(8), 2668. https://doi.org/10.3390/ijms21082668.

Maurice, C.F. (2019). Considering the other half of the gut microbiome: Bacteriophages. *mSystems.* 24(3), e00102-19. https://doi.org/10.1128/mSystems.00102-19.

Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S. A., Wu, G. D…Bushman, F. D. (2011). The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome research.* 21(10), 1616–1625. https://doi.org/10.1101/gr.122705.111.

Mohandas, S., & Pannaraj, P.S. (2020). Beyond the bacterial microbiome: Virome of human milk and effects on the developing infant. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 94, 86-93. https://doi.org/10.1159/000504997.

Monaco, C.L., Gootenberg, D.B., Zhao, G., Handley, S.A., Ghebremichael, M.S., Lim, E.S… Virgin, H.W. (2016). Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Cell Host Microbe.* 19(3), 311-22. doi: 10.1016/j.chom.2016.02.011.

Nakatsu, G., Zhou, H., Wu, W.K.K., Wong, S.H., Coker, O.O., Dai, Z…Yu, J. (2018). Alterations in Enteric Virome Are Associated With Colorectal Cancer and Survival Outcomes. *Gastroenterology.*155(2), 529-541. e5. doi: 10.1053/j.gastro.2018.04.018.

Nayfach, S., Páez-Espino, D., Call, L., Low, S. J., Sberro, H., Ivanova, N. N…Kyrpides, N. C. (2021). Metagenomic compendium of 189,680 DNA viruses from the human gut microbiome. *Nature microbiology*, 6(7), 960–970. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00928-6.

Neil, J.A., & Cadwell, K. (2018). The intestinal virome and immunity. *J Immunol.* 201(6), 1615-24. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800631.

Nexø, B. A., Villesen, P., Nissen, K. K., Lindegaard, H. M., Rossing, P., Petersen…Laska, M. J. (2016). Are human endogenous retroviruses triggers of autoimmune diseases? Unveiling associations of three diseases and viral loci. *Immunologic research,* 64(1), 55–63. https://doi.org/10.1007/s12026-015-8671-z.

Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C…Virgin, H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell.* 160(3), 447–460. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002.

Oikarinen, M., Tauriainen, S., Oikarinen, S., Honkanen, T., Collin, P., Rantala, I…Hyöty, H. (2012). Type 1 diabetes is associated with enterovirus infection in gut mucosa. *Diabetes.* 61(3), 687-91. doi: 10.2337/db11-1157.

Ott, S. J., Waetzig, G. H., Rehman, A., Moltzau-Anderson, J., Bharti, R., Grasis, J. A…Schreiber, S. (2017). Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium difficile Infection. *Gastroenterology*, 152(4), 799–811.e7. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.010.

Pannaraj, P. S., Ly, M., Cerini, C., Saavedra, M., Aldrovandi, G. M., Saboory, A. A…Pride, D. T. (2018). Shared and Distinct Features of Human Milk and Infant Stool Viromes. *Frontiers in microbiology*. *9*, 1162. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01162.

Rasmussen, T. S., Mentzel, C. M. J., Kot, W., Castro-Mejía, J. L., Zuffa, S., Swann, J. R…Nielsen, D. S. (2020). Faecal virome transplantation decreases symptoms of type 2 diabetes and obesity in a murine model. *Gut.* 69(12), 2122–2130. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320005.

Rogers, M.A.M., Basu, T., & Kim, C. (2019). Lower Incidence Rate of Type 1 Diabetes after Receipt of the Rotavirus Vaccine in the United States, 2001-2017. *Sci Rep*. 9(1), 7727. doi: 10.1038/s41598-019-44193-4.

Sadeharju, K., Hämäläinen, A.M., Knip, M., Lönnrot, M., Koskela, P., Virtanen, S.M… Hyöty, H. (2003). Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol*. 132(2), 271-7. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02147.x.

Santiago-Rodriguez, T.M., & Hollister, E.B. (2019). Human virome and disease: High throughput sequencing for virus discovery, identification of phage-bacteria dysbiosis and development of therapeutic approaches with emphasis on the human gut. *Viruses.* 11(7), 656. https://doi.org/10.3390/v11070656.

Schulfer, A., Santiago-Rodriguez, T.M., Ly, M., Borin, J.M., Chopyk, J., & Blaser, M.J., Pride, D.T. (2020). Fecal Viral Community Responses to High-Fat Diet in Mice. *mSphere.* 5(1), e00833-19. doi: 10.1128/mSphere.00833-19.

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14(8), e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.

Shkoporov, A.N., & Hill, C. (2019). Bacteriophages of the human gut: the"Known Unknown" of the microbiome.Cell *Host Microbe*. 25, 195–209. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017.

Siljander, H., Honkanen, J., & Knip, M. (2019). Microbiome and type 1 diabetes. *EBioMedicine.* 46, 512-21. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.031.

Sinha, A., Li, Y., Mirzaei, M.K., Shamash, M., Samadfam, R., King, I.L., & Maurice, C.F. (2022). Transplantation of bacteriophages from ulcerative colitis patients shifts the gut bacteriome and exacerbates the severity of DSS colitis. *Microbiome.* 10(1), 105. doi: 10.1186/s40168-022-01275-2.

Siqueira, J. D., Curty, G., Xutao, D., Hofer, C. B., Machado, E. S., Seuánez, H. N… Soares, E. A. (2019). Composite Analysis of the Virome and Bacteriome of HIV/HPV Co-Infected Women Reveals Proxies for Immunodeficiency. *Viruses.* 11(5), 422. https://doi.org/10.3390/v11050422

Tetz, G., & Tetz, V. (2016). Bacteriophage infections of microbiota can lead to leaky gut in an experimental rodent model. *Gut Pathog.* 8, 33. doi: 10.1186/s13099-016-0109-1.

Ungaro, F., Massimino, L., D'Alessio, S., & Danese, S. (2019). The gut virome in inflammatory bowel disease pathogenesis: From metagenomics to novel therapeutic approaches. *United European Gastroenterol J.* 7(8), 999- 1007. https://doi.org/10.1177/2050640619876787.

Wang, D. (2020). 5 challenges in understanding the role of the virome in health and disease. *PLOS Pathog.* 16(3), e10008318. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008318.

Woolhouse, M.E., Howey, R., Gaunt, E., Reilly, L., Chase-Topping, M., & Savill, N. (2008) Temporal trends in the discovery of human viruses. Proc Biol Sci. 275(1647), 2111-5. doi: 10.1098/rspb.2008.0294.

Wylie, K.M., Weinstock, G.M., & Storch, G.A. (2012). Emerging view of the human virome. *Transl Res.* 60(4), 283-90. doi: 10.1016/j.trsl.2012.03.006.

Wylie, K.M., Mihindukulasuriya, K.A., Sodergren, E., Weinstock, G.M., & Storch, G.A. (2012). Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. *PLoS One*. 7(6):e27735. doi: 10.1371/journal.pone.0027735.

Virgin, H.W., Wherry, E.J., & Ahmed, R. (2009). Redefining chronic viral infection. 138(1), 30-50. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.036.

Yang, J.Y., Kim, M.S., Kim, E., Cheon, J.H., Lee, Y.S., Kim, Y…Kweon, M.N. (2016). Enteric Viruses Ameliorate Gut Inflammation via Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7-Mediated Interferon-β Production. *Immunity.* 44(4), 889-900. doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.009.

Yang, K., Niu, J., Zuo, T., Sun, Y., Xu, Z., Tang, W…Ng SC. (2021). Alterations in the Gut Virome in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Gastroenterology.* 161(4), 1257-1269.e13. doi: 10.1053/j.gastro.2021.06.056.

Yeoh, Y. K., Zuo, T., Lui, G. C., Zhang, F., Liu, Q., Li, A. Y…Ng, S. C. (2021). Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 70(4), 698–706. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323020.

Zhao, G., Vatanen, T., Droit, L., Park, A., Kostic, A.D., Poon, T.W…Virgin, H.W. (2017). Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114 (30), E6166-E6175. doi: 10.1073/pnas.1706359114.

Zuo, T., Wong, S. H., Lam, K., Lui, R., Cheung, K., Tang, W…Ng, S. C. (2018). Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection is associated with treatment outcome. *Gut*. *67*(4), 634–643. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313952.

Zou, S., Caler, L., Colombini-Hatch, S., Glynn, S., & Srinivas, P. (2016). Research on the human virome: where are we and what is next. Microbiome. 4(1), 32. doi: 10.1186/s40168-016-0177-y.

Zuo, T., Lu, X. J., Zhang, Y., Cheung, C. P., Lam, S., Zhang, F… Ng, S. C. (2019). Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut.* 68(7), 1169–1179. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318131.

Zuo, T., Zhan, H., Zhang, F., Liu, Q., Tso, E. Y. K., Lui, G. C. Y…Ng, S. C. (2020). Alterations in Fecal Fungal Microbiome of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization until Discharge. *Gastroenterology*, 159(4), 1302–1310.e5. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.048.

Zuo, T., Zhang, F., Lui, G. C. Y., Yeoh, Y. K., Li, A. Y. L., Zhan, H…Ng, S. C. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology,* 159(3), 944–955. e8. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.048.

Zuo, T., Liu, Q., Zhang, F., Lui, G.C., Tso, E.Y., Yeoh, Y.K… Ng, S.C. (2021). Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*. 70(2), 276-284. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322294.

3. BÖLÜM / CHAPTER 3

İNSAN MİKROBİYOTASINDAKİ MANTARLAR: ROLLERİ VE ÖNEMİ

FUNGI IN THE HUMAN MICROBIOTA: THEIR ROLE AND IMPORTANCE

Dilek ŞATANA[1]

[1]Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: dilek.satana@istanbul.edu.tr

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.003

ÖZ

İnsan mikrobiyotası bakteriler, arkealar, virüsler ve mantarlardan oluşur. Mikrobiyota üyeleri, birbirleri ve konakçı arasında oldukça karmaşık bir etkileşim ağı oluşturmaktadır. Komensal bakterilerin konakçı sağlığı ve bağışıklık mekanizması üzerindeki etkisine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak, bağırsak mikrobiyotası içindeki komensal mantarların rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Bağırsak mikrobiyomu üyesi mantarlar, insanlarda bağırsak mikrobiyomunun küçük ama önemli bir bileşenidir. Mantar mikrobiyotası ve metabolitleri gastrointestinal fonksiyonu etkiler ve sindirim hastalıklarının patogenezine katkıda bulunur. Multipl skleroz, amyotrofik lateral skleroz ve Alzheimer gibi nörolojik hastalıklarda bağırsak mikrobiyota disbiyozu olduğu bildirilmiştir. Bağırsak mikrobiyomunda *C albicans* artışı, inflamatuar bağırsak hastalığı, bağırsak graft-versus-host hastalığı, *C difficile* enfeksiyonu, karaciğer hastalığı, astım, şizofreni ve COVID-19 dahil olmak üzere birçok hastalıkta sürekli olarak görülmektedir. *C albicans*'ın bu tür hastalıkların patogenezine nasıl katkıda bulunduğu tam olarak anlaşılmamış olsa da, *C albicans* kolonizasyonunun Th17 aracılı bağışıklık tepkilerini yönlendirebileceği ve hastalığı şiddetlendirmek için bağırsak mikrobiyom düzenini bozabileceği iyi bilinen bir mekanizmadır. İnsan bağırsağında bulunan mantarlar, koruyucu bağışıklık tepkilerinin temel düzenleyicisi olan T yardımcı 17 hücrelerinin indüksiyonunu sağlamaktadır. Benzer şekilde, bağırsak mikrobiyotasındaki mantar üyelerinin, yerel enflamatuar tepkileri azaltarak veya teşvik ederek memeli konağın immünolojik tepkilerini etkilediği gösterilmiştir. Mikrobiyotayı oluşturan mikrorganizma grubunun sağlık ve hastalığa nasıl katkıda bulunduğunu anlamak için insan barsak mikrobiyotasında yer alan mantarların daha fazla araştırılması gerektiği vurgulanmaktadır. Bu derlemede bağırsak mikrobiyomunun oluşumu, mikrobiyomu etkileyen faktörler ve bağırsak mantarlarının (özellikle Candida ve Saccharomyces spp) konakçı bağışıklığı ile etkileşimleri ele alınacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mantar, barsak mikrobiotası, *Candida albicans*, İnflamatuar bağırsak hastalığı

ABSTRACT

The human microbiota consists of bacteria, archaea, viruses and fungi. Microbiota members form a highly complex network of interactions between each other and the host. There are many studies on the impact of commensal bacteria on host health and immune mechanisms. However, little is known about the role of commensal fungi within the gut microbiota. Fungi, members of the gut microbiome, are a small but important component of the gut microbiome in humans. Fungal microbiota and metabolites influence gastrointestinal function and contribute to the pathogenesis of digestive diseases. Dysbiosis of the gut microbiota has been reported in neurological diseases such as multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *C albicans* overgrowth in the gut microbiome is consistently seen in many diseases, including inflammatory bowel disease, intestinal graft-versus-host disease, *C difficile* infection, liver disease, asthma, schizophrenia and COVID-19. While it is not fully understood how *C albican*s contributes to the pathogenesis of such diseases, a well-known mechanism is that *C albicans* colonization can drive Th17-mediated immune responses and disrupt gut microbiome regulation to exacerbate disease. Fungi present in the human gut induce induction of T helper 17 cells, a key regulator of protective immune responses. Similarly, fungal members of the gut microbiota have been shown to influence the immunological responses of the mammalian host by reducing or promoting local inflammatory responses. It is emphasized that fungi in the human intestinal mycobiota should be further investigated to understand how the group of microorganisms that make up the microbiota contribute to health and disease. In this review, the formation of the intestinal mycobiome, factors affecting the microbiome and the interaction of intestinal fungi (especially Candida and Saccharomyces spp) with host immunity will be discussed.

Keywords: Fungi, gut microbiota, Candida albicans, Inflammatory bowel disease

Extended Abstract

This study reviewed information on the development of the intestinal bacterial and fungal community, the impact of the microbiota on human health and disease, and the role of the opportunistic yeast *C. albicans*, and evaluated the possible benefits of commensal fungal colonization and recent findings on bacterial-fungal interactions.

The human microbiome has attracted the attention of scientific and medical research groups for decades. The intestinal microbiota is a complex structure consisting of bacteria, archaea, viruses, protists and fungi. Commonly used approaches to inventory and study the microbiota, such as sequencing the DNA encoding 16S ribosomal RNA, have nevertheless been designed to target only the bacterial component, unintentionally neglecting other components. For a long time, fungi have been particularly underrepresented in microbiota studies. However, the realization that fungi living in the human gut can elicit important physiological processes (e.g., induction of T helper 17 cells, central regulators of protective immune responses) has led to a renewed interest in commensal fungal research. The study of the gut "microbiota," which refers to various fungal species, is a relatively new and rapidly advancing field. In recent studies examining the microbiome; For example, 101 species of 85 fungal genera have been found in the oral cavity of healthy people. Fecal samples from

45 healthy human volunteers yielded 72 operational taxonomic units representing two phyla and ten fungal classes. In many studies involving stool samples, yeasts from the genera Saccharomyces, Malassezia, and Candida have been reported as the dominant fungi found in the human intestine. Saccharomyces spp. and Malassezia spp. They are respectively either associated with certain foods or are known inhabitants of the skin, which raises questions as to whether members of these two genera should truly be considered natural inhabitants of the gastrointestinal tract. Studies evaluating the intestinal microbiota have shown that not only fungal communities change due to disease, but also play a role in maintaining intestinal homeostasis and affecting systemic immunity. Additionally, it is now widely accepted that host-fungus and bacteria-fungal relationships are critical to host health. Fungal diversity in the microbiota is lowest in adulthood and higher in the elderly and infants. Some Saccharomyces and Candida species are commonly associated with humans. Among these, some species are considered strictly host-associated, while others occupy environmental niches or are used during food production. Dysbiosis of the gut mycobiota has been associated with a number of diseases including autoimmune, metabolic and neurological disorders, cancers, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, celiac disease. Additionally, changes in the intestinal mycobiome have been reported to be linked to the development and progression of cancers such as colorectal cancer and pancreatic ductal adenocarcinoma, as well as the development or cause of intestinal graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic cell transplantation. The gut mycobiome has also been associated with diseases of extra-intestinal organs, including alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. Chronic alcohol administration has been found to increase enteric fungal load and translocation of fungal β-glucan and candidalysin into the systemic circulation, thereby causing liver inflammation in mice. Recent studies have reported significant changes in the gut mycobiome in infectious diseases, including bacterial *C. difficile* infection and COVID-19 infection; Increases in *C. albicans* with concurrent bacterial dysbiosis have been found in both diseases. Disruption of the intestinal fungal community has also been shown to occur in other viral infectious diseases such as hepatitis B and HIV infection. Colonization and growth of opportunistic fungal pathogens in the intestine can influence the course of the disease by causing dysregulated host immune responses. In addition, intestinal fungi, especially Candida species; Some mechanisms may influence the function and reorganization of the intestinal bacterial microbiome through cellular contact, competition or cooperation for available nutrients, production of secondary metabolites and antimicrobial peptides, and physiochemical changes in the intestinal niche. Overall, these mechanisms of interaction between intestinal fungi, bacteria, and host immunity underlie human immune homoeostasis and all contribute to health and disease.

The recent inclusion of microorganism-free mice in studies to study the biology of *C. albicans* in the human gastrointestinal tract makes it possible to determine the specific roles of the fungi in the intestinal ecosystem. Moreover, as studies in the field progress, such experimental systems have a special importance in terms of investigating and revealing data on synergistic, symbiotic or antagonistic interactions between fungal and bacterial members of the microbiota. Identifying the interaction mechanisms and environmental factors affecting these interactions will provide a basis for personalized risk assessment in dysbiosis patients. Although fungi are mostly considered pathogens, they may provide undiscovered benefits for the host. Although causes and effects are difficult to pinpoint, potential interventions targeting the gut microbiome can be envisioned to prevent the spread of Candida from the gastrointestinal tract in individuals at risk of long-term infection; This is something that has not yet been achieved for fungal infections. It should not be overlooked that, under different circumstances, *C. albicans*, which is found in the gut microbiota of most humans and appears to have adapted to its human host, may even have beneficial effects on the host.

As we increasingly understand the role of the microbiota in different aspects of human life and well-being, it is becoming increasingly clear that we also need to better understand fungal functions within the bacterial community. For this, the interactions between fungal and bacterial species need to be investigated in more detail.

1. İnsan Gastrointestinal Sisteminde Yaşayan Mantarlar

Bugüne kadar insan mikrobiyotasına yönelik çalışmalar bağırsak mikrobiyotasının bakteriyel bileşenini açıklamaya odaklanmaktadır. Mikrobiyomun bakteriyel kısmının envanterini çıkarmaya adanmış geniş kaynakların aksine, nispeten daha az sayıda proje insanlarda bulunan mantar türlerinin tamamını tanımlamaya çalışmıştır. Bu çaba hala birçok teknik zorluk nedeniyle engellenmektedir (Limon et al., 2017; Richard & Sokol, 2019; Kong & Segre, 2020; Pérez, 2021). Örneğin, mantarların kalın hücre duvarlarıyla çevrili olması, bakteriyel DNA'yı geri kazanmak için geliştirilen DNA hazırlama metodolojilerine göre yetersiz kalınması anlamına gelmektedir. Belirli mantar türlerini tanımlamak için kullanılan fungal rDNA "internal transcribed spacer regions" (dahili transkripsiyonlu ara bölgeleri- ITS), mantarlar arasında uzunluk bakımından farklılık gösterir ve yaygın yeni nesil dizileme platformları kullanılırken potansiyel bir karışıklığa neden olur. ITS varyasyonu da türler arasında ayrım yapmak için genellikle yetersizdir. Son olarak, üretilen dizilerden oluşan bir havuzda temsil edilen organizmaları kapsamlı bir şekilde tanımlamak için kalite kontrollü referans veri tabanlarının eksikliği söz konusudur.

Çeşitli mantar türlerini ifade eden bağırsak "mikrobiyotası"nın incelenmesi nispeten yeni ve hızla ilerleyen bir alandır. Mikrobiyomu inceleyen son araştırmalarda; örneğin, sağlıklı insanların ağız boşluğunda 85 mantar cinsine ait 101 tür bulunmuştur (Ghannoum et al., 2010). Sağlıklı 45 insan gönüllüden alınan dışkı örneklerinde, iki filum ve on mantar sınıfını temsil eden 72 operasyonel taksonomik birim (OTB) elde edilmiştir (Hallen-Adams et al., 2015). Yazarlar, 96 dışkı örneğinden oluşan başka bir kohortta (Hoffmann et al., 2013), 66 mantar cinsi ve cins düzeyinde sınıflandırılamayan 13 ek soy tespit etmiştir. Sağlıklı 147 gönüllüden alınan dışkı örneklerinin incelendiği daha büyük bir çalışmada (Nash et al., 2017), 247 cinsi kapsayan 701 mantar OTB'si tanımlanmıştır (mantar OTB 'lerinin %17'si bilinen herhangi bir türe atanamamıştır). Ancak Nash et aladaşlarının çalışmasında örneklerdeki OTB sayısı 2 ila 92 arasında değişmektedir. Bu sayılar, bir örnek içindeki toplulukların düzgünlüğü ve zenginliğinin popüler bir ölçüsü olan Shannon çeşitlilik endeksinin azalması anlamına gelir ve örneklerin çoğunluğu için düşük alfa çeşitliliğine işaret eder. İnsan bağırsağı bakteri topluluklarında tipik olarak bulunan kompozisyonla karşılaştırıldığında hem gözlemlenen OTB sayısı hem de Shannon çeşitlilik endeksi değerleri mantarlar için daha yüksektir (Nash et al., 2017). Dışkı örneklerinin yer aldığı birçok çalışmada Saccharomyces, Malassezia ve Candida cinslerinden mayalar, insan bağırsağında bulunan baskın mantarlar olarak bildirilmiştir. Saccharomyces spp. ve Malassezia spp. sırasıyla ya belirli gıdalarla ilişkilidir ya da cildin bilinen sakinleridir, bu da bu iki cinsin üyelerinin gerçekten gastrointestinal sistemin doğal sakinleri

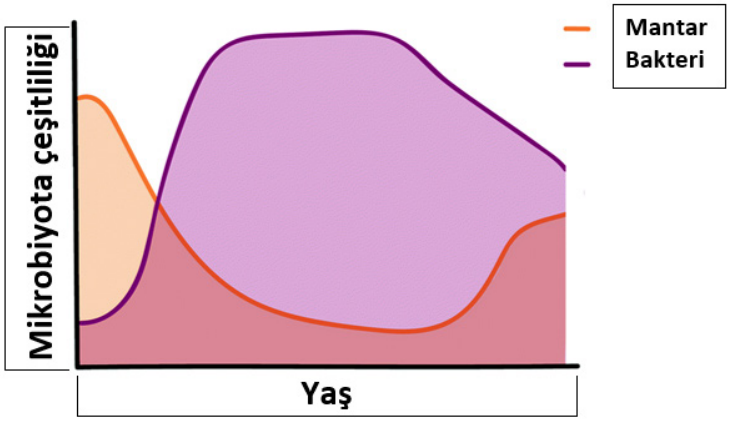
olarak kabul edilip edilmeyeceğine dair soruları gündeme getirmektedir (Tablo 1) (Fiers et al., 2019). Açıkçası, hangi mantarların "çekirdek bağırsak mikrobiyomunu" oluşturduğu veya böyle bir kavramın bu mikroorganizmalara uygulanıp uygulanamayacağı konusunda henüz bir fikir birliği yoktur. Bu alan, insanlarda yaşayan mantar türlerinin tamamını tanımlamayı amaçlayan ek büyük ölçekli çalışmalardan açıkça fayda sağlayacaktır. Her yerde mevcut olmasına rağmen, insan bağırsağını işgal eden mantarların sayısı ve miktarı, bakterilere oranla çok daha küçüktür. Yine de mikrobiyomun nasıl şekillendiği ve konak olarak insanı nasıl etkilediği büyük ölçüde bilinmemektedir. Ancak son bilgiler bağırsak mikrobiyotasının sağlık ve hastalıkla karmaşık bir şekilde bağlantılı olabileceğini öne sürmektedir. Bağırsak mikrobiyotasının değerlendirildiği çalışmalarda, yalnızca mantar topluluklarının hastalık nedeniyle değişmediği, aynı zamanda bağırsak homeostazının korunmasında ve sistemik bağışıklığın etkilenmesinde de rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca konakçı-mantar ve bakteri-mantar ilişkilerinin konak sağlığı açısından kritik olduğu artık yaygın olarak kabul edilmektedir.

Tablo 1. İnsan bağırsağında sıklıkla bulunan önemli mantar türleri (Pérez, 2021).

Tür İsimleri	**Gözlemler/Yorumlar**
Candida albicans	Yetişkin insan gastrointestinal sistem kanalındaki en yaygın mantar. Th17'nin oluşumunu indükleyicileri hücreler.
Candida glabrata	Fırsatçı patojen. Bağırsakta bilinmeyen rol(ler)
Candida parapsilosis	Fırsatçı patojen. Bağırsakta bilinmeyen rol(ler)
Rhodotorula mucilaginosa	Yenidoğanlarda yoğun miktarda bulunması ile ilişkili çocukluk çağı atopisi (Fujimura et al., 2016).
Issatchenkia orientalis *(Candida krusei or Pichia kudriavzevii)*	Bebeklerde yoğun miktarda bulunması ile ilişkili atopik hırıltı (Arrieta et al., 2018).
Malassezia restricta	Dışkı örneklerinde sıklıkla bulunsa da deride bulunan bu mantar türü insan bağırsağını gerçek bir simbiyotik olarak temsil etmeyebilir (Fiers et al., 2019).
Saccharomyces spp.	Dışkı örneklerinde sıklıkla bulunmalarına rağmen (muhtemelen birçok içecek ve yiyeceklerin bileşiminin bileşeni oldukları için) bu mayalar insan bağırsağının doğal sakinleri olarak kabul edilmez.

İnsan mikrobiyotasında var olan mantar popülasyonu, bakteriyel mikrobiyotaya benzer şekilde perinatal dönemde, doğum sırasında ve sonrasında doğrudan anneden ve yenidoğan ile yakın temas halinde yaşayan diğer bireylerden miras olarak alınmaktadır (Bliss et al., 2008; Nagata et al., 2012). Yenidoğan mikrobiyotası üzerinde yapılan çalışmalarda bağırsak sisteminde en fazla bulunan mantar türlerinin annenin vajinal mikrobiyotasına karşılık gelen *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *C. ortopsilosis*

olduğu saptanmıştır. Vajinal yolla doğan bebeklerde ciltte en baskın mantar türü *C. albicans*'tır (Juyal et al., 2013; Ward et al., 2018). Doğumdan sonra bireydeki bağırsak mantar popülasyonu, farklı iç ve dış faktörlerden etkilenerek değişikliğe uğramaktadır. Mikrobiyotanın çeşitliliği yaşla birlikte değişmektedir. Bakteri çeşitliliğinin düşük olduğu doğumdan sonra mantarlar baskın hale gelir. Bakteriyal mikrobiyotadaki çeşitlilik yetişkinlikte maksimuma ulaşırken, mantar çeşitliliği azalır. Bu eğilim yaşlılıkla birlikte tersine döner, yaş alımıyla birlikte bakteri türleri azalırken, mikrobiyotadaki mantar türlerinde artış meydana gelir (Yatsunenko et al., 2012). Mikrobiyotadaki mantar çeşitliliği yetişkinlikte en düşük, yaşlılarda ve bebeklerde ise daha yüksek oranda görülmektedir (Strati et al., 2016) (Şekil 1). Muhtemelen mikrobiyotanın tamamını şekillendiren ve etkileyen dış faktörler, örneğin yaşam tarzı (Evans et al., 2014; Misic et al., 2015), beslenme (David et al., 2014) ve yeni mikroorganizmaların dışarıdan edinilmesidir (Strati et al., 2016).



Şekil 1: Bağırsaktaki bakteri ve mantarların zamanla çeşitliliği (Kapitan et al., 2019).

Bazı Saccharomyces ve Candida türleri genellikle insanlarla ilişkilendirilir. Bunlar arasında, bazı türlerin kesinlikle konakçıyla ilişkili olduğu düşünülürken, bazılarının da çevresel nişler veya gıda üretimi sırasında kullanımları bulunmaktadır. Gıda üretimine, ekmeğin mayalanarak kabartılmasında kullanılan ekmek mayası *S. cerevisiae* örnek olarak verilebilir. Bu maya muhtemelen insan hayatı, kültür, toplum ve bilim üzerinde en büyük etkiye sahip olan mantardır (Chambers & Pretorius 2010) ve gastrointestinal (GI) kanalda bulunan baskın mantar türlerinden biridir (Hoffmann et al., 2013). Çevresel nişe; özellikle üzüm gibi meyvelerde, kabuğun hasar görmesi ve *S. cerevisiae*'nin buradaki şekerleri fermente ederek alkolik fermentasyonu başlatması örnek olarak verilebilir (Goddard, 2008). Mayalardaki bu fermantasyon kapasitesi insanlar tarafından ekmek ve alkollü içecek üretimi için kullanılmaktadır.

Meyvelerdeki doğal konumu ve gıda üretiminde yaygın kullanımı nedeniyle, bu mayanın sıklıkla insanın gastrointestinal sistemine girmesi şaşırtıcı değildir. *S. cerevisiae*, diğer çevresel mantarlar gibi gastrointestinal sistemden geçerek canlılığını korumaktadır (Strati et al., 2016). Bununla birlikte, *S. cerevisiae*'nin dışkıda var oluşunun geçici geçişi mi göstermesinden, yoksa *S. cerevisiae*'nin bağırsakta kalıcı olarak bulunmasından mı kaynaklandığı tam olarak açık değildir. Yaygın ve güvenli kullanımı nedeniyle *S. cerevisiae* probiyotik olarak bile kullanılmaktadır (Pennacchia et al., 2008). *Saccharomyces boulardii* halihazırda ticari olarak temin edilen ve probiyotik olarak kullanılan bir mayadır (Kelesidis ve Pothoulakis, 2012). İlk kez 1980'lerde hayvan ve insan deneylerinde gösterildiği gibi, başlıca faydaları *Clostridium difficile* büyümesinin azaltılması (Massot et al., 1984) ve bağırsak bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileridir (Corthier et al., 1986).

Candida cinsi, 150'den fazla ilgili türden oluşur ve bunların 15'inin insanlarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Bunlardan en sık görülen hastalık etkenleri *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'dir (Yapar, 2014). *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* dünya çapında mantarların neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının sırasıyla yaklaşık %17, %10 ve %2'sinden sorumludur (Pfaller et al., 2011). Bu mantarlar, örneğin bağırsakta *C. tropicalis* (Roilides et al., 2003) ve deride *C. parapsilosis* (Trofa et al., 2008) gibi insan mikrobiyotasının bir parçası olarak bulunabilse de, hepsi aynı zamanda çevrede de yaygın olarak bulunmaktadır (Carruba et al., 1991; Yang et al., 2012). *C. krusei*'nin insanlarda taşınma oranı oldukça düşük gibi görünse de kakao tohumlarının önemli bir fermentörüdür (Nielsen et al., 2005) ve bu nedenle insanlarla iç içe bir çevresel nişe sahiptir. *C. tropicalis* toprakta yaygın olarak bulunur (Yang et al., 2012) ve *C. parapsilosis* toprak, su, bitkiler ve böcekler gibi çeşitli çevresel ortamlarda bulunabilir (Gadanho & Sampaio, 2005; Medeiros et al.,2008; Suh et al.,2008).

Buna karşılık, kandidiyazla ilişkili en sık izole edilen iki Candida türü olan *C. albicans* ve *C. glabrata*, ağırlıklı olarak sıcak kanlı konaklarla birlikte bulunur. *C. glabrata* genetik olarak *S. cerevisiae* ile diğer Candida türlerine göre daha yakın akrabadır (Kurtzman & Robnett, 1998). Yalnızca maya olarak büyür ve insan ağız boşluğu ile gastrointestinal kanalda koloni oluşturur (Anderson, 1917). Kolonizasyon oranları oldukça düşüktür, ancak yaşla pozitif yönde ilişkilidir (Malani et al., 2011). C. glabrata için çevresel bir nişin mevcut olup olmadığı hala tartışılmaktadır (Gabaldon & Carrete, 2016). Doğrudan veya dolaylı olarak insanlara veya diğer hayvanlara bulaşabileceği ve bulaşın kuşlarla ilişkili olduğu, ancak bu konakların bu mantar türü için doğal bir niş mi yoksa sadece geçici bir rezervuar mı olduğu henüz tam olarak belli değildir. Bir çalışmada, bozulmuş portakallarda *C. glabrata* izole edilmiş (Koç et al.,

2007), ancak bunun nedeninin kuş pisliklerinden kaynaklanan kontaminasyon olabileceği düşünülmüştür. *C. albicans* insanlar dahil yalnızca sıcakkanlı hayvanlarla birlikte bulunmuştur. Gastrointestinal sistem, ürogenital sistem ve ağız gibi çoğu mukozal yüzeyde ve aynı zamanda sağlıklı bireylerin en az %60'ının cildinde mevcuttur (Calderone & Clancy, 2012). Altta yatan risk faktörlerinin yokluğunda *C. albicans* enfeksiyonları genellikle yüzeyseldir. Pamukçuk olarak da bilinen ağız enfeksiyonları ve bebek bezi döküntüsü gibi cilt enfeksiyonları, özellikle stabil bir mikrobiyotanın henüz gelişmediği bebeklerde görülmektedir (Mohamadi et al., 2014). Oral kandidiyaz ağırlıklı olarak HIV pozitif bireylerde ve aynı zamanda yaşlılarda da görülür. Yaşlılarda görülmesi oral protezlerle ilişkilendirilir (Bianchi et al., 2016) ve bu durum lokal oral mikrobiyota kompozisyonunu etkileyebilir. Diğer açılardan sağlıklı olan kadınların %75'i hayatları boyunca en az bir defa vajinal enfeksiyon yaşamaktadır ve bu enfeksiyon çoğunlukla vajinal ortamı etkileyen antibiyotik ve/veya oral kontraseptif kullanımı sonrasında yaşanmaktadır (Brown et al., 2012). Şiddetli, yaşamı tehdit eden yaygın Candida enfeksiyonları genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde görülür. İmmün supresyonun yanı sıra biyofilmle ilişkili enfeksiyonların kaynağı olarak kalıcı kateterler ve bağırsak bariyerinin travmatik veya cerrahi olarak ihlali kandidiyaz için yaygın risk faktörleridir (Yapar, 2014). *C. albicans*'a bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarının çoğunluğunun, hastanın kendi bağırsağından gelen endojen suşlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (Odds et al., 2006) ve bu da bağırsağın fırsatçı mantar enfeksiyonları için bir kaynak olarak rolü oynadığını göstermektedir. Ayrıca antibiyotik tedavisi sadece mukozal değil aynı zamanda sistemik Candida enfeksiyonlarına da zemin hazırlamaktadır (Pappas, 2006). Bakteriyel mikrobiyotanın tükenmesi sıklıkla artan mantar kolonizasyonuyla ilişkilendirilir ve bu da kandidiyazın gelişme olasılığıyla ilişkilidir (Azevedo et al., 2015). Öte yandan *C. albicans* enfeksiyonlarının önemli bir kısmının polimikrobiyal olduğu, dolayısıyla Candida'ya bakterilerin de eşlik ettiği gösterilmiştir (Kim et al., 2013; Pulimood et al., 2002; Bouza et al., 2013; Klotz et al., 2007; Hermann et al., 1999). Bu açıkça bakteriyel-mantar etkileşimlerinin invazif kandidiyaz gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

1.1. *Candida albicans*'ın Bağırsaktaki Yaşamı

C. albicans bugüne kadar en iyi çalışılan Candida türü olduğundan, Candida'nın bağırsaktaki yaşamı ve bu nişteki konak ve bakterilerle etkileşimleri hakkında şu ana kadar bilinenleri tartışmak için bu türe odaklanılmıştır.

Bağırsak ortamı, gastrointestinal kanalın uzunluğu boyunca ve bağırsağın çapı boyunca önemli ölçüde değişiklik gösterir (Zheng et al., 2015; Khutoryanskiy, 2015; Fischbach ve Sonnenburg, 2011; Flint et al., 2012). *C. albicans*'ın şaşırtıcı transkripsiyonel ve metabolik

çok yönlülüğü, mantarın bu farklı ortamlarda gelişmesine olanak tanır ve aynı zamanda lokal ve sistemik enfeksiyonlar sırasında hayatta kalmasını kolaylaştırır (Brown et al., 2014; Ene et al., 2014). Fare bağırsağını kolonize eden *C. albicans*'ın ekspresyon paterni, ilginç bir şekilde doku istilası sırasında gözlemlenen ekspresyon paterninden farklı görünmektedir (Rosenbach et al., 2010; Thewes et al., 2007; Walker et al., 2009; Zakikhany et al., 2007). Bu da konak nişinde ortak bir yaşam tarzına özel bir adaptasyon olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşünce, farklı konak nişlerinde *C. albicans*'ın hayatta kalması için farklı transkripsiyon faktörlerinin rolünü analiz eden çalışmalarla desteklenmektedir. Örneğin, *C. albicans* Efg1, sistemik kandidiyazis sırasında virülans açısından önemlidir, ancak bağırsakta Efg1 eksikliği olan *C. albicans* suşlarının daha etkin koloni oluşturabildiği saptanmıştır (Pierce et al., 2013). Aksine, transkripsiyon faktörü Efh1'in *C. albicans* kommensalizmini aktif olarak desteklediği görülmektedir, ancak sistemik enfeksiyonlar için vazgeçilmezdir (White et al., 2007). Demir alımı bağlamında transkripsiyon faktörlerinin karşılıklı rolleri de açıklanmıştır. Demir alımını azaltan transkripsiyonel baskılayıcı Sfu1, *C. albicans*'ın bağırsakta kalıcılığı için gereklidir. Buna karşılık, artan demir alımına aracılık eden pozitif regülatör Sef1, sistemik enfeksiyonun fare modelinde virülans için gerekli olduğu bulunmuştur (Chen et al., 2011).

C. albicans'ın diğer önemli ve en dikkat çekici özelliklerinden biri morfolojik esnekliği yani morfogenezidir. Laboratuvarda 30 °C veya altındaki sıcaklıklarda tipik büyüme formu, "beyaz hücreler" olarak da bilinen tomurcuklanan mayadır. Bununla birlikte, belirli çevresel değişikliklerle (örn. 37 °C'ye geçiş, yüksek CO2 seviyeleri, yüzeylerle temas, serum bileşenleri) *C. albicans* filament oluşturup yalancı hif veya gerçek hif oluşturabilir (Noble et al., 2017; Sudbery, 2011; Wang & Xu, 2008). Mayalar daha hızlı çoğalırken, hifler dokuya nüfuz ederek invazyon yapabilir (Berman & Sudbery, 2002) ve ayrıca bağışıklıktan kaçmaya da katkıda bulunabilir (Torosantucci et al., 2004). Bu nedenle filamentasyonun sistemik ve aynı zamanda mukozal enfeksiyonlarda virülans ile ilişkili olması şaşırtıcı değildir (Katagiri et al., 2018). Ancak bağırsakta yer alan *C. albicans* türleri vücut ısısı, yüksek CO2 ve temas gibi güçlü filamentasyon oluşturma etkileri ile karşı karşıya olmasına karşın, bağırsakta nadiren hif oluşumu yaptıkları gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, bu gözlem, nişte daha da güçlü hifal baskılama sinyallerinin meydana geldiğinin işaretidir. Mikrobiyal bağırsak topluluğunun üyelerinin filamentasyonun baskılanmasına katkıda bulunabileceğinin düşüncesi oluşsa da, yalnızca *C. albicans* ile kolonize edilen GDO'lu farelerde filamentasyon gözlemlenmemiş olması (Böhm et al., 2017), bu durumun maya formunda büyümeyi teşvik edenin mikrobiyotadan ziyade bağırsak ortamından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca birçok çalışma, *C. albicans*'ın genetik olarak filamentli forma zorlanmasının kolonizasyon seviyelerini azalttığını

göstermiştir (Böhm et al., 2017; Rosenbach et al., 2010; Vautier et al., 2015).

"Beyaz hücre" morfotipine ek olarak *C. albicans*, metabolik olarak birbirinden farklı olan diğer birkaç maya fenotipine geçiş yapabilir. Örneğin opak hücreler, beyaz hücrelerden daha büyük, uzun, dikenli tek hücreler olarak büyür ve çiftleşebilir (Hickman et al., 2013). Beyazdan opaklığa geçiş, iki ana düzenleyicisi ve birbirini baskılayan Efg1 ve Wor1 olan farklı transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir ağ tarafından düzenlenir (Morschhäuser, 2010). Wor1 hücrelerin opak fenotipe geçmesini teşvik ederken, Efg1'in baskın olduğu hücreler beyazdır. Ancak 37 °C'de opak hücreler kararsızdır ve beyaz forma geri döner (Slutsky et al., 1987), bu da bağırsak nişi içinde çiftleşme olasılığını azaltır.

Son zamanlarda iki fenotip daha keşfedilmiştir. "Gri hücre" tipi beyaz-opak geçiş ile bağlantılıdır, ancak çiftleşme tipi lokusundan bağımsızdır (Tao et al., 2014). Opak ve gri hücrelerin kommensalizmdeki rolü belirsizliğini korurken, GI kaynaklı geçiş (GUT) morfotipi *C. albicans*'ın fare bağırsağından birden fazla geçişinden sonra gözlemlenmiştir. Opak hücrelere benzer şekilde, Wor1'in aşırı ekspresyonu GUT hücrelerine geçiş için gereklidir. Bununla birlikte, GUT hücreleri opak hücrelere kıyasla uzamış ancak pürüzsüzdür ve bu nedenle morfolojik olarak farklıdır. GUT hücreleri, muhtemelen bağırsak nişine daha iyi uyum sağlaması ve daha verimli bir metabolizmaya sahip olması nedeniyle bir fare kolonizasyon modelinde beyaz hücreleri geride bırakmaktadır (Pande et al., 2013). Efg1'in filament oluşumunda rol oynadığı (Stoldt et al., 1997) ve *C. albicans*'taki düşük Efg1 seviyelerinin fare bağırsağının kolonizasyonunu teşvik ettiği (Pierce et al., 2013) dikkate alındığında, bu farklı maya hücre tiplerinin farklı konakçı nişlerinde Efg1 ve Wor1 tarafından düzenlenen farklı rollere sahip olduğu görülmektedir. Efg1 mayadan hifaya geçiş ve dolayısıyla virülans için gerekli iken (Lo et al., 1997), Wor1 kommensalizm ve dolayısıyla kolonizasyon sırasında önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir.

C. albicans fare bağırsak kanalında ağırlıklı olarak maya formunda büyümesine rağmen, yerel popülasyonun daha önce sadece hifal büyümeye dahil olduğu veya bununla ilişkili olduğu varsayılan birkaç geni ifade ettiği gösterilmiştir (Herwald & Kumamoto, 2014; Rosenbach et al., 2010). Ayrıca, mikroorganizmalardan arındırılmış (germ-free; GF) farelerde filamentasyon gözlenmezken, daha önceki çalışmalarda antibiyotikle tedavi edilen, *C. albicans* ile kolonize farelerin bağırsağında düşük düzeyde filamentasyon olduğu bildirilmiştir (Böhm et al., 2017). Bu durum, bağırsaktaki hif ve virülansla ilişkili mantar özelliklerinin sıkı bir şekilde düzenlenmiş ifadesinin, mikrobiyota ile etkileşimi sırasında *C. albicans*'ı desteklediğini gösterebilir.

1.2. Çeşitli Hastalıklarda Bağırsak Mikobiyomunun Disbiyozu

Bağırsak mikobiyotasının disbiyozu (simbiyontların kaybı, patobiyontların veya fırsatçıların büyümesi, mikrobiyal rekabet ve mikrobiyal çeşitliliğin bozulmasını içeren mikrobiyal topluluğun bileşimindeki dengesizlik), otoimmün, metabolik ve nörolojik bozukluklar ve kanserleri kapsayan bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Fırsatçı mantar patojenlerinin bağırsakta kolonileşmesi ve büyümesi, düzensiz konak bağışıklık tepkilerine neden olarak hastalığın seyrini etkileyebilir. Buna ek olarak, bağırsak mantarları (özellikle Candida spp); hücresel temas, mevcut besinler için rekabet veya işbirliği, ikincil metabolitlerin ve antimikrobiyal peptitlerin üretimi ve bağırsak nişinde fizyokimyasal değişiklikler yoluyla bağırsak bakteriyel mikrobiyomunun (konakçı fizyolojisinin bir başka temel düzenleyicisi) yeniden düzenlenmesi ve işlevi gibi bazı mekanizmaların etkileyebilir. Genel olarak, bağırsak mantarları, bakteriler ve konakçı bağışıklığı arasında etkileşime giren bu mekanizmalar, insan bağışıklık homoeostazının temelini oluşturur ve hepsi de sağlık ve hastalığa katkıda bulunurlar (Zhang et al., 2022; Wu et al.,2021).

Farelerde yapılan çalışmalar, antifungal ilaçların oral tedavisiyle bağırsak mantarlarının bozulmasının koliti şiddetlendirdiğini ve alerjik hava yolu hastalığını kötüleştirdiğini göstermiştir (Wheeler et al., 2016). Bu da bağırsak mikobiyomundaki bir dengesizliğin hem bağırsak hem de bağırsak dışı hastalıkların patogenezine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bağırsak mikobiyomundaki disbiyoz, enflamatuar bağırsak hastalığı (Liguori et al., 2016; Sokol et al., 2017; Nelson et al., 2021; Limon et al., 2019; Lam et al., 2019; Hoffman et al., 2013; Li et al., 2022; Chin et al., 2020; Wu et al., 2021; Chassaing et al., 2021; Wheeler et al., 202016; Li et al., 2014), irritabl bağırsak sendromu (Raman et al., 2019), çölyak hastalığı gibi bağırsak bozukluklarıyla yakından ilişkilendirilmiştir (Lebwohl et al., 2018). Ayrıca, bağırsak mikobiyomundaki değişikliklerin kolorektal kanser (Luan et al., 2015; Gao et al., 2017; Richard et al., 2018; Chin et al., 2018) ve pankreatik duktal adenokarsinom (Aykut et al., 2019) gibi kanserlerin gelişimi ve ilerlemesi, allojenik hematopoetik hücre naklinden sonra bağırsak graft-versus-host hastalığının (GVHD) gelişimi veya nedeni ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (van der Veldeni et al., 2016).

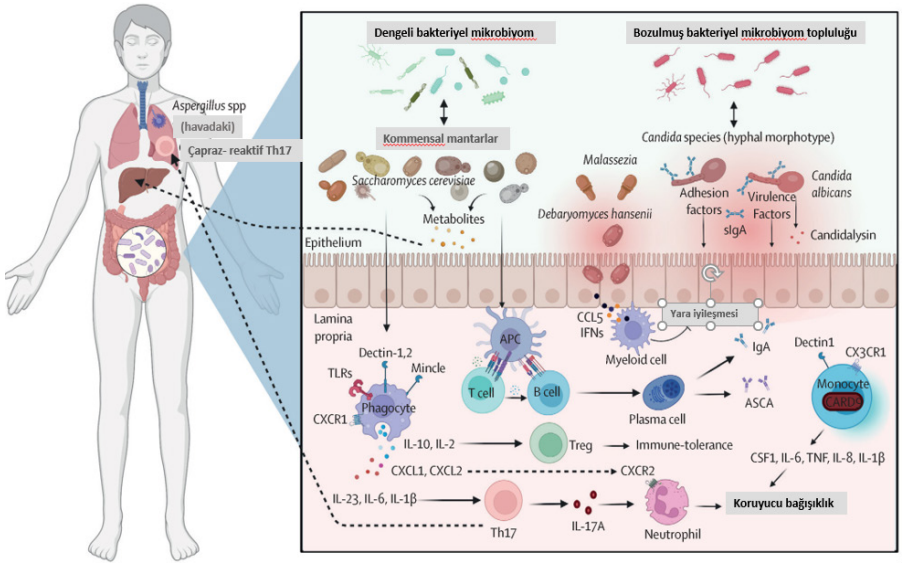
Gastrointestinal sistemin ötesinde, bağırsak mikobiyomu alkolik karaciğer hastalığı (Lang et al., 2020) ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı dahil olmak üzere bağırsak dışı organların hastalıklarıyla da ilişkilendirilmiştir (Lemoinne et al., 2020). Kronik alkol uygulamasının enterik mantar yükünü, mantar β-glukan ve kandidalizin toksininin sistemik dolaşıma translokasyonunu artırdığı ve böylece farelerde karaciğer iltihabına neden olduğu

bulunmuştur (Lang et al., 2016; Yang et al., 2017). Son 4 yılda yapılan üç çalışma, bakteriyel *C. difficile* enfeksiyonu ve COVID-19 enfeksiyonu dahil olmak üzere bulaşıcı hastalıklarda bağırsak mikobiyomunda önemli değişiklikler olduğunu bildirmiştir; her iki hastalıkta da eş zamanlı bakteriyel disbiyoz ile birlikte *C. albicans* artışları bulunmuştur (Zuo et al., 2018; Zuo et al., 2020; Zuo et al., 2021). Bağırsak mantar topluluğunun bozulması, hepatit B ve HIV enfeksiyonu gibi diğer viral bulaşıcı hastalıklarda da bulunmuştur (Chen et al., 2011; Mukherjee et al., 2018). Varsayılan mekanizmalardan biri, mantar ikincil metaboliti olan ekzofilik asidin virüslerin konak hücrelere girişini engellemesidir (Kobayashi et al., 2018). Son 10 yılda, bağırsak mantarlarının metabolik bozukluklara ve nörolojik hastalıklara katkıları, obezite (Mar Rodríguez et al., 2015; Gouba et al., 2013), diyabet (Kowalewska et al., 2016; Gosiewski et al., 2014) ve ateroskleroz (Chacón et al., 2018; Xu et al., 2020), multipl skleroz (Shah et al., 2021), Rett sendromu (Strati et al., 2016; Strati et al., 2018), otizm spektrum bozukluğu (Strati et al., 2017; Zou et al., 2021), Parkinson hastalığı (Enaud et al., 2020), şizofreni (Severance et al., 2012; Severance et al., 2016), Alzheimer hastalığı (Nagpal et al., 2012; Ling et al., 2021) ve yeme bozuklukları dahil olmak üzere epidemiyolojik çalışmalarla tanımlanmıştır (Gouba et al., 2014). Fare çalışmaları, *C. parapsilosis* ve *Stereum hirsutum* gibi bazı spesifik mantarların metabolik bozukluklarda zararlı ve faydalı etkileri olduğunu (Huang et al., 2020; Sun et al., 2021; Kang et al., 2019; Kowalewska et al., 2016) ve mukozal mantarların farelerde T-helper-17 (Th17) hücre bağışıklığı yoluyla bağırsak bariyer fonksiyonunu ve sosyal davranışı destekleyebileceğini göstermiştir (Leonardi et al., 2022). Bu çalışmalar, bağırsak mantarlarının sistemik düzeyde ve konakçıdaki bağırsak-beyin ekseni üzerinde geniş kapsamlı bir etkisi olduğunu göstermektedir. Genel olarak, hastaların bağırsak mikobiyomlarında yapılan bu gözlemsel, keşifsel çalışmalar, bağırsak mikobiyomunun disbiyozu ile bir hastalığın patogenezi arasındaki bağlantının altını çizmektedir. Bununla birlikte, nedenler veya sonuç ilişkileri hastalık seyri sırasında bir şekilde iç içe geçebilir ve hastalıklar arasında farklılık gösterebilir. Bu nedenle, farklı mantarların farklı hastalıklardaki rollerinin ve klinik uygulama değerlerinin daha derinlemesine araştırılması gerekmektedir.

1.3. Hastalıkla İlişkili Bağırsak Mantarlarının Zararlı Rolleri

Bağırsak mikobiyomunda *C. albicans* büyümesi, inflamatuar bağırsak hastalığı (Liguori et al., 2016; Sokol et al., 2017; Hoarau et al., 2016), GVHD (Nelson et al., 2021), *C. difficile* enfeksiyonu (Zuo et al., 2018), karaciğer hastalığı (Chu et al., 2020), astım (Gouba et al., 2014), şizofreni (Severance et al., 2012; Severance et al., 2016) ve COVID-19 (Zuo et al., 2020) dahil olmak üzere birçok hastalıkta sürekli olarak görülmektedir. *C albicans*'ın bu tür hastalıkların patogenezine nasıl katkıda bulunduğu tam olarak anlaşılmamış olsa da,

iyi bilinen bir mekanizma, *C. albicans* kolonizasyonunun Th17 aracılı bağışıklık tepkilerini yönlendirebileceği ve hastalığı şiddetlendirmek için bağırsak mikrobiyom düzenini bozabileceğidir (Rao et al., 2021; Iliev et al., 2012; Hernández-Santos et al., 2012). Mantar hücre duvarlarının oldukça korunmuş bir bileşeni olan mannanlar, örüntü tanıma reseptörlerinin (pattern recognition receptors; PRR) aktivasyonu yoluyla Candida-spp kaynaklı Th17 ve IL-23 yanıtlarından türetilmiş ve böylece farelerde hem GVHD'yi hem de koliti şiddetlendirmiştir (van der Velden et al., 2013; Hernández-Santos et al., 2012; Iliev et al., 2012; Uryu et al., 2015). Bağırsak iltihabı, bağırsaktaki *C. albicans* miktarını artırmış ve bu da havadaki mantar *Aspergillus fumigatus* da dahil olmak üzere diğer mantar türlerine karşı çapraz reaktif olan Th17 hücrelerini indüklemiştir. Bağırsakta *C. albicans* ile indüklenen Th17 hücrelerinin havadaki mantarlarla bu tür çapraz reaktivitesi, akciğerlerdeki Th17 hücre popülasyonunun genişlemesine ve dolayısıyla hava yolu inflamasyonuna yol açarak bağırsak mantarları ile solunum patolojisi arasında sistemik, uzak bağlantıyı desteklemektedir (Bacher et al., 2019). *Malassezia restricta* iyi çalışılmış bir başka mantardır ve birçok hastalıkta sorumlu olarak gösterilmektedir (Limon et al., 2019; Xu et al., 2020). *M. restricta*'nın hem farelerde hem de enflamatuar bağırsak hastalığı olan insanlarda, özellikle de CARD9S12N polimorfizmi için homozigot olan Crohn hastalığı olan hastalarda bağırsak enflamasyonunu kötüleştirdiği bulunmuştur (Limon et al., 2019; Spatz et al., 2020). Ayrıca Malassezia türleri (özellikle *Malassezia globosa*), pankreas kanseri olan farelerde C3 kompleman kademesinin aktivasyonunu da içeren tümör büyümesini tetikleyebilmektedir (Aykut et al., 2019). Crohn hastaları ile ilgili olarak 2021'de yapılan daha yeni bir çalışmada, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir mantar olan *Debaryomyces hansenii*'nin Crohn hastalığı olan hastaların iltihaplı mukozal dokularında oldukça fazla miktarda bulunduğu saptanmıştır. Deneysel bir çalışmada; *D. hansenii* geleneksel olarak yetiştirilmiş, ancak barsak mukozasında mekanik hasar oluşturulmuş yaralı veya GF farelere verildiğinde *D. hansenii*'ye yanıt olarak farelerde miyeloid hücre kaynaklı tip 1 IFN ve CCL5'in şiddetlenmesiyle kolonda iyileşmenin bozulduğu gösterilmiştir (Jain et al., 2021). Buna karşın, tipik mantar (maya) olan *S. cerevisiae*'nin hastalıklardaki rolü tartışmalıdır (Sokol et al., 2017). Anti-*S. cerevisiae* antikorları Crohn hastalığı olan hastalarda, sağlıklı bireylere kıyasla artmıştır ve bu nedenle klinik olarak Crohn hastalığı teşhisi için serolojik bir belirteç olarak kabul edilmiştir (Giaffer et al., 1992; Vermeire et al., 2001). Bugüne kadar, çok çeşitli bağırsak mantarlarının farklı hastalıklarda oynadığı roller henüz ortaya çıkarılmamış olup tam olarak araştırılmalara devam edilmektedir ve bu çalışmalar yeni terapötik hedeflere ışık tutacaktır.



Şekil 2: Bakteri mikrobiyomunun bir araya gelmesiyle bağlantılı olarak bağırsak mikobiyomu ve konakçı bağışıklığı arasındaki etkileşim (Zhang et al., 2022). ASCA=anti-*Saccharomyces cerevisiae* antikoru. Treg=düzenleyici T hücresi. Th17=T-yardımcı-17 hücresi

2. Bağırsak Mantarları ve Konak Bağışıklığı Arasındaki Etkileşimler

Bağırsakta kolonize olan mantarlar, bağırsak mikrobiyotasının immünolojik açıdan oldukça reaktif bir bileşenini temsil etmektedir. Bağırsak mantarları, sabit durumda memeli konakçı ile simbiyotik etkileşimler sergiler (Şekil 2). Fareler üzerinde yapılan çalışmalar, antibiyotik tedavisi ile bağırsak kommensal bakterilerinin yok edilmesinin ardından kolit ve *İnfluenza A* virüsü enfeksiyonuna yatkınlığın, *C. albicans* veya *S. cerevisiae* ile monokolonizasyon ile etkili bir şekilde ortadan kaldırıldığını ortaya koymuştur. Kommensal mantarların koruyucu faydalarına daha sonra mannanların aracılık ettiği bulunmuştur (Jiang et al., 2017). Bu bulgular, enterik mantarların enfeksiyöz ve enflamatuar bozukluklara karşı koruma sağlayarak işlevsel olarak bakterilerin yerini alabileceğini vurgulamıştır. Mannana ek olarak, β-glukanlar, kitin ve mannozla ilişkili kompleksler gibi mantar hücre duvarlarının diğer bileşenleri, konak hücrelerin içinde veya üzerinde bulunan C-tipi lektin reseptörleri, toll like reseptörler ve NOD benzeri reseptörler gibi PRR tarafından tanınmakta ve antifungal bağışıklığı yönlendiren sinyal iletim basamaklarını tetiklemektedir (Richard et al., 2019; Kasper et al., 2018) (Gil et al., 2009). Hücresel düzeyde, C-tipi lektin reseptörlerini ifade eden CX3CR1+ mononükleer fagositlerin, Syk sinyaline bağlı bir şekilde bağırsak mantarlarına karşı hem doğal hem de adaptif bağışıklık tepkilerinin başlatılması için gerekli olduğu bulunmuştur;

bu da bu miyeloid alt kümenin ve Syk yolunun mantarlara karşı bağışıklıktaki kilit rolünü vurgulamaktadır (Leonardi et al., 2019). Bu doğuştan gelen tepkiler sırasında oluşan sitokin ve kemokin ortamı, IL-17 üreten Th17, IFN-γ üreten Th1 ve IL-17 veya IFN-γ birlikte üreten Th1 veya Th17 hücrelerinin tercihli olarak farklılaşmasını sağlar (Nauseef et al., 1983), nötrofillerin bağırsak lamina propriyasına alınmasını kolaylaştırır ve sonuç olarak bağırsak mantarlarının aşırı çoğalmasını kısıtlar (Roth et al., 2013). Ayrıca, hem sağlıklı bireylerin hem de inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastaların serumlarında mantar β-glukan ve diğer mantar antijenlerine karşı antikorlar tespit edilmiştir, bu da mantarların konakçı humoral bağışıklığını da ortaya çıkardığını düşündürmektedir. (Li et al., 2019; Doron et al., 2021). Üç çalışma bağırsak mantarlarına yönelik insan antikor repertuarını araştırmış ve sistemik IgG1 ve bağırsak salgılayıcı IgA antikorları tarafından bağlanan mantar popülasyonlarını ve moleküllerini belirlemiştir. Salgısal IgA antikorları, maya morfotipinin aksine tercihen *C. albicans*'ın hifal morfotipine (hifal morfotipin maya morfotipinden daha virülan olduğu bilinmektedir), özellikle de Als3 ve Sap6 gibi adezyon ve invazyon moleküllerini içeren hifle ilişkili virülans faktörlerine bağlanmıştır. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında Crohn hastalığı olan hastaların mukozal yıkamasında granüler hiflerdeki artış, antifungal salgılayıcı IgA antikor titrelerindeki düşüşle ilişkilidir. Mantarların hifal formları tarafından üretilen adhezine karşı geliştirilen klinik olarak uygun bir aşının, fareleri kolit sırasında *C. albicans* ile ilişkili hasardan koruma kabiliyeti kanıtlanmıştır (Ost et al., 2021; Doron et al., 2022). Bu verilerle birlikte, mukozal IgA antikorlarının, mantarların hifal formunun yanı sıra virülans faktörlerini de baskılayarak bağırsaktaki mantar kommensalizminin önemli bir düzenleyicisi olduğunu ve bunların bozulmasının bağırsak iltihabına yol açabileceğini göstermektedir. Genel olarak, bağırsak mantarlarının dengesi veya disbiyozu (bileşimsel, morfolojik veya her ikisi birden) konağın koruyucu ve pro-inflamatuar bağışıklık tepkilerini belirler. Bu konak tepkileri karşılıklı olarak, bazı mantarların fırsatçı yayılımlarının enflamasyon ve patolojik süreçlere neden olabileceği dengeli bir bağırsak mantarı topluluğunu düzenler. Mantar enfeksiyonları, insan hastalıklarında ve homoeostazda antifungal immün yanıtlarla ilişkili olarak konakçı bağışıklığının anlaşılması son on yılda önemli ölçüde ilerlemiş olsa da, çekirdek mikobiyom ve bileşenlerine karşı immün yanıtların, işlevlerin ve hafızanın çeşitliliği ve karmaşıklığı tam olarak araştırılmayı beklemektedir.

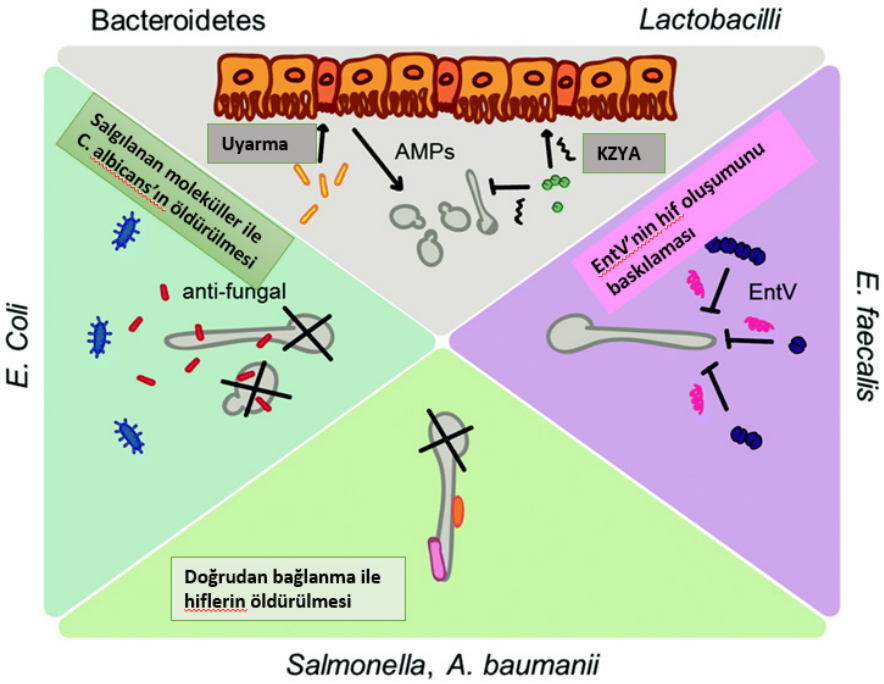
2.1. Kommensal Bakteriler ve *Candida albicans* Arasındaki Antagonistik Etkileşimler

Kommensal mikrobiyotanın bağırsaktaki mantar çoğalmasını sınırlama potansiyeli bulunmaktadır. Konağın geniş spektrumlu antibiyotikleri uzun süreli kullanımıyla kommensal

mikrobiyotanın tükenmesi ve buna bağlı olarak normal florada sıklıkla var olan mantarların aşırı derecede artması şeklinde ortaya çıkan klinik gözlem bunun ispatı şeklindedir (Ianiro et al., 2016; Eggimann et al., 2015; Mason et al., 2012b; Erb Downward et al., 2013; Pasqualotto et al., 2006). Kommensal mikrobiyota tarafından kolonizasyon oluşumunu önleyen direnç farklı şekillerde meydana gelebilmektedir. Kommensal bakteriler, konak bağışıklık sisteminin modülasyonu yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak diğer mikrobiyota üyelerinin hayatta kalmasını veya yeniden popülasyonunu etkileyebilir ki bu da belirli bakteriler üzerinde geri bildirim etkilerine yol açabilir (Buffie ve Pamer, 2013). Bazı bakterilerin diğer bağırsak bakterilerinin miktarını etkileyen moleküller salgıladığı bildirilmektedir. Örneğin ortak yaşayan *Bacteroidetes thetaiotaomicron*, *Enterohemorajik Escherichia coli* suşlarının toksin üretimini baskılayan bir faktör salgılar (de Sablet et al., 2009). Benzer şekilde, bazı Bifidobacterium spp. patojenik *E. coli* ve *Citrobacter rodentium* türlerine karşı korumayı destekleyen çözünür faktörler üretir (Gagnon et al., 2004). Probiyotik suşu *E. coli* Nissle 1917, inflamatuar koşullar altında patobiyotik veya patojenik Enterobacteriacaeae türlerinin yayılmasını sınırlayan mikrosinler salgılar ve böylece homeostazın yeniden kurulmasına yardımcı olur. *Bacillus thuringiensis*'in, suşa özgü bir bakteriyosin salgılayarak *Clostridium difficile*'yi inhibe ettiği rapor edilmiştir. Özellikle bu bakterisinler ve mikrosinlerin diğer mikrobiyota bileşenlerini etkilemeden hedefe özgü bir şekilde hareket ettiği görülmektedir (Sassone-Corsi et al., 2016; Rea et al., 2011). Bir diğer önemli faktör ise yapışma bölgeleri ve besin maddeleri için rekabettir. Örneğin *Lactobacillus reuteri*, konakçı mukozaya yapışmayı kolaylaştıran mukus bağlayıcı bir proteini eksprese eder (Kankainen et al., 2009). Bu etkinin *Clostridium difficile* gibi patojenlerin birincil yapışmasının sınırlandırılmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. *Bacteroidetes thetaiotaomicron*, bitki kaynaklı monosakkaritleri metabolize eder ve böylece patojen *C. rodentium*'un büyümesini sınırlandırır (Kamada et al., 2012). Ancak bu tür mukozal arayüzlerde sadece rekabet oluşmaz, aynı zamanda sinerjistik etkiler de gözlenir. Örneğin, *Bacteroidetes longum*, *Bacteroidetes thetaiotaomicron*'un karbonhidratı metabolize eden enzimlerinin artışını düzenleyerek bu suşun büyümesini destekler. Ayrıca mikrobiyota bileşenleri, konakçı bağışıklık sisteminin modülasyonu yoluyla diğer konsorsiyum üyelerinin yeniden çoğalmasını dolaylı olarak etkiler. Bu tür bir modülasyon, diğerlerinin yanı sıra, antimikrobiyal peptit (AMP) salgılanmasının indüksiyonunu, antimikrobiyal C-tipi lektinlerin üretimini (Sonnenburg et al., 2006), plazma hücresi kaynaklı IgA'nın indüksiyonunu (Ivanov et al., 2009) veya T hücresi aracılı bağışıklığın modülasyonunu (Gaboriau-Routhiau et al., 2009) içerir. Ancak, mikrobiyotanın farklı üyelerinin *C. albicans*'a karşı kolonizasyon direncinden sorumlu olup olmadığı ve buna hangi mekanizmaların aracılık ettiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Antagonistik Candida-bakteri etkileşimleri için en iyi çalışılan örneklerden biri laktik asit bakterileridir (LAB). Glikozu laktik asite fermente etme yetenekleriyle karakterize edilirler, ancak aynı zamanda bakterisinler ve mantar önleyici peptidler de üretirler (De Vuyst & Leroy, 2007) (Şekil 3). Laktobasiller, vajinal mikrobiyotanın baskın türleridir ve *C. albicans* da dahil olmak üzere diğer bakterilerin neden olduğu ürogenital enfeksiyonları laktik asit yoluyla vajinal mukozanın asitleştirilmesiyle önlerler (Vasquez et al., 2002).

Mason et aladaşlarının çalışmasında, farelerde antibiyotik tedavisinden sonra *C. albicans* ve laktobasillerin bağırsak ve midede nasıl etkileşime girdiğini açıklığa kavuşturulması amaçlanmıştır. *C. albicans*'ın varlığında, antibiyotik tedavisi kesildikten sonra laktobasillerin mideyi yeniden kolonize etme kapasiteleri baskılanmıştır. Laktobasiller yerine enterokoklar baskın tür haline gelmiştir. Mantar hücreleri olmadığında bu etki tersine dönmüştür (Mason et al. 2012a). Benzer sonuçlar, mantarın Bacteroidetes popülasyonunun daha hızlı iyileşmesine yol açtığı kolonda da gözlenmiştir (Mason et al. 2012b). Olası bir açıklama, *C. albicans*'ın doğrudan laktobasilleri antagonize etmesidir. Yine, enterokokal büyümenin mantar tarafından teşvik edilmesi ve ardından bakterisinlerin salgılanmasıyla diğer Gram-pozitif bakterilerin baskılanmasına yol açması da gözlemleri açıklayabilir (Sawa et al., 2012). Laktobasiller, başta asetat, propiyonat ve bütirat olmak üzere kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) üretimi yoluyla *C. albicans*'ı potansiyel olarak antagonize edebilir (Pessione, 2012). KZYA'leri sadece bağırsak bariyer fonksiyonunu desteklemekle kalmaz, aynı zamanda *C. albicans* filamentasyonunu ve dolayısıyla invazivliğini de engelledikleri gösterilmiştir (Noverr & Huffnagle, 2004) (Şekil 3). Bununla birlikte, kolonda laktobasiller genellikle genel mikrobiyotanın %2'sinden daha azını oluşturur ve KZYA'lerin çoğunluğu diğer birkaç bakteri taksonu ve türü tarafından üretilir. Örneğin propiyonat için en önemli üretici mukus parçalayan bakteri *Akkermansia muciniphila*'dır (Derrien et al., 2004), bütirat ise çoğunlukla *Ruminococcus bromii* ve diğer birkaç tür tarafından dirençli nişastadan üretilir (Louis et al., 2010; Ze et al., 2012). Yine de laktobasil türevi moleküller, farklı bağırsak nişlerinde veya farklı şekilde oluşan mikrobiyotada kolonizasyon direncine önemli ölçüde katkıda bulunabilir. Ayrıca, diğer kolonizasyon direnci mekanizmalarının aracılık ettiği etkiler de mümkün görünmektedir.



Şekil 3: Mantarlar ve bakteriler arasındaki antagonist etkileşimler. Üst: Bacteroidetes türleri bağırsak hücrelerini daha fazla HIF1α üretmesi için uyarabilir, bu da antimikrobiyal peptitlerin (AMP'ler) salgılanmasına yol açar ve bu da bir fare modelinde *C. albicans*'a karşı kolonizasyon direncini artırır. Lactobacilli, enterositlerin ana enerji kaynağı olan kısa zincirli yağ asitlerini salgılayabilir ve *C. albicans*'ın filamentasyonunu ve istilasını in vitro olarak inhibe edebilir. Sağda: *E. faecalis*, nematodlarda filamentasyonu engelleyen, EntV adı verilen küçük bir peptid salgılayabilir. Altta: Salmonella türleri ve *Acinetobacter (A.) baumanii*, *C. albicans*'ın filamentli formuna doğrudan bağlanır ve bu da mantarın in vitro öldürülmesine yol açar. Sol: *E. coli*, magnezyumun tükenmesi sırasında in vitro mantar büyümesini engelleyen bir mantar önleyici peptid salgılar (Kapitan et al., 2019).

Laktobasillerin yanı sıra diğer anaerobik bağırsak bakterileri de kolonizasyon direncine aracılık edebilir. Gram-negatif bakterilerin varlığında, IEC'ler ve Paneth hücreleri Gram-pozitif bakterilere karşı oldukça aktif olan bir C-tipi lektin olan RegIIIc salgılar (Cash et al., 2006). Farelerde yapılan deneyler, bu bağışıklık uyarımının konağı vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* kolonizasyonuna karşı koruyabileceğini göstermiştir (Brandl et al., 2008). Mantarlar için de benzer mekanizmalar bulunmuştur: Fan et aladaşları (Fan et al., 2015) iki anaerobik bakteri türü olan *Bacteroides thetaiotamicron* ve *Blautia producta* varlığının C. albicans'ı fare bağırsağından temizlemek için yeterli olduğunu göstermiştir. Mantarların varlığında, bu bakteriler bağırsak hücrelerini doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir düzenleyicisi olan HIF1a'yı daha fazla sentez etmeleri için uyararak (Nizet & Johnson, 2009) bir grup antimikrobiyal peptit olan katelisidinlerin üretimini teşvik etmiştir (Peyssonnaux et al., 2005).

C. albicans ve bu anaerobik bakterilerden biriyle birlikte kolonize edilen farelerde, HIF1a ve katelisidin LL-37-CRAMP önemli ölçüde artışı düzenlenmiştir. İnsanlarda LL-37 Candida'ya karşı aktiftir (Lopez-Garcia et al., 2005). Bu bulgular, kommensal bakterilerin kolonda dolaylı olarak mantarlarla kolonizasyonu potansiyel olarak azaltabileceğini göstermektedir.

2.2. Patojenik Bakteriler ve *Candida albicans* Arasındaki Etkileşimler

Disbiyoz sadece *C. albicans* ile değil, aynı zamanda fırsatçı bakteriyel patojenlerle de kolonizasyonun artmasını kolaylaştırır (Bien et al., 2013). Bağırsaklarda yaygın olarak bulunan geniş bir bakteri spektrumu konakçıda yaygın enfeksiyonlara neden olabilir (Klastersky & Aoun, 2004; Mootsikapun, 2007). *C. albicans* ve bakterileri içeren karışık enfeksiyonların nadir olmadığı (Kim et al., 2013) ve disbiyozun bağırsakta aynı anda hem *C. albicans* hem de fakültatif patojenik bakterilerin büyümesini desteklediği (Behnsen et al., 2014; Bien et al., 2013; Nerandzic et al., 2012) göz önüne alındığında, bu bakteriler ve mantar arasındaki etkileşimlerin türü klinik öneme sahip olabilir. Disbiyotik bağırsaktaki mantar-bakteri etkileşimleri antagonistik ise, göreceli enfeksiyon riski etkilenmeyebilir. Bunun aksine, sinerjik etkileşimler riskin artmasına yol açabilir ve profilaktik tedavi gerektirebilir.

Gastrik biyopsi örneklerinde *C. albicans* ve *Helicobacter pylori* (gastrik ülserlerle güçlü bir şekilde bağlantılı bir bakteri türü) arasında bir etkileşim olduğu belirlenmiştir. *H. pylori*'nin, *C albicans* hücrelerindeki vakuoller içinde potansiyel olarak midenin düşük pH'ında hayatta kalmak için bulunduğu saptanmıştır. Bir başka fare çalışmasında, antibiyotik tedavisinin midede *C albicans* kolonizasyonunu kolaylaştırdığı ve bunu takiben gastrik enflamasyonun meydana geldiği, bunun da kommensal Lactobacillus suşlarının yeniden kolonizasyonunu engellediği bildirilmiştir (Zhang et al., 2022; Wang et al., 2022).

Acinetobacter baumanii son zamanlarda hastane kaynaklı fırsatçı bir patojen olarak ortaya çıkan Gram-negatif bir bakteridir (Lee et al., 2007) ve çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi nedeniyle tedavisi zordur (Dijkshoorn et al., 2007). *C. albicans* ile etkileşimleri antagonistik olarak tanımlanmıştır. İn vitro koinkübasyon sırasında bakteri, *A. baumanii* dış membran proteini A (OmpA) aracılığıyla *C. albicans* hiflerine bağlanabilir ve bu da hifal apoptozla sonuçlanır (Gaddy et al., 2009) (Şekil 3). Benzer şekilde, bir *Caenorhabditis elegans* nematod modelindeki koenfeksiyon, mantar filamentasyonunun inhibisyonunun aracılık ettiği ölümcüllüğün azalmasıyla sonuçlanmıştır (Peleg et al., 2008). Bununla birlikte, memeli bağırsağındaki etkileşimlerin de aynı şekilde antagonistik olup olmadığı henüz belirlenmemiştir.

C. albicans ile en sık ilişkili olan bakteri grubu Gram-pozitiflerdir (Hermann et al., 1999). Streptococcus (Bamford et al., 2015; Falsetta et al., 2014; Yu et al., 2018) ve Staphylococcus türleri, özellikle de *Staphylococcus aureus* (Harriott & Noverr, 2010; Kong et al., 2016; Krause et al., 2015; Schlecht et al., 2015; Carlson, 1983a, 1983b) için çeşitli etkileşimler bulunmuştur. Ancak bu etkileşimler çoğunlukla bağırsak dışında gerçekleşmektedir. *Enterococcus faecalis* ise *C. albicans* ile çeşitli nişleri paylaşmaktadır (Hayashi et al. 2005; Horsley et al. 2013; Komiyama et al. 2016) ve bağırsakta etkileşim olasılığı yüksektir (Mason et al. 2012b). Klinik ortamlarda *C. albicans* ve *E. faecalis* arasındaki yüksek birliktelik, sinerjik ilişkilere veya en azından nötr bir birlikteliğe işaret etmektedir. Ancak, şimdiye kadar deneysel olarak tanımlanan etkileşimler antagonistiktir. Cruz et aladaşları (Cruz et al., 2013), *E. faecalis* ve *C. albicans* ile birlikte enfekte olan nematodların, ilgili tek enfeksiyonlara kıyasla daha uzun süre hayatta kaldığını gözlemlemiştir. Bunun nedeni kısmen hiflerin, daha sonra tanımlanan ve EntV olarak adlandırılan küçük bir peptit tarafından inhibe edilmesidir (Graham et al., 2017) (Şekil 3). Peptidin tek başına, hif oluşumunu inhibe ederek fareleri orofaringeal kandidiyaz (OPC) modelinde *C. albicans* enfeksiyonundan koruyabildiği ve ayrıca olgun mantar biyofilmlerini çözebildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, EntV'nin bağırsakta ifade edilip edilmediği ve bu nişteki etkileşimlerin de antagonistik olup olmadığı belirsizdir.

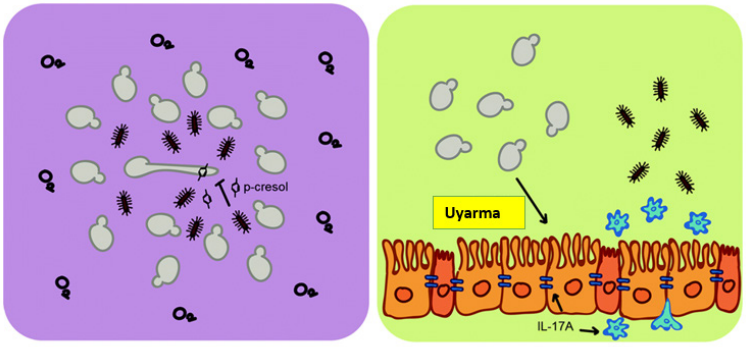
Escherichia coli çok çeşitliliği olan bir bakteri türüdür (Becker et al., 2014; Meador et al., 2014) ve bu nedenle *C. albicans*'a karşı davranışında da heterojenik görünmesi şaşırtıcı değildir. Yakın zamanda, *E. coli* suşu MG1655'in magnezyumdan yoksun koşullar altında in vitro olarak *C. albicans* ile birlikte üretilmesi sırasında *C. albicans*'ı öldüren fungisidal bir molekül salgıladığı bulunmuştur (Cabral et al., 2018). Buna karşılık, *Enterohemorajik E. coli* (EHEC), muhtemelen EFG1 ve HWP1 gibi hifle ilişkili genlerin yukarı regülasyonunun aracılık ettiği koenfeksiyon sırasında in vitro enterositlerin istilasının ve hasarının artmasına yol açmıştır (Yang et al. 2016) (Şekil 3). Bu tür fungal-bakteriyel sinerjizm, farelerin intraperitoneal koenfeksiyonu sırasında in vivo olarak da gözlemlenmiştir. Her iki türün tek başına enfeksiyonu sırasında hiçbir fare ölmezken, her iki mikroorganizmanın birlikte enfeksiyonu ölüm oranının büyük ölçüde artmasına neden olmuştur (Klaerner et al., 1997). Ayrıca bir *E. coli* türünün sıçanların mesane mukozasına mantar tutunmasını arttırdığı ve idrar yolu enfeksiyonu sırasında daha yüksek virülansa yol açtığı gösterilmiştir (Levison ve Pitsakis, 1987). Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa*'ya benzer şekilde *E. coli* süpernatantlarının in vitro biyofilm oluşumunu engelleyebildiği de gösterilmiştir (Holcombe et al., 2010; Bandara et al., 2013). Bir başka in vitro çalışmada, *C. albicans* varlığında *E. coli* K12'nin büyümesinin ve çoğalmasının teşvik edildiği gözlemlenmiştir. Bu etki, her iki mikrobiyal türün demir edinme

mekanizmalarına bağlıdır. Demir alımında rol oynayan transkripsiyon faktörleri olan SEF1 veya SFU1 mantar genlerinin (Chen et al., 2011) ya da FepD veya FebG bakteriyel ferrik taşıyıcılarının silinmesi, büyüme artışını ortadan kaldırmıştır (Chenault & Earhart, 1992). İlginç bir şekilde, bu büyüme teşviki kendi sideroforlarından yoksun *E. coli* mutantlarında da meydana gelmiştir. Yazarlar, fungal siderofor benzeri bir molekülün *E. coli*'nin çevresel demiri almasını destekleyebileceğini öne sürmüşlerdir. Mekanizma tam olarak anlaşılmamış olsa da belirli mikro nişlerde meydana gelen demir alımı sınırlaması bağırsakta önemli bir potansiyel olabilir. *C. albicans*, çevresel ortama ve etkileşim partnerine bağlı olarak henüz bilinmeyen salgılanan faktörlerle çevresindeki mikrobiyotayı stabilize etmeye yardımcı olabilir.

Metal kazanımı Salmonella enfeksiyonu sırasında da önemlidir. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) kolonizasyonu şiddetli inflamatuar ishale yol açar (Hohmann, 2001). Salmonella enfeksiyonuna yanıt olarak, konak IL-22 sitokin indüksiyonu ile tetiklenen çinko ve manganezin yanı sıra demiri de kısıtlar (Godinez et al., 2008). IL-22, RegIIIb ve RegIIIc gibi farklı antimikrobiyal peptitlerin salgılanmasına yol açar, iki C-tipi lektinler Gram-negatif ve Gram-pozitif komensal bakterileri öldürebilmekte ancak *S. typhimurium*'u öldürememektedir (Cash et al., 2006; Stelter et al., 2011). IL-22'nin diğer iki aşağı yönlü hedefi, bakteriyel siderofor enterochelin'e bağlanan ve demir alımını önleyen lipokalin-2 (Raffatellu et al., 2009) ve bir çinko ve manganez şelatörü olan calprotectin'dir (Corbin et al., 2008; Sohnle et al., 1996). Bu durum *E. coli* gibi komensal bakterilerin baskılanmasına ve *S. typhimurium*'un aşırı büyümesine yol açar (Behnsen et al., 2014). Ancak IL-22'nin *C. albicans* üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Kagami et al., 2010). *C. albicans* ve *S.* Typhimurium arasındaki doğrudan antagonizm, bakterilerin hiflere bağlandığı ve bir tip III salgı sistemi üzerinden mantar hücrelerini aktif olarak öldürdüğü bir nematod modelinde de tanımlanmıştır (Kim ve Mylonakis, 2011) (Şekil 3).

Bazı bakterilerle potansiyel olarak zararlı etkileşimlerin aksine, *C. albicans, C. difficile* gibi patojenlerle antagonistik etkileşimler yoluyla konağı korur (Markey et al., 2018). *C. difficile*, Gram-pozitif zorunlu anaerobik spor oluşturan bir bakteridir ve genellikle ölümle sonuçlanan şiddetli ishal ve kolite neden olabilir (Burke & Lamont, 2014). Enfeksiyon için önemli bir risk faktörü, *C. difficile*'nin kommensal mikrobiyota tarafından sağlanan kolonizasyon direncinin üstesinden gelmesine olanak tanıyan antibiyotik tedavisidir (Pepin et al., 2005). Tekrarlayan *C. difficile* enfeksiyonuna karşı çare fekal mikrobiyota transplantasyonudur (van Nood et al., 2013). Daha önce *C. albicans*'ın kültür işlemi sırasında zorunlu anaerob *C. difficile*'nin aerobik koşullar altında büyümesine izin verebileceği gösterilmiştir. Bu etki, anaerobik büyümeyi teşvik ettiği bilinen mantarın biyofilm oluşumundan bağımsız

olup (Fox et al., 2014); aksine bakteri, hif oluşumunu engelleyen ve hiflerin tekrar maya hücrelerine dönüşmesine yol açan bir p-kresol molekülünü salgılamaktadır (van Leeuwen et al. 2016). Bu durum *C. albicans*'ın bakterinin gelişmesi için bir niş sağlayabileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan bir in vivo çalışmada, farelerin *C. albicans* ile önceden kolonize edilmesinin hayvanları *C. difficile* ile ölümcül bir enfeksiyona karşı koruduğunu göstermiştir (Markey et al., 2018). Bu koruyucu etki, *C. albicans* ile kolonize edilmiş farelerdeki bazı bakteri türlerinin (örneğin Akkermansia ve Bifidobacterium türleri) mikrobiyota bileşiminin önemli ölçüde değişmesine rağmen, mantarın varlığında daha yüksek kolonizasyon direncinden kaynaklanmamıştır. Clostridium kaynaklı toksin konsantrasyonu da her iki grupta da değişmemiştir. Bu etkiye, en azından kısmen, mantarın pro-enflamatuar bir sitokin olan IL-17 üretimini teşvik etmesinin aracılık ettiği görülmüştür. Bununla birlikte, mantar kolonizasyonu nötrofilleri çeken (Nakagawa et al., 2016; Rubino et al., 2012) ve sıkı bağlantılar yoluyla epitel bütünlüğünü destekleyen (Lee et al., 2015) pro-enflamatuar IL-17A seviyelerinde artışa neden olmuştur (Şekil 4). Diğer bir çalışmada (Fan et al., 2015) birkaç Bacteroidetes ve Clostridial Firmicutes'in murin bağırsağında *C. albicans*'ı antagonize ettiği bulunmuştur. Bu bakteriler, *C. albicans*'a karşı bağırsak mukozal bağışıklık savunması üretimini uyararak mantarın çoğalmasını sınırlandırmıştır. Konağın bağışıklık sistemi tarafından hazırlanan yanıtlar, kommensal bakterilerin memeli konağını istilacı patojenlerden koruduğu yaygın bir mekanizmadır (Khosravi &Mazmanian, 2013). Bu mekanizma tipik olarak bakteri-bakteri antagonistik ilişkileri bağlamında ortaya atılsa da burada açıklanan örneklere göre, kavramın mantar-bakteri ilişkilerine de genişletilebileceğini göstermektedir.



Şekil 4: *C. albicans* ve *Clostridium difficile* arasındaki etkileşimler. Sol: Zorunlu anaerobik bakteri *C. difficile*, normoksik koşullar altında in vitro *C. albicans* varlığında büyüyebilmektedir. Bu etki mantar biyofilm oluşumundan bağımsızdır. Aslında bakteri, mantar filamentasyonunu ve dolayısıyla biyofilm oluşumunu önleyen küçük bir molekül olan p-krezol salgılar. Sağda: *C. albicans* ile bağırsak kolonizasyonu, fareleri *C. difficile*'nin neden olduğu ölüme karşı korur. Mantar, bağırsak hücrelerini daha fazla IL-17A salgılaması için uyarır, bu da enterosit rejenerasyonunu, sıkı bağlantıların ekspresyonunu artırır ve koruyucu bağışıklık hücrelerini çeker (Kapitan et aladaşları,2019).

C. albicans'ın konağı patojen bakterilerden koruduğu mekanizma henüz tam olarak tanımlanmamış olsa da, bu bulgular bağırsakta yaşayan komensal mantarların belirli koşullar altında konağı mikrobiyal tehditlere karşı koruyabileceğini göstermektedir (Pérez, 2019; Pérez, 2021). Nitekim Jiang et aladaşları (Jiang et al., 2017), antibiyotik tedavisinden sonra *C. albicans* veya *S. cerevisiae* tarafından oluşturulan mono kolonizasyonun fareleri kimyasal olarak indüklenen kolitten koruyabileceğini gösterebilmiştir. Kommensal *C. albicans* taşıyan fareler kolon kısalması veya enflamasyon belirtileri göstermemiş ve bu bakımdan sağlam mikrobiyotaya sahip fareler gibi davranmıştır. Çarpıcı bir şekilde, her iki mantar ile bağırsak mono-kolonizasyonu, pulmoner *İnfluenza A* virüsü enfeksiyonu üzerine ölümlere karşı korumaya aracılık etmiştir. Bu korumanın sorumlusu mantar hücre duvarında bulunan ve koruyucu bağışıklık hücrelerinin birikmesine yol açan mannanlardır (Ruiz-Herrera et al., 2006). Bu çalışma, antibiyotik tedavisinin mantar büyümesini desteklemesine rağmen, bunun mutlaka zararlı olmayabileceğini, ancak farklı koşullar altında mantarların diğer bakteri enfeksiyonlarına da karşı koyabileceğini göstermektedir. Yukarıda belirtilen çalışmalara göre, *C. albicans*'ın ikili rolü olması dikkat çekicidir:

1. Konağı bakteriyel bir patojenden korumak için bir yanıt ortaya çıkarabilen bir kommensal olarak,

2. Konağın kommensal bakteriler tarafından ortaya çıkarılan bağışıklık yanıtlar yoluyla korunmasında bir fungal patojeni olarak.

3. Sonuç

Tarihsel olarak bakıldığında, *C. albicans* ve diğer kommensal mantarların fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilme yetenekleri ve gıda sindirimine yardımcı rolleri konusunda yaygın bir görüş hakim olmuştur. Bağırsak mikrobiyotasının fungal bileşeni, bakterilere kıyasla yeterince araştırılmamış olsa da bağırsakta kommensal mantarlarının memeli bağırsağından çoklu ve sonuçsal tepkiler ortaya çıkardığına dair kanıtlar giderek artmaktadır. Candida cinsi mantarlar (örneğin *C. albicans* ve *C. parapsilosis*) tipik olarak fırsatçı patojenler olarak adlandırılır. Bağırsakta yaşadıkları için, bağırsak mikrobiyotasının Candida'nın patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği varsayılmıştır. Son klinik kanıtlar bu düşünceyi desteklemektedir. Yaygın Candida enfeksiyonu olan hastalarda, *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'in kan dolaşımına translokasyonundan önce gastrointestinal sistemde her iki türün de çoğaldığı bulunmuştur. Ancak bağırsaktaki mikrobiyotanın bir parçası olarak mantarların rolü hakkında nispeten az şey bilinmektedir. Bakterilerin *C. albicans*'a karşı kolonizasyon direncine aracılık ettiği açık olsa da farklı bakteri türleri ile etkileşimlerinin antagonistikten sinerjistiğe kadar değiştiği ve

muhtemelen bu etkileşimlerin gerçekleştiği ortama bağlı olduğu görülmektedir. Ayrıca, fungal disbiyozun, özellikle anaerobik bakterilerin kaybı olmak üzere bakteriyel disbiyoz ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur (Zhai et al., 2020).

İnsan gastrointestinal sisteminde yer alan *C. albicans*'ın biyolojisini incelemek için GF'lerin yakın zamanda çalışmalara dahil edilmesi, mantarların bağırsak ekosistemindeki özel rollerini belirlenmesini olanaklı hale getirmektedir. Ayrıca, alandaki çalışmalar ilerledikçe, bu tür deneysel sistemlerin mikrobiyotanın fungal ve bakteriyel üyeleri arasındaki sinerjik, simbiyotik veya antagonistik etkileşimlerin araştırılması ve verilerin ortaya konulması anlamında özel bir öneme sahiptir. Etkileşim mekanizmalarının ve bu etkileşimleri etkileyen çevresel faktörlerin belirlenmesi, disbiyoz hastalarında kişiselleştirilmiş risk değerlendirmesi için bir temel sağlayacaktır. Mantarlar çoğunlukla patojen olarak kabul edilse de konak için henüz keşfedilmemiş faydalar sağlayabilirler. Sebep ve sonuçların tam olarak belirlenmesi zor olsa da uzun vadede enfeksiyon riski taşıyan kişilerde Candida'nın gastrointestinal sistemden yayılmasını engellemek için bağırsak mikrobiyomunu hedef alan potansiyel müdahaleler öngörülebilir; bu, mantar enfeksiyonları için henüz başarılamamış bir şeydir. Ayrı koşullar altında, insanların çoğunun bağırsak mikrobiyotasında bulunan ve insan konağına uyum sağlamış gibi görünen *C. albicans*'ın konak üzerinde faydalı etkilere bile sahip olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Mikrobiyotanın insan yaşamı ve refahının farklı yönlerinde sahip olduğu rolünün giderek daha iyi anlaşılmasıyla birlikte, bakteri topluluğu içindeki mantar işlevlerini de daha iyi anlamamız gerektiği giderek daha açık hale gelmektedir. Bunun için mantar ve bakteri türleri arasındaki etkileşimlerin daha detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Kaynakça / References

Anderson, H.W. (1917). Yeast-like fungi of the human intestinal tract. *J Infect Dis 21*(4):341–354. https://doi.org/10.1093/infdis/21.4.341.

Arrieta, M. C., Arévalo, A., Stiemsma, L., Dimitriu, P., Chico, M. E., Loor, S., Vaca, M., Boutin, R. C. T., Morien, E., Jin, M., Turvey, S. E., Walter, J., Parfrey, L. W., Cooper, P. J., & Finlay, B. (2018). Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *142*(2), 424–434.e10. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.041

Aykut, B., Pushalkar, S., Chen, R., Li, Q., Abengozar, R., Kim, J. I., Shadaloey, S. A., Wu, D., Preiss, P., Verma, N., Guo, Y., Saxena, A., Vardhan, M., Diskin, B., Wang, W., Leinwand, J., Kurz, E., Kochen Rossi, J. A., Hundeyin, M., Zambrinis, C., … Miller, G. (2019). The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature*, *574*(7777), 264–267. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1608-2

Azevedo, M. M., Teixeira-Santos, R., Silva, A. P., Cruz, L., Ricardo, E., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. G. (2015). The effect of antibacterial and non-antibacterial compounds alone or associated with antifugals upon fungi. *Frontiers in microbiology*, *6*, 669. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00669

Bacher, P., Hohnstein, T., Beerbaum, E., Röcker, M., Blango, M. G., Kaufmann, S., Röhmel, J., Eschenhagen, P., Grehn, C., Seidel, K., Rickerts, V., Lozza, L., Stervbo, U., Nienen, M., Babel, N., Milleck, J., Assenmacher, M., Cornely, O. A., Ziegler, M., Wisplinghoff, H., … Scheffold, A. (2019). Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against Candida albicans. *Cell*, *176*(6), 1340–1355.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.041

Bamford, C. V., Nobbs, A. H., Barbour, M. E., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2015). Functional regions of Candida albicans hyphal cell wall protein Als3 that determine interaction with the oral bacterium Streptococcus gordonii. *Microbiology (Reading, England)*, *161*(Pt 1), 18–29. https://doi.org/10.1099/mic.0.083378-0

Bandara, H. M., Cheung, B. P., Watt, R. M., Jin, L. J., & Samaranayake, L. P. (2013). Secretory products of Escherichia coli biofilm modulate Candida biofilm formation and hyphal development. *Journal of investigative and clinical dentistry*, *4*(3), 186–199. https://doi.org/10.1111/jicd.12048

Becker, H. M., Apladas, A., Scharl, M., Fried, M., & Rogler, G. (2014). Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and commensal E. coli K12 differentially affect the inflammasome in intestinal epithelial cells. *Digestion*, *89*(2), 110–118. https://doi.org/10.1159/000357521

Behnsen, J., Jellbauer, S., Wong, C. P., Edwards, R. A., George, M. D., Ouyang, W., & Raffatellu, M. (2014). The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity*, *40*(2), 262–273. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.003

Bianchi, C. M., Bianchi, H. A., Tadano, T., Paula, C. R., Hoffmann-Santos, H. D., Leite, D. P., Jr, & Hahn, R. C. (2016). FACTORS RELATED TO ORAL CANDIDIASIS IN ELDERLY USERS AND NON-USERS OF REMOVABLE DENTAL PROSTHESES. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *58*, 17. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658017

Bien, J., Palagani, V., & Bozko, P. (2013). The intestinal microbiota dysbiosis and Clostridium difficile infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease?. Therapeutic advances in gastroenterology, 6(1), 53–68. https://doi.org/10.1177/1756283X12454590

Bliss, J. M., Basavegowda, K. P., Watson, W. J., Sheikh, A. U., & Ryan, R. M. (2008). Vertical and horizontal transmission of Candida albicans in very low birth weight infants using DNA fingerprinting techniques. *The Pediatric infectious disease journal*, *27*(3), 231–235. https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31815bb69d

Bouza, E., Burillo, A., Muñoz, P., Guinea, J., Marín, M., & Rodríguez-Créixems, M. (2013). Mixed bloodstream infections involving bacteria and Candida spp. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *68*(8), 1881–1888. https://doi.org/10.1093/jac/dkt099

Böhm, L., Torsin, S., Tint, S. H., Eckstein, M. T., Ludwig, T., & Pérez, J. C. (2017). The yeast form of the fungus Candida albicans promotes persistence in the gut of gnotobiotic mice. *PLoS pathogens*, *13*(10), e1006699. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006699

Brandl, K., Plitas, G., Mihu, C. N., Ubeda, C., Jia, T., Fleisher, M., Schnabl, B., DeMatteo, R. P., & Pamer, E. G. (2008). Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*, *455*(7214), 804–807. https://doi.org/10.1038/nature07250

Brown, A. J., Brown, G. D., Netea, M. G., & Gow, N. A. (2014). Metabolism impacts upon Candida immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends in microbiology*, *22*(11), 614–622. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.001

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, *4*(165), 165rv13. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404

Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature reviews. Immunology*, *13*(11), 790–801. https://doi.org/10.1038/nri3535

Burke, K. E., & Lamont, J. T. (2014). Clostridium difficile infection: a worldwide disease. *Gut and liver*, *8*(1), 1–6. https://doi.org/10.5009/gnl.2014.8.1.1

Cabral, D. J., Penumutchu, S., Norris, C., Morones-Ramirez, J. R., & Belenky, P. (2018). Microbial competition between *Escherichia coli* and *Candida albicans* reveals a soluble fungicidal factor. *Microbial cell (Graz, Austria)*, *5*(5), 249–255. https://doi.org/10.15698/mic2018.05.631

Calderone R. A. & Clancy C. J. (2012). Candida and candidiasis (2nd ed.). ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555817176

Carlson E. (1983a). Effect of strain of Staphylococcus aureus on synergism with Candida albicans resulting in mouse mortality and morbidity. *Infection and immunity*, *42*(1), 285–292. https://doi.org/10.1128/iai.42.1.285-292.1983

Carlson E. (1983b). Enhancement by Candida albicans of Staphylococcus aureus, Serratia marcescens, and Streptococcus faecalis in the establishment of infection in mice. *Infection and immunity*, *39*(1), 193–197. https://doi.org/10.1128/iai.39.1.193-197.1983

Carruba, G., Pontieri, E., De Bernardis, F., Martino, P., & Cassone, A. (1991). DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of Candida parapsilosis. *Journal of clinical microbiology*, *29*(5), 916–922. https://doi.org/10.1128/jcm.29.5.916-922.1991

Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., & Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science (New York, N.Y.)*, *313*(5790), 1126–1130. https://doi.org/10.1126/science.1127119

Chacón, M. R., Lozano-Bartolomé, J., Portero-Otín, M., Rodríguez, M. M., Xifra, G., Puig, J., Blasco, G., Ricart, W., Chaves, F. J., & Fernández-Real, J. M. (2018). The gut mycobiome composition is linked to carotid atherosclerosis. *Beneficial microbes*, *9*(2), 185–198. https://doi.org/10.3920/BM2017.0029

Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports*, *11*(12), 914–920. https://doi.org/10.1038/embor.2010.179

Chassaing, B., Compher, C., Bonhomme, B., Liu, Q., Tian, Y., Walters, W., Nessel, L., Delaroque, C., Hao, F., Gershuni, V., Chau, L., Ni, J., Bewtra, M., Albenberg, L., Bretin, A., McKeever, L., Ley, R. E., Patterson, A. D., Wu, G. D., Gewirtz, A. T., … Lewis, J. D. (2022). Randomized Controlled-Feeding Study of Dietary Emulsifier Carboxymethylcellulose Reveals Detrimental Impacts on the Gut Microbiota and Metabolome. *Gastroenterology*, *162*(3), 743–756. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.006

Chen, C., Pande, K., French, S. D., Tuch, B. B., & Noble, S. M. (2011). An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in Candida albicans commensalism and pathogenesis. *Cell host & microbe*, *10*(2), 118–135. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.07.005

Chen, Y., Chen, Z., Guo, R., Chen, N., Lu, H., Huang, S., Wang, J., & Li, L. (2011). Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *70*(4), 492–498. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.005

Chenault, S. S., & Earhart, C. F. (1992). Identification of hydrophobic proteins FepD and FepG of the Escherichia coli ferrienterobactin permease. *Journal of general microbiology*, *138*(10), 2167–2171. https://doi.org/10.1099/00221287-138-10-2167

Chin, S. F., Megat Mohd Azlan, P. I. H., Mazlan, L., & Neoh, H. M. (2018). Identification of *Schizosaccharomyces pombe* in the guts of healthy individuals and patients with colorectal cancer: preliminary evidence from a gut microbiome secretome study. *Gut pathogens*, *10*, 29. https://doi.org/10.1186/s13099-018-0258-5

Chin, V. K., Yong, V. C., Chong, P. P., Amin Nordin, S., Basir, R., & Abdullah, M. (2020). Mycobiome in the Gut: A Multiperspective Review. *Mediators of inflammation*, *2020*, 9560684. https://doi.org/10.1155/2020/9560684

Chu, H., Duan, Y., Lang, S., Jiang, L., Wang, Y., Llorente, C., Liu, J., Mogavero, S., Bosques-Padilla, F., Abraldes, J. G., Vargas, V., Tu, X. M., Yang, L., Hou, X., Hube, B., Stärkel, P., & Schnabl, B. (2020). The Candida albicans exotoxin candidalysin promotes alcohol-associated liver disease. *Journal of hepatology*, *72*(3), 391–400. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.09.029

Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J., Anderson, K. L., Dattilo, B. M., Dunman, P. M., Gerads, R., Caprioli, R. M., Nacken, W., Chazin, W. J., & Skaar, E. P. (2008). Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5865), 962–965. https://doi.org/10.1126/science.1152449

Corthier, G., Dubos, F., & Ducluzeau, R. (1986). Prevention of Clostridium difficile induced mortality in gnotobiotic mice by Saccharomyces boulardii. *Canadian journal of microbiology*, *32*(11), 894–896. https://doi.org/10.1139/m86-164

Cruz, M. R., Graham, C. E., Gagliano, B. C., Lorenz, M. C., & Garsin, D. A. (2013). Enterococcus faecalis inhibits hyphal morphogenesis and virulence of Candida albicans. *Infection and immunity*, *81*(1), 189–200. https://doi.org/10.1128/IAI.00914-12

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559–563. https://doi.org/10.1038/nature12820

de Sablet, T., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., Vareille, M., Gobert, A. P., & Martin, C. (2009). Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infection and immunity*, *77*(2), 783–790. https://doi.org/10.1128/IAI.01048-08

De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, *13*(4), 194–199. https://doi.org/10.1159/000104752

Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *54*(Pt 5), 1469–1476. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0

Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Nature reviews. Microbiology*, *5*(12), 939–951. https://doi.org/10.1038/nrmicro1789

Doron, I., Leonardi, I., Li, X. V., Fiers, W. D., Semon, A., Bialt-DeCelie, M., Migaud, M., Gao, I. H., Lin, W. Y., Kusakabe, T., Puel, A., & Iliev, I. D. (2021). Human gut mycobiota tune immunity via CARD9-dependent induction of anti-fungal IgG antibodies. *Cell*, *184*(4), 1017–1031.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.016

Doron, I., Mesko, M., Li, X. V., Kusakabe, T., Leonardi, I., Shaw, D. G., Fiers, W. D., Lin, W. Y., Bialt-DeCelie, M., Román, E., Longman, R. S., Pla, J., Wilson, P. C., & Iliev, I. D. (2021). Mycobiota-induced IgA antibodies regulate fungal commensalism in the gut and are dysregulated in Crohn's disease. *Nature microbiology*, *6*(12), 1493–1504. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00983-z

Eggimann, P., Que, Y. A., Revelly, J. P., & Pagani, J. L. (2015). Preventing invasive candida infections. Where could we do better?. *The Journal of hospital infection*, *89*(4), 302–308. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.006

Enaud, R., Vandenborght, L. E., Coron, N., Bazin, T., Prevel, R., Schaeverbeke, T., Berger, P., Fayon, M., Lamireau, T., & Delhaes, L. (2018). The Mycobiome: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Microorganisms*, *6*(1), 22. https://doi.org/10.3390/microorganisms6010022

Ene, I. V., Brunke, S., Brown, A. J., & Hube, B. (2014). Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *4*(12), a019695. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019695

Erb Downward, J. R., Falkowski, N. R., Mason, K. L., Muraglia, R., & Huffnagle, G. B. (2013). Modulation of post-antibiotic bacterial community reassembly and host response by Candida albicans. *Scientific reports*, *3*, 2191. https://doi.org/10.1038/srep02191

Evans, C. C., LePard, K. J., Kwak, J. W., Stancukas, M. C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y., Leone, V., Antonopoulos, D. A., Smith, D., Chang, E. B., & Ciancio, M. J. (2014). Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PloS one*, *9*(3), e92193. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092193

Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C. H., Gonzalez-Begne, M., Watson, G., Krysan, D. J., Bowen, W. H., & Koo, H. (2014). Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and immunity*, *82*(5), 1968–1981. https://doi.org/10.1128/IAI.00087-14

Fan, D., Coughlin, L. A., Neubauer, M. M., Kim, J., Kim, M. S., Zhan, X., Simms-Waldrip, T. R., Xie, Y., Hooper, L. V., & Koh, A. Y. (2015). Activation of HIF-1α and LL-37 by commensal bacteria inhibits Candida albicans colonization. *Nature medicine*, *21*(7), 808–814. https://doi.org/10.1038/nm.3871

Fiers, W. D., Gao, I. H., & Iliev, I. D. (2019). Gut mycobiota under scrutiny: fungal symbionts or environmental transients?. *Current opinion in microbiology*, *50*, 79–86. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.010

Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L. (2011). Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell host & microbe*, *10*(4), 336–347. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.002

Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes*, *3*(4), 289–306. https://doi.org/10.4161/gmic.19897

Fox, E. P., Cowley, E. S., Nobile, C. J., Hartooni, N., Newman, D. K., & Johnson, A. D. (2014). Anaerobic bacteria grow within Candida albicans biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Current biology : CB*, *24*(20), 2411–2416. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.057

Fujimura, K. E., Sitarik, A. R., Havstad, S., Lin, D. L., Levan, S., Fadrosh, D., Panzer, A. R., LaMere, B., Rackaityte, E., Lukacs, N. W., Wegienka, G., Boushey, H. A., Ownby, D. R., Zoratti, E. M., Levin, A. M., Johnson, C. C., & Lynch, S. V. (2016). Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nature medicine*, *22*(10), 1187–1191. https://doi.org/10.1038/nm.4176

Gabaldón, T., & Carreté, L. (2016). The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in Candida glabrata. *FEMS yeast research*, *16*(2), fov110. https://doi.org/10.1093/femsyr/fov110

Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., Eberl, G., Snel, J., Kelly, D., & Cerf-Bensussan, N. (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, *31*(4), 677–689. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020

Gadanho, M., & Sampaio, J. P. (2005). Occurrence and diversity of yeasts in the mid-atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microbial ecology*, *50*(3), 408–417. https://doi.org/10.1007/s00248-005-0195-y

Gaddy, J. A., Tomaras, A. P., & Actis, L. A. (2009). The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection and immunity*, *77*(8), 3150–3160. https://doi.org/10.1128/IAI.00096-09

Gagnon, M., Kheadr, E. E., Le Blay, G., & Fliss, I. (2004). In vitro inhibition of Escherichia coli O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International journal of food microbiology*, *92*(1), 69–78. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.010

Gao, R., Kong, C., Li, H., Huang, L., Qu, X., Qin, N., & Qin, H. (2017). Dysbiosis signature of mycobiota in colon polyp and colorectal cancer. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *36*(12), 2457–2468. https://doi.org/10.1007/s10096-017-3085-6

Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS pathogens*, *6*(1), e1000713. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713

Giaffer, M. H., Clark, A., & Holdsworth, C. D. (1992). Antibodies to Saccharomyces cerevisiae in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *Gut*, *33*(8), 1071–1075. https://doi.org/10.1136/gut.33.8.1071

Gil, M. L., & Gozalbo, D. (2009). Role of Toll-like receptors in systemic Candida albicans infections. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *14*(2), 570–582. https://doi.org/10.2741/3263

Goddard M. R. (2008). Quantifying the complexities of Saccharomyces cerevisiae's ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, *89*(8), 2077–2082. https://doi.org/10.1890/07-2060.1

Godinez, I., Haneda, T., Raffatellu, M., George, M. D., Paixão, T. A., Rolán, H. G., Santos, R. L., Dandekar, S., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J. (2008). T cells help to amplify inflammatory responses induced by Salmonella enterica serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infection and immunity*, *76*(5), 2008–2017. https://doi.org/10.1128/IAI.01691-07

Gosiewski, T., Salamon, D., Szopa, M., Sroka, A., Malecki, M. T., & Bulanda, M. (2014). Quantitative evaluation of fungi of the genus Candida in the feces of adult patients with type 1 and 2 diabetes- a pilot study. *Gut pathogens*, *6*(1), 43. https://doi.org/10.1186/s13099-014-0043-z

Gouba, N., Raoult, D., & Drancourt, M. (2014). Gut microeukaryotes during anorexia nervosa: a case report. *BMC research notes*, *7*, 33. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-33

Gouba, N., Raoult, D., & Drancourt, M. (2013). Plant and fungal diversity in gut microbiota as revealed by molecular and culture investigations. *PloS one*, *8*(3), e59474. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059474

Graham, C. E., Cruz, M. R., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2017). *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(17), 4507–4512. https://doi.org/10.1073/pnas.1620432114

Hallen-Adams, H.E., Kachman, S.D., Kim, J., Legge, R.M., Martinez, I., 2015. Fungi inhabiting the healthy human gastrointestinal tract: a diverse and dynamic community. *Fungal Ecol*. 15, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.01.006.

Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2010). Ability of Candida albicans mutants to induce Staphylococcus aureus vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(9), 3746–3755. https://doi.org/10.1128/AAC.00573-10

Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2005). Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of medical microbiology*, *54*(Pt 11), 1093–1101. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45935-0

Hermann, C., Hermann, J., Munzel, U., & Rüchel, R. (1999). Bacterial flora accompanying Candida yeasts in clinical specimens. *Mycoses*, *42*(11-12), 619–627. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00519.x

Hernández-Santos, N., & Gaffen, S. L. (2012). Th17 cells in immunity to Candida albicans. *Cell host & microbe*, *11*(5), 425–435. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.008

Herwald, S. E., & Kumamoto, C. A. (2014). *Candida albicans* Niche Specialization: Features That Distinguish Biofilm Cells from Commensal Cells. *Current fungal infection reports*, *8*(2), 179–184. https://doi.org/10.1007/s12281-014-0178-x

Hickman, M. A., Zeng, G., Forche, A., Hirakawa, M. P., Abbey, D., Harrison, B. D., Wang, Y. M., Su, C. H., Bennett, R. J., Wang, Y., & Berman, J. (2013). The 'obligate diploid' Candida albicans forms mating-competent haploids. *Nature*, *494*(7435), 55–59. https://doi.org/10.1038/nature11865

Hoarau, G., Mukherjee, P. K., Gower-Rousseau, C., Hager, C., Chandra, J., Retuerto, M. A., Neut, C., Vermeire, S., Clemente, J., Colombel, J. F., Fujioka, H., Poulain, D., Sendid, B., & Ghannoum, M. A. (2016). Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease. *mBio*, *7*(5), e01250-16. https://doi.org/10.1128/mBio.01250-16

Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., & Bushman, F. D. (2013). Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PloS one*, *8*(6), e66019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019

Hohmann E. L. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *32*(2), 263–269. https://doi.org/10.1086/318457

Holcombe, L. J., McAlester, G., Munro, C. A., Enjalbert, B., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., Ding, C., Butler, G., O'Gara, F., & Morrissey, J. P. (2010). Pseudomonas aeruginosa secreted factors impair biofilm development in Candida albicans. *Microbiology (Reading, England)*, *156*(Pt 5), 1476–1486. https://doi.org/10.1099/mic.0.037549-0

Horsley, H., Malone-Lee, J., Holland, D., Tuz, M., Hibbert, A., Kelsey, M., Kupelian, A., & Rohn, J. L. (2013). Enterococcus faecalis subverts and invades the host urothelium in patients with chronic urinary tract infection. *PloS one*, *8*(12), e83637. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083637

Huang, J., Wu, Q., Lin, Z., Liu, S., Su, Q., & Pan, Y. (2020). Therapeutic effects of chitin from Pleurotus eryngii on high-fat diet induced obesity in rats. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, *19*(3), 279–289. https://doi.org/10.17306/J.AFS.0775

Ianiro, G., Tilg, H., & Gasbarrini, A. (2016). Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*, *65*(11), 1906–1915. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312297

Iliev, I. D., Funari, V. A., Taylor, K. D., Nguyen, Q., Reyes, C. N., Strom, S. P., Brown, J., Becker, C. A., Fleshner, P. R., Dubinsky, M., Rotter, J. I., Wang, H. L., McGovern, D. P., Brown, G. D., & Underhill, D. M. (2012). Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6086), 1314–1317. https://doi.org/10.1126/science.1221789

Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., & Littman, D. R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, *139*(3), 485–498. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033

Jain, U., Ver Heul, A. M., Xiong, S., Gregory, M. H., Demers, E. G., Kern, J. T., Lai, C. W., Muegge, B. D., Barisas, D. A. G., Leal-Ekman, J. S., Deepak, P., Ciorba, M. A., Liu, T. C., Hogan, D. A., Debbas, P., Braun, J., McGovern, D. P. B., Underhill, D. M., & Stappenbeck, T. S. (2021). *Debaryomyces* is enriched in Crohn's disease intestinal tissue and impairs healing in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *371*(6534), 1154–1159. https://doi.org/10.1126/science.abd0919

Jiang, T. T., Shao, T. Y., Ang, W. X. G., Kinder, J. M., Turner, L. H., Pham, G., Whitt, J., Alenghat, T., & Way, S. S. (2017). Commensal Fungi Recapitulate the Protective Benefits of Intestinal Bacteria. *Cell host & microbe*, *22*(6), 809–816.e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.013

Juyal, D., Sharma, M., Pal, S., Rathaur, V. K., & Sharma, N. (2013). Emergence of non-albicans Candida species in neonatal candidemia. *North American journal of medical sciences*, *5*(9), 541–545. https://doi.org/10.4103/1947-2714.118919

Kagami, S., Rizzo, H. L., Kurtz, S. E., Miller, L. S., & Blauvelt, A. (2010). IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against Candida albicans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *185*(9), 5453–5462. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001153

Kamada, N., Kim, Y. G., Sham, H. P., Vallance, B. A., Puente, J. L., Martens, E. C., & Núñez, G. (2012). Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6086), 1325–1329. https://doi.org/10.1126/science.1222195

Kang, D., , Su, M., , Duan, Y., , & Huang, Y., (2019). Eurotium cristatum, a potential probiotic fungus from Fuzhuan brick tea, alleviated obesity in mice by modulating gut microbiota. *Food & function*, *10*(8), 5032–5045. https://doi.org/10.1039/c9fo00604d

Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, A., Vesterlund, S., Hendrickx, A. P., Lebeer, S., de Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., ... de Vos, W. M. (2009). Comparative genomic analysis of Lactobacillus rhamnosus GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(40), 17193-17198. https://doi.org/10.1073/pnas.0908876106

Kapitan, M., Niemiec, M. J., Steimle, A., Frick, J. S., & Jacobsen, I. D. (2019). Fungi as Part of the Microbiota and Interactions with Intestinal Bacteria. *Current topics in microbiology and immunology*, *422*, 265–301. https://doi.org/10.1007/82_2018_117

Kasper, L., König, A., Koenig, P. A., Gresnigt, M. S., Westman, J., Drummond, R. A., Lionakis, M. S., Groß, O., Ruland, J., Naglik, J. R., & Hube, B. (2018). The fungal peptide toxin Candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. *Nature communications*, *9*(1), 4260. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06607-1

Katagiri, H., Fukui, K., Nakamura, K., & Tanaka, A. (2018). Systemic hematogenous dissemination of mouse oral candidiasis is induced by oral mucositis. *Odontology*, *106*(4), 389–397. https://doi.org/10.1007/s10266-018-0366-1

Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic Saccharomyces boulardii for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic advances in gastroenterology*, *5*(2), 111–125. https://doi.org/10.1177/1756283X11428502

Khutoryanskiy V. V. (2015). Supramolecular materials: Longer and safer gastric residence. *Nature materials*, *14*(10), 963–964. https://doi.org/10.1038/nmat4432

Kim, S. H., Yoon, Y. K., Kim, M. J., & Sohn, J. W. (2013). Risk factors for and clinical implications of mixed Candida/bacterial bloodstream infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *19*(1), 62–68. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03906.x

Kim, Y., & Mylonakis, E. (2011). Killing of Candida albicans filaments by Salmonella enterica serovar Typhimurium is mediated by sopB effectors, parts of a type III secretion system. *Eukaryotic cell*, *10*(6), 782–790. https://doi.org/10.1128/EC.00014-11

Klaerner, H. G., Uknis, M. E., Acton, R. D., Dahlberg, P. S., Carlone-Jambor, C., & Dunn, D. L. (1997). Candida albicans and Escherichia coli are synergistic pathogens during experimental microbial peritonitis. *The Journal of surgical research*, *70*(2), 161–165. https://doi.org/10.1006/jsre.1997.5110

Klastersky, J., & Aoun, M. (2004). Opportunistic infections in patients with cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *15 Suppl 4*, iv329–iv335. https://doi.org/10.1093/annonc/mdh947

Klotz, S. A., Chasin, B. S., Powell, B., Gaur, N. K., & Lipke, P. N. (2007). Polymicrobial bloodstream infections involving Candida species: analysis of patients and review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *59*(4), 401–406. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.001

Kobayashi, C., Watanabe, Y., Oshima, M., Hirose, T., Yamasaki, M., Iwamoto, M., Iwatsuki, M., Asami, Y., Kuramochi, K., Wakae, K., Aizaki, H., Muramatsu, M., Sureau, C., Sunazuka, T., & Watashi, K. (2022). Fungal Secondary Metabolite Exophillic Acid Selectively Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses. *Viruses*, *14*(4), 764. https://doi.org/10.3390/v14040764

Koc, A. N., Silici, S., MUTLU-SARIGUZEL, F., & Sagdic, O., (2007). Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technology And Biotechnology* , vol.45, no.1, 57-61.

Komiyama, E. Y., Lepesqueur, L. S., Yassuda, C. G., Samaranayake, L. P., Parahitiyawa, N. B., Balducci, I., & Koga-Ito, C. Y. (2016). Enterococcus Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. *PloS one*, *11*(9), e0163001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163001

Kong, H. H., & Segre, J. A. (2020). Cultivating fungal research. *Science (New York, N.Y.)*, *368*(6489), 365–366. https://doi.org/10.1126/science.aaz8086

Kong, E. F., Tsui, C., Kucharíková, S., Andes, D., Van Dijck, P., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Commensal Protection of Staphylococcus aureus against Antimicrobials by Candida albicans Biofilm Matrix. *mBio*, *7*(5), e01365-16. https://doi.org/10.1128/mBio.01365-16

Kowalewska, B., Zorena, K., Szmigiero-Kawko, M., Wąż, P., & Myśliwiec, M. (2016). Higher diversity in fungal species discriminates children with type 1 diabetes mellitus from healthy control. *Patient preference and adherence*, *10*, 591–599. https://doi.org/10.2147/PPA.S97852

Krause, J., Geginat, G., & Tammer, I. (2015). Prostaglandin E2 from Candida albicans Stimulates the Growth of Staphylococcus aureus in Mixed Biofilms. *PloS one*, *10*(8), e0135404. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135404

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, *73*(4), 331–371. https://doi.org/10.1023/a:1001761008817

Lam, S., Zuo, T., Ho, M., Chan, F. K. L., Chan, P. K. S., & Ng, S. C. (2019). Review article: fungal alterations in inflammatory bowel diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *50*(11-12), 1159–1171. https://doi.org/10.1111/apt.15523

Lang, S., Duan, Y., Liu, J., Torralba, M. G., Kuelbs, C., Ventura-Cots, M., Abraldes, J. G., Bosques-Padilla, F., Verna, E. C., Brown, R. S., Jr, Vargas, V., Altamirano, J., Caballería, J., Shawcross, D., Lucey, M. R., Louvet, A., Mathurin, P., Garcia-Tsao, G., Ho, S. B., Tu, X. M., … Schnabl, B. (2020). Intestinal Fungal Dysbiosis and Systemic Immune Response to Fungi in Patients With Alcoholic Hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *71*(2), 522–538. https://doi.org/10.1002/hep.30832

Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease. *Lancet (London, England)*, *391*(10115), 70–81. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8

Lee, J. S., Tato, C. M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M. F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Judo, M., Ayanoglu, G., McClanahan, T. K., Li, X., & Cua, D. J. (2015). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity*, *43*(4), 727–738. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.003

Lee, N. Y., Lee, H. C., Ko, N. Y., Chang, C. M., Shih, H. I., Wu, C. J., & Ko, W. C. (2007). Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial Acinetobacter baumannii bacteremia. *Infection control and hospital epidemiology*, *28*(6), 713–719. https://doi.org/10.1086/517954

Lemoinne, S., Kemgang, A., Ben Belkacem, K., Straube, M., Jegou, S., Corpechot, C., Saint-Antoine IBD Network, Chazouillères, O., Housset, C., & Sokol, H. (2020). Fungi participate in the dysbiosis of gut microbiota in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut*, *69*(1), 92–102. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317791

Levison, M. E., & Pitsakis, P. G. (1987). Susceptibility to experimental Candida albicans urinary tract infection in the rat. *The Journal of infectious diseases*, *155*(5), 841–846. https://doi.org/10.1093/infdis/155.5.841

Leonardi, I., Gao, I. H., Lin, W. Y., Allen, M., Li, X. V., Fiers, W. D., De Celie, M. B., Putzel, G. G., Yantiss, R. K., Johncilla, M., Colak, D., & Iliev, I. D. (2022). Mucosal fungi promote gut barrier function and social behavior via Type 17 immunity. *Cell*, *185*(5), 831–846.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.017

Leonardi, I., Li, X., Semon, A., Li, D., Doron, I., Putzel, G., Bar, A., Prieto, D., Rescigno, M., McGovern, D. P. B., Pla, J., & Iliev, I. D. (2018). CX3CR1^{+} mononuclear phagocytes control immunity to intestinal fungi. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6372), 232–236. https://doi.org/10.1126/science.aao1503

Li, Q., Wang, C., Tang, C., He, Q., Li, N., & Li, J. (2014). Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in Crohn's disease. *Journal of clinical gastroenterology*, *48*(6), 513–523. https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000035

Li, X. V., Leonardi, I., Putzel, G. G., Semon, A., Fiers, W. D., Kusakabe, T., Lin, W. Y., Gao, I. H., Doron, I., Gutierrez-Guerrero, A., DeCelie, M. B., Carriche, G. M., Mesko, M., Yang, C., Naglik, J. R., Hube, B., Scherl, E.J., & Iliev, I.D. (2022). Immune regulation by fungal strain diversity in inflammatory bowel disease. *Nature*, *603*(7902), 672–678. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04502-w

Li, X.V., Leonardi, I., & Iliev, I.D. (2019). Gut Mycobiota in Immunity and Inflammatory Disease. *Immunity*, *50*(6), 1365–1379. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.023

Li, Y., Komai-Koma, M., Gilchrist, D. S., Hsu, D. K., Liu, F. T., Springall, T., & Xu, D. (2008). Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(4), 2781–2789. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2781

Liguori, G., Lamas, B., Richard, M. L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., Di Simone, M. P., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M., & Sokol, H. (2016). Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *Journal of Crohn's & colitis*, *10*(3), 296–305. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv209

Limon, J. J., Tang, J., Li, D., Wolf, A. J., Michelsen, K. S., Funari, V., Gargus, M., Nguyen, C., Sharma, P., Maymi, V. I., Iliev, I. D., Skalski, J. H., Brown, J., Landers, C., Borneman, J., Braun, J., Targan, S. R., McGovern, D. P. B., & Underhill, D. M. (2019). Malassezia Is Associated with Crohn's Disease and Exacerbates Colitis in Mouse Models. *Cell host & microbe*, *25*(3), 377–388.e6. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.007

Limon, J. J., Skalski, J. H., & Underhill, D. M. (2017). Commensal Fungi in Health and Disease. *Cell host & microbe*, *22*(2), 156–165. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.002

Ling, Z., Zhu, M., Liu, X., Shao, L., Cheng, Y., Yan, X., Jiang, R., & Wu, S. (2021). Fecal Fungal Dysbiosis in Chinese Patients With Alzheimer's Disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 631460. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.631460

Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous C. albicans mutants are avirulent. *Cell*, *90*(5), 939–949. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80358-x

López-García, B., Lee, P. H., Yamasaki, K., & Gallo, R. L. (2005). Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in Candida albicans skin infection. *The Journal of investigative dermatology*, *125*(1), 108–115. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23713.x

Louis, P., Young, P., Holtrop, G., & Flint, H. J. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental microbiology*, *12*(2), 304–314. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x

Luan, C., Xie, L., Yang, X., Miao, H., Lv, N., Zhang, R., Xiao, X., Hu, Y., Liu, Y., Wu, N., Zhu, Y., & Zhu, B. (2015). Dysbiosis of fungal microbiota in the intestinal mucosa of patients with colorectal adenomas. *Scientific reports*, *5*, 7980. https://doi.org/10.1038/srep07980

Malani, A. N., Psarros, G., Malani, P. N., & Kauffman, C. A. (2011). Is age a risk factor for Candida glabrata colonisation?. *Mycoses*, *54*(6), 531–537. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01941.x

Mar Rodríguez, M., Pérez, D., Javier Chaves, F., Esteve, E., Marin-Garcia, P., Xifra, G., Vendrell, J., Jové, M., Pamplona, R., Ricart, W., Portero-Otin, M., Chacón, M. R., & Fernández Real, J. M. (2015). Obesity changes the human gut mycobiome. *Scientific reports*, *5*, 14600. https://doi.org/10.1038/srep14600

Markey, L., Shaban, L., Green, E. R., Lemon, K. P., Mecsas, J., & Kumamoto, C. A. (2018). Pre-colonization with the commensal fungus Candida albicans reduces murine susceptibility to Clostridium difficile infection. *Gut microbes*, *9*(6), 497–509. https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1465158

Mason, K. L., Erb Downward, J. R., Falkowski, N. R., Young, V. B., Kao, J. Y., & Huffnagle, G. B. (2012a). Interplay between the gastric bacterial microbiota and Candida albicans during postantibiotic recolonization and gastritis. *Infection and immunity*, *80*(1), 150–158. https://doi.org/10.1128/IAI.05162-11

Mason, K. L., Erb Downward, J. R., Mason, K. D., Falkowski, N. R., Eaton, K. A., Kao, J. Y., Young, V. B., & Huffnagle, G. B. (2012b). Candida albicans and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. *Infection and immunity*, *80*(10), 3371–3380. https://doi.org/10.1128/IAI.00449-12

Massot, J., Sanchez, O., Couchy, R., Astoin, J., & Parodi, A. L. (1984). Bacterio-pharmacological activity of Saccharomyces boulardii in clindamycin-induced colitis in the hamster. *Arzneimittel-Forschung*, *34*(7), 794–797.

Meador, J. P., Caldwell, M. E., Cohen, P. S., & Conway, T. (2014). Escherichia coli pathotypes occupy distinct niches in the mouse intestine. *Infection and immunity*, *82*(5), 1931–1938. https://doi.org/10.1128/IAI.01435-13

Medeiros, A. O., Kohler, L. M., Hamdan, J. S., Missagia, B. S., Barbosa, F. A., & Rosa, C. A. (2008). Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water research*, *42*(14), 3921–3929. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.026

Misic, A. M., Davis, M. F., Tyldsley, A. S., Hodkinson, B. P., Tolomeo, P., Hu, B., Nachamkin, I., Lautenbach, E., Morris, D. O., & Grice, E. A. (2015). The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from Staphylococcus carriage sites. *Microbiome*, *3*, 2. https://doi.org/10.1186/s40168-014-0052-7

Mohamadi, J., Motaghi, M., Panahi, J., Havasian, M. R., Delpisheh, A., Azizian, M., & Pakzad, I. (2014). Anti-fungal resistance in candida isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. *Bioinformation*, *10*(11), 667–670. https://doi.org/10.6026/97320630010667

Mootsikapun P. (2007). Bacteremia in adult patients with acquired immunodeficiency syndrome in the northeast of Thailand. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, *11*(3), 226–231. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.02.010

Morschhäuser J. (2010). Regulation of white-opaque switching in Candida albicans. *Medical microbiology and immunology*, *199*(3), 165–172. https://doi.org/10.1007/s00430-010-0147-0

Mukherjee, P. K., Chandra, J., Retuerto, M., Tatsuoka, C., Ghannoum, M. A., & McComsey, G. A. (2018). Dysbiosis in the oral bacterial and fungal microbiome of HIV-infected subjects is associated with clinical and immunologic variables of HIV infection. *PloS one*, *13*(7), e0200285. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200285

Nagata, R., Nagano, H., Ogishima, D., Nakamura, Y., Hiruma, M., & Sugita, T. (2012). Transmission of the major skin microbiota, Malassezia, from mother to neonate. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*, *54*(3), 350–355. https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2012.03563.x

Nagpal, R., Neth, B. J., Wang, S., Mishra, S. P., Craft, S., & Yadav, H. (2020). Gut mycobiome and its interaction with diet, gut bacteria and alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment: A pilot study. *EBioMedicine*, *59*, 102950. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102950

Nakagawa, T., Mori, N., Kajiwara, C., Kimura, S., Akasaka, Y., Ishii, Y., Saji, T., & Tateda, K. (2016). Endogenous IL-17 as a factor determining the severity of Clostridium difficile infection in mice. *Journal of medical microbiology*, *65*(8), 821–827. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000273

Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, *5*(1), 153. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4

Nauseef, W. M., Root, R. K., & Malech, H. L. (1983). Biochemical and immunologic analysis of hereditary myeloperoxidase deficiency. *The Journal of clinical investigation*, *71*(5), 1297–1307. https://doi.org/10.1172/jci110880

Nelson, A., Stewart, C. J., Kennedy, N. A., Lodge, J. K., Tremelling, M., UK IBD Genetics Consortium, Probert, C. S., Parkes, M., Mansfield, J. C., Smith, D. L., Hold, G. L., Lees, C. W., Bridge, S. H., & Lamb, C. A. (2021). The Impact of NOD2 Genetic Variants on the Gut Mycobiota in Crohn's Disease Patients in Remission and in Individuals Without Gastrointestinal Inflammation. *Journal of Crohn's & colitis*, *15*(5), 800–812. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa220

Nerandzic, M. M., Mullane, K., Miller, M. A., Babakhani, F., & Donskey, C. J. (2012). Reduced acquisition and overgrowth of vancomycin-resistant enterococci and Candida species in patients treated with fidaxomicin versus vancomycin for Clostridium difficile infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *55 Suppl 2*(Suppl 2), S121–S126. https://doi.org/10.1093/cid/cis440

Nielsen, D. S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K., & Jespersen, L. (2005). Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast (Chichester, England)*, *22*(4), 271–284. https://doi.org/10.1002/yea.1207

Nizet, V., & Johnson, R. S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature reviews. Immunology*, *9*(9), 609–617. https://doi.org/10.1038/nri2607

Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature reviews. Microbiology*, *15*(2), 96–108. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157

Noverr, M. C., & Huffnagle, G. B. (2004). Regulation of Candida albicans morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infection and immunity*, *72*(11), 6206–6210. https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6206-6210.2004

Odds, F. C., Davidson, A. D., Jacobsen, M. D., Tavanti, A., Whyte, J. A., Kibbler, C. C., Ellis, D. H., Maiden, M. C., Shaw, D. J., & Gow, N. A. (2006). Candida albicans strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*, *44*(10), 3647–3658. https://doi.org/10.1128/JCM.00934-06

Ost, K. S., O'Meara, T. R., Stephens, W. Z., Chiaro, T., Zhou, H., Penman, J., Bell, R., Catanzaro, J. R., Song, D., Singh, S., Call, D. H., Hwang-Wong, E., Hanson, K. E., Valentine, J. F., Christensen, K. A., O'Connell, R. M., Cormack, B., Ibrahim, A. S., Palm, N. W., Noble, S. M., … Round, J. L. (2021). Adaptive immunity induces mutualism between commensal eukaryotes. *Nature*, *596*(7870), 114–118. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03722-w

Pande, K., Chen, C., & Noble, S. M. (2013). Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes Candida albicans commensalism. *Nature genetics*, *45*(9), 1088–1091. https://doi.org/10.1038/ng.2710

Pappas P. G. (2006). Invasive candidiasis. *Infectious disease clinics of North America*, *20*(3), 485–506. https://doi.org/10.1016/j.idc.2006.07.004

Pasqualotto, A. C., Nedel, W. L., Machado, T. S., & Severo, L. C. (2006). Risk factors and outcome for nosocomial breakthrough candidaemia. *The Journal of infection*, *52*(3), 216–222. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.04.020

Peleg, A. Y., Tampakakis, E., Fuchs, B. B., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Jr, & Mylonakis, E. (2008). Prokaryote-eukaryote interactions identified by using Caenorhabditis elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(38), 14585–14590. https://doi.org/10.1073/pnas.0805048105

Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O., & Villani, F. (2008). Isolation of Saccharomyces cerevisiae strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *Journal of applied microbiology*, *105*(6), 1919–1928. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03968.x

Pépin, J., Saheb, N., Coulombe, M. A., Alary, M. E., Corriveau, M. P., Authier, S., Leblanc, M., Rivard, G., Bettez, M., Primeau, V., Nguyen, M., Jacob, C. E., & Lanthier, L. (2005). Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for Clostridium difficile-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *41*(9), 1254–1260. https://doi.org/10.1086/496986

Pérez J. C. (2021). Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance. *International journal of medical microbiology : IJMM*, *311*(3), 151490. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151490

Pérez J. C. (2019). Candida albicans dwelling in the mammalian gut. *Current opinion in microbiology*, *52*, 41–46. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.007

Pessione E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *2*, 86. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086

Peyssonnaux, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E. A., Gallo, R. L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V., & Johnson, R. S. (2005). HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *The Journal of clinical investigation*, *115*(7), 1806–1815. https://doi.org/10.1172/JCI23865

Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messer, S. A., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2011). Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among Candida bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *Journal of clinical microbiology*, *49*(1), 396–399. https://doi.org/10.1128/JCM.01398-10

Pierce, J. V., Dignard, D., Whiteway, M., & Kumamoto, C. A. (2013). Normal adaptation of Candida albicans to the murine gastrointestinal tract requires Efg1p-dependent regulation of metabolic and host defense genes. *Eukaryotic cell*, *12*(1), 37–49. https://doi.org/10.1128/EC.00236-12

Pulimood, S., Ganesan, L., Alangaden, G., & Chandrasekar, P. (2002). Polymicrobial candidemia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *44*(4), 353–357. https://doi.org/10.1016/s0732-8893(02)00460-1

Raffatellu, M., George, M. D., Akiyama, Y., Hornsby, M. J., Nuccio, S. P., Paixao, T. A., Butler, B. P., Chu, H., Santos, R. L., Berger, T., Mak, T. W., Tsolis, R. M., Bevins, C. L., Solnick, J. V., Dandekar, S., & Bäumler, A. J. (2009). Lipocalin-2 resistance confers an advantage to Salmonella enterica serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell host & microbe*, *5*(5), 476–486. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.011

Raman, A. S., Gehrig, J. L., Venkatesh, S., Chang, H. W., Hibberd, M. C., Subramanian, S., Kang, G., Bessong, P. O., Lima, A. A. M., Kosek, M. N., Petri, W. A., Jr, Rodionov, D. A., Arzamasov, A. A., Leyn, S. A., Osterman, A. L., Huq, S., Mostafa, I., Islam, M., Mahfuz, M., Haque, R., … Gordon, J. I. (2019). A sparse covarying unit that describes healthy and impaired human gut microbiota development. *Science (New York, N.Y.)*, *365*(6449), eaau4735. https://doi.org/10.1126/science.aau4735

Rao, C., Coyte, K. Z., Bainter, W., Geha, R. S., Martin, C. R., & Rakoff-Nahoum, S. (2021). Multi-kingdom ecological drivers of microbiota assembly in preterm infants. *Nature*, *591*(7851), 633–638. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03241-8

Rea, M. C., Sit, C. S., Clayton, E., O'Connor, P. M., Whittal, R. M., Zheng, J., Vederas, J. C., Ross, R. P., & Hill, C. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against Clostridium difficile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(20), 9352–9357. https://doi.org/10.1073/pnas.0913554107

Richard, M. L., & Sokol, H. (2019). The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *16*(6), 331–345. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0121-2

Richard, M. L., Liguori, G., Lamas, B., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T. W., Pierluigi Di Simone, M., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M., & Sokol, H. (2018). Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer. *Gut microbes*, *9*(2), 131–142. https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1379637

Roilides, E., Farmaki, E., Evdoridou, J., Francesconi, A., Kasai, M., Filioti, J., Tsivitanidou, M., Sofianou, D., Kremenopoulos, G., & Walsh, T. J. (2003). Candida tropicalis in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *Journal of clinical microbiology*, *41*(2), 735–741. https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.735-741.2003

Rosenbach, A., Dignard, D., Pierce, J. V., Whiteway, M., & Kumamoto, C. A. (2010). Adaptations of Candida albicans for growth in the mammalian intestinal tract. *Eukaryotic cell*, *9*(7), 1075–1086. https://doi.org/10.1128/EC.00034-10

Roth, S., & Ruland, J. (2013). Caspase recruitment domain-containing protein 9 signaling in innate immunity and inflammation. *Trends in immunology*, *34*(6), 243–250. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.006

Rubino, S. J., Geddes, K., & Girardin, S. E. (2012). Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens. *Trends in immunology*, *33*(3), 112–118. https://doi.org/10.1016/j.it.2012.01.003

Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentín, E., & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of Candida albicans and its relation to pathogenicity. *FEMS yeast research*, *6*(1), 14–29. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x

Sassone-Corsi, M., Nuccio, S. P., Liu, H., Hernandez, D., Vu, C. T., Takahashi, A. A., Edwards, R. A., & Raffatellu, M. (2016). Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature*, *540*(7632), 280–283. https://doi.org/10.1038/nature20557

Sawa, N., Wilaipun, P., Kinoshita, S., Zendo, T., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2012). Isolation and characterization of enterocin W, a novel two-peptide lantibiotic produced by Enterococcus faecalis NKR-4-1. *Applied and environmental microbiology*, *78*(3), 900–903. https://doi.org/10.1128/AEM.06497-11

Schlecht, L. M., Peters, B. M., Krom, B. P., Freiberg, J. A., Hänsch, G. M., Filler, S. G., Jabra-Rizk, M. A., & Shirtliff, M. E. (2015). Systemic Staphylococcus aureus infection mediated by Candida albicans hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology (Reading, England)*, *161*(Pt 1), 168–181. https://doi.org/10.1099/mic.0.083485-0

Severance, E. G., Gressitt, K. L., Stallings, C. R., Katsafanas, E., Schweinfurth, L. A., Savage, C. L., Adamos, M. B., Sweeney, K. M., Origoni, A. E., Khushalani, S., Leweke, F. M., Dickerson, F. B., & Yolken, R. H. (2016). Candida albicans exposures, sex specificity and cognitive deficits in schizophrenia and bipolar disorder. *NPJ schizophrenia*, *2*, 16018. https://doi.org/10.1038/npjschz.2016.18

Severance, E. G., Alaedini, A., Yang, S., Halling, M., Gressitt, K. L., Stallings, C. R., Origoni, A. E., Vaughan, C., Khushalani, S., Leweke, F. M., Dickerson, F. B., & Yolken, R. H. (2012). Gastrointestinal inflammation and associated immune activation in schizophrenia. *Schizophrenia research*, *138*(1), 48–53. https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.02.025

Shah, S., Locca, A., Dorsett, Y., Cantoni, C., Ghezzi, L., Lin, Q., Bokoliya, S., Panier, H., Suther, C., Gormley, M., Liu, Y., Evans, E., Mikesell, R., Obert, K., Salter, A., Cross, A. H., Tarr, P. I., Lovett-Racke, A., Piccio, L., & Zhou, Y. (2021). Alterations of the gut mycobiome in patients with MS. *EBioMedicine*, *71*, 103557. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103557

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., & Soll, D. R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans. *Journal of bacteriology*, *169*(1), 189–197. https://doi.org/10.1128/jb.169.1.189-197.1987

Sohnle, P. G., Hahn, B. L., & Santhanagopalan, V. (1996). Inhibition of Candida albicans growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. *The Journal of infectious diseases*, *174*(6), 1369–1372. https://doi.org/10.1093/infdis/174.6.1369

Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M. L., & Beaugerie, L. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, *66*(6), 1039–1048. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746

Sonnenburg, J. L., Chen, C. T., & Gordon, J. I. (2006). Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS biology*, *4*(12), e413. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040413

Spatz, M., & Richard, M. L. (2020). Overview of the Potential Role of *Malassezia* in Gut Health and Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 201. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00201

Stelter, C., Käppeli, R., König, C., Krah, A., Hardt, W. D., Stecher, B., & Bumann, D. (2011). Salmonella-induced mucosal lectin RegIIIβ kills competing gut microbiota. *PloS one*, *6*(6), e20749. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020749

Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E., & Ernst, J. F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen Candida albicans, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *The EMBO journal*, *16*(8), 1982–1991. https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1982

Strati, F., Calabrò, A., Donati, C., De Felice, C., Hayek, J., Jousson, O., Leoncini, S., Renzi, D., Rizzetto, L., De Filippo, C., & Cavalieri, D. (2018). Intestinal Candida parapsilosis isolates from Rett syndrome subjects bear potential virulent traits and capacity to persist within the host. *BMC gastroenterology*, *18*(1), 57. https://doi.org/10.1186/s12876-018-0785-z

Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., Jousson, O., Leoncini, S., Renzi, D., Calabrò, A., & De Filippo, C. (2017). New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*, *5*(1), 24. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1

Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., Jousson, O., Leoncini, S., Pindo, M., Renzi, D., Rizzetto, L., Stefanini, I., Calabrò, A., & De Filippo, C. (2016). Altered gut microbiota in Rett syndrome. *Microbiome*, *4*(1), 41. https://doi.org/10.1186/s40168-016-0185-y

Strati, F., Di Paola, M., Stefanini, I., Albanese, D., Rizzetto, L., Lionetti, P., Calabrò, A., Jousson, O., Donati, C., Cavalieri, D., & De Filippo, C. (2016). Age and Gender Affect the Composition of Fungal Population of the Human Gastrointestinal Tract. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1227. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01227

Sudbery P. E. (2011). Growth of Candida albicans hyphae. *Nature reviews. Microbiology*, *9*(10), 737–748. https://doi.org/10.1038/nrmicro2636

Suh, S. O., Nguyen, N. H., & Blackwell, M. (2008). Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel Candida species near Candida albicans. *FEMS yeast research*, *8*(1), 88–102. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00320.x

Sun, S., Sun, L., Wang, K., Qiao, S., Zhao, X., Hu, X., Chen, W., Zhang, S., Li, H., Dai, H., & Liu, H. (2021). The gut commensal fungus, Candida parapsilosis, promotes high fat-diet induced obesity in mice. *Communications biology*, *4*(1), 1220. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02753-3

Tao, L., Du, H., Guan, G., Dai, Y., Nobile, C. J., Liang, W., Cao, C., Zhang, Q., Zhong, J., & Huang, G. (2014). Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in candida albicans: roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PLoS biology*, *12*(4), e1001830. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001830

Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S. G., & Hube, B. (2007). In vivo and ex vivo comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive Candida albicans isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Molecular microbiology*, *63*(6), 1606–1628. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05614.x

Torosantucci, A., Romagnoli, G., Chiani, P., Stringaro, A., Crateri, P., Mariotti, S., Teloni, R., Arancia, G., Cassone, A., & Nisini, R. (2004). Candida albicans yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. *Infection and immunity*, *72*(2), 833–843. https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.833-843.2004

Trofa, D., Gácser, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*, *21*(4), 606–625. https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08

Uryu, H., Hashimoto, D., Kato, K., Hayase, E., Matsuoka, S., Ogasawara, R., Takahashi, S., Maeda, Y., Iwasaki, H., Miyamoto, T., Saijo, S., Iwakura, Y., Hill, G. R., Akashi, K., & Teshima, T. (2015). α-Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood*, *125*(19), 3014–3023. https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-615781

van der Velden, W. J., Netea, M. G., de Haan, A. F., Huls, G. A., Donnelly, J. P., & Blijlevens, N. M. (2013). Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *19*(2), 329–332. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.11.008

Van Dyken, S. J., Garcia, D., Porter, P., Huang, X., Quinlan, P. J., Blanc, P. D., Corry, D. B., & Locksley, R. M. (2011). Fungal chitin from asthma-associated home environments induces eosinophilic lung infiltration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *187*(5), 2261–2267. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100972

van Leeuwen, P. T., van der Peet, J. M., Bikker, F. J., Hoogenkamp, M. A., Oliveira Paiva, A. M., Kostidis, S., Mayboroda, O. A., Smits, W. K., & Krom, B. P. (2016). Interspecies Interactions between *Clostridium difficile* and *Candida albicans*. *mSphere*, *1*(6), e00187-16. https://doi.org/10.1128/mSphere.00187-16

van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Visser, C. E., Kuijper, E. J., Bartelsman, J. F., Tijssen, J. G., Speelman, P., Dijkgraaf, M. G., & Keller, J. J. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *The New England journal of medicine*, *368*(5), 407–415. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205037

Vásquez, A., Jakobsson, T., Ahrné, S., Forsum, U., & Molin, G. (2002). Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *Journal of clinical microbiology*, *40*(8), 2746–2749. https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2746-2749.2002

Vautier, S., Drummond, R. A., Chen, K., Murray, G. I., Kadosh, D., Brown, A. J., Gow, N. A., MacCallum, D. M., Kolls, J. K., & Brown, G. D. (2015). Candida albicans colonization and dissemination from the murine gastrointestinal tract: the influence of morphology and Th17 immunity. *Cellular microbiology*, *17*(4), 445–450. https://doi.org/10.1111/cmi.12388

Vermeire, S., Joossens, S., Peeters, M., Monsuur, F., Marien, G., Bossuyt, X., Groenen, P., Vlietinck, R., & Rutgeerts, P. (2001). Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assays in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *120*(4), 827–833. https://doi.org/10.1053/gast.2001.22546

Walker, L. A., Maccallum, D. M., Bertram, G., Gow, N. A., Odds, F. C., & Brown, A. J. (2009). Genome-wide analysis of Candida albicans gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. *Fungal genetics and biology : FG & B*, *46*(2), 210–219. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.10.012

Wang, Y., & Xu, X. L. (2008). Bacterial peptidoglycan-derived molecules activate Candida albicans hyphal growth. *Communicative & integrative biology*, *1*(2), 137–139. https://doi.org/10.4161/cib.1.2.6870

Ward, T. L., Dominguez-Bello, M. G., Heisel, T., Al-Ghalith, G., Knights, D., & Gale, C. A. (2018). Development of the Human Mycobiome over the First Month of Life and across Body Sites. *mSystems*, *3*(3), e00140-17. https://doi.org/10.1128/mSystems.00140-17

Wheeler, M. L., Limon, J. J., Bar, A. S., Leal, C. A., Gargus, M., Tang, J., Brown, J., Funari, V. A., Wang, H. L., Crother, T. R., Arditi, M., Underhill, D. M., & Iliev, I. D. (2016). Immunological Consequences of Intestinal Fungal Dysbiosis. *Cell host & microbe*, *19*(6), 865–873. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.003

White, S. J., Rosenbach, A., Lephart, P., Nguyen, D., Benjamin, A., Tzipori, S., Whiteway, M., Mecsas, J., & Kumamoto, C. A. (2007). Self-regulation of Candida albicans population size during GI colonization. *PLoS pathogens*, *3*(12), e184. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030184

Wu, X., Xia, Y., He, F., Zhu, C., & Ren, W. (2021). Intestinal mycobiota in health and diseases: from a disrupted equilibrium to clinical opportunities. *Microbiome*, *9*(1), 60. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01024-x

Xu, J., Zhang, Y., Wang, X., Ren, X., & Liu, Y. (2020). Changes and roles of intestinal fungal microbiota in coronary heart disease complicated with nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of translational research*, *12*(7), 3445–3460.

Yang, A. M., Inamine, T., Hochrath, K., Chen, P., Wang, L., Llorente, C., Bluemel, S., Hartmann, P., Xu, J., Koyama, Y., Kisseleva, T., Torralba, M. G., Moncera, K., Beeri, K., Chen, C. S., Freese, K., Hellerbrand, C., Lee, S. M., Hoffman, H. M., Mehal, W. Z., … Schnabl, B. (2017). Intestinal fungi contribute to development of alcoholic liver disease. *The Journal of clinical investigation*, *127*(7), 2829–2841. https://doi.org/10.1172/JCI90562

Yang, Y. L., Lin, C. C., Chang, T. P., Lauderdale, T. L., Chen, H. T., Lee, C. F., Hsieh, C. W., Chen, P. C., & Lo, H. J. (2012). Comparison of human and soil Candida tropicalis isolates with reduced susceptibility to fluconazole. *PloS one*, *7*(4), e34609. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034609

Yapar N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and clinical risk management*, *10*, 95–105. https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., … Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, *486*(7402), 222–227. https://doi.org/10.1038/nature11053

Yu, X. Y., Fu, F., Kong, W. N., Xuan, Q. K., Wen, D. H., Chen, X. Q., He, Y. M., He, L. H., Guo, J., Zhou, A. P., Xi, Y. H., Ni, L. J., Yao, Y. F., & Wu, W. J. (2018). *Streptococcus agalactiae* Inhibits *Candida albicans* Hyphal Development and Diminishes Host Vaginal Mucosal TH17 Response. *Frontiers in microbiology*, *9*, 198. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00198

Zakikhany, K., Naglik, J. R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M., & Hube, B. (2007). In vivo transcript profiling of Candida albicans identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cellular microbiology*, *9*(12), 2938–2954. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01009.x

Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2012). Ruminococcus bromii is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME journal*, *6*(8), 1535–1543. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4

Zhai, B., Ola, M., Rolling, T., Tosini, N. L., Joshowitz, S., Littmann, E. R., Amoretti, L. A., Fontana, E., Wright, R. J., Miranda, E., Veelken, C. A., Morjaria, S. M., Peled, J. U., van den Brink, M. R. M., Babady, N. E., Butler, G., Taur, Y., & Hohl, T. M. (2020). High-resolution mycobiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. *Nature medicine*, *26*(1), 59–64. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0709-7

Zhang, F., Aschenbrenner, D., Yoo, J. Y., & Zuo, T. (2022). The gut mycobiome in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly. *The Lancet. Microbe*, *3*(12), e969–e983. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00203-8

Zheng, L., Kelly, C. J., & Colgan, S. P. (2015). Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *American journal of physiology. Cell physiology*, *309*(6), C350–C360. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00191.2015

Zou, R., Wang, Y., Duan, M., Guo, M., Zhang, Q., & Zheng, H. (2021). Dysbiosis of Gut Fungal Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, *51*(1), 267–275. https://doi.org/10.1007/s10803-020-04543-y

Zuo, T., Wu, X., Wen, W., & Lan, P. (2021). Gut Microbiome Alterations in COVID-19. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, *19*(5), 679–688. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.09.004

Zuo, T., Zhan, H., Zhang, F., Liu, Q., Tso, E. Y. K., Lui, G. C. Y., Chen, N., Li, A., Lu, W., Chan, F. K. L., Chan, P. K. S., & Ng, S. C. (2020). Alterations in Fecal Fungal Microbiome of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization until Discharge. *Gastroenterology*, *159*(4), 1302–1310.e5. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.048

Zuo, T., Wong, S. H., Cheung, C. P., Lam, K., Lui, R., Cheung, K., Zhang, F., Tang, W., Ching, J. Y. L., Wu, J. C. Y., Chan, P. K. S., Sung, J. J. Y., Yu, J., Chan, F. K. L., & Ng, S. C. (2018). Gut fungal dysbiosis correlates with reduced efficacy of fecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infection. *Nature communications*, *9*(1), 3663. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06103-6

4. BÖLÜM / CHAPTER 4

İNSAN ÜROGENİTAL SİSTEM MİKROBİYOMU

HUMAN GENITOURINARY TRACT MICROBIOME

Fatma ERDEM[1]

[1]Doç. Dr. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı , Eskişehir, Türkiye
E-mail: dr.akfatma@hotmail.com

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.004

ÖZ

İnsan vücudu sağlık üzerindeki etkisi giderek daha fazla kabul gören; mikroorganizmalarla kolonizedir. Ürogenital mikrobiyota (üriner, periüretral, vajinal, penil) üropatojen kaynaklı enfeksiyonlar (üriner sistem enfeksiyonu, üretrit) ve mikroorganizma ilişkili olmayan hastalıklar (mesane kanseri, tekrarlayan gebelik kayıpları v.b.) için önleyici ve koruyucu potansiyel bir role sahiptir. Yeni nesil dizileme (NGS) yöntemleri ile yapılan metagenomik analizler, mikrobiyomun karakterizasyonunu kolaylaştırmış, mikrobiyal popülasyonlar hakkında detaylı bilgiye ulaşmayı ve kültürü yapılamayan mikroorganizmaların keşfedilmesini sağlamıştır. Anatomik yapının farklılığı, idrar içeriğinin değişen yapısı (kadınlarda kalsiyum yoğunluğu, erkeklerde kreatinin yoğunluğu gibi) nedenlerle kadın ve erkeklerde üriner mikrobiyota dağılımı farklılık göstermektedir. Üriner mikrobiyota, değişen hormonlar, değişen diyet düzeni ve değişen hijyen koşulları nedeniyle yaşla birlikte de değişim göstermektedir. Mikrobiyotanın büyük çoğunluluğunu Firmicutes filumu (erkeklerde %65, kadınlarda %73) oluşturmaktadır. Firmicutes filumunu (%15 erkek - %19 kadın) sırasıyla Bacteroides (%10 erkek - %3 kadın) ve Proteobacteria (%8 erkek - %3 kadın) filumları takip etmektedir Metagenomik dizileme yöntemi ile üriner mikrobiyotada bulunan virüs ve bakteriyofajları (bakteri virüslari) da tespit edilebilmektedir (üriner virom). Human papillomavirus, molluscum contagiosum virus, BK and JC polyomavirus, Herpesvirus and Anellovirus üriner sistemde tespit edilen virüslerdir. Sağlıklı bireylerde bulgu vermeden idrarda latent olarak bulunabilen BK ve JK virüs immunsuprese bireylerde nefropati, hemorajik sistit ve lökoensefalopati tablosuna yol açmaktadır.

Bu yazıda, ürogenital mikrobiyom normal dağılımının değerlendirilmesi, mikrobiyomun hastalıklarla ilişkisinin tartışılması ve aynı zamanda, mikrobiyota içerikli biyolojik terapotiklerin (probiyotikler v.b) ürogenital sistem hastalıklardan korunma ve mevcut tedavilere (antimikrobiyal, antikanser tedaviler) katkısını değerlendirmek amaçlanmışıtr. Ürogenital mikrobiyoma bütünsel bakış, ürogenital mikrobiyom çalışmaları için de yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Yeni Nesil Dizileme (NGS), ürogenital mikrobiyota, probiyotik, metagenomik analiz, üriner sistem enfeksiyonu, takrarlayan gebelik kaybı

ABSTRACT

The human body is colonized by microorganisms (microbiome) and its impact on health is increasingly reconized. The urogenital microbiota (urinary, periurethral, vaginal, penile) has a potential preventive and protective role for uropathogen-induced infections (urinary system infection, urethritis) and non-microorganism-related conditions (bladder cancer, recurrent pregnancy loss, etc.). Metagenomic analysis using Next Generation Sequencing (NGS) has facilitated the characterization of the microbiome, providing detailed information about microbial populations and the discovery of non-culturable microorganisms. quantitative characterization of the microbiome.

The urinary microbiota distribution in men and women differs due to the difference in the anatomical structure and structure of the urine content is diffrent among men and women (such as calcium density in women, creatinine density in men). Urinary microbiota also changes with age due to changing hormones, changing diet and changing hygiene conditions. The majority of urinary microbiota belongs to the order Firmicutes (65% in males, 73% in females). The phylum of Firmicutes (15% male - 19% female) is followed by Bacteroidetes (10% male - 3% female) and Proteobacteria (8% male - 3% female). By metagenomic sequencing method, viruses and (bacterial viruses) bacteriophages can also be detected in the urinary tract (urinary viroma). Human papilloma virus, molluscum contagiosum virus, BK and JC polyomavirus, herpesvirus and anellovirus are viruses detected in the urinary tract. BK and JK viruses, which can be found latent in the urine without symptoms in healthy individuals, cause nephropathy, hemorrhagic cystitis and leukoencephalopathy in immunosuppressed individuals. The female reproductive system (FRT) consists of the vulva, vagina (lower urogenital system), endometrium, fallopian tubes and ovaries (upper urogenital system). The normal female genital tract (FGT) microbiome plays an important role in preventing preterm birth and reducing the transmission rate of sexually transmitted diseases. Sperm fluid interacts directly with the FGT microbiota and ultimately determines the ability to conceive and delivery rates.

In this chapter, it is aimed to evaluate the normal distribution of the urogenital microbiome, to discuss the relationship between the microbiome and diseases, and to evaluate the contribution of microbiota-containing biological therapeutics (probiotics, etc.) to the prevention of urogenital system diseases as an alternative of current treatments (antimicrobial, anticancer treatments). A holistic view of the urogenital microbiome will also be a guide for urogenital microbiome studies.

Keywords: Next Generation Sequencing (NGS), urogenital microbiota, probiotic, metagenomic analysis, urinary tract infection, recurrent pregnancy loss

Extended Abstract

The term “urine microbiota (urinary microbiome)” refers to the microbial community in urine obtained from the bladder. Full characterization of the urinary microbiota is still under development. The diversity and density of human urine microbiota is less than in other body regions. High salt, low pH, urea, nitrates and proteins with antimicrobial properties limit the growth of microorganisms in the urinary tract in the human organism environment. However, more than 100 species belonging to more than 50 genera have been identified in urine.

Midstream urine, transurethral catheter, and suprapubic aspiration samples are the types of clinical samples used for urinary microbiome analysis. Although midstream urine is a non-invasive method, there is a high risk of contamination from the skin, vagina or perianal area in

samples taken without proper periurethral cleaning. Although suprapubic aspiration is the most suitable sample type for the specific determination of microbiota, it is an invasive method that can cause injuries and ethical problems, especially in elderly patients. Metagenomic analysis with Next Generation Sequencing (NGS) and extended quantitative urine culture method (EQUC) provided information about microbial populations, facilitating the discovery of non-culturable microorganisms and thus the quantitative characterization of the microbiome.

The urinary microbiota distribution in men and women differs due to the difference in the anatomical structure and structure of the urine content is diffrent among men and women (such as calcium density in women, creatinine density in men). Urinary microbiota also changes with age due to changing hormones, changing diet and changing hygiene conditions. The majority of urinary microbiota belongs to the order *Firmicutes* (65% in males, 73% in females). The phylum of *Firmicutes* is followed by (15% male - 19% female), *Bacteroidetes* (10% male - 3% female) and *Proteobacteria* (8% male - 3% female). Acute urinary symptoms and chronic urinary diseases have been associated with urinary microbiota distribution. By metagenomic sequencing method, viruses and (bacterial viruses) bacteriophages in the urinary microbiota can also be detected (urinary viroma). Human papillomavirus, molluscum contagiosum virus, BK and JC polyomavirus, herpesvirus and anellovirus are viruses detected in the urinary tract. While BK and JC viruses, which can be found in the urine without symptoms in healthy individuals, also cause nephropathy, hemorrhagic cystitis and leukoencephalopathy in immunosuppressed individuals. The vaginal microbiome and gut microbiome have been shown to be significantly associated with urinary tract infections. Metagenomic sequencing of the female urinary tract and vagina suggested that they have similar microbiota and that there is interaction and exchange between communities. In patients who underwent fecal microbiota transplant, a decrease in recurrent urinary tract infections was achieved with the restoration of healthy intestinal microbiota.

The female reproductive system (FRT) consists of the vulva, vagina (lower urogenital system), endometrium, fallopian tubes and ovaries (upper urogenital system). The normal female genital tract microbiome plays an important role in preventing preterm birth and reducing the transmission rate of sexually transmitted diseases. Dysbiosis in woman genital tract plays a direct role in the etiology of gynecological cancers. Especially in women diagnosed with cervical cancer, *Lactobacillus* spp. It has been shown that this situation, which has lost its dominance and is replaced by the vaginal microbiota with anaerobic bacteria density (*G. vaginalis*, *Sneathia*, *Megaphera*, and *Prevotella)*, poses a risk for HPV (Human Papilloma Virüs) persistence and HPV-related lesions.

Its possible connection with male infertility, its role in sexually transmitted diseases, its effect on bacterial colonization of the female genital tract, and its relationship with gynecological and obstetric outcomes increase the importance of EGT microbiome studies. Sperm fluid interacts directly with the KGT microbiota and ultimately determines the ability to conceive and delivery rates. Although the sperm microbiota has more diversity compared to the KGT microbiota, bacterial colonization is less. As in KGT, *Lactobacillus* spp. dominance is an indicator of healthy and quality sperm.

1. Üriner Mikrobiyom/Ürobiyom

İdrar mikrobiyotası (üriner mikrobiom) terimi, mesaneden elde edilen idrardaki mikrobiyal topluluğu ifade etmektedir. İdrar mikrobiyotasının tam karakterizasyonu halen geliştirilme aşamasındadır. Yeni Nesil Dizileme (NGS) ile metagenomik analiz ve genişletilmiş kantitatif idrar kültürü yöntemi (EQUC) mikrobiyal popülasyonlar hakkında bilgi sağlayarak, kültürü yapılamayan mikroorganizmaların keşfedilmesini bu sayede mikrobiyomun kantitatif karakterizasyonunu kolaylaştırmıştır. İki yaklaşım vardır. Bunlar: 1)Amplikon dizileme 2) Shutgun dizileme. Amplikon dizilemede bakterilere spesifik değişken bölgelerin özgün primerler kullanılarak, PCR ile çoğaltılmasına dayanırken, shutgunda tüm genom dizilenmektedir. Shutgun dizlime yöntemi ile bakteri dışında ki mikrobiota üyeleri de (virüs, mantar) tespit edilebilmektedir(Wang et al., 2015).

Üriner sistem mikrobiyotası için sınırlı sayıda çalışma vardır. Vaka sayılarının az olması, yaş, cinsiyet ve coğrafi dağılım gibi değişkenlerin bulunması üriner mikrobiyomun (ürobiyom) tam karakterizasyonunu ve üriner hastalıklarla ilişkisinin ortaya çıkarılmasını sınırlandırmıştır. İnsan idrar mikrobiyotası çeşitililiği ve yoğunluğu diğer vücut bölgelerinden azdır. Yüksek tuz, düşük ph, üre, nitratlar ve antimikrobial özellikli proteinler insan organizması ortamında üriner trakta mikroorganizma üremesini sınırlandırmaktadır. Bununla birlikte, idrarda 50 den fazla cinse ait 100 den fazla tür tanımlanmıştır (Neugent, Hulyalkar, Nguyen, Zimmern, & De Nisco, 2020).

Anatomik yapının farklılığı, idrar içeriğinin değişen yapısı (kadınlarda kalsiyum yoğunluğu, erkeklerde kreatinin yoğunluğu gibi) nedenlerle kadın ve erkeklerde üriner mikrobiyota dağılımı farklılık göstermektedir. Üriner mikrobiyota, değişen hormonlar, değişen diyet düzeni ve değişen hijyen koşulları nedeniyle yaşla birlikte de değişim göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, 70 yaş üstü bireylerde anaerob bakteri hakimiyeti tespit edilmiştir (*Jonquetella*, *Parvimonas, Proteiniphilum* a)(Colella et al., 2023).

Mikrobiyotanın büyük çoğunluluğunu *Firmicutes* takımına (erkeklerde %65, kadınlarda %73) aittir. *Firmicutes* takımını sırasıyla (%15 erkek - %19 kadın), *Bacteroidetes* (%10 erkek - %3 kadın) ve *Proteobacteria* (%8 erkek - %3 kadın) takip etmektedir (Resim 1)(Modena et al., 2017).. Üretrit semptomu olmayan yetişkin erkeklerde ve seksüel geçişli enfeksiyon (SGE) tansısı alan erkelerde yapılan bir çalışmada, semptomu olmayan erkeklerde üriner traktta *Lactobacillus*, *Corynebacteria*, and *Streptococcus* türleri hakimken, üretrit semptomu olan erkeklerde normal ürobiyomdan farklı olarak *Sneathia*, *Gemella,* and *Prevotella* türleri yoğun olarak bulunmuştur(Nelson et al., 2010). Tablo 1.

Tablo 1. Sağlıklı kadın ve erkeklerde ürobiyom dağılımı.

RefErans	Yöntem	Sağlıklı Kadın	Sağlıklı Erkek
(Lewis et al., 2013)	16SrRNA	*70 genera identified: Actinobaculum, Actinomyces, Aerococcus, Anaerococcus, Anaerosphaera, Anaerovorax, Arcanobacterium, Arthrobacter, Atopobium, Azospira, Brevibacterium, Brooklawnia, Butyricicoccus, Campylobacter, Catonella, Caulobacter, Coriobacterium, Corynebacterium, Dialister, Enterobacter, Enterococcoccus, Facklamia, Fastidiosipila, Finegoldia, Flavonifractor, Friedmanniella, Fusobacterium, Gallicola, Gardnerella, Gulosibacter, Helcococcus, Howardella, incertae_sedis, Jonquetella, Lachnospiracea_, Lactobacillus, Methylovirgula, Microvirgula, Mobiluncus, Modestobacter, Murdochiella, Negativicoccus, Neisseria, Oligella, Paraprevotella, Parvimonas, Pelomonas, Peptococcus, Peptoniphilus, Peptostreptococcus, Porphyromonas, Prevotella, Propionimicrobium, Proteiniphilum, Rhodococcus, Rhodopila, Saccharofermentans, Sneathia, Soehngenia, Sporanaerobacter, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Streptococcus, Streptophyta, Sutterella, Tepidimonas, Tessaracoccus, Thermoleophilum, TM7_genera_, Varibaculum*	*46 genera identified: Actinobaculum, Aerococcus, Aminobacterium, Anaerococcus, Anaerophaga, Anaerosphaera, Anaerotruncus, Atopobium, Atopostipes, Azospira, Butyricicoccus, Campylobacter, Catonella, Corynebacterium, Dialister, Eubacterium, Filifactor, Finegoldia, Fusobacterium, Gardnerella, Gemella, Gordonibacter, Kocuria, Lactobacillus, Lactonifactor, Marixanthomonas, Megasphaera, Microvirgula, Mobiluncus, Murdochiella, Mycoplasma, Parvimonas, Peptococcus, Peptoniphilu, Peptostreptococcus, Porphyromonas, Prevotella, Proteiniphilum, Pseudomonas, Pseudoramibacter, Rikenella, Saccharofermentans, Sediminitomix, Sneathia, Soehngenia, Staphylococcus*
(Kogan, Naboka Iu, Ibishev Kh, & Gudima, 2014; Kogan, Naboka, Ibishev, Gudima, & Naber, 2015)	16SrRNA	***Lactobacillus,*** *Coagulase-negative Staphylococci, Peptococcus, Corynebacterium, Propionibacterium, Eubacterium, Peptostreptococcus, Candida, Bacteroides, Bacillus, Veillonella, Enterobacteriaceae, Staphylococcus aureus, Enterococcus, Micrococcus, Prevotella, Actinomyces, Streptococcus*	*Coagulase-negative Staphylococci, Eubacterium, Corynebacterium, Peptostreptococcus, Enterococcus, Bacteroides, Peptococcus, Megasphaera, Mobiluncus, Enterobacteriaceae, S. aureus, Propionibacterium, Veillonella, Fusobacterium*
(Modena et al., 2017)	16SrRNA	***Lactobacillus,*** *Corynebacterium, Gardnerella, Prevotella, Bacillus*	*Streptococcus, Lactobacillus, Prevotella, Corynebacterium, Pseudomonas*

(Gottschick et al., 2017)	16SrRNA	*Prevotella amnii, Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae,* ***Lactobacillus iners****, Shigella sonnei, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Streptococcus agalacticie, Citrobacter murliniae, Lactobacillus crispatus*	*Prevotella amnii, Sneathia amnii, Shigella sonnei, Enterococcus faecalis, Streptococcus agalacticie*, Citrobacter murliniae
(Naboka et al., 2020)	Kültür	*Corynebacterium spp., Eubacterium spp. and* ***Lactobacillus spp***	*Enterococcus spp. and Peptococcus spp. Peptostreptococcus spp. ve Veillonella spp.*

Metagenomik sekanslama yöntemi ile üriner mikrobiyotada bulunan virüs ve (bakteri virüslari) bakteriyofajları da tespit edilebilmektedir (üriner virom). *Human papillomavirus*, *molluscum contagiosum virus*, BK and JC *polyomavirus*, *herpesvirus* and *anellovirus* üriner traktta tespit edilen virüslerdir. Sağlıklı bireylerde bulgu vermeden idrarda latent olarak bulunabilen BK ve JK virüs immunsuprese bireylerde nefropati, hemorajik sistit ve lökoensefalopati tablosuna yol açmaktadırlar. Hemorajik kök hücre transplantasyonu yapılan hastaların % 50'sinde üretelyal BKV replikasyonu tespit edilmiş ve bunların sadece %10'nunda hemorajik sistit geliştiği bildirilmiştir. (Moustafa et al., 2018). (Egli et al., 2009).

Orta akım idrarı, transüretral kateter ve suprapubik aspirasyon örnekleri üriner mikrobiyom analizi için kullanılan klinik örnek tipleridir. Orta akım idrarı invaziv olmayan bir yöntem olmakla birlikte periüretral temizlik iyi yapılmadan alınan örneklerde deri, vajina veya perianal bölgeden kontaminasyon riski yüksektir. Suprapubik aspirasyon mikrobiotanın spesifik olarak tespitinde en uygun örnek tipi olmakla birlikte özellikle yaşlı hastalarda yaralanmalara ve etik problemlere sebep olabilen invaziv bir yöntemdir(Quince, Walker, Simpson, Loman, & Segata, 2017).

1.1. Üriner Mikrobiyota ile İlişkili Hastalıklar

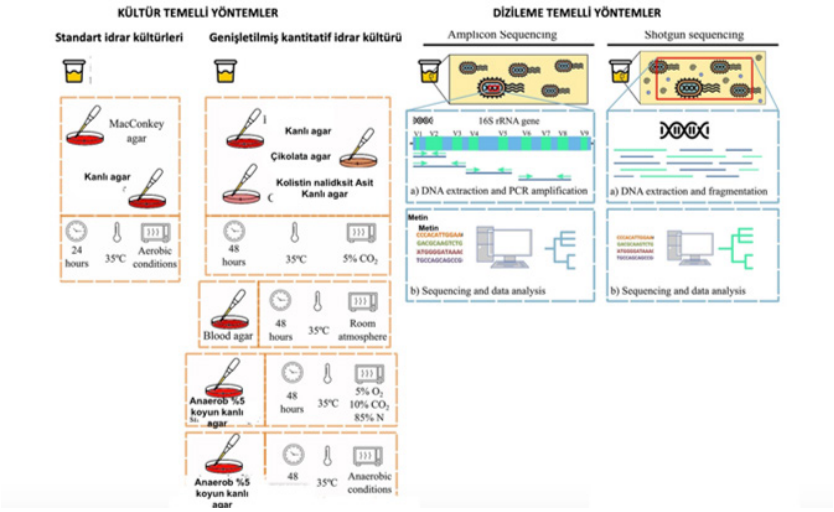
Yapılan birçok çalışmada akut üriner semptomlar ve kronik üriner hastalıklar üriner mikrobiota dağılımı ile ilişkili bulunmuştur. İdrar mikrobiyota çeşitliliğinin azalması patojen mikroorganizmalarla ilişkili üriner enfeksiyon riskini artırmaktadır.

1.1.1. Üriner Sistem Enfeksiyonu mikrobiyota ilişkisi

İdrar yolu enfeksiyonları dünya çapında en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır. Komplike olmayan sistitten hayatı tehdit eden ürosepsise kadar (sistit, piyelonefrit, prostatit, ürosepsis ve kateterle ilişkili İYE (CA-UTI) geniş bir yelpazesi olmakla birlikte, çoğunluğunu akut komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları oluşturmaktadır. Sistemik semptom ve bulguların varlığı ya da eşlik eden fonksiyonel ve anatomik anormallikler komplike idrar

yolu infeksiyonu tanısı koydurmaktadır (Bilsen et al., 2023). Anatomik yapının farklılığı (kısa üretra) ve hormonal dalgalanmalar nedeniyle UTİ kadınlarda daha çok görülmektedir(Abelson et al., 2018). Etken çoğunlukla *Escherichia coli* dir, fakat diğer bağırsak mikrobiotası üyeleri de (*Enterococcus*, and *Staphylococcus)* idrar yolu enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Prcie ve arkadaşlarının 16S rRNA hızlı yeni nesil gen dizilimi (NGS) ve genişletilmiş kantitatif idrar kültürü (EQUC) kullanarak, idrar yolu enfeksiyonu semptomları olan ve olmayan kadınlardan oluşan iki grupla yaptıkları çalışmada İYE semptomu olan kadınlarda *E. coli* hakimiyetini bildirirken, semptomsuz grupta *Gardnerella vaginalis, Streptococcus mitis/oralis/pneumoniae, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus salivarius, and Streptococcus sanguinis* varlığı gösterilmiştir. (Price et al., 2016). *Klebsiella pneumoniae* , *Streptococcus agalactiae, Aerococcus urinae, Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, ve *Streptococcus anginosus* sıklık sırasına göre belirlenen üropatojenlerdir.

Birçok bakteri özel inkübasyon koşulları ve farklı besin maddelerine ihtiyaç duyduklarından standart kültür yöntemleri ile tespit edilememektedir. Genişletilmiş kantitatif idrar kültürü yöntemi (EQUC) ile standard idrar kültürü ile izole edilemeyen bakteriler izole edilebilmektedir. Bu yöntemde daha fazla idrar volümü kullanılarak, örnekler farklı atmosferik koşullarda farklı inkübasyon sürelerine tabi tutulmaktadır. İYE'li hastalarda üropatojenleri saptamak için kullanılan standart idrar kültürleri genellikle kanlı agar plakalarında (BAP) ve MacConkey agar plaklarında 1 µL idrar kullanılarak, 35 ◦C'de aerobik koşullar altında inkübe edilirken, EQUC yönteminde 100 µL'ye kadar idrar kullanır ve kanlı agar (BAP)', MacConkey, çikolata, kolistin-nalidiksik asit (NAC) agarları ve ayrıca CDC anaerob kanlı agarlara ekilerek, anaerobik koşullarda ve 35 ◦C'de farklı ortam havalarında inkübe edilir. EQUC , İdrar yolu enfesiyonu (İYE) yakınmaları olan ve standart kültür yöntemi ile üremenin tespit edilemediği hastalarda ve tekrarlayan İYE'li hastalarda önerilmektedir. Şekil 1 1(Price et al., 2016).



Şekil 1: İYE' li hastalarda üropatojenleri tanımlama yöntemleri ((Price et al., 2016).



Şekil 2: Sağlıklı ürobiyom ve tekrarlayan İYE'da mikrobiyota dağılımının kıyaslanması (Kenneally, Murphy, Sleator, & Culligan, 2022)

Vajinal mikrobiyom ve bağırsak mikrobiyomunun idrar yolu enfeksiyonları ile anlamlı ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kadın idrar yolu ve vajinasının metagenomik dizilimi, benzer mikrobiyotaya sahip olduklarını ve topluluklar arasında etkileşim ve değişim olduğunu düşündürmüştür. Öte yandan, 16rRNA dizileme yöntemi ile böbrek transplant hastalarında yapılan bir çalışmada bağırsaktaki enterekok hakimiyeti idrar yolu enfeksiyonu gelişimi ile ilişkili bulunmuş, bağırsak mikrobiyomunun iyileştirilmesinin bu hastaları idrar yolu enfeksiyonundan koruyacağı bildirilmiştir(Magruder et al., 2019). Priüretral boşluğun bağırsak mikrobiyotası ile kontaminasyonu üretra ve mesanenin üropatojen ile kolonizasyonuna neden

olmaktadır. Fekal mikrobiyota transplantı yapılan hastalarda sağlıklı bağırsak mikrobiyotası restorasyonu ile terarlayan idrar yolu enfeksiyonlarında azalma sağlanmıştır(Kim & Lee, 2023). Antibiyotik kullanımı diğer vücut bölgelerinde olduğu gibi ÜGT sağlıklı mikrobiyota yapısını bozmakta, özellikle *Lactobacillus* cinsi bakterilerin azalmasına ve yerini üropatojen bakterilerin almasına sebep olmaktadır (Mulder et al., 2019). Şekil 2.

1.1.2. Mesane Kanseri Mikrobiyota İlişkisi

Sigara, kimyasal karsinojenlere maruzüyet, *Schistosoma hematobium* enfeksiyonları mesane kanseri için bilinen en önemli risk faktörleridir(Wu, Ros, Gu, & Kiemeney, 2008). Üriner sistem enfeksiyonu ve mesane kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Son güncel çalışmalarda idrarda artan yoğunluktaki *Klebsiella* ve *Escherichia* 'nın kolibaktin gibi genotoksinler üreterek karsinogenezi tetiklediği bildirilmiştir(Faïs, Delmas, Barnich, Bonnet, & Dalmasso, 2018; Strakova, Korena, & Karpiskova, 2021).

Orta akım idrarı ile yapılan çalışmalarda, nonneoplastik kontrol gruplarında *Lactobacillus, Roseomonas, Veillonella,* neoplatsik *olgularda ise Acinetobacter, Actinomyces, Aeromonas, Anaerococcus, Pseudomonas, ve Tepidomonas* artmış olarak tespit edilmiştir. Neoplastik dokularda ise herhangi bir taxa grubunda artış tespit edilmezken non neoplastik dokularda *Lactobacillus spp.* hakimiyeti tespit edilmiştir(Wu et al., 2008; Yacouba, Tidjani Alou, Lagier, Dubourg, & Raoult, 2022). Çift kör, plasebo kontrollü randomize bir çalışmada, *Lactobacillus casei'*nin oral kullanımının yüzeysel mesane kanseri nüksünü azalttığı gösterilmiştir(Aso & Akazan, 1992).

1.1.3. Asemptomatik Bakteriüri

Asemptomatik bakteriüri terimi idrarda İdrar Yolu Enfeksiyonu semptom ve bulguları olmadan kontaminasyonun dışlandığı bakteri tespit edilmesidir. Kadınlarda en az iki kez yapılan idrar kültüründe 100.000 cfu veya üstü bakteri tespit edilmesi, erkeklerde tek idrar öreneğinde 100.000 cfu veya üstü tek tip bakteri varlığı, hem kadın hem erkeklerde kateter ile alınan idrar örneğinde 100 cfu ve üstü bakteri varlığı asemptomatik bakteriüri tanımına uymaktadır. İleri yaş, kadın cinsiyet, hastaneye yatış, diyabet gibi komorbid durumlar, kalıcı kateterizasyon/kalıcı foley katater varlığı asemptomatik bakteriüri için risk faktörleridir. (Nicolle et al., 2005).

1.1.4. Probiyotiklerin üriner mikrobiyota öbiyozisinin sağlanmasındaki rolü ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisindeki yeri

Probiyotikler Dünya Sağlık Örgütü tarafından ''yeterli miktarda alındıklarında kişinin sağlığı ve fizyolojisi üzerinde olumlu etki yapan yararlı mikroorganizmalar'' olarak tanım-

lanmıştır. İyi bir probiyotik; a) Güvenilir, noninvaziv uygulanabilir olmalıdır. b) Kanserojen olmamalıdır. c) Hücrelere adhere olarak patojenik adezyonu önlemelidir. d) Asit, hidrojen peroksit ve baktroyosin gibi patojen bakterilerin üremesini inhibe eden maddeleri üretebilmelidir. Probiyotik mikroorganizmalar antitoksin maddeler salgılatarak *E.coli* ve *C.difficle* gibi bakteri toksinlerini nötralize etmenin yanı sıra, immunomodülatör etkileri ile sağlıklı üriner mikrobiyota devamlılığında rol oynamaktadırlar. Vajinal normal florada hakim olan *Lactobacillus spp'* in varlığı sağlıklı ürogenital floranın devamında önemlidir. *Lactobacillus spp*. tarafından üretilen laktik asit ve hidrojen peroksit üropatojen *E. col'i*nin (UPEC) kolonizasyonunu azaltmaktadır. *Lactobacillus acidophilus, Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum (L. plantarum PXN47 and Lacticaseibacillus antibakteriyel* etkilerilerinin yanı sıra müsin üreterek üropatojen *E.col*i'nin adezyonunu inhibe ederler. (Iannitti & Palmieri, 2010; Preidis & Versalovic, 2009). Vajinal olarak uygulanabilen probiyotik ajanlar UPEC kolonizasyonu azaltmakta ve tekrarlayan İYE tedavisinde kullanılmaktadır.

2. Kadın Genital Sistem (KGS) Mikrobiyomu

Kadın üreme sistemi (KGS) vulva, vajina (alt ürogenital sistem), endometrium , fallop tüpleri ve overlerden (üst ürogenital sistem) oluşmaktadır. Normal kadın genital sistem mikrobiyomu erken doğumun önlemesinde ve cinsel yolla bulaşan hastalıkların bulaşma oranın azalmasında rol oynamaktadır. Üst ürogenital sistem bakteri yoğunluğu alt ürogenital sistemden 10.000 kat daha azdır. .

2.1. Üst KGS Mikrobiyomu

Önceleri steril olduğu düşünülen, uterus, fallop tüpleri ve overlerin az yoğunlukta mikrobiyal topluluk içerdiği metagenomik yöntemlerle gösterilmiştir. Üst KGS mikrobiyotası daha az yoğun fakat daha fazla çeşitlililiğe (diveristy) sahipken, alt KGS mikrobiyotası daha fazla yoğunlukta mikrobiyal yüke daha az mikrobiyal çeşitliliğe sahiptir (Ravel et al., 2011).

2.1.1. Uterin Mikrobiyom

Yeni nesil dizileme tekniklerinin geliştirilmesiyle endometriumun mikrobiyota yapısı anlaşılmıştır. Yapılan çok sayıda çalışmada; sağlıklı bir kadında uterusta *Lactobacillus spp.ve Streptococcus spp. hakim türler* olarak belirlenmiştir. (Franasiak et al., 2016; Koedooder et al., 2019). Düzensiz vajinal kanama ve fibromyoma nedeniyle histerektomi yapılan kadın hastalarla (n:99) yapılan bir çalışmada uterin kavitenin patojen mikroorganizmalarla (çoğunluğu *Gardnerella vaginalis, Enterobacter, and Streptococcus agalactiae*) kolonize olduğu gösterilmiştir(Agostinis et al., 2019).

2.2. Alt genital sistem mikrobiyomu

2.2.1. Vajinal Mikrobiyom

1892'de Gustav Döderlein, vajinanın baskın olarak *Lactobacillus spp*. ile kolonize olduğunu keşfettiğini açıkladığından beri, laktik asit ve hidrojen peroksit üreten *Lactobacillus spp.nin* kalıcı mevcudiyeti ve hakimiyetinin sağlıklı vajinanın göstergesi olduğu ve üreme sağlığından kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Üreme çağındaki sağlıklı bir kadında vajen epitel hücreleri tarafından salgılanan glikojen *Lactobacillus spp.* tarafından laktik aside çevrilir ve düşük vajinal ph'lı ortamda patojen bakterilerin çoğalması önlenmiş olur. *(Chlamydia trachomatis, Neisseria gibi patojenik bakteriler gonorrhoeae ve Trichomonas vajinalis).* Ravel ve arkadaşları 2011 yılında sağlıklı bir vajinada beş community state type (CST) sınıflandırmasını yapmıştır. CST I, I I , I I I ve V dominat türler olarak *L. crispatus, L. gasseri, L. iners, ve L. Jensenii i*çerirken , CST IV' de daha az yoğunlukta *Lactobacillus* spp. daha yoğun olarak anaerobik bakteriler *(Atopobium, Dialister, Gardnerella, Prevotella ve Sneathia)* bulunmaktadır(Elkafas, Walls, Al-Hendy, & Ismail, 2022; Ravel et al., 2011). Tablo 2.

Tablo 2. Vajinal Mikrobiyota Sınıflandırmasında baskın olan mikrobiyota üyeleri (Cominitty state types) (Elkafas, Walls, Al-Hendy, & Ismail, 2022; Ravel et al., 2011).	
CST I	*Lactobacillus crispatus*
CST I I	*Lactobacillus gasseri*
CST I I I	*Lactobacillus iners*
CST IV	Fakültatif anaerob bakteriler
CST V	*Lactobacillus jensenii*

*Lactobacillus spp.*laktik asit üreterek oluşturduğu düşük ph'lı genital ortamda diğer bakterilerin kolonizasyonuu önler ve dominant tür olarak bulunur. *Lactobacillus spp* nin hakim olduğu genital mikrobiyota aynı zamanda diğer cinsel yolla bulaşan *Herpes simpleks virüsü* tip 2, *C. trachomatis*, *N. gonorrhea*,, *Trichomonas vaginalis* etkenlerle enfeksiyon riskini azaltır . BV (Bakteriyel vajinozis) *Lactobacillus. spp.* baskın olduğu floranın azalması, *Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus curtisii* ve *Mycoplasma hominis* cinsi bakterilerin çoğalması ile karakterize vajinal bir sendromdur. Yapılan çalışmalarda genital traktta *Lactobacillus spp*. hakimiyeti olan bireyler ve olmayan bireyler kıyaslandığında HIV (İnsan immuetmezlik virüsü) ile enfekte olma riskinin BV (Bakteriyel vajinozis)'lu hastalarda daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda HIV ile enfekte hastalarda, cinsel yolla bulaş riskinin ve fetüse veritikal bulaşmanın *Lactobacillus spp*. hakimiyeti olan hastalarda daha az olduğu bulunmuştur (Spear et al., 2014).

Yaşla birlikte östrojen hormonunun azalmasıyla, düşük ph'lı ortamda *Lactobacillus spp.*'nin yerini *Gardnerella*, *Mycoplasma,* and *Prevotella,* gibi anaerobik bakteriler alır. Artan anaerobik bakteri popülasyonu vajinal peptidlerden aminlerin üretilmesine neden olmaktadır. BV'de yüksek vajinal pH, *G. vajinalis'*in eksfoliye edici epitel hücrelerine yapışması için zemin hazırlar ve bu da, kokobasillerin yapıştığı vajinal epitel hücreleri olan karakteristik ipucu hücrelerinin gelişmesine yol açar. Aminler ayrıca *M. hominis'in* üremesi için de substrat sağlar(Ravel et al., 2011).. (Bagnall & Rizzolo, 2017; Moreno et al., 2016).

KGS mikrobiyomu menstruel siklus dönemlerinde hormonal değişimlerden etkilenmektedir. Krog ve arkadaşları menstrual dönemde vajinal mikrobiyom çeşitliğinin arttığını luteal ve folüküler fazda östrojen seviyesi ile paralel olarak *Lactobacillus spp.* nin hakimiyet kazandığını göstermişlerdir(Krog et al., 2022). Sağlıklı gebeliği olan ve takrarlayan gebelik kayıpları olan Japon kadınların karşılaştırıldığı bir çalışmada mensturasyon sırasında serviko-vajinal örneklerde *Lactobacillus spp*. hakimiyetinin azaldığı, luteal fazda *Streptococcus, Staphylococcus, Corynebacterium, Anaerococcus* cinsi bakterilerde artış olduğu gösterilmiştir(Mori et al., 2023). Öte yandan yapılan çalışmalarla hormonal kontrasepsiyon yöntemlerinin vajinal mikrobiyotada disbyozise neden olmadığı gösterilmiştir. Krog ve arkadaşlarının 160 sağlıklı kadınla yaptığı bir çalışmada, mesutruel siklus, kontrasepsiyon yöntemleri ve vajinal mikrobiyom incelendiğinde konrtrasepisyon yöntem tipinin fekal, oral ya vajinal mikrobiyom bileşimi ile anlamlı ilşkiisi olmadığı gösterilmiştir(Krog et al., 2022).

2.3.KGS Mikrobiyomu ve jinekolojik kanser ilişkisi

KGS disbyozisi jinekolojik kanselerlerin etyolojinde doğrudan rol oynamaktadır. Servikal kanser tanılı kadınlarda özellikle *Lactobacillus spp*. hakimiyetinin kaybolduğu yerini anaerob bakterilerin *(G. vaginals, Sneathia, Megaphera,* ve *Prevotella)* baskın olduğu vajinal mikrobiyotanın aldığı ve bu durumun HPV (Human Papilloma Virüs) ilişkli lezyonlar için risk oluşturduğu gösterilmiştir (Kyrgiou & Moscicki, 2022).

Endometrium kanseri tanılı hastalarda da *Atopobium and Porphyromonas cinsi* bakterilerde artış gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda over kanser tanılı hastalarda ise hücre içi yerleşimli bakterilerde (*Brucella, Mycoplasma ve Chlamydia)* artış olduğu bildirilmiştir. Hui-Wen Lin ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada pelvik imflamatuar hastalığı olan kadınlarda over kanseri riskinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir(Lin et al., 2011; Zhou et al., 2019).

2.4. KGS Mikrobiyomu ve Gebelik Kayıpları

Tekrarlayan gebelik kayıpları çoğunlukla etyolojisi tespit edilemeyen ve etkili tedavinin sınırlı olduğu önemli bir gebelik komplikasyonudur. Kromozomal anomaliler, uterus anomalileri, endokrin bozukluklar, antifosfolipid antikor sendromu sıklıkla bilinen etyolojiler olmakla brilikte; bozulmuş genital mikrobiyota da tekrarlayan gebelik kayıpları ve erken doğum ile ilişkilidir(Masucci et al., 2023). Ardarda iki veya daha fazla gebelik kaybı yaşayan 47 kadın ve kontrol grubu olarak gebelik kaybı öyküsü olmayan 39 sağlıklı kadınla yapılan bir çalışmada; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan kadınların endometriyal örneklerinde *Lactobacillus crispatus*'un daha az miktarda olduğu, *Gardnerella vajinalis*'in ise daha yoğun olduğu gösterilmiştir (Peuranpää et al., 2022).

Bozulmuş vajinal mikrobiyom aynı zamanda erken memran riptürü (PMMR) için risk faktörüdür. PMMR sonrası koryoamniyonit, neonatal sepsis ve serebral plasi riski artmaktadır (Bennett, Brown, & MacIntyre, 2020). IVF (In vitro fertilizasyon) hastalarında *Lactobacillus spp*. hakimiyetinde olmayan endometrium mikrobiyotasına sahip hastalarda *lactobacillus spp.* hakimiyeti olan endomterial mkrobiyotaya sahip hastalara kıyasla implantasyon oranlarınının daha az olduğu ve gebelik kayıplarının daha fazla olduğu görülmüştür(Moreno et al., 2016). Gastrointestinal sistemden peritoneal yolla (fallop tüpleri aracılığı ile) endometriuma mikroorganizima geçişi, hemotojen yayılım ve vajenden asendan yayılım endomterial mikrobiyota yapısını değiştirmektedir. Tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon başarısızlıkları olan hastalarda endometriumda gastrointestinal sisitem kaynaklı *Bacteriodes spp*. cinsi bakterilerin varlığı gösterilmiştir(Verstraelen et al., 2016).

3. Erkek Genital Sistem (EGS) Mikrobiyomu

Erkek genital sisteminin (EGS) karmaşık anatomik yapısı nedeniyle örnekleme yapılması invaziv işlem gerektirir. Bu nedenle numunelerin mevcudiyeti, prostat kanseri, orşiektomi gerekliliği veya kısırlık nedeniyle testis biyopsilerin yapıldığı patolojik durumlarla sınırlıdır. Semen invaziv uygulama gerektirmediğinden EGS mikrobiyomunu incelemek amacı ile kullanılabilmektedir. Erkek kısırlığı ile olan olası bağlantısı, seksüel geçişli hastalıklardaki rolü, kadın genital sisteminin bakteriyel kolonizasyonuna etkisi, jinekolojik ve obstretik sonuçlarla ilişkisi EGS mikrobiyom çalışmalarının önemini artırmaktadır. Sperm sıvısı (semen) KGS mikrobiyotası ile doğrudan etkileşime girer ve sonuçta gebe kalma yeteneğini ve doğum oranlarını belirler. Semen mikrobiyotası KGS mikrobiyotasına kıyasla daha fazla çeşitliliğe sahip olduğu halde bakteriyel kolonizasyon daha azdır. KGS' de olduğu gibi semende de *Lactobacillus spp*. baskınlığı sağlıklı ve kaliteli spermin göstergesidir (Colella et al., 2023).

Azospermik erkek hastalarla yapılan çalışmada testiste azospermi varlığında *Proteobacteria* ve *Bacteriodes* hakimiyetindeki mikrobiyotanın yerini *Actinobacetria* hakimiyetindeki mikrobiyotanın aldığı gösterilmiştir(Zuber, Peric, Pluchino, Baud, & Stojanov, 2023)

Kaynakça / References

Abelson, B., Sun, D., Que, L., Nebel, R. A., Baker, D., Popiel, P., . . . Damaser, M. S. (2018). Sex differences in lower urinary tract biology and physiology. *Biology of Sex Differences, 9*(1), 45. doi:10.1186/s13293-018-0204-8

Agostinis, C., Mangogna, A., Bossi, F., Ricci, G., Kishore, U., & Bulla, R. (2019). Uterine Immunity and Microbiota: A Shifting Paradigm. *Front Immunol, 10*, 2387. doi:10.3389/fimmu.2019.02387

Aso, Y., & Akazan, H. (1992). Prophylactic effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. BLP Study Group. *Urol Int, 49*(3), 125-129. doi:10.1159/000282409

Bagnall, P., & Rizzolo, D. (2017). Bacterial vaginosis: A practical review. *Jaapa, 30*(12), 15-21. doi:10.1097/01.JAA.0000526770.60197.fa

Bennett, P. R., Brown, R. G., & MacIntyre, D. A. (2020). Vaginal Microbiome in Preterm Rupture of Membranes. *Obstet Gynecol Clin North Am, 47*(4), 503-521. doi:10.1016/j.ogc.2020.08.001

Bilsen, M. P., Jongeneel, R. M. H., Schneeberger, C., Platteel, T. N., van Nieuwkoop, C., Mody, L., . . . Lambregts, M. M. C. (2023). Definitions of Urinary Tract Infection in Current Research: A Systematic Review. *Open Forum Infect Dis, 10*(7), ofad332. doi:10.1093/ofid/ofad332

Colella, M., Topi, S., Palmirotta, R., D'Agostino, D., Charitos, I. A., Lovero, R., & Santacroce, L. (2023). An Overview of the Microbiota of the Human Urinary Tract in Health and Disease: Current Issues and Perspectives. *Life (Basel), 13*(7). doi:10.3390/life13071486

Egli, A., Infanti, L., Dumoulin, A., Buser, A., Samaridis, J., Stebler, C., . . . Hirsch, H. H. (2009). Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis, 199*(6), 837-846. doi:10.1086/597126

Elkafas, H., Walls, M., Al-Hendy, A., & Ismail, N. (2022). Gut and genital tract microbiomes: Dysbiosis and link to gynecological disorders. *Front Cell Infect Microbiol, 12*, 1059825. doi:10.3389/fcimb.2022.1059825

Faïs, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., & Dalmasso, G. (2018). Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins, 10*(4), 151. Retrieved from https://www.mdpi.com/2072-6651/10/4/151

Franasiak, J. M., Werner, M. D., Juneau, C. R., Tao, X., Landis, J., Zhan, Y., . . . Scott, R. T. (2016). Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *J Assist Reprod Genet, 33*(1), 129-136. doi:10.1007/s10815-015-0614-z

Gottschick, C., Deng, Z.-L., Vital, M., Masur, C., Abels, C., Pieper, D. H., & Wagner-Döbler, I. (2017). The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome, 5*(1), 99. doi:10.1186/s40168-017-0305-3

Iannitti, T., & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition, 29*(6), 701-725. doi:https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.05.004

Kenneally, C., Murphy, C. P., Sleator, R. D., & Culligan, E. P. (2022). The urinary microbiome and biological therapeutics: Novel therapies for urinary tract infections. *Microbiol Res, 259*, 127010. doi:10.1016/j.micres.2022.127010

Kim, D. S., & Lee, J. W. (2023). Urinary Tract Infection and Microbiome. *Diagnostics (Basel), 13*(11). doi:10.3390/diagnostics13111921

Koedooder, R., Mackens, S., Budding, A., Fares, D., Blockeel, C., Laven, J., & Schoenmakers, S. (2019). Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts. *Hum Reprod Update, 25*(3), 298-325. doi:10.1093/humupd/dmy048

Kogan, M. I., Naboka Iu, L., Ibishev Kh, S., & Gudima, I. A. (2014). [Unsterile urine in health human--new paradigm in medicine]. *Urologiia*(5), 48-52.

Kogan, M. I., Naboka, Y. L., Ibishev, K. S., Gudima, I. A., & Naber, K. G. (2015). Human urine is not sterile - shift of paradigm. *Urol Int, 94*(4), 445-452. doi:10.1159/000369631

Krog, M. C., Hugerth, L. W., Fransson, E., Bashir, Z., Nyboe Andersen, A., Edfeldt, G., . . . Nielsen, H. S. (2022). The healthy female microbiome across body sites: effect of hormonal contraceptives and the menstrual cycle. *Human Reproduction, 37*(7), 1525-1543. doi:10.1093/humrep/deac094

Kyrgiou, M., & Moscicki, A. B. (2022). Vaginal microbiome and cervical cancer. *Semin Cancer Biol, 86*(Pt 3), 189-198. doi:10.1016/j.semcancer.2022.03.005

Lewis, D. A., Brown, R., Williams, J., White, P., Jacobson, S. K., Marchesi, J. R., & Drake, M. J. (2013). The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol, 3*, 41. doi:10.3389/fcimb.2013.00041

Lin, H. W., Tu, Y. Y., Lin, S. Y., Su, W. J., Lin, W. L., Lin, W. Z., . . . Lai, Y. L. (2011). Risk of ovarian cancer in women with pelvic inflammatory disease: a population-based study. *Lancet Oncol, 12*(9), 900-904. doi:10.1016/s1470-2045(11)70165-6

Magruder, M., Sholi, A. N., Gong, C., Zhang, L., Edusei, E., Huang, J., . . . Lee, J. R. (2019). Gut uropathogen abundance is a risk factor for development of bacteriuria and urinary tract infection. *Nat Commun, 10*(1), 5521. doi:10.1038/s41467-019-13467-w

Masucci, L., D'Ippolito, S., De Maio, F., Quaranta, G., Mazzarella, R., Bianco, D. M., . . . Di Simone, N. (2023). Celiac Disease Predisposition and Genital Tract Microbiota in Women Affected by Recurrent Pregnancy Loss. *Nutrients, 15*(1). doi:10.3390/nu15010221

Modena, B. D., Milam, R., Harrison, F., Cheeseman, J. A., Abecassis, M. M., Friedewald, J. J., . . . Salomon, D. R. (2017). Changes in Urinary Microbiome Populations Correlate in Kidney Transplants With Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy Documented in Early Surveillance Biopsies. *Am J Transplant, 17*(3), 712-723. doi:10.1111/ajt.14038

Moreno, I., Codoñer, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazán, J., . . . Simon, C. (2016). Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol, 215*(6), 684-703. doi:10.1016/j.ajog.2016.09.075

Mori, R., Hayakawa, T., Hirayama, M., Ozawa, F., Yoshihara, H., Goto, S., . . . Sugiura-Ogasawara, M. (2023). Cervicovaginal microbiome in patients with recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol, 157*, 103944. doi:10.1016/j.jri.2023.103944

Moustafa, A., Li, W., Singh, H., Moncera, K. J., Torralba, M. G., Yu, Y., . . . Telenti, A. (2018). Microbial metagenome of urinary tract infection. *Scientific Reports, 8*(1), 4333. doi:10.1038/s41598-018-22660-8

Mulder, M., Radjabzadeh, D., Hassing, R. J., Heeringa, J., Uitterlinden, A. G., Kraaij, R., . . . Verbon, A. (2019). The effect of antimicrobial drug use on the composition of the genitourinary microbiota in an elderly population. *BMC Microbiology, 19*(1), 9. doi:10.1186/s12866-018-1379-1

Naboka, Y. L., Gudima, I. A., Mordanov, S. V., Krakhotkin, D. V., Ilyash, A. V., Kogan, M. I., & Ibishev, K. S. (2020). [Virusuria as a component of the urine microbiota and its significance for assessing the health of the urinary tract: a descriptive clinical study]. *Urologiia*(1), 12-18.

Nelson, D. E., Van Der Pol, B., Dong, Q., Revanna, K. V., Fan, B., Easwaran, S., . . . Fortenberry, J. D. (2010). Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PLoS One, 5*(11), e14116. doi:10.1371/journal.pone.0014116

Neugent, M. L., Hulyalkar, N. V., Nguyen, V. H., Zimmern, P. E., & De Nisco, N. J. (2020). Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *mBio, 11*(2). doi:10.1128/mBio.00218-20

Nicolle, L. E., Bradley, S., Colgan, R., Rice, J. C., Schaeffer, A., & Hooton, T. M. (2005). Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis, 40*(5), 643-654. doi:10.1086/427507

Peuranpää, P., Holster, T., Saqib, S., Kalliala, I., Tiitinen, A., Salonen, A., & Hautamäki, H. (2022). Female reproductive tract microbiota and recurrent pregnancy loss: a nested case-control study. *Reprod Biomed Online, 45*(5), 1021-1031. doi:10.1016/j.rbmo.2022.06.008

Preidis, G. A., & Versalovic, J. (2009). Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology, 136*(6), 2015-2031. doi:10.1053/j.gastro.2009.01.072

Price, T. K., Dune, T., Hilt, E. E., Thomas-White, K. J., Kliethermes, S., Brincat, C., . . . Schreckenberger, P. C. (2016). The Clinical Urine Culture: Enhanced Techniques Improve Detection of Clinically Relevant Microorganisms. *J Clin Microbiol, 54*(5), 1216-1222. doi:10.1128/jcm.00044-16

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology, 35*(9), 833-844. doi:10.1038/nbt.3935

Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., . . . Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108 Suppl 1*(Suppl 1), 4680-4687. doi:10.1073/pnas.1002611107

Spear, G. T., French, A. L., Gilbert, D., Zariffard, M. R., Mirmonsef, P., Sullivan, T. H., . . . Hamaker, B. R. (2014). Human α-amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus. *J Infect Dis, 210*(7), 1019-1028. doi:10.1093/infdis/jiu231

Strakova, N., Korena, K., & Karpiskova, R. (2021). Klebsiella pneumoniae producing bacterial toxin colibactin as a risk of colorectal cancer development - A systematic review. *Toxicon, 197*, 126-135. doi:https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.007

Verstraelen, H., Vilchez-Vargas, R., Desimpel, F., Jauregui, R., Vankeirsbilck, N., Weyers, S., . . . Van De Wiele, T. (2016). Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ, 4*, e1602. doi:10.7717/peerj.1602

Wang, W.-L., Xu, S.-Y., Ren, Z.-G., Tao, L., Jiang, J.-W., & Zheng, S.-S. (2015). Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World journal of gastroenterology: WJG, 21*(3), 803.

Wu, X., Ros, M. M., Gu, J., & Kiemeney, L. (2008). Epidemiology and genetic susceptibility to bladder cancer. *BJU Int, 102*(9 Pt B), 1207-1215. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07961.x

Yacouba, A., Tidjani Alou, M., Lagier, J. C., Dubourg, G., & Raoult, D. (2022). Urinary microbiota and bladder cancer: A systematic review and a focus on uropathogens. *Semin Cancer Biol, 86*(Pt 3), 875-884. doi:10.1016/j.semcancer.2021.12.010

Zhou, B., Sun, C., Huang, J., Xia, M., Guo, E., Li, N., . . . Chen, G. (2019). The biodiversity Composition of Microbiome in Ovarian Carcinoma Patients. *Sci Rep, 9*(1), 1691. doi:10.1038/s41598-018-38031-2

Zuber, A., Peric, A., Pluchino, N., Baud, D., & Stojanov, M. (2023). Human Male Genital Tract Microbiota. *Int J Mol Sci, 24*(8). doi:10.3390/ijms24086939

5. BÖLÜM / CHAPTER 5

PROBİYOTİK, PREBİYOTİK VE SİNBİYOTİKLERİN MİKROBİYOTA ÜZERİNE ETKİLERİ

EFFECTS OF PROBIOTICS, PREBIOTICS AND SYNBIOTICS ON MICROBIOTA

Lütfiye ÖKSÜZ[1]

[1]Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: oksuzl@istanbul.edu.tr

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.005

ÖZ

Bağırsak mikrobiyotası, gıda sindiriminin düzenlenmesi, kimyasal metabolizma ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi önemli işlevlere sahiptir. Disbiyoz (bakteriyel kolonizasyon değişikliği), bazı faydalı bakterilerin kaybı, değişen bakteri çeşitliliği veya mikrobiyomdaki patojenlerin artması ile ortaya çıkabilir. Mikrobiyotayı düzenlemek için kullanılan beslenme alışkanlığı düzenleyicileri arasında, fermente gıdalar ve lif açısından zengin beslenme rejimlerinin yanı sıra probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler yer almaktadır.

Probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında konağa sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotikler, kolonizasyon direnci, bozulmuş mikrobiyotanın normalleştirilmesi, rekabetle patojenlerin dışlanması, vitamin sentezi, bağırsak bariyeri takviyesi, karsinojenlerin nötralizasyonu gibi fonksiyonlara sahiptir. Probiyotikler gastrointestinal sistem hastalıkları, allerjik ve metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılabilmektedir.

Prebiyotikler, "sağlık yararı sağlayan konak mikroorganizmalar ve probiyotik suşlar tarafından seçici olarak kullanılan ve besin görevi gören maddelerdir. Prebiyotik olarak kullanılan maddeler çeşitli oligosakkaritleri içerir. Prebiyotiklerin gastrointestinal sisteme, kalp metabolizmasına, mental sağlığa, kanser gelişimine ve diğer sistemlere olan etkileri bilinmektedir.

Sinbiyotikler ise probiyotik ve prebiyotiklerin birleşimi olarak düşünülebilir ve "konağa sağlık yararı sağlayan, konak mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan canlı mikroorganizmalar ve substratlardan oluşan bir karışım" olarak tanımlanmaktadır. Sinbiyotikler "tamamlayıcı sinbiyotikler " veya "sinerjik sinbiyotikler" olarak iki şekilde tasarlanabilir: Tamamlayıcı sinbiyotikleri oluşturan probiyotik ve prebiyotiklerin, tanımlama kriterlerini karşılaması gerekirken, sinerjik sinbiyotiklerin bu kriterleri karşılaması gerekmez; ancak hem selektif kullanılabilmeli, hem sağlık yararı sağlamalı, hem de hedef konakta denenmelidir. Sinbiyotiklerin bağırsak mikrobiyotası dengesinin korunması, immün sistemin düzenlenmesi ve bakteriyel translokasyonun önlenmesi gib fonksiyonları vardır.

Postbiyotikler, "canlı olmayan bakteriyel ürünler" veya "konakta biyolojik aktiviteye sahip probiyotik mikroorganizmaların metabolik yan ürünleri" olarak tanımlanmıştır. Postbiyotiklere örnek olarak bütirat, kısa zincirli yağ asitleri, muramil dipeptid ve ekzopolisakkaritler gösterilebilir.

Probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotiklerle mikrobiyota üzerine yapılan müdahaleler, çeşitli metabolik fonksiyonlar üzerinde önemli etkiler oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: İnsan sağlığı, mikrobiyota, probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik, postbiyotik

ABSTRACT

The intestinal microbiota has important functions such as regulating food digestion, chemical metabolism and regulation of the immune system. Dysbiosis (change of bacterial colonization) can occur with loss of certain beneficial bacteria, changing bacterial diversity, or increased pathogens in the microbiome. Dietary regulators used to regulate the microbiota include fermented foods and diets rich in fiber, as well as probiotics, prebiotics, and synbiotics.

Probiotics are live microorganisms that provide health benefits to the host when administered in adequate amounts. Probiotics have functions such as colonization resistance, normalization of impaired microbiota, competitive exclusion, vitamin synthesis, intestinal barrier reinforcement, neutralization of carcinogens. Probiotics can be used in the treatment of diseases such as gastrointestinal system diseases, allergic diseases, and metabolic diseases.

Prebiotics are substances that act as nutrients and are selectively used by host microorganisms and probiotic strains that provide health benefits. Substances used as prebiotics consist of various oligosaccharides. The effects of prebiotics on the gastrointestinal system, cardiac metabolism, mental health, cancer development and other systems are known.

Synbiotics are known as a combination of probiotics and prebiotics and are defined as "a mixture of living microorganisms and substrates that are selectively used by host microorganisms, conferring health benefits on the host". Synbiotics can be designed as "complementary synbiotics" or "synergistic synbiotics" in two ways: Probiotics and prebiotics that make up complementary synbiotics must meet the definition criteria, while synergistic synbiotics do not need to meet these criteria. Synbiotics have functions such as maintaining the intestinal microbiota balance, regulating the immune system and preventing bacterial translocation.

Postbiotics are defined as "non-viable bacterial products" or "metabolic byproducts of probiotic microorganisms with biological activity in the host". Examples of postbiotics are butyrate, short-chain fatty acids, muramyl dipeptide, and exopolysaccharides.

Interventions in the microbiota with probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics can have significant effects on various metabolic functions.

Keywords: Human health, microbiota, probiotic, prebiotic, synbiotic, postbiotic

Extended Abstract

The human microbiota can be defined as all microorganisms (~90 trillion bacteria, archaea, microeukaryotes, and viruses) that live in the human body without causing infection or disease. The human microbiome, on the other hand, includes genes and gene assemblages (RNA, proteins, metabolites) produced by this microbial community. There are more microorganisms

in the human microbiota than there are 39 trillion human cells in the body. Hundreds of different genera and species of bacteria have been described in the human gastrointestinal tract. The number of viable cells in the stool material is about 10^{11}-10^{12}/gr, and the majority of these organisms are obligate anaerobes.

The intestinal microbiota has important functions such as regulating food digestion, chemical metabolism and regulation of the immune system. The gastrointestinal system provides a protective host defense against antigens from food and microorganisms in the intestinal lumen, through saliva, gastric acid, peristalsis, mucus, intestinal proteolysis, intestinal flora, and epithelial cell membranes. The role of the human microbiome, which is a large bacterial community that cannot be completely cultured, in health and disease, especially its association with specific chronic conditions such as obesity, diabetes, metabolic syndrome, immunity and some cancers are known. Dysbiosis (change of bacterial colonization) can occur with loss of certain beneficial bacteria, changing bacterial diversity, or increased pathogens in the microbiome. The presence or absence of a specific type of organism may be associated with the disease, and probiotics can be used to prevent or treat these diseases. Dietary regulators used to regulate the microbiota include fermented foods and diets rich in fiber, as well as probiotics, prebiotics, and synbiotics.

Probiotics are live microorganisms that provide health benefits to the host when administered in adequate amounts. Probiotics have functions such as colonization resistance, normalization of impaired microbiota, competitive exclusion, vitamin synthesis, direct antagonism, intestinal barrier reinforcement, neutralization of carcinogens. Probiotics can be used in the treatment of diseases such as gastrointestinal system diseases, allergic diseases, obesity, non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus.

Prebiotics are substances that act as nutrients and are selectively used by host microorganisms and probiotic strains that provide health benefits. Substances used as prebiotics are various oligosaccharides inulin, pyrodextrins and lactulose. The effects of prebiotics on the gastrointestinal system, cardiac metabolism, mental health, bone health, cancer development and other systems are known.

Synbiotics are known as a combination of probiotics and prebiotics and are defined as “a mixture of living microorganisms and substrates that are selectively used by host microorganisms, conferring health benefits on the host”. Synbiotics can be designed as “complementary synbiotics” or “synergistic synbiotics” in two ways: Probiotics and prebiotics that make up complementary synbiotics must meet the definition criteria, while synergistic

synbiotics do not need to meet these criteria. Synbiotics have functions such as maintaining the intestinal microbiota balance, regulating the immune system and preventing bacterial translocation.

Postbiotics are defined as non-viable bacterial products or metabolic byproducts of probiotic microorganisms with biological activity in the host. Examples of postbiotics are butyrate, short-chain fatty acids, muramyl dipeptide, and exopolysaccharides. Postbiotics have the potential to regulate the barrier property of the intestines and may improve metabolic diseases. The area of action of postbiotics is not limited to the intestines, but can also be applied to host surfaces such as the oral cavity, skin, urogenital system or nasopharynx. Since treatment of type 2 diabetes mellitus is often accompanied by regulation of intestinal bacterial metabolites, probiotics, prebiotics, and postbiotics can be used as an alternative therapeutic agent for fecal microbiota transplantation.

Interventions in the microbiota with probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics can have significant effects on various metabolic functions. As a result of current and future studies about effects of probiotics, prebiotics and synbiotics on microbiota, they can be used alone or as an alternative to conventional therapies in the treatment of many diseases.

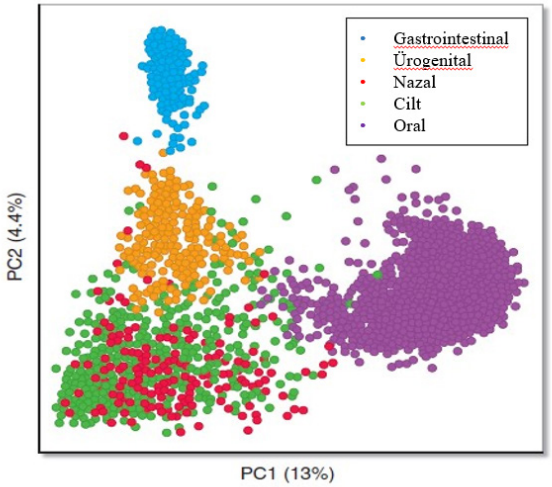
1. Mikrobiyota

İnsan mikrobiyotası, enfeksiyona veya hastalığa neden olmadan insan vücudunda yaşayan tüm mikroorganizmalar (~90 trilyon bakteri, arkeler, mikroökaryotlar ve virüsler) olarak tanımlanabilir. İnsan mikrobiyomu ise bu mikrobiyal topluluk tarafından üretilen genleri ve gen ürünlerini (RNA, proteinler, metabolitler) içerir (Kjersti Aagaard, 2015; Pommerville, 2022a). İnsan mikrobiyotasında, vücuttaki 39 trilyon insan hücresinden daha fazla sayıda mikroorganizma yer almaktadır. İnsan mikrobiyomundaki protein kodlayan genlerin tahmini sayısı, insandaki protein kodlayan 20.000 genin 10.000 katından fazla olup 232 milyon olarak belirtilmiştir (Pommerville, 2022a).

İnsan mikrobiyotasının gelişimine bakıldığında, fetüs bağırsağı steril olmasına rağmen, annenin vajinal / fekal florası ve çevresel bakteriler nedeniyle doğum ile birlikte kolonizasyon başlamaktadır. Yaşamın ilk yıllarında, mikrobiyota daha az karmaşık olup takriben 2-3 yaşlarında sağlıklı yetişkinlerinkine benzer şekilde stabil hale gelir. Mikrobiyotadaki organizmalar, çevre ile bağlantılı hücre ve doku yüzeyleriyle kalıcı bir ilişki kurduğundan burun, ağız, gözler, üst solunum yolu, ürogenital kanal ve bağırsaklar çok sayıda mikrobiyal tür tarafından kolonize edilir (Pommerville, 2022a). Mikrobiyota tüm bireylerde aynı değildir, her bireyin kendine özgü ve benzersiz bir mikrobiyotası vardır. Yetişkin bireylerin mikrobiyota bileşiminde fizyolojik farklılıklar, yaş, beslenme rejimi, antibiyotik kullanımı, çevresel faktörler ve coğrafi konumdan kaynaklanan değişiklikler meydana gelebilir (Becker, Neurath, & Wirtz, 2015; Pommerville, 2022b). İnsan mikrobiyotası, beş filumdan (*Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria* ve *Verrucomicrobia*) oluşur ve bunlardan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*, bağırsaktaki tüm bakteri türlerinin %90'ını oluşturur (Aoun, Darwish, & Hamod, 2020; Lv et al., 2019).

İnsan mikrobiyomu ile ilgili araştırmalar, sağlıklı bireylerin bağırsak, deri ve vajina mikrobiyotasında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Beslenme düzeni, çevre, konak genetiği ve erken mikrobiyal maruziyet gibi bazı faktörlerin bireylerdeki mikrobiyota farklılığına etki edebileceği düşünülmüş, ancak çeşitliliğin nedeni tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. İnsan mikrobiyom projesi (HMP), metabolik yolların metagenomik taşınmasının, toplum yapısındaki etnik, ırksal ve alt yapı farklılıklarına rağmen bireyler arasında stabil olduğunu ortaya koymuştur. HMP projesinde, 18 insan vücut bölgesinde standart patojenlerin mevcut olmadığı kanıtlanmıştır (Şekil 1) (Consortium, 2012; Kjersti Aagaard, 2015). Sağlıklı bireylerde standart patojenler nadir olmasına rağmen, fırsatçı patojenler nispeten yaygındır ve bu nedenle bağışıklık sisteminin baskılanması sıklıkla fırsatçı enfeksiyonlara yol açar. Standart patojenler,

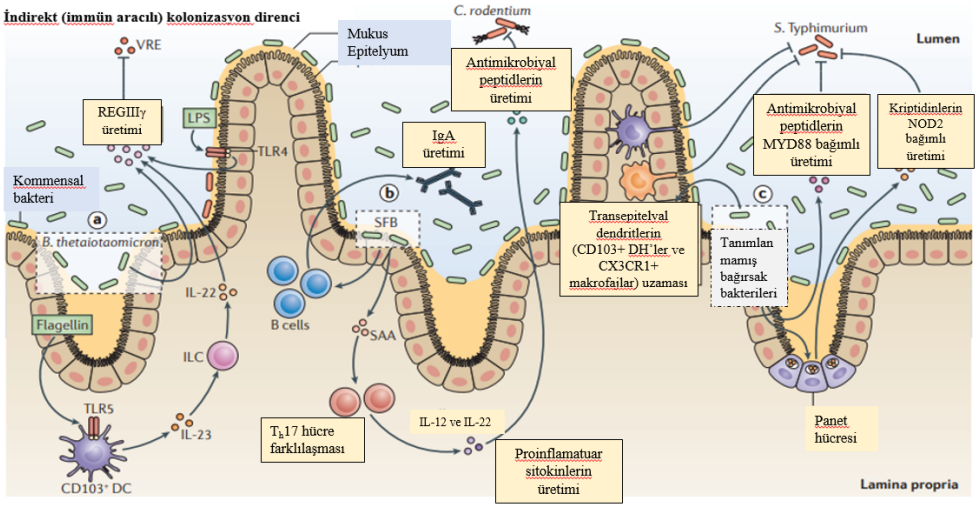
sağlıklı bireylere diğer insanlardan, hayvanlardan veya çevreden bulaşabilmesine rağmen, fırsatçı patojenler, ekzojen kaynaklardan olası bulaşa ek olarak, endojen mikrobiyotadan da kaynaklanabilir (Kjersti Aagaard, 2015).



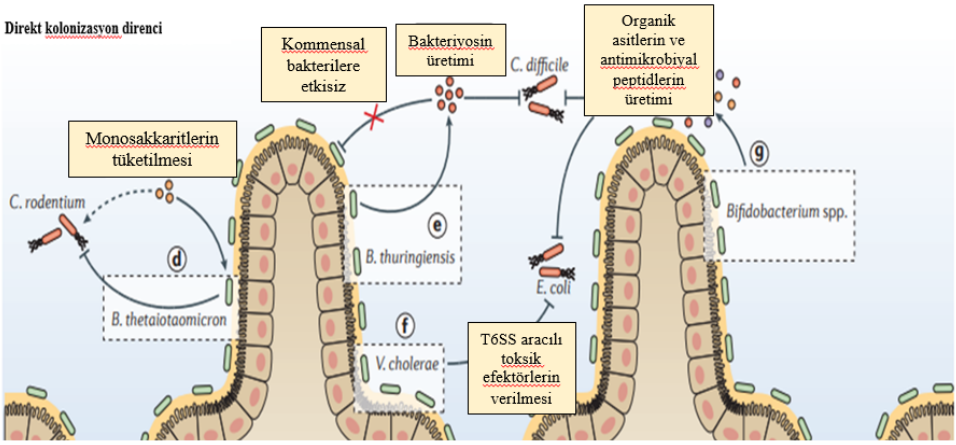
Şekil 1: İnsan mikrobiyomu, farklı vücut bölgelerindeki farklı bakteri popülasyonları (Consortium, 2012; Kjersti Aagaard, 2015). Bu temel bileşenler analizi (PCA) grafiği, sağlıklı yetişkinlerde her bir farklı vücut bölgesini ve mikrobiyal bileşimini gösterir. Boşluktaki her renkli daire, 16S rRNA gen dizilimi tarafından belirlenen bir bireyin mikrobiyomunu temsil eder ve benzer mikrobiyomlar iki boyutlu uzayda birbirine daha yakın gruplanır.

1.1. Bağırsak mikrobiyotası

İnsan gastrointestinal sisteminde (GİS), yüzlerce farklı cins ve türde bakteri tanımlanmıştır. Gaita materyalindeki canlı hücre sayısı yaklaşık 10^{11}- 10^{12}/gr arasındadır ve bu organizmaların büyük çoğunluğu zorunlu anaeroplardır (Macfarlane, 2010). Bağırsak mikrobiyotasının besin sindirimini düzenlemek, kimyasal metabolizma ve immün sistemin düzenlenmesi gibi önemli fonksiyonları vardır (Reque PM, 2022). GİS, bağırsak mukozası aracılığıyla, bağırsak lümenindeki gıdalardan ve mikroorganizmalardan gelen antijenlere karşı tükürük, mide asidi, peristaltizm, mukus, bağırsak proteolizi, bağırsak florası ve epitel hücre zarları aracılığıyla koruyucu bir konak savunması sağlar (Isolauri, Sütas, Kankaanpää, Arvilommi, & Salminen, 2001). Probiyotik olarak da kullanılabilen bazı bağırsak bakterilerinin (örn, *Bifidobacterium* spp.) indirekt ve direkt yoldan sağladığı kolonizasyon direnci mekanizmaları Şekil 2 ve Şekil 3'de açıklanmıştır (Buffie & Pamer, 2013).



Şekil 2: Bağırsak bakterilerinin, enterik patojenlere karşı dolaylı (immün aracılı) yolla sağladığı kolonizasyon direnci (Buffie & Pamer, 2013) Komensal bakteri türleri ve mikrobiyal ürünler (yeşil), patojenik bakterileri (kırmızı) hedefleyen bağışıklık tepkilerini aktive ederek dolaylı olarak enfeksiyona karşı koruma sağlar. *B. thetaiotaomicron*, öncelikle Gram-pozitif bakterileri hedefleyen ve öldüren bir AMP olan REGIIIγ'ün (peptidoglikan bağlayıcı C-tipi lektin rejenere edici adacık türevi protein) ekspresyonunu arttırır. Bakterinin lipopolisakkarit (LPS) ve flagellin gibi mikrobiyal ürünleri, VRE tarafından kolonizasyonu bozan REGIIIγ'nın epitelyal ekspresyonunu arttırmak için TLR_4^+ stromal hücreleri ve $TLR_5^+CD_{103}^+$ DC'leri uyarır. Segmentli filamentöz bakteriler (SFB), bağırsak epiteli ile yakından ilişkilidir ve B hücreleri tarafından IgA üretimini, serum amiloid A (SAA) bağımlı TH_{17} hücre farklılaşmasını, proinflamatuar sitokin üretimini ve epitelyal AMP üretimini arttırır. Bu işlemler, *Citrobacter rodentium*'a karşı koruma sağlar. Tanımlanmamış mikrobiyal popülasyonlar ve ürünler, bağışıklık savunmalarını (MYD_{88} bağımlı AMP'lerin üretimi, NOD_2 bağımlı kriptdin üretimi, lamina propria'daki fagositik DC'ler tarafından transepitelyal dendritlerin uzaması) aktive eder. Bu işlemler, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium enfeksiyonuna karşı direnci artırır. (CX3 CR1: CX3-kemokin reseptörü 1; IL: interlökin; ILC: doğuştan gelen lenfoid hücre, MYD_{88}: Paneth hücrelerinin myeloid farklılaşma primer cevap proteini 88, NOD_2: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı 2)



Şekil 3: Bağırsak bakterilerinin, enterik patojenlere karşı sağladığı direkt kolonizasyon direnci (Buffie & Pamer, 2013). Diğer bakteriler, besinler için rekabet ederek veya inhibe edici maddelerin üretimini teşvik ederek bağırsak patojenlerini doğrudan inhibe eder: (d) *B. thetaiotaomicron*, *C. rodentium* tarafından kullanılan karbonhidratları tüketir, bu da patojenin bağırsak lümeninden rekabetçi bir şekilde dışlanmasına katkıda bulunur. (**e**) *Bacteroides thuringiensis*, bilinmeyen bir etki mekanizmasıyla, spor oluşturan *Bacilli* ve *Clostridia*'yı (*C. difficile* dahil) doğrudan hedefleyen bir bakteriyosin salgılar. (**f**) *Vibrio cholerae* gibi Gram-negatif bakteriler, tip VI sekresyon sistemleri (T6SS) yoluyla doğrudan *Escherichia coli*'ye toksik efektör proteinleri verir. (**g**) Çeşitli *Bifidobacterium* türleri, patojenik *E. coli'*nin enterositlere adezyonunu ve çoğalmasını bozan organik asitler ve peptitler üretir. (**a-d**) Bazı bakteri popülasyonları (örn, *B. thetaiotaomicron*), doğrudan ve dolaylı mekanizmaların kombinasyonu yoluyla patojenlerin kolonizasyonunu önleyebilir veya antagonistik etkileri gerçekleştirmek için başka bakterilere ihtiyaç duyabilir; bu da kolonizasyon direncini arttıran bakteri türlerinin tanımlanmasını ve yorumlanmasını komplike hale getirir.

Gastrointestinal sistemdeki bakteri çeşitliliği, duodenumdan jejunum yoluyla distal ileum ve kolona kadar (proksimalden distale doğru) giderek artmaktadır. Farklı bağırsak bölümlerinin mikrobiyal çeşitliğinde önemli farklılıklar mevcuttur. *Streptococcus, Veillonella, Clostridium* gibi cinsleri kapsayan Gram pozitif *Firmicutes* filumu ince bağırsaklarda baskındır, distal ince bağırsakta ise *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* nispeten daha fazladır. Çekum, kolon ve rektumu kapsayan kalın bağırsak oldukça zengin olup ve çeşitli mikroorganizma topluluklarını içermekle birlikte *Bacteroidetes* (*Bacteroides* cinsi) ve *Firmicutes* (*Clostridium, Faecalibacterium, Lactobacillus* ve *Ruminococcus*) filumu baskındır. Bağırsak mikrobiyatasındaki çeşitliliğin azalması, hastalığa duyarlılığın artması ve hastalık nüksü ile ilişkilendirilmiştir. Mikrobiyal çeşitliliğin azalması, mikrobiyomun immünomodülatör fonksiyonlarının azalmasına ve bağırsak patojenlerine karşı direncin azalmasına katkıda bulunarak konağı enfeksiyonlara veya hastalıklara yatkın hale getirebilir. Bu hastalıklara inflamatuar bağırsak hastalığı, nekrotizan enterokolit ve *Clostridioides difficile* enfeksiyonu örnek olarak verilebi-

lir. Bu hastalık/ enfeksiyonlarda Gamma-Proteobakterilerin (*Escherichia, Salmonella, Vibrio, Yersinia*) daha fazla etken olduğu saptanmış olup bu bakterilerin salgıladığı endotoksinler veya diğer moleküller yoluyla enflamasyonu tetikleyerek hastalığı şiddetlendirdiği, bağırsak epitel yüzeyinin bütünlüğünü bozarak da hastaları kolite veya abdominal enfeksiyonlara daha yatkın hale getirdiği düşünülmektedir (Kjersti Aagaard, 2015). Tamamının kültürü yapılamayan büyük bir bakteri topluluğu olan insan mikrobiyomunun sağlık ve hastalıktaki rolleri, özellikle obezite, diyabet, metabolik sendrom, bağışıklık ve bazı kanserler gibi spesifik kronik durumlarla ilişkileri bilinmektedir (Sartor, 2004).

Disbiyoz (bakteriyel kolonizasyonun değişmesi), belirli yararlı bakterilerin kaybı, değişen bakteri çeşitliliği veya mikrobiyomdaki patojenlerin artması ile ortaya çıkabilir. Disbiyozun genetik veya çevresel (antibiyotik kullanımı, beslenme rejimi, stres ve kronik hastalık) olabilen çeşitli nedenleri vardır. Disbiyotik bakteriler, değişen metabolizma nedeniyle hastalığa katkıda bulunabilmesine rağmen bunun bir sebep mi yoksa sonuç mu olduğu henüz kesinlik kazanmamıştır. Spesifik bir organizma türünün varlığı veya yokluğu hastalıkla ilişkili olabilir ve bu hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için probiyotikler kullanılabilir (Walker, 2017).

2. Probiyotikler

Probiyotik sözcüğü, Latince "*pro*" ve Yunanca "*bios*" kelimelerinden türetilmiş olup "yaşam için" anlamına gelmektedir. Probiyotikler, sağlığa faydaları bilinmeden çok daha önce bira, ekmek, şarap, kefir, peynir gibi pek çok fermente ürün sayesinde beslenme ve tedavi amacıyla sıklıkla kullanılmaktaydı (Reque PM, 2022). Probiyotiklerin ilk kullanımının, sütün daha uzun süre muhafaza edilmesinin keşfedildiği M.Ö. 2000 yıllarına kadar uzandığı bilinmektedir. Ayrıca Türk toplumlarının tarihi, folkloru, dili ve mutfağı hakkında bilgi veren iki önemli XI. yüzyıl eserinde (Divan-ı Lügati't Türk ve Kutadgu Bilig) Türklerin yoğurdu sağlıklı beslenmek ve mide-bağırsak sorunlarını önlemek veya tedavi etmek için kullandıkları belirtilmektedir. Laktik asit üreten bakteriler ise ilk kez 1857'de Pasteur tarafından keşfedilmiştir. 1905 yılında Bulgaristan'ın dağlık bir bölgesinde, çok miktarda fermente süt ürünü tüketen köylülerin genel nüfustan daha uzun yaşadığını fark eden Metchnikov, süt ürünlerindeki laktik asit bakterilerinin (LAB), laktozu parçalayıp proteolitik bakterilerin üremesini engelleyerek kolondaki pH'ı düşürebileceğini öne sürmüştür. Daha sonra Metchnikov'a bu fikri veren Bulgar doktor Stamen Grigorov tarafından yoğurttan izole edilen bakteriye *Lactobacillus bulgaricum* adı verilmiştir (Ozen & Dinleyici, 2015; Reque PM, 2022).

Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Birliği (ISAAP) tarafından yapılan tanımlamaya göre probiyotikler, "yeterli miktarda vücuda verildiğinde konağa sağlık yararı

sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır (Salminen et al., 2021). İlk olarak 1908 yılında Mechnikov, LAB ve insan sağlığı üzerine yaptığı araştırmada bu bakterilerin oral olarak alınmasının konağın sağlığını iyileştirdiğini bulmuştur. LAB, insan bağırsağında bulunan ve fermente gıdaların (yoğurt, fermente süt ürünleri, çeşitli peynirler ve fermente edilmiş kurutulmuş et yan ürünleri) sindirilmesi yoluyla alınan heterojen bir mikroorganizma grubudur (Plaza-Diaz, Ruiz-Ojeda, Gil-Campos, & Gil, 2019). Probiyotikler, sindirim sistemini patojen mikroorganizmalardan koruyarak gastrointestinal (Gİ) sağlığın korunmasına ve inflamatuar bağırsak hastalıklarının yönetilmesine yardımcı olur, bağışıklık fonksiyonlarını uyarabilir, besinlerin sindirimine ve emilimine yardımcı olabilir, vitaminler gibi bazı besin maddelerini sentezleyebilir (Thammarutwasik et al., 2009). Bir mikoorganizmanın ideal bir probiyotik olması için bazı ön şartları taşıması gereklidir: Bakteri patojen olmamalıdır, toksin genleri taşımamalıdır, genetik olarak stabil olmalıdır, aside ve safraya toleranslı olmalıdır, hayatta kalma şartları açısından sağlam olmalıdır, laktik asit üretebilmelidir, bölünme süresi kısa olmalıdır ve bağırsak iç yüzeyine etkili olarak tutunabilmelidir (Pandey, Naik, & Vakil, 2015).

Probiyotikler, birçok farklı türde mikroorganizma içerir (M. Sanders, Merenstein, Merrifield, & Hutkins, 2018). *Bifidobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Saccharomyces boulardii* suşları birçok fonksiyonel gıda takviyesinde bulunan ve en yaygın kullanılan probiyotik bakterilerdir. *Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus ve Streptococcus* gibi diğer suşlar da probiyotik olarak kullanılmaktadır (Plaza-Diaz et al., 2019). Probiyotikler cins, tür ve suş adlarına göre tanımlanmaktadır (örneğin, *Lactobacillus rhamnosus* GG) (M. Sanders et al., 2018).

2.1. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotikler, disbiyozu tedavi etmek, mikrobiyal çeşitliliği eski haline getirmek ve bozulan bağırsak mikrobiyotasını değiştirmek için güncel bir tedavi yöntemidir; ancak spesifik etki mekanizmaları tamamen aydınlatılmamıştır (Plaza-Diaz et al., 2019). Potansiyel probiyotik bakteriler için klasik bir seçim kriteri olan konak hücreye adezyon, bağırsak bariyerini ve metabolik fonksiyonları uyarır, immünomodülatör etkilerin desteklenmesine yardımcı olur ve geçici kolonizasyonla sonuçlanabilir (Monteagudo-Mera, Rastall, Gibson, Charalampopoulos, & Chatzifragkou, 2019). Farklı bakteri türleri arasındaki ortak etki mekanizmaları, benzer probiyotik etkiler oluşturabilir. Örneğin, laktat ve asetat gibi organik asitlerin üretimi, hem *Bifidobacterium,* hem de *Lactobacillus* türlerinin çoğu tarafından kullanılan bir probiyotik mekanizmasıdır. Kolonda mikrobiyal olarak üretilen bu organik asitler, istenmeyen mikroorganizmaları engelleyerek ve diğer faydalı bağırsak mikroorganizmalarını çarpraz besleyerek sağlıklı bağırsak ortamı oluşturmaya önemli katkılar sağlar ve bu durum bağırsak epitel hüc-

relerini besleyen bütirat üretimiyle sonuçlanır. Birçok farklı probiyotik türü ve suşu tarafından yaygın olarak üretilen organik asitler, bağırsak sağlığına katkıda bulunur. (M. Sanders et al., 2018).

Beslenme düzeninin mikrobiyom üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada, enterotiplerin, beslenme düzenindeki büyük değişikliklerden (yüksek yağlı, düşük lifli veya az yağlı, yüksek lifli yiyecekler) sonra bile 10 günlük süre içinde stabil kaldığı, ancak probiyotiklerin verilmesiyle bağırsak mikrobiyomunda gen ekspresyon modellerinin hızla değişebileceği bildirilmiş ve oral antimikrobiyal tedavinin kesilmesinden sonraki dört hafta içinde insan bağırsak bakterilerinin hemen hemen tamamen yeniden oluşturulmasının, bağırsak mikrobiyomundaki elastikiyeti gösterdiği bildirilmiştir (Kjersti Aagaard, 2015).

2.2. Probiyotiklerin fonksiyonları

Probiyotiklerin fonksiyonları için temel mekanizmalar mevcut olmasına rağmen, tüm probiyotik suşları aynı mekanizmayı kullanmamaktadır. Bazı mekanizmalar ortak olarak, bazıları da belli probiyotik türleri tarafından kullanılmaktadır. Probiyotiklerin yaygın etkileri, kolonizasyon direnci, kısa zincirli yağ asidi (KZYA) ve asit üretimi, bağırsak geçişinin düzenlenmesi, bozulmuş mikrobiyotanın normalleştirilmesi, enterosit döngüsünün artması ve rekabetle patojenlerin dışlanması olarak sıralanabilir. Sıklıkla gözlenen cins düzeyindeki etkileri vitamin sentezi, direkt antagonizma, safra tuzu metabolizması, enzimatik aktivite, bağırsak bariyeri takviyesi ve karsinojenlerin nötralizasyonunu kapsar. Suş düzeyindeki nadir etkiler ise nörolojik, immünolojik, endokrinolojik etkiler ile spesifik biyoaktiflerin üretimini içermektedir (M. Sanders et al., 2018). İyi bir probiyotik, çok sayıda canlı hücre içermeli, patojenik ve toksik olmamalı, bağırsakta hayatta kalma ve metabolize olma kapasitesine sahip olmalı, depolama ve kullanım sırasında canlılığını korumalı ve tüketildiğinde faydalı bir etki göstermelidir (Gibson et al, 2010). Terapötik etkinlik için probiyotik bir ürünün en az 10^6-10^7 CFU/gr (veya toplamda 10^8-10^9 CFU) bakteri içermesi ve günlük tüketimin 100 g veya 100 ml olması gerektiği bildirilmiştir (Flach, van der Waal, van den Nieuwboer, Claassen, & Larsen, 2018; Reque PM, 2022).

Probiyotiklerin yararlı etkileriyle ilişkili olduğu düşünülen bazı mekanizmalar aşağıda belirtilmiştir (Pandey et al., 2015):

- Bakteriyosinler, hidrojen peroksit (H_2O_2), organik asitler vb. inhibitör maddelerin üretimi,
- Patojen bakteriler için adezyon bölgelerinin bloke edilmesi.

- Besinler için patojen bakterilerle rekabet,
- Toksinlerin parçalanması ve toksin reseptörlerinin bloke edilmesi,
- İmmün yanıtların modülasyonu.

2.3. Probiyotiklerin kaynakları

Probiyotikler, "sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmışsa da, çoğu probiyotik preparat, özellikle raf ömrünün sonunda potansiyel olarak çok sayıda ölü ve yararlı mikroorganizma içermektedir (Plaza-Diaz et al., 2019; Salminen et al., 2021). İyi bilinen probiyotiklerin yanı sıra sporlu bakteriler de hayvan yemlerinde, insan besin takviyelerinde ve tescilli ilaçlarda probiyotik takviyeleri olarak kullanılmaktadır (Tablo 1). Sporlu bakterilerin ısı stabiliteleri ve mide bariyerinde hayatta kalma yetenekleri, gıda katkı maddeleri olarak kullanılmalarını sağlar (Cutting, 2011).

Tablo 1. Probiyotik olarak kullanılabilen mikroorganizmalar (Sagar Reddy & Varsha Shriram, 2022).

Laktik asit bakterileri (LAB)	**Bifidobacteria**	**Propionibacteria**	**Enterobacteria**	**Sporlu bakteriler**
***Lactobacillus* spp.** *L. amylovorus* *L. acidophilus* *L. brevis* *L. bulgaricus* *L. casei* *L. fermentum* *L. rhamnosus* *L. curvatus* *L. reuteri* *L. plantarum* *L. crispatus* *L. lactis* *L. cellobiosus* *L. johnsonii* *L. gallinarum* *L. paracasei* *L. salivarius*	***Bifidobacterium* spp.** *B. bifidum* *B. breve* *B. animalis* *B. adolescentis* *B. longum* *B. thermophilum* *B. infantis* *B. essensis*	***Propionibacterium* spp.** *P. acidipropionici* *P. jensenii* *P. freudenreichii* *P. thoenii*	***Enterococcus* spp.** *E. faecium* *E. faecalis*	***Bacillus* spp.** *B. alcalophilus* *B. clausii* *B. subtilis* *B. coagulans* *B. cereus*

2.4. Probiyotiklerin sağlık yararları

Probiyotikler rutin olarak üretilerek ilaç ve gıda endüstrisi tarafından ilaç, yiyecek, tıbbi besin, besin takviyesi, yeni doğan maması veya hayvansal gıda olarak ticari hale getirilebilir (Reque PM, 2022). Probiyotikler, çeşitli tıbbi durumların önlenmesi, tedavisi ve genel sağlığı desteklemek amacıyla kullanılmaktadır (Williams, 2010). Probiyotiklerin akut diyare, nozokomiyal diyare ve antibiyotikle ilişkili diyare gibi sindirim bozukluklarının; bebeklerde atopik dermatit (egzama) ve allerjik rinit gibi allerjik bozuklukların; yetişkinlerde *Clostridioides*

difficile ile ilişkili diyare ve bazı inflamatuar bağırsak bozukluklarının ilerlemesini önlediği ve iyileştirdiği gösterilmiştir. Ek olarak probiyotikler, obezite, metabolik sendrom, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ve tip 2 diyabet gibi metabolik bozuklukların tedavisinde de kullanılabilmektedir (Plaza-Diaz et al., 2019).

2.4.1. Akut diyare

Diyare, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından "24 saatlik sürede üç veya daha fazla gevşek veya sulu dışkılama" olarak tanımlanmaktadır. Son 20 yılda *in vitro, in vivo* ve klinik çalışmalarda, probiyotik alımının farklı türlerdeki diyarenin durdurulmasında olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (Pandey et al., 2015). Bir çalışmada, 1-3 yaş arası çocuklarda akut diyareyi tedavi etmek için tek başına probiyotiklerin, plasebo veya hidrasyondan daha etkili olduğu bildirilmiştir. Başka çalışmalarda da akut diyaresi olan beş yaşın altındaki çocuklarda standart rehidrasyon tedavisiyle birlikte probiyotiklerin kullanılmasının diyarenin sıklığını ve süresini kısalttığı belirtilmiştir (Islam, 2016). Gelişmiş ülkelerde akut diyarenin probiyotiklerle tedavi edilmesi halinde akut diyare süresinin bir gün azaldığı, gelişmekte olan ülkelerde ise persistan diyare süresinde dört gün azalma olduğu gösterilmiştir (M. E. Sanders et al., 2013).

2.4.2. Turist diyaresi

Tüm dünyada, seyahat eden bireylerin %20-60'ının turist diyaresinden etkilendiği tahmin edilmektedir. Turist diyaresi, özellikle sanayileşmiş ülkelerden gelişmekte olan tropikal bölgelere seyahat eden insanları etkilemektedir. Turist diyaresinden sorumlu en yaygın (vakaların %60-85'i) mikroorganizmalar bakteriler olup, kalan enfeksiyonların yaklaşık %10'unundan parazitler ve %5'inden virüsler sorumludur. En yaygın bakteriyel patojenin *Escherichia coli* olduğu ve onu *Campylobacter jejuni, Shigella* türleri ve *Salmonella* türlerinin takip ettiği bildirilmektedir. Turist ishalinin önlenmesinde *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus* ve *Streptococcus* türleri profilaktik olarak kullanılabilmektedir. *Saccharomyces boulardii'*nin bakteriyel diyareye, *Lactobacillus* GG'nin ise viral ve idiyopatik diyareye karşı daha etkili olduğu bildirilmiştir. Probiyotiklerin, immün sistemin uyarılması, bağırsak epitel hücrelerinde bağlanma bölgesi için rekabet veya nisin gibi bakteriyosinlerin salgılanması yoluyla diyareyi önlediği veya iyileştirdiği düşünülmektedir (Pandey et al., 2015).

2.4.3. Antibiyotikle ilişkili diyare

Antibiyotikle ilişkili diyarede (AİD) temel mekanizma, bağırsak florasının bozulmasını takiben karbonhidratların, kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) ve safra asitlerinin metabolizmasındaki değişikliklere bağlı olarak patojenlere karşı direncin bozulmasıdır. Birçok çalışma,

probiyotiklerin AİD sıklığını azalttığını göstermiştir; ancak tüm probiyotik suşları her koşulda etkili değildir. *Lactobacillus acidophilus, L. rhamnosus* GG*, L. delbruckii, L. fermentum* vb. gibi çeşitli laktoasil türlerini ve *S. boulardii* mayasını içeren probiyotikler, AİD insidansını azaltmada etkilidir (Islam, 2016; Pandey et al., 2015). *S. boulardi, L. rhamnosus* GG ve diğer suşları içeren probiyotiklerle yapılan çeşitli çalışmalarda, AİD'de ve *C. difficile* ile ilişkili diyare nükslerinde azalmalar olduğu bildirilmiştir (M. E. Sanders et al., 2013). Başka bir çalışmada *S. boulardii*'nin oral metronidazol ve/veya vankomisin ile kombine halde kullanıldığında, *C. difficile* enfeksiyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Islam, 2016).

2.4.4. İnflamatuar bağırsak hastalığı (İBH)

Genetik olarak yatkın kişilerde bağırsak mikrobiyomunun kalitatif ve kantitatif bozuklukları, inflamatuar bağırsak hastalığı (İBH) gelişimine katkıda bulunabilir (Akutko & Stawarski, 2021). İBH, GİS'in idiyopatik, kronik, tekrarlayan bir inflamatuar hastalığı olup sindirim sistemi disfonksiyonu ve bağırsak mikrobiyotası disbiyozu ile ilişkilidir; *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*'un daha az ve *E. coli*'nin daha fazla olmasıyla kendini gösterir (Becker et al., 2015; Li et al., 2021). İBH, Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) şeklinde görülmektedir. Her iki hastalık da kronik ve tekrarlayan İBH olmakla birlikte, inflamasyonun GİS'deki yeri ve bağırsak duvarındaki histolojik değişiklikler birbirinden farklıdır. İBH gelişimi için bağırsak mikrobiyotasının önemli bir rolü olduğu ve komensal bağırsak mikrobiyotası bileşenlerine karşı bağışıklık tepkisinin yeniden düzenlenmesinin, İBH patofizyolojisinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. İBH'nın hayvan deneylerinin çoğunda, deneysel veya spontan bağırsak iltihabının bakterilerin yokluğunda iyileşmesi, bu bakterilerin bağırsak iltihabı için tetikleyici rolünü vurgulamaktadır. Ayrıca insan genomu sekanslama çalışmalarıyla, İBH gelişme riskini arttıran çoklu genetik polimorfizmler tanımlanmıştır (Becker et al., 2015). CH, ÜK ve poşit (ileal rezervuarın spesifik olmayan bir enflamasyonu), genetik olarak yatkın bireylerde komensal enterik bakterilere karşı aşırı agresif bağışıklık tepkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu hastalıklarda agresif ve koruyucu bakteri türlerinin dengesinin değiştiği gösterilmiş ve tedavide agresif bakteri türlerini ortadan kaldıran antibiyotiklere alternatif olarak probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerini yeniden baskın hale getirebileceği belirtilmiştir (Sartor, 2004). Örneğin poşit (ÜK ameliyatları sonrasında, ince bağırsak makata bağlanırken oluşturulan rezervuardaki –ileo anal poş- enfeksiyon), ÜK'li hastalarda en sık görülen komplikasyondur. Poşit patogenezinde bağırsak bakterilerinin rol oynadığı düşünüldüğünden, tedavisinde probiyotik ve antibiyotikler kullanılmaktadır. Yüksek oranda konsantre bir probiyotik kokteyli olan VSL3'ün (*Bifidobacteria, Lactobacilli* ve *Streptococci* içerir), poşit başlangıcını ve nükslerini önlemede etkili olduğu gösterilmiştir (Gionchetti et al., 2012).

Deneysel hayvan modellerinde ve *in vitro* çalışmalarda, çok sayıda bakteri türünün (pro-inflamatuar sitokinlerin aşağı regülasyonu veya antiinflamatuar faktörlerin *in vivo* uyarılması yoluyla) konağı bağırsak inflamasyonundan koruduğu gösterilmiştir (Becker et al., 2015; Gkouskou, Deligianni, Tsatsanis, & Eliopoulos, 2014). Örneğin, *Bifidobacterium* veya *Lactobacillus* ile oral tedavinin, IL-10 knockout farelerde kronik enflamasyonun başlamasından önce immünomodülatör etkilere sahip olduğu ve kolitin derecesini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Bu mekanizma tam olarak aydınlatılamasa da besinler için rekabet, epitel yüzeyine bakteri adezyonu ve üremeyi sınırlayan toksin üretiminin rolünün önemli olduğu öne sürülmüştür (Becker et al., 2015; Sheil et al., 2006). Probiyotik ajanların bağırsak iltihabındaki koruyucu etkileri, patojen bakterilerle epitel invazyonunun veya üremenin baskılanması, epitel bariyeri fonksiyonunun arttırılması veya immün düzenleyici aktiviteler olarak belirtilmiştir. Enterik patojenlerin üremesi ve işlevinin baskılanması; KZYA'lerinin üretimi, bakterisidal proteinlerin salgılanması ve epitelyal adezyonun önlenmesi yoluyla azalan lümen pH'ına bağlanmıştır. (Sartor, 2004).

2.4.5. Huzursuz bağırsak sendromu

Huzursuz bağırsak sendromu (HBS), hem sanayileşmiş toplumlarda, hem de gelişmekte olan ülkelerde en yaygın (%10-15) bağırsak sorunlarından biridir, HBS, organik bir hastalık bulunmaksızın bağırsak alışkanlığında değişiklik şikayeti ve kronik, tekrarlayan karın ağrısı ile karakterizedir, ayrıca karında şişkinlik hissi, kaygı artışı ve bağırsak dışı semptomlar da yaygındır. Bazı çalışmalarda HBS'de bağırsak mikrobiyotasında farklılıklar olduğu belirtilse de bu farklılıkların, değişen bağırsak hareketliliğinin nedeni mi sonucu mu olduğu kesin değildir. Preklinik çalışmalar bağırsak mikrobiyotasının ve probiyotiklerin enterik sinir sistemini ve beyin sinyallerini etkilediğini göstermiştir. Çeşitli meta analizlerde, probiyotiklerin HBS üzerine etkinliğine dair farklı sonuçlar verilmektedir. Örneğin, bir çalışmada, LAB ve *B. infantis* 356 kullanılması durumunda hastaların karın ağrısı, şişkinlik ve/veya bağırsak hareketlerinde plaseboya kıyasla önemli gelişmeler elde edildiği ve probiyotiklerin HBS yönetiminde faydalı olduğu bildirilmiştir (M. E. Sanders et al., 2013).

Huzursuz bağırsak sendromunun tedavisinde probiyotiklerin kullanımı, bakteri florasındaki değişiklikleri normal/ sağlıklı duruma dönüştürmesi, konak bağışıklığını düzenleyebilmesi ve böylece bağırsak iltihabının azalmasına neden olması dolayısıyla tercih edilmektedir. Bilindiği gibi bağırsak epiteli mukoza tabakası, potansiyel zararlı maddelere karşı koruyucu bir bariyer görevi görmekte ve bağırsak hareketliliğini artırmak için kayganlık sağlamaktadır. Probiyotikler, mukus üretimini teşvik ederek hareketliliği arttırır ve savunma bariyeri işlevini geliştirebilir. HBS olan hastalarda probiyotiklerin (*Lactobacillus* spp.) oral uygulanmasının,

bağırsak epitel hücreleri üzerindeki bazı reseptörlerin ekspresyonunu arttırdığı ve böylece karın ağrısını azaltmak için analjezik bir etki sağladığı gösterilmiştir (Cash, 2014).

2.4.6. Nekrotizan enterokolit (NEK)

Erken doğmuş bebeklerin bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıkların, bu bebeklerin nekrotizan enterokolite (NEK) yatkınlığını etkileyebileceği düşünülmüştür. NEK'li bebeklerin mikrobiyotası, diğer düşük doğum ağırlıklı bebeklerinkinden farklı olup *Firmicutes* filumu azalmış ve Gamma-Proteobakteriler artmıştır. Ayrıca bu bebeklerde antibiyotik kullanımının artmış olduğu belirtilmiştir. Günümüzde NEK, tıptaki ilerlemelere rağmen %30 mortalite veya ciddi sekellerle seyretmektedir. Bağırsak perforasyonu oluşmadan hastalığı teşhis etmek güçtür. Prematüre bebeklerin olgunlaşmamış bağırsağı iltihaplanmaya ve epitel bütünlüğünün kaybına eğilimli olduğundan, probiyotiklerin bu ilerlemeyi durdurabileceği düşünülmüştür. NEK'i önlemek için *Bifidobacterium, Lactobacillus, Saccharomyces* ve/veya *S. thermophilus* suşları ile yapılan çalışmalarda NEK sıklığında ve genel mortalitede azalma olduğu gösterilmiştir (M. E. Sanders et al., 2013).

2.4.7. Kolorektal kanser (CRC)

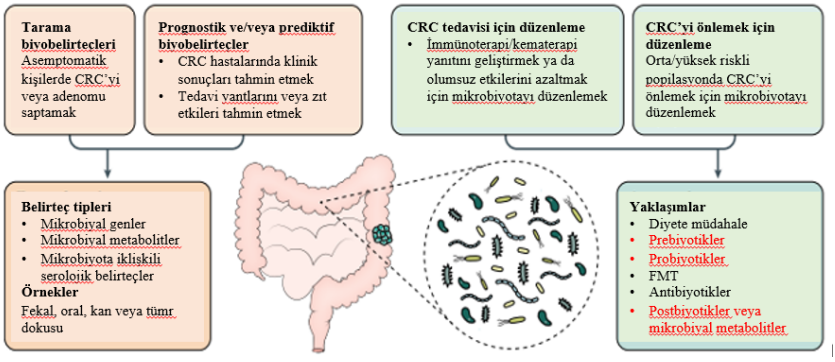
Kolorektal kanser (CRC) dünya çapında en yaygın üçüncü kanserdir. Meyve ve sebze yönünden zayıf beslenme, yüksek düzeyde hayvansal yağ ve protein içeren beslenme tarzı ve genetik faktörlerin yanı sıra mutajenik ve genotoksik bileşik üretebilen bağırsak bakterilerinin de CRC patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Macfarlane, 2010; Wang et al., 2020). Kolorektal karsinogenez, farklı etiyolojik mekanizmalara sahip genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen karmaşık bir süreçtir. CRC, kalın bağırsağın belirli epitel hücrelerindeki bir dizi genetik ve epigenetik bozulmanın ardından ortaya çıkar, ardından normal epitel hücreler adenomlara (iyi huylu neoplazmalar veya polipler) ve sonuçta invaziv karsinomlara dönüşür. Beslenme alışkanlıkları (daha az lif/aşırı kırmızı et), sigara, obezite, alkol tüketimi ve diyabet gibi çeşitli risk faktörleri, CRC'nin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca CRC karsinogenezinde bağırsak mikrobiyotasının rolü de bilinmektedir (Fang et al., 2021; Han, Zhuang, Wu, Wu, & Yang, 2020; Ren et al., 2021).

Belli bağırsak mikrobiyotası üyelerinin miktarındaki değişiklikler bağırsak disbiyozuna neden olabilir. Disbiyoz, bağırsak mikrobiyotasının kalıcı dengesizliğidir ve inflamatuar bağırsak hastalıkları, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve kanser gelişimini etkiler. CRC'nin gelişiminde bazı bakteriler özel bir rol oynayarak bağırsak epitel hücrelerinin zarar görmesine, kronik inflamasyona ve karsinogeneze yol açar. Metagenomik çalışmalar, CRC'li hastaların bağırsak mikrobiyotasında, çeşitli bakteri türlerinin (*Bacteroides, Fusobacterium,*

Parvimonas, Porphyromonas, Peptostreptococcus ve Streptococcus) önemli ölçüde daha fazla olduğunu göstermiştir: Ayrıca bazı bakteri türlerinin (*Bacteroides fragilis, Fusobacterium nucleatum, Parvimonas micra, Peptostreptococcus anaerobius ve Porphyromonas asaccharolytica*) CRC'de yükseldiği bulunmuştur. Benzer şekilde bazı oral anaerop bakterilerin (*Enterobacteriaceae* bakterileri,-*Escherichia, Shigella, Klebsiella*- ve *Eikenella* spp, *Gemella morbillorum, Prevotella intermedia* ve *Solobacterium moorei*) CRC gelişiminde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bu bakterilerin her birinin CRC karsinogenezinde oynadıkları roller farklılık göstermektedir (Karpiński, Ożarowski, & Stasiewicz, 2022; Ren et al., 2021).

Bağırsak mikrobiyotası, CRC'nin başlamasını ve ilerlemesini çeşitli yollarla düzenleyebilir: Komensal bakterilerin veya bunların ürünlerinin infiltrasyonu, tümörle ilişkili miyeloid hücreleri aktive ederek tümöre teşvik eden inflamasyonu indükler. Patojen bakteriler bağırsak epitel hücrelerine bağlanır ve tümör oluşumunu tetikler. Bakteriler tarafından üretilen genotoksinler, bağırsak epitel hücrelerinde DNA hasarına neden olur ve CRC gelişimini başlatır. Kronik inflamasyonun uyarımı altında, inflamatuar hücreler reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretebilir; bu da DNA hasarını indükler. Sekonder safra asitleri, H_2S ve nitroso bileşikler gibi çeşitli bakteriyel metabolitler, CRC karsinogenezini destekleyen DNA hasarına neden olabilir. Biyofilm gibi mikrobiyal topluluklar, IL-6 ve efektör STAT-3 aktivasyonu yoluyla karsinogenezi tetikler (Cheng, Ling, & Li, 2020).

Çeşitli klinik uygulamalar (tarama, prognostik veya prediktif biyobelirteçler olarak kanseri önlemek, tedavileri iyileştirmek veya tedavinin olumsuz etkilerini azaltmak için mikroorganizmaları modüle etmek vb.) için bağırsak mikrobiyotasının kullanılabileceği bildirilmiştir. Probiyotikler, tedavi yaklaşımları arasında da yer almaktadır (Şekil 4) (Wong & Yu, 2019).



Şekil 4: CRC'de bağırsak mikrobiyotası ile ilgili potansiyel klinik yaklaşımlar (Wong & Yu, 2019).

Çeşitli çalışmalarda probiyotik bakterilerin, farklı potansiyel bağışıklık mekanizmalarıyla antikanser aktiviteleri incelenmiştir. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türlerinin, CRC için

kanser hücresi apoptozunu indükleyen hücre proliferasyonunu inhibe etme, konak bağışıklığını modüle ederek karsinojenik toksinleri etkisiz hale getirme ve antikanserojenik bileşikler üretme gibi farklı mekanizmalar yoluyla antikanserojen özelliklere sahip olduğu preklinik çalışmalarda göstermiştir. Klinik çalışmalarda, insanlarda CRC için probiyotiklerin etkinliği değerlendirilmiş, *Lactobacillus casei*'nin oral uygulanmasının, rezeksiyon geçirmiş hastalarda orta veya yüksek dereceli displastik tümörlerin oluşma oranını azalttığı, ancak toplam tümör sayısını azaltmadığı bildirilmiştir. Yine de, *in vitro* ve *in vivo* deneysel verilere rağmen, CRC'nin önlenmesi için probiyotiklerin kullanımını destekleyen kanıtlar ön hazırlık niteliğindedir (Wong & Yu, 2019).

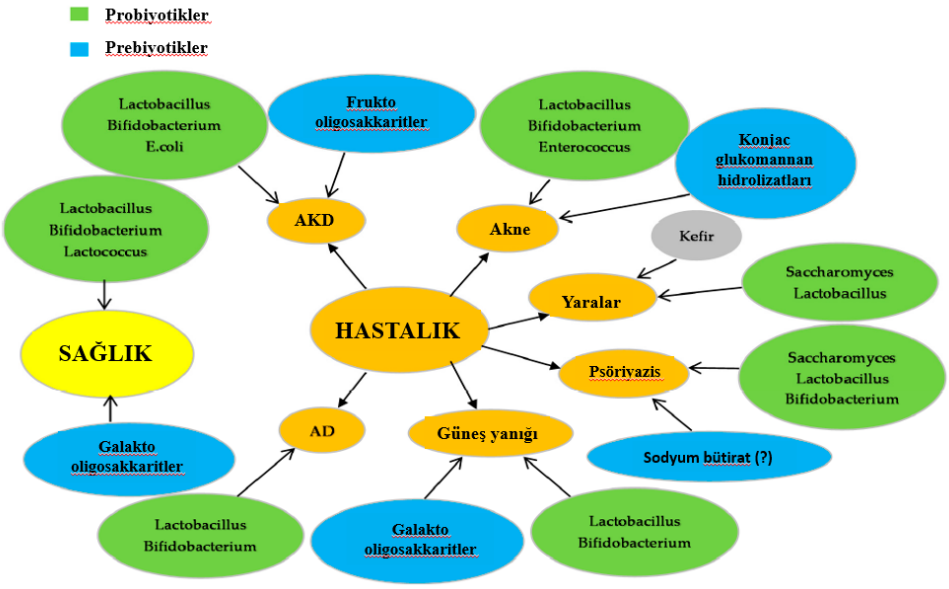
2.4.8. Alerjiler

Anormal bağırsak mikrobiyotası, alerjik bozukluklar ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca alerji ile ilişkili faktörlerin (doğum şekli, yeni doğan ve bebeklerde antibiyotik kullanımı, anne sütü harici besleme) de bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerle ilişkili olduğu bilinmektedir (M. E. Sanders et al., 2013).

Son zamanlarda, probiyotiklerin allerjik hastalıkların korunmasında ve tedavisinde yararlı rolleri olduğu ortaya çıkmıştır. *Lactobacillus plantarum* L67 gibi bazı probiyotiklerin, konakta IL-12 ve IFN-ϒ üretimi ile alerjik bozuklukları önleme potansiyeli olduğu *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, *L. plantarum* 06CC2'nin allerji semptomlarını önemli ölçüde hafiflettiği ve ovalbümine duyarlılaştırılmış farelerin serumundaki total IgE, ovalbümine özgü IgE ve histamin seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir. Farelerin dalak hücrelerinde, *L. plantarum* 06CC2'nin allerjik semptomların hafifletilmesinden sorumlu IFN-ϒ ve IL-4 salgılanmasını önemli ölçüde arttırdığı bilinmektedir (Kerry et al., 2018).

Allerjilerin "atopik yürüyüş" olarak bilinen egzama-rinit-astım ilerleyişini durdurmak için probiyotiklerden faydalanılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (M. E. Sanders et al., 2013). Allerjiler arasında atopik dermatit (AD), yaşamın erken evrelerinde görülen, alerjik rinit, gıda alerjileri ve astım şeklinde seyredebilen ve çocuklarda daha yaygın olan inflamatuar bir cilt hastalığıdır (Lolou & Panayiotidis, 2019). Dünya çapında AD prevalansının çocuklarda %15-20, yetişkinlerde ise %1-3 oranında olduğu ve prevalansın son yıllarda 2-3 kat arttığı bildirilmiştir (Reque PM, 2022). AD'nin önemli bir özelliği, bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili olmasıdır (M. E. Sanders et al., 2013). Bağırsak mikrobiyotasında sağlıklı bebeklere kıyasla artan sayıda *Clostridium* cinsi bulunan bebeklerde AD gelişme riskinin yüksek olduğu ve AD gelişimi ile bağırsak mikroflorası arasında bir ilişki olduğu; ayrıca *L. rhamnosus* ve *L. reuteri* uygulamasının AD'li çocuklarda atopik egzamanın sıklığını %50 oranında azalttığı

bildirilmiştir (Kalliomäki et al., 2001; Lolou & Panayiotidis, 2019). Belli probiyotik mikroorganizmaların, bir dizi biyolojik süreci etkileyerek AD ve diğer cilt hastalıkları (akne, sedef hastalığı, güneş yanığı, yaralar, vb.) üzerine önleyici etki yaptığı gösterilmiştir (Şekil 5). Probiyotikler, immün sistem uyarımı, integrin bloklama, transkripsiyonun aktivasyonu/baskılanması, anti-inflamatuar etkiler, bakteriyosinlerin üretilmesi, gen ekspresyonunun arttırılması/inhibisyonu, yarışmalı dışlama gibi birçok yolla çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde yarar sağlayabilmektedir. Bir çalışmada, hamile kadınlara doğumdan dört hafta önce ve doğumdan altı ay sonra ilave bir probiyotik olarak *L. rhamnosus* uygulandığında, çocuklarda ilk yedi yılda AD geliştirme riskinin önemli ölçüde azaldığı, ancak sonraki yıllarda astımın ekspresyonu üzerine herhangi bir etki gözlenmediği bildirilmiştir. Yine AD geliştirme riski yüksek olan bebeklere hamilelik sırasında ve doğumdan sonra probiyotik mikroorganizma karışımı verildiğinde, IgE ile ilişkili egzamada %40 oranında azalma gözlendiği bildirilmiştir (Lolou & Panayiotidis, 2019).



Şekil 5: Cilt sağlığı ve hastalıkları üzerine probiyotik ve prebiyotiklerin etkisi (Lolou & Panayiotidis, 2019) AKD: Alerjik kontakt dermatit, AD: Atopik dermatit.

2.4.9. Metabolik sendromlar

Metabolik hastalıklar (obezite, diabetes mellitus, alkolik olmayan karaciğer yağlanması, osteoartrit vb.), bağırsak mikrobiyotasıyla ilişkili olup halk sağlığı için ciddi tehdit oluşturan hastalıklardır. Probiyotikler, metabolik hastalıkların önlenmesinde uygun bir strateji olarak

öne sürülmüştür. Bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili mekanizmalar, bağırsak mikrobiyota bileşiminin modülasyonu, bağırsak mikrobiyal metabolitlerinin düzenlenmesi ve bağırsak bariyer fonksiyonunun iyileştirilmesidir (Li et al., 2021).

2.4.10. Obezite

Beslenme esnasında makrobesinlerin parçalanması ve metabolizması için bağırsak mikrobiyomunun önemi büyüktür. Bağırsak mikrobiyomunun, besin metabolizması ve enerji harcaması üzerinde etkisi olup, karbonhidrat, lipid ve esansyel amino asit metabolizmasıyla bağlantılıdr (Aoun et al., 2020).

'İkinci beyin' olarak adlandırılan bağırsak, beyini ve beyin sinyallerini doğrudan etkileyen, açlık ve iştah için uyarıcıları etkileyen trilyonlarca mikroorganizmadan oluşur. Bağırsak mikrobiyomunun çeşitliliği ve bileşimi, doğum şekli, beslenme alışkanlıkları, antibiyotik ve ilaç kullanımı, yaşlanma ve diğer çevresel faktörler gibi birçok faktörden etkilenir. Bu faktörler, kilo alımı ve obezite ile ilişkili disbiyoza yol açabilir. Spesifik olarak, diyet, fiziksel aktivite, diyet takviyesi, ilaçlar ve bariatrik cerrahi bağırsak mikrobiyomunu etkiler. Örneğin antibiyotik kullanımı, çoklu enflamatuar bozuklukların gelişme riskini arttırır ve bağırsak mikrobiyomundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Antibiyotik kaynaklı disbiyoz, hayvan çalışmalarında kilo alımına neden olur ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)/yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oranlarını arttırır. Dolayısıyla, bağırsak mikrobiyomunun, metabolizma, hormon dengesi, nörotransmiter işlevi ve beyin üzerindeki etkisi, kilo yönetiminde ve obezite tedavisinde önemli bir rol oynayabilir. Probiyotik ve prebiyotiklerin kullanımının, bağırsak bakteri bileşimini iyileştirerek obezitenin önlenmesi ve tedavisi için umut verici olabileceği bildirilmiştir. Araştırmalar, probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotiklerle takviyenin, hormonların, nörotransmiterlerin ve enflamatuar faktörlerin salgılanmasını değiştirerek kilo alımına yol açan gıda alımı tetikleyicilerini önleyebileceğini göstermiştir (Aoun et al., 2020).

Sağlığı doğrudan bozan anormal veya aşırı yağ birikimi (obezite), enerji mevcudiyetindeki artış, hareketsiz yaşam ve ortam sıcaklığının daha fazla kontrolü ile bağlantılıdır ve bunun sonucu olarak enerji alımı ve harcamasında bir dengesizliğe yol açar. Bağırsak mikroflorasının obez farelerden steril farelere nakledilmesinin, obez fenotipi çoğaltabileceği ve gıdadan enerji elde etmede ve lipogenezi uyarmada daha verimli olmasına yol açabileceği bildirilmiştir (Kerry et al., 2018). Bağırsak bakterilerinin, diğer obezite risk faktörlerinin yanı sıra, besinlerin sindirimi yoluyla alınan enerji miktarını arttırarak, düşük seviyeli sistemik inflamasyona neden olarak, yağ birikimini arttırarak ve bireyin hissettiği açlığı etkileyerek obeziteye yol açabileceği öne sürülmüştür (Norman-McKay, 2019). Probiyotiklerin, mikroorganizmaları

düzenleyerek konak sağlığına katkıda bulunan fizyolojik işlevlere sahip olduğu bilinmektedir (Kerry et al., 2018). *Lactobacillus pentosus* GSSK2 ve *Lactobacillus plantarum* GS26A gibi probiyotik suşların obeziteyi azaltmada yararlı etkileri vardır. *Bifidobacterium lactis* LMG P-28149 ve *Lactobacillus rhamnosus* LMG S-28148 içeren probiyotik karışımının, obezite ile ilişkili bağırsak mikrobiyotasının bileşimini düzenleyebileceği; *Lactobacillaceae* bolluğunu azaltacağı; buna karşın *Akkermansia muciniphila* ve *Rikenellaceae* bolluklarını eski haline getirebileceği bildirilmiştir (Li et al., 2021). *Lactobacillus gasseri* BNR17 ise leptin ve adiponektinin ana kaynağı olan adiposit dokusundaki artışı inhibe etme ve böylece leptin sekresyonunu sınırlama özelliği göstermiştir. *Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium longum* gibi diğer probiyotik mikroorganizmaların da hipokolesterolemik etkileri olduğu bildirilmiştir (Kerry et al., 2018).

2.4.11. Laktoz intoleransı

Laktoz intoleransı, genetik olarak belirlenen bir beta-galaktosidaz eksikliğidir; laktozun glikoz ve galaktoza hidrolize edilememesiyle sonuçlanır. Sindirilmemiş laktoz kalın bağırsağa ulaştığında bakteriyel enzimler tarafından parçalanır ve ozmotik diyareye yol açar (Kechagia et al., 2013). Dünya nüfusunun %60'dan fazlası, düşük laktaz enzim aktivitesi seviyeleri nedeniyle laktoz intoleransından muzdariptir. Laktaz enzim aktivitesi yaş, ırk, ince bağırsak zarının bütünlüğü ve ince bağırsak geçiş süresi gibi birçok faktörden etkilenir. Laktaz aktivitesi yaşla birlikte azalır ve emilmeyen laktoz kolon bakterileri tarafından KZYA ve gaz üretmek üzere metabolize edilir (Oak & Jha, 2019). Mukozaya zarar veren pelvik radyoterapi, laktaz üreten hücreleri enfekte eden Rotavirus enfeksiyonu ve kısa bağırsak sendromu beta-galaktosidaz eksikliğine yol açabilir; ancak genellikle geri dönüşümlüdür. Laktoz intoleransı olan bireylerde süt veya süt ürünleri tüketimi sonrasında şişkinlik, diyare, batın krampları ve mide bulantısı gelişir. Bireylerin bir kısmı probiyotik takviyesine olumlu yanıt verdiğinden laktoz intoleransının tedavisinde probiyotiklerin kullanılması, klinisyenler tarafından terapötik bir alternatif olarak düşünülmüştür (Kechagia et al., 2013; Oak & Jha, 2019). Daha sonraki araştırmaların sonucunda laktaz pozitif probiyotik suşların, laktoz intolerasının semptomlarını gidermek için uygulanabileceği bildirilmiştir (Reque PM, 2022).

Probiyotiklerin, bağırsak sağlığının iyileştirilmesi, bağışıklık tepkilerinin arttırılması ve serum kolesterolünün düşürülmesi gibi çeşitli sağlık yararları olduğu gösterilmiştir. Ayrıca fermente edilmiş ve edilmemiş süt ürünlerindeki probiyotik bakterilerin, laktoz intoleransının klinik semptomlarını hafifletmek için kullanılabileceği bildirilmiştir (Oak & Jha, 2019). Probiyotikler laktoz metabolizmasını iyileştirerek önemli bir sağlık yararı sağlamaktadır (Kechagia et al., 2013). Probiyotikler, laktoz intoleransı durumunda ince bağırsaktaki genel hidrolitik

kapasiteyi artırarak ve kolonik fermentasyonu arttırarak laktoz sindirimini destekler. Ayrıca, fermente ürünlerde laktoz konsantrasyonunu azaltabilir ve fermente ürünlerle birlikte ince bağırsağa giren aktif laktaz enzimini artırabilir (Oak & Jha, 2019).

Bifidobacterium. longum ve *Lactobacillus bulgaricus* gibi suşlar, epitel hücresine patojen girişini bloke ederek etki gösterir (Oak & Jha, 2019). *S. thermophilus ve L. delbrueckii ssp. bulgaricus* kullanan geleneksel yoğurt preparasyonları daha yüksek beta galaktosidaz aktivitesi nedeniyle tedavide kısmen daha etkilidir (Kechagia et al., 2013).

2.4.12. Helicobacter pylori enfeksiyonu

Helicobacter pylori'nin mide kanserine yol açan enfeksiyonlarla ilgili en önemli patojen olduğu bilinmektedir. *H. pylori,* midede yaşayabilen spiral şekilli Gram negatif bir bakteridir. *H. pylori* enfeksiyonu insanda en yaygın enfeksiyonlardan biridir; dünya nüfusunun yarıdan fazlasının mide mukozasının *H. pylori* ile kolonize olduğu tahmin edilmektedir (Reque PM, 2022). Mide kanserine yol açan diğer risk faktörleri beslenme düzeni, yaşam stili, genetik faktörler, aile öyküsü, ilaçlar, demografik özellikler, mesleki maruziyet, iyonize ışınlar ve enfeksiyonlar olarak sıralanabilir (Yusefi, Lankarani, Bastani, Radinmanesh, & Kavosi, 2018). Mide kanseri dünya çapında önemli bir kanser türü olup 1.000.000'den fazla yeni vakadan ve tahmini 783.000 ölümden sorumludur. Bu nedenle mide kanseri, dünyada en sık tanı konan beşinci kanserdir ve kanser ölümlerinin üçüncü önde gelen nedenidir. Genellikle erkeklerde kadınlara göre iki kat daha fazla görülür. Dünya Kanser İstatistikleri (GLOBOCAN) 2018 verilerine göre Türkiye'de erkeklerde beşinci en sık kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerde %8,6 ile ikinci sıradadır (Bray et al., 2018; Wroblewski & Peek, 2016). *H. pylori* enfeksiyonu çocukluk çağında oluşabilir; ancak prevalans yaşla ilişkili olup çoğunlukla asemptomatiktir. Enfeksiyon devam ederse mide ülserlerine ve sonuçta mide kanserine yol açabilir. Gastrektomi ve mide ameliyatı öyküsü de mide kanseri riskini arttırabilir, çünkü ameliyattan sonra mide asidi seviyesi düşebilir ve *H. pylori*'ye duyarlılık artabilir (Ji & Yang, 2020; Ruggiero, 2014; Yusefi et al., 2018). *H. pylori* enfeksiyonu tedavisi proton pompa inhibitörü (PPI) ve antibiyotikler uygulanarak yapılmaktadır, Ancak tedavi midenin asidik ortamı ve antibiyotik direnci nedeniyle giderek güçleşmektedir. Üçlü tedavi (PPI, amoksisilin, klaritromisin) son zamanlara kadar *H. pylori* eradikasyonu için en etkili tedavi yöntemi olmasına rağmen, ilaç dirençli suşların artışı, yan etkiler ve antibiyotik tedavisinin yol açtığı disbiyoz nedeniyle tedavide güçlükler yaşanmaya başlamış ve tedavi amaçlı probiyotik kullanımı gündeme gelmiştir (Ji & Yang, 2020; Reque PM, 2022).

Midede *Helicobacter pylori* kolonizasyonu ve *H. pylori*'nin mide hastalıkları ile ilişkisi nedeniyle, *H. pylori* üzerine probiyotiklerin etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış-

tır. Birçok çalışmada çeşitli probiyotiklerin, metabolitleri veya bakteri hücreleri aracılığıyla *H. pylori*'yi antagonize etme potansiyeline sahip olduğunu gösterilmiştir. Probiyotiklerin *H. pylori*'ye karşı etkinliği, antibakteriyel maddelerin (laktik asit, KZYA, H_2O_2, bakteriyosin) salgılanması, rekabetçi inhibisyon, mukus bariyerlerinin güçlendirilmesi ve bağışıklığın düzenlenmesi gibi doğrudan veya dolaylı etkileşim yoluyla olmaktadır (Ji & Yang, 2020; Ruggiero, 2014). Probiyotik takviyeli antibiyotik tedavisinin, antibiyotiklerin etkinliğini arttırdığı, konağın Gİ mikroflorasını koruduğu ve yan etkileri azalttığı klinik olarak kanıtlanmıştır (Ji & Yang, 2020). Eradikasyon tedavisine ilave olarak genellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerini içeren probiyotik formülleri kullanılmaktadır (Ruggiero, 2014). Önceki çalışmalarda probiyotiklerin tek başına uygulandıklarında *H. pylori'*ye karşı sadece kısmi etkinlik gösterdiği, ancak eradikasyon tedavisi ile birlikte uygulandığında etkinliğin arttığı ve/veya yan etkilerin azaldığı bildirilmiştir. Örneğin probiyotiklerle desteklenmiş eradikasyon tedavisi alan deneklerin sadece %82,63'ünde eradikasyon gözlenmiştir (Ruggiero, 2014). Daha yakın tarihli çalışmalarda ise *Lactobacillus* türlerinin tek başına ve diğer probiyotik suşlarla kombine halde kullanıldığında *H. pylori* üremesini inhibe ettiği ve inflamatuar yanıtları baskıladığı belirtilmiştir. Ayrıca *Pediococcus* suşlarının da *H. pylori* enfeksiyonunu eradike etmede etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak yine de *H. pylori* eradikasyonu için probiyotiklerin tek tedavi olarak kullanılmasının önerilmemesi gerektiği belirtilmiştir (Eslami et al., 2019).

2.4.13. Ürogenital sistem

Ürogenital enfeksiyonlar, her yıl etkilediği hasta sayısına bakıldığında önemli bir halk sağlığı problemidir. Cinsel temasla ilgili olmayan ürogenital enfeksiyonlar bakteriyal vajinoz (BV), idrar yolu enfeksiyonu (İYE) ve maya vajinitini kapsar (Bustamante et al., 2020). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) verilerine göre dünyada bir milyardan fazla kadın, bu enfeksiyonlardan muzdariptir (Kerry et al., 2018).

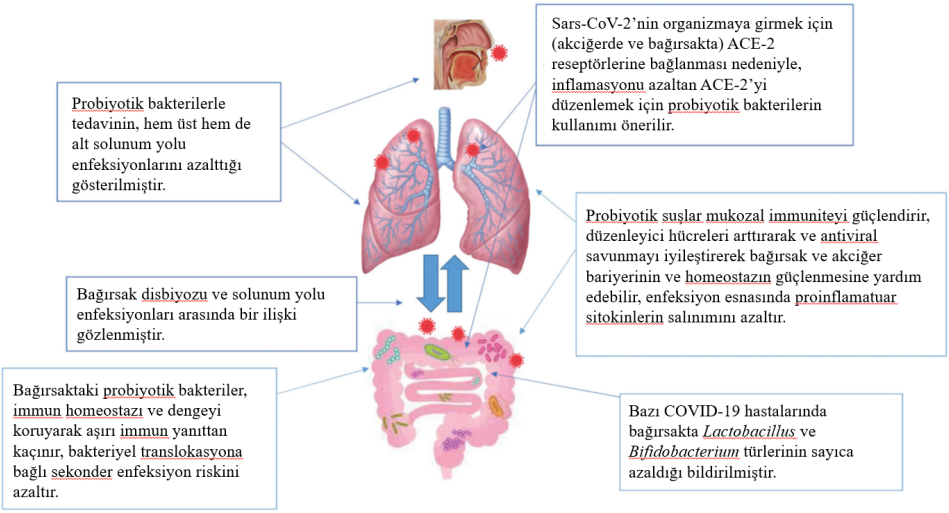
Kadınlarda vajinal mikrobiyota aerop ve anaerop bakterilerden oluşmaktadır ve baskın mikroorganizma *Lactobacillus* türleridir. Laktobasiller, vajinal mukoza yüzeyinde, organik asitlerin salgılanması, antimikrobiyal maddelerin (H_2O_2 ve bakteriyosin) üretimi, besinler için rekabet, ko-agregasyon, bağışıklık sisteminin uyarılması, epitel adezyonunun dışlanması gibi farklı mekanizmalarla vajinayı patojen mikroorganizmalara karşı koruyan bir biyofilm oluşturur (Bustamante et al., 2020). Vajinal mikroflorada laktobasillerin dışında yaklaşık 50 farklı bakteri türü bulunmakta ve vajinanın mikrobiyal bileşimindeki dengesizlik, vajinal mikroflora sağlığını büyük ölçüde etkileyerek BV ve İYE gibi enfeksiyonlara yol açmaktadır. Anormal vajinal mikrobiyal flora ile artmış İYE insidensi arasında bir ilişki olduğu iyi bilinmektedir (Kerry et al., 2018).

Son yıllarda tıp alanındaki en önemli sorun, enfeksiyonlara yol açan patojenlerin çoğunun ilaca direnç geliştirmiş olmasıdır. Bu nedenle yeni ilaçlar geliştirmek yerine, patojenlere karşı savaşan ve patojen olmayan organizmalar gibi yeni canlı takviyeler geliştirme zorunluluğu ortaya çıkmıştır (Kerry et al., 2018). Çeşitli çalışmalarda, ürogenital enfeksiyonların, probiyotik takviyesiyle *Lactobacillus* spp. sayısı dengelenerek iyileştirilebileceği bildirilmiştir. Birçok araştırmada antibiyoterapilerin probiyotiklerle takviye edilerek (gıda takviyesi olarak oral yolla, vajinal fitiller olarak intravajinal yolla veya topikal jellerle) vajinal mikrobiyotanın restorasyonunun sağlanabileceği ve/veya yerel mukozal bağışıklık yanıtının modüle edilebileceği gösterilmiştir (Bustamante et al., 2020; Kerry et al., 2018). Başka bir meta analizde, vajinal disbiyozun farklı türlerini tedavi etmek amacıyla kullanılan dört *Lactobacillus* suşunu içeren probiyotik ürünlerin, mikrobiyal bileşimi iyileştirebileceği belirtilmiştir (Bustamante et al., 2020).

2.4.14. Solunum yolu hastalıkları

Solunum yolundaki mukozal yüzeylerin enfeksiyonları, rinit, sinüzit, tonsillit, larenjit, farenjit ve nezleyi kapsar. Üst solunum yolu enfeksiyonlarının (ÜSYE) dünyada her yıl yaklaşık 17 milyar bireyi etkilediği tahmin edilmektedir (Reque PM, 2022). ÜSYE'nin önlenmesi ve azaltılmasında probiyotiklerin kullanılabileceği belirtilmiştir. ÜSYE'larının önlenmesinde oral probiyotiklerin etkisini değerlendiren bir çalışmada, 18-24 yaş arası öğrencilere 12 hafta süreyle *L. rhamnosus* ve *B. animalis ssp. lactis* içeren probiyotik karışımının (10^9 CFU) oral olarak (5 g) uygulanmasını takiben, ÜSYE süresinin iki gün kısaldığı ve enfeksiyon şiddetinin %34 oranında azaldığı belirtilmiştir (Smith, Rigassio-Radler, Denmark, Haley, & Touger-Decker, 2013). Başka bir çalışmada *L. casei, L. paracasei* ve *L. fermentum* içeren probiyotik karışımı kullanımının, kanda IFN-ϒ ve bağırsakta sIgA seviyelerini arttırarak ÜSYE insidensini azalttığı bildirilmiştir (Zhang et al., 2018). Ayrıca probiyotiklerin hava yolundaki T_{reg} yanıtını arttırarak pulmoner immüniteyi uyarabildiği ve bağırsak immünitesini geliştirerek enfeksiyon riskini azaltabildiği bilinmektedir. Bazı probiyotik suşların antiviral aktiviteye sahip olmaları ve COVID-19 varlığında bağırsak mikrobiyotasında değişiklikler olması nedeniyle laktobasil ve bifidobakterileri içeren probiyotiklerin kullanımının, SARS-CoV-2 enfeksiyonuyla indüklenen bağırsak disbiyozunun üstesinden gelebileceği ve COVID-19'a karşı destek tedavi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Sundararaman, Ray, Ravindra, & Halami, 2020). COVID-19 enfeksiyonunda probiyotik uygulamasının olası faydalarının (Şekil 6), doğal ve kazanılmış bağışıklığa etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Probiyotiklerin, mukozal bağışıklığı iyileştirmek için IgA sekresyonunun uyarılması, fagositoz ve makrofaj üretiminin aktivasyonu, T_{reg} hücrelerin seviyelerinin /fonksiyonunun düzenlenmesi,

dendritik hücre olgunlaşmasının indüklenmesi ve bağırsak epitel hücrelerinin sitokin üretimi üzerindeki etkilerinin sistemik inflamasyonu etkileyebileceği öne sürülmektedir (Bottari, Castellone, & Neviani, 2021).



Şekil 6: Sars-CoV-2 enfeksiyonunun yükünü ve şiddetini azaltmada probiyotiklerin olası uygulamaları (Bottari et al., 2021).

2.4.15. Mental/ nörolojik hastalıklar

Bağırsak mikroflorası ve beyin arasındaki ilişki, bağırsak ve beyinin, kan-beyin bariyerini geçen kimyasallar veya sinir sistemi aracılığıyla birbirleriyle etkileşime girebilmesi şeklinde gerçekleşir. Örneğin, *vagus* siniri, beyindeki nöronlarla bağırsak sinir hücreleri arasındaki bağlantıyı sağlar. Bağırsak florası, metiyonin, glutamat, monoaminler ve homosistein üretir; bunlar lenfatik sistem ve dolaşım sistemi yoluyla merkezi nöronlara ulaşabilir ve onların aktivitelerini (davranış değişiklikleri, kaygı, hafıza bozukluğu, diğer bilişsel bozuklukla vb.) etkileyebilir. Bağırsak mikroflorası, glutamat, KZYA, biyojenik aminler, serotonin, dopamin, histamin gibi nöromodülatörleri /nörotransmitterleri ve homosistein, GABA ve triptofan gibi diğer amino asit metabolitlerini sentezleyebilir ve salgılayabilir. Tüm bu moleküller beyin dokusuna etki eder ve nöronların aktivitesini kontrol eder. Bağırsak mikroflora değişikliklerinin davranışsal anormalliklerden sorumlu olduğu doğrulanmış, ancak neden-sonuç ilişkisi saptanamamıştır. Üstelik bağırsak bakterileri, beyin tarafından (nörotransmiterler aracılığıyla) gönderilen bilgilere duyarlıdır, böylece bağırsak sinir sistemi, bağırsak bakterileri aracılığıyla beyinle bilgi alışverişinde bulunabilir Dolayısıyla, "bağırsak-beyin-mikrobiyota ekseni" bağırsak ve beyin arasındaki çift yönlü bir iletişimi ifade eder. Bağırsak- beyin arasındaki bilgi ve madde alışverişi, periferik dolaşım sistemi aracılığıyla da gerçekleşebilir. (Pluta,

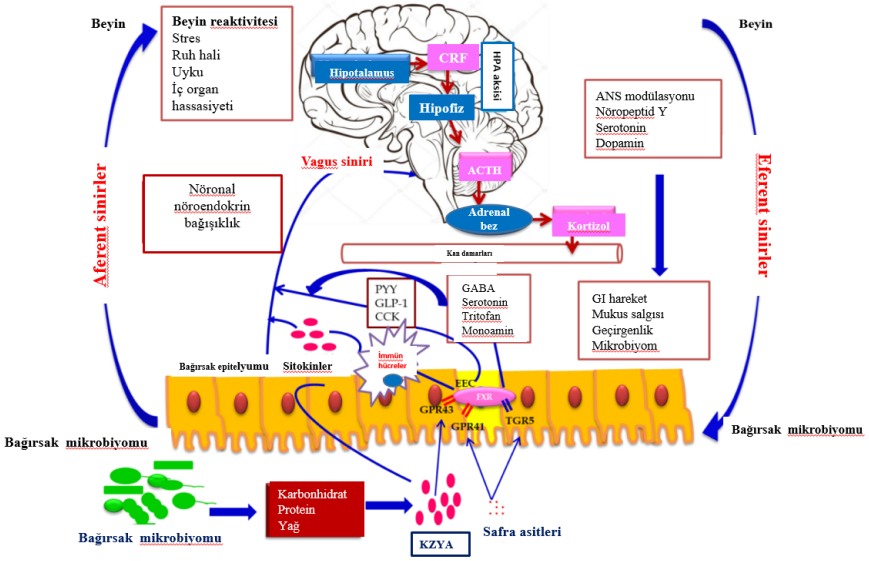
Ułamek-Kozioł, Januszewski, & Czuczwar, 2020).

Bağırsak-beyin-mikrobiyota eksenindeki etkileşimler, çeşitli nörolojik bozukluklarla (Alzheimer, Parkinson, otizm spektrum bozukuğu, anksiyete, depresyon vb.) ilgilidir (Reque PM, 2022). Son araştırmalara göre, bağırsak mikroflorasındaki değişiklikler çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Alzheimer hastalığının gelişiminde bağırsak disbiyozunun olası rolüne dair kanıtlar bulunmuştur. Alzheimer hastalığı, beyinde amiloid ve işlevsiz *tau* proteininin birikmesi ile ortaya çıkan ve demans ile sonuçlanan bir hastalıktır. Son yıllarda beyin ve bağırsağın "bağırsak-beyin-mikrobiyota ekseni" adı verilen bir ağ oluşturduğu ortaya çıktığından, bağırsak mikroflorasının Alzheimer hastalığında işe karışabileceği düşünülmektedir. Bağırsak mikrobiyotasının bireysel bir diyet veya faydalı mikroflora müdahalesi (probiyotik/prebiyotikler, mikrobiyolojik bileşenler ve amiloid proteini) yoluyla modülasyonunun, Alzheimer hastalığı için yeni bir tedavi olabileceği belirtilmektedir. Amiloid birikiminde ve hastalığın ilerlemesinde akut ve kronik nöroinflamasyon önemli olduğundan, nöroinflamasyonu baskılayan probiyotik/prebiyotiklerin (LAB ve *Bifidobacterium*) tedavi amacıyla kullanılabileceği düşünülmüş, *in vivo* modellerde probiyotik tedavisinin bağırsak metabolitlerinin (örn, KZYA) içeriğini değiştirdiği gözlenmiştir (Pluta et al., 2020).

Otizm spektrum bozukluğu, beyindeki farklılıkların neden olduğu gelişimsel bir yetersizlik olup dil ve sosyal bozukluklar, sınırlı ilgi alanları ve tekrarlayan basmakalıp faaliyetler gibi bir dizi nörogelişimsel bozuklukla karakterizedir. Erkeklerde kadınlara göre daha yaygındır (He, Liu, Tang, Chen, & Song, 2023). Gıda tercihleri ve beslenme rejimleri, otizm gelişimi için faktörlerini etkilemede anahtar olarak kabul edilmektedir. Özellikle annenin diyetinin ve yaşam tarzının otizm ve diğer nörogelişimsel bozuklukların gelişimi ile büyük ölçüde ilişkili olduğu belirtilmiştir (Sivamaruthi, Suganthy, Kesika, & Chaiyasut, 2020). Dünya nüfusunun %0,1 ila %1,8'ini etkileyen yaygınlığına rağmen, otizm patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Otizmli hastaların daha sık Gİ şikayetleri olduğu, çünkü otizmli çocuklarda bağırsağın mikrobiyal bileşimininde farklılıklar olduğu bilinmektedir (Ng et al., 2019; Sivamaruthi et al., 2020).

Bağırsak-beyin ekseni teorisi ve otizmli hastalarda Gİ bozuklukların nispeten yüksek prevalansı göz alınarak, probiyotiklerin otizm üzerine terapötik etkileri olabileceği düşünülmüştür. Bağırsak-beyin ekseni; memeli GİS ve merkezi sinir sistemi (MSS) bilgi alışverişi için önemli bir yoldur. Bağırsak-beyin ekseni; MSS'nin sempatik ve parasempatik dallarından, nöroendokrin sistemden, otonom sinir sisteminden, enterik sinir sisteminden, bağırsak mikroflorasından ve bunların metabolitlerinden oluşur. Bağırsak florası bilgiyi enterik sinir sistemi yoluyla *vagus* sinirine iletir ve daha sonra psikolojik, bilişsel, davranışsal ve nörolojik

işlevleri etkilemek için MSS'ne ulaşır (He et al., 2023) (Şekil 7).



Şekil 7: Bağırsak mikrobiyomu-beyin ekseni: bağırsak mikrobiyomu, bağırsak bariyeri ve beyin arasındaki ilişkiyi gösteren çift yönlü sinyal yolları. Bağırsak mikrobiyotası beyinle nöroendokrin bağışıklık ağı yoluyla ya dolaylı olarak afferent vagal sinir uçlarına etki eden bağırsaktan türetilen moleküller yoluyla ya da doğrudan mikroorganizma tarafından üretilen sinyaller aracılığıyla iletişim kurar. Beynin yapısal bağlantıları (merkezi sinir sisteminin birbirine bağlı çoklu yapısal ağları), otonom sinir sistemi yoluyla bağırsak mikrobiyotasını düzenler. Çift yönlü etkileşim yanıtı kazanımındaki bozulma, psikososyal veya bağırsaktan kaynaklanan stresin beyin-bağırsak bozukluklarına tezahür etmesinden kaynaklanır (Sivamaruthi et al., 2020).
(HPA: Hipotalamus hipofiz adrenal aksisi, ACTH: Adrenokortikotropik hormon, ANS: Otonom sinir sistemi, CRF: Kortikotrofin salgılama faktörü)

Genellikle probiyotikler, otizm için alternatif ve tamamlayıcı bir terapötik destek olarak kabul edilmektedir. Bir çalışmada probiyotik takviyesinin, otizm ile ilişkili semptomları düzelttiği, ancak sonuçların kesin olmadığı belirtilmiştir (Sivamaruthi et al., 2020). Başka bir çalışmada probiyotiklerin oitzmli çocuklarda Gİ semptomları hafifletebildiği ve davranış sorunlarını iyileştirebildiği bildirilmiştir (Ng et al., 2019). Probiyotikler, nöroaktif maddeleri üretip taşıdıkları (*L. brevis* ve *B. denticola* tarafından üretilen γ-aminobutirik asit-GABA- ve *S. aureus* ve *E. coli* tarafından üretilen dopamin gibi) ve bağırsak-beyin ekseni üzerinde hareket ettikleri için "psikobiyotik" olarak da tanımlanmıştır (He et al., 2023).

Farklı probiyotiklerin karışımı veya tek tür içeren probiyotikler, otizmi tedavi etmek için kullanılmış olup genellikle beslenme rejimine ilave edilerek kullanımı tercih edilmiştir. Çoklu

suş içeren probiyotik karışımlarla tedavinin, otizmli çocuklar üzerinde pozitif etki gösterdiği ve tek suş içeren probiyotiklerden daha etkili olduğu bildirilmiştir. (He et al., 2023).

2.4.16. Yeni uygulamalar

Teranostik (terapi+diagnostik), "tanı ve tedavi için eş zamanlı kullanılan ilaçlar veya yöntemler" anlamında yeni bir terimdir. Teranostik nanotıp ise bu tür ilaçların hazırlanması için nanoteknolojinin uygulanması anlamına gelmekte ve"'teşhis edebilen, hedefe yönelik tedavi uygulayabilen ve tedaviye yanıtı izleyebilen entegre bir nanoterapötik sistem" olarak tanımlamaktadır. Kanser teranostiği için mikroorganizmaların uygulanması, son zamanlarda gündemde olan bir konudur (Ahmed, Fessi, & Elaissari, 2012). Birçok farklı organın tümör mikroçevresinde mikroorganizmaların var olduğu doğrulanmıştır. Tümör mikroçevresinde bulunan mikroorganizmalar, türe bağlı olarak tümör büyümesini inhibe ederek veya destekleyerek tümör mikroçevresini düzenler. Mikroorganizmaları güçlü kanser teranostik ajanlarına dönüştürmek amacıyla, bu tür mikroorganizma- tümör mikroçevresi etkileşimleri taklit edilmiştir. Probiyotiklerle ilgili olarak, kolon kanserinde tümör süpresör genleri reaktive etmek için probiyotiklerin kullanımı, kolorektal kanserli hastalarda probiyotiklerin kullanımı, intestinal mikrobiyotanın düzenlenmesinde probiyotiklerin rolü gibi teranostik çalışmalar mevcuttur (Jiang et al., 2022).

3. Prebiyotikler

İlk olarak 1921 yılında, karbonhidrat tüketimini takiben mikrobiyotası laktobasillerle zenginleştirilen bireylerin kalın bağırsağında anaeropların baskın olduğunun keşfedilmesi, sonraki mikrobiyom projesinde önemli rol oynayan araştırmaları başlatmıştır (Gibson et al., 2017). Prebiyotik kavramı ise ilk kez 1995 yılında "kolondaki sınırlı sayıdaki bakterilerin üremesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konağa fayda sağlayan sindirilemeyen besin maddesi" olarak tanımlanmıştır (Gibson & Roberfroid, 1995). Daha sonra bu tanım, "GİS mikrobiyotasının bileşiminde ve/veya aktivitesinde spesifik değişiklikler yaparak konak sağlığına fayda sağlayan seçici olarak fermente edilmiş bileşen" (Gibson et al., 2010) olarak ve ardından "sağlık yararı sağlayan konak mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan madde" olarak düzenlenmiştir (Hill et al., 2014). En son tanımıyla prebiyotikler, "sağlık yararı sağlayan konak mikroorganizmalar ve probiyotik suşlar tarafından seçici olarak kullanılan ve besin görevi gören madde"lerdir. Prebiyotikler, çeşitli bağırsak mikroorganizmalarının üremesini teşvik eden pektinler, selüloz ve ksilanlar gibi birçok diyet lifinden farklıdır; bu farklılık metabolize edilmemeleri ve ortamdaki yararlı mikroorganizmalara yönelik bir metabolizmayı ortaya çıkarmalarından kaynaklanmaktadır. Prebiyotiklerin, bağırsak mikrobiyotasındaki *Bifi-*

dobacterium bolluğunu arttırdığı bildirilmiştir. (Gibson et al., 2017). Potansiyel bir prebiyotik için beş temel kriter olduğu belirtilmiştir:

- Mide asidine, memeli enzimleri tarafından hidrolize ve gastrointestinal absorpsiyona dirençli olmalı; böylece sindirim sisteminin üst bölümlerinde sindirilmeden kolona ulaşabilmelidir,
- Potansiyel yararlı bakteriler tarafından seçici olarak fermente edildiği kolonda, bağırsak mikrobiyotası (*Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi yararlı bakteriler) tarafından fermentasyona uğratılabilmelidir,
- Konak sağlığı üzerine yararlı etkileri olmalıdır,
- Probiyotik üretimini seçici olarak uyarabilmelidir (*Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi yararlı bakterilerin üremesini arttırırken, *C. perfringens* gibi patojenlerin üremesini arttırmamalıdır).
- Gıda işleme koşullarına dayanabilmeli ve bozulmadan veya kimyasal olarak değişmeden kalmalı; bağırsakta bakteriyel metabolizma için kullanılabilir olmalıdır (Gibson et al., 2017; Gibson et al., 2010; Markowiak & Śliżewska, 2017; Thammarutwasik et al., 2009).

Yaygın olarak kullanılan prebiyotiklerle birlikte oligosakkaritlerin önemli özelliklerinden bazıları Tablo 2'de özetlenmiştir (Pandey et al., 2015).

Tablo 2. İdeal bir prebiyotik suşun özellikleri (Pandey et al., 2015)

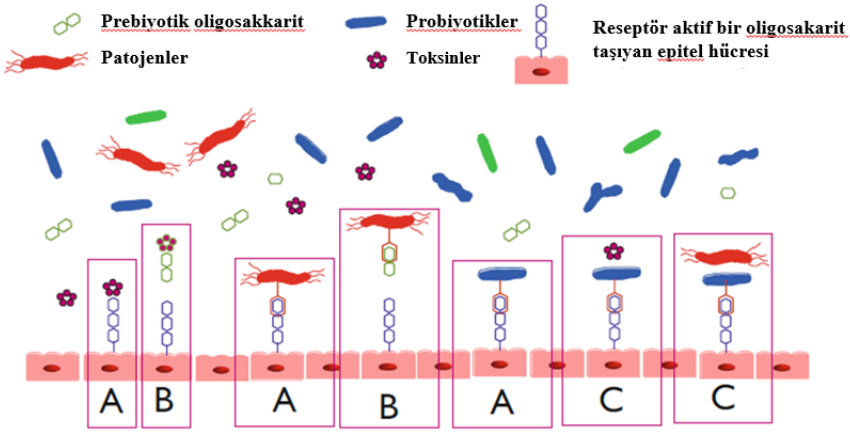
İstenen özellikler	**Oligosakkaritlerin özellikleri**
Düşük dozda aktif olması	*Bifidobacterium* ve/veya *Lactobacillus* spp. tarafından seçici ve verimli bir şekilde metabolize edilme
Yan etkilerinin olmaması	Yararlı bakteriler tarafından gaz üretmeden seçici ve verimli bir şekilde metabolize edilme
Kolon boyunca kalıcılık	Tercihen yüksek moleküler ağırlık
Değişken viskozite	Farklı moleküler ağırlıklarda ve farklı zincilerde mevcut olma
Depolama ve işlemede kabul edilebilir kararlılık	1-6 zincire ve piranosil şeker halkasına sahip olma
Mikroflora modülasyonunu kontrol etme yeteneği	Sınırlı mikrobiyal türler tarafından seçici olarak metabolize edilme
Değişken tat	Değişken monosakkarit bileşimi

3.1. Prebiyotiklerin etki mekanizmaları

Prebiyotikler, konağın yararlı mikroorganizmaları (uygulanan probiyotik suşlar ve kalıcı flora) için besin görevi gören cansız substratlar olup, probiyotik bakterilerin üremesini arttırıp patojen mikroorganizmaların üremesini azaltır. Prebiyotikler, ayrıca patojen ve toksinlerin epitel reseptörlerine yapışmalarını önleyerek bariyer görevi de görebilir. Bunun yanı sıra, probiyotikler hem rekabetçi dışlama, mukus üretimini artırma ve biyofilm oluşturma yoluyla patojen mikroorganizmaların bağırsak epitelinde kolonize olmasını bloke eder, hem de bazı patojen bakterilerin prebiyotiklerin şeker kısımlarına bağlanma yeteneklerini kullanarak patojen kolonizasyonunun başarısız olmasına yol açar; yani patojen bakterilerin üremesini engellemek için sinerjik hareket ederler (Şekil 8). (Gibson et al., 2017; Monteagudo-Mera et al., 2019).

Kolondaki epitel hücreleri için ana enerji kaynağı karbonhidratların fermentasyonudur. Bu gereksinim, bağırsak mikrobiyotası (bifidobakteriler vb.) tarafından prebiyotiklerin fermentasyonu sonucu kolayca karşılanabilir. Bifidobakterilerin yanı sıra, sindirilemeyen bu oligosakkaritlerin fermente edilmesinde önemli rol oynayan başka bağırsak mikroorganizmaları da vardır (Kerry et al., 2018).

Prebiyotikler, bağırsak mikrobiyotasını besleyebilen ve bağırsak mikrobiyotası tarafından parçalanan bir besin grubudur; gıdalarda düşük miktarlarda bulunur. Doğal ürünlerde bulunmasına rağmen ayrıca gıdalara ilave edilebilirler. Bu ilavelerin amacı, onların besinsel ve sağlık değerini iyileştirmektir. Bazı fermente edilebilir karbonhidratların prebiyotik etki gösterdiği bildirilmiş olmasına rağmen, insanda sağlık yararı olanlar, sindirilemeyen oligosakkaritlerdir. Bunlar arasında iki önemli prebiyotik grubu frukto-oligosakkaritler (FOS) ile galakto-oligosakkaritlerdir (GOS); tercihen bifidobakteriler tarafından metabolize edilirler. Prebiyotik olarak kullanılan diğer maddeler inülin, soya oligosakkaritleri (SOS), ksilooligosakkaritler (XOS), pirodekstrinler, izo-malto oligosakkaritler (IMOS) ve laktulozdur. Bunlar arasında en çok araştırılan prebiyotikler, FOS ve GOS'tur (Davani-Davari et al., 2019; Gibson et al., 2017; Macfarlane, 2010; Markowiak & Śliżewska, 2017). Mevcut prebiyotikler genellikle karbonhidrat bazlı olmakla birlikte, ilgili konjuge yağ asitlerine dönüştürülen polifenoller ve çoklu doymamış yağ asitleri gibi diğer maddelerin de bu tanıma uyabileceği bildirilmiştir (Gibson et al., 2017). Konak mikroorganizma tarafından, seçici kullanımı içermeyen mekanizmalar yoluyla mikrobiyotanın bileşimini etkileyen substratlar (antibiyotikler, mineraller, vitaminler ve bakteriyofajları) prebiyotik değildir, çünkü bu substratların alınması mikrobiyota ve metabolik kompozisyonu değiştirmesine rağmen bunlar çoğalamazlar (Gibson et al., 2017).



Şekil 8: Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin adezyon önleyici özelliklerinin şematik gösterimi **A**. Patojenler, probiyotik ve bakteriyel toksinler, glikolipidler ve glikoproteinler üzerinde taşınan hücre yüzeyi oligosakkaritlerine yapışır; **B**. Prebiyotik oligosakkaritler, özellikle galakto-oligosakkaritler (GOS), hücre yüzeyi glikoproteinlerine bazı yapısal benzerliklere sahiptir ve toksinlerin ve patojenlerin hücrelere adezyonu engellediği varsayılır; **C**. Probiyotik bakterilerin hücre yüzeyi reseptörlerine adezyonunun, toksinlerin ve patojenlerin bu reseptörlere adezyonu engellediği varsayılmaktadır (Monteagudo-Mera et al., 2019).

Bağırsak mikrobiyomu son derece çeşitli olduğundan, prebiyotiklerin veya probiyotiklerin kullanılmasının, bakteriyel homeostazın bozulmasına ve diyare gibi istenmeyen etkilere yol açma olasılığı vardır. Bazen prebiyotikler, sağlık yararı olan bakterilerin üremesini baskılayan (ya besinlerini kullanarak ya da üremeleri için yaşanmaz bir ortam oluşturarak) patojen bakteriler için bir besin kaynağı olarak da hareket edebilirler (Sagar Reddy & Varsha Shriram, 2022).

3.2. Prebiyotiklerin sağlık yararları

Son yıllarda, faydalı canlı mikroorganizmaların (probiyotikler) veya koruyucu bağırsak organizmalarının üremesini seçici olarak destekleyen besin takviyelerinin (prebiyotikler) terapötik amaçlı kullanımıyla bağırsakta inflamasyonun düzenlenmesini ve bağırsaktaki fonksiyonel çeşitliliğin yeniden oluşturulmasını amaçlayan çalışmalar öne çıkmaktadır (Becker et al., 2015). Prebiyotikler, probiyotiklere alternatif olarak veya onlara destek amacıyla ilave olarak kullanılabilmektedir (Markowiak & Śliżewska, 2017). Beslenme rejiminde prebiyotiklerin olması, çok sayıda sağlık yararına yol açabilir. Prebiyotiklerin GİS'e (patojenlerin inhibisyonu, bağışıklık uyarımı), kalp metabolizmasına (kan-lipid düzeylerinde azalma, insülin direnci üzerindeki etkiler), mental sağlığa (beyin fonksiyonunu, enerjiyi ve bilişi etkile-

yen metabolitler), kemik sağlığına (mineral biyoyararlanımı) ve diğer sistemlere olan etkileri bilinmektedir (Tablo 3) (Gibson et al., 2017; Markowiak & Śliżewska, 2017). Örneğin sık sebze ve meyve yiyen kişilerde kolorektal karsinomun daha az görüldüğü gösterilmiş ve bu etki çoğunlukla inülin ve oligofruktoza (FOS) atfedilmiştir. FOS'un lipid katabolizmasını hızlandırdığı da düşünülmektedir. İnülin ve oligofruktozun insan sağlığı üzerindeki diğer etkileri, karsinojenezin önlenmesi, laktoz intoleransının desteklenmesi ve diş çürüğü tedavisi olarak sıralanabilir (Markowiak & Śliżewska, 2017).

İnülin ve pektin gibi prebiyotikler, diyarenin yaygınlığını ve süresini azaltır; inflamasyondan ve bağırsak bozukluğu ile ilişkili diğer semptomlardan korur; ayrıca kolon kanserini önlemek için koruyucu etkileri vardır. Bunların yanısıra, minerallerin alımını ve biyoyararlanımını arttırma, kardiyovasküler hastalığın bazı risk faktörlerini azaltma, kilo kaybını tetikleme ve böylece obeziteyi önlemede rol oynarlar (Gibson et al., 2017; Pandey et al., 2015).

Probiyotikten türetilen moleküllerin ekstraksiyonu veya sentezi de yararlı olabilir. Örneğin, tanımlanmış biyolojik etkilere sahip *L rhamnosus* GG'den p40 veya *Bacteroides fragilis*'ten polisakarit A gibi immünoaktif saflaştırılmış ürünler sentezlenebilir ve uygulanabilir. Alternatif olarak, endojen komensallerin üremesini ve işlevini seçici olarak arttırmak veya zararlı bakterilerin aktivitelerini azaltmak için beslenme rejimleri geliştirilebilir. Örneğin, inülin veya FOS gibi prebiyotikler, kolon epitel hücreleri için önemli metabolik substratlar olan *Bifidobacterium* türlerinin lümendeki sayılarını ve koruyucu KZYA konsantrasyonlarını arttırır. Buna karşılık, rafine şekerler ve gıda katkı maddeleri (örn, demir), *E. coli, Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* gibi zararlı bakteri türlerinin çoğalmasını arttırabilir (M. E. Sanders et al., 2013; Sartor, 2004).

Prebiyotiklerin avantajları arasında, kandaki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyesinin düşürülmesi, bağışıklık sisteminin uyarılması, kalsiyumun emilebilirliğinin arttırılması, doğru bağırsak pH değerinin korunması, düşük kalori değeri, peptik ülser ve vajinal mikoz semptomlarının hafifletilmesi sayılabilir (Markowiak & Śliżewska, 2017). Prebiyotikler, çeşitli mekanizmalarla (lümen pH'ını düşürerek, kolonizasyon direncini indükleyerek, epitelyal bağlanmayı ve bakterisidal maddelerin salgılanmasını bloke ederek, patojen türleri sekonder olarak baskılayan koruyucu laktik asit basillerinin üremesini uyararak) İBH hastalarının distal ileumunda yararlı ve agresif komensal bakteri türlerinin bozulan dengesini düzeltme yeteneğine sahiptir. Metabolik olarak aktif *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin sayıca artması, bakteriyel fermentasyonu arttırır ve sonuçta epitelyal bariyer fonksiyonunu iyileştiren bütirat üretimi oluşur (Sartor, 2004). Prebiyotiklerin parçalanma ürünleri, kan dolaşımına salınan KZYA olup sadece GİS'i değil uzak organları da etkiler (Davani-Davari et al., 2019).

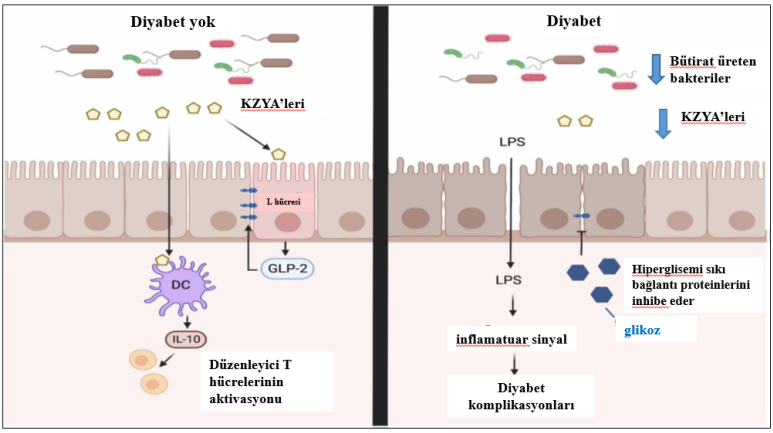
Prebiyotikler, allerjik kontakt dermatit, akne, psöriyazis, güneş yanığı gibi cilt hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Lolou & Panayiotidis, 2019).

Tablo 3. İnsan denemelerinde oral uygulanan prebiyotiklerin hedeflenen sağlık son noktaları (Gibson et al., 2017)

Sağlık yararı hedefleri	**Kullanılan prebiyotik**
Metabolik sağlık: aşırı kilo ve obezite; tip 2 diyabet; metabolik sendrom ve dislipidemi; inflamasyon	İnülin, GOS, FOS
Bağırsakta nörokimyasal üreten bakterilerin uyarılması	GOS
Ca^{++} ve diğer minerallerin iyileşmiş absorbsiyonu, kemik sağlığı	İnülin, FOS
Cilt sağlığı, su tutmanın iyileştirilmesi ve eritemin azaltılması	GOS
İnflamatuar bağırsak hastalığı	İnülin, laktuloz
Ürogenital sağlık	GOS
Bebeklerde bağırsak alışkanlığı ve genel bağırsak sağlığı	GOS, FOS
Enfeksiyon ve aşı yanıtı	FOS, GOS, polidekstroz
Erken doğmuş bebeklerde nekrotizan enterokolit	GOS, FOS
Huzursuz bağırsak sendromu	GOS
Turist diyaresi	GOS
Kabızlık	İnülin
Yaşlı bireylerde immün fonksiyon	GOS

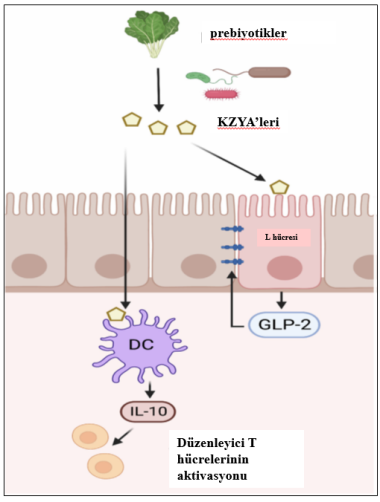
FOS: Frukto-oligosakkaritler, GOS: Galakto-oligosakkaritler.

Metabolik bir hastalık olan diyabette bağırsak mikrobiyotasının bileşimi değişir, KZYA üreticilerinin (özellikle bütiratın) seviyeleri azalır. Bütirat, Gİ bariyerin bütünlüğünde artış sağlayarak yararlı olur. Değişen bağırsak mikrobiyotası, mukozal bariyerin bozulması için önemli bir uyarandır ve sistemik dolaşımda lipoplisakkarit (LPS) gibi toksik metabolitlerin yüksek seviyeleri ile ilişkilidir. Diyabet, bağırsak geçirgenliğindeki artış ile de ilişkilidir. Geçirgenlik artışı, glukagon benzeri peptit-2 (GLP-2) vb. düzeylerinin azalmasına, bakteriyel translokasyona ve sistemik inflamasyona yol açar. Artan bağırsak geçirgenliği, LPS'nin dolaşıma erişmesine ve inflamasyonu tetiklemesine izin verir (Şekil 9) (Snelson, de Pasquale, Ekinci, & Coughlan, 2021).



Şekil 9: Diyabette intestinal bariyerin bozulması: Diyabet sırasında, bütirat üreten bakterilerin bolluğunda ve buna bağlı olarak kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) mikrobiyal ürününde eş zamanlı bir azalma olur. KZYA 'ndeki bu azalma, Gİ bariyerin bütünlüğünün azalmasına katkıda bulunur. Ek olarak, glikozun kendisi, bağırsak bariyerindeki epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı proteinlerini inhibe eder. Bariyer bütünlüğündeki bu azalma, LPS translokasyonuna izin vererek, enflamatuar sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar (Snelson et al., 2021).

Bağırsak bariyerinin bozulmasını ve sistemik inflamasyonu sınırlayan tedaviler, diyabet komplikasyonlarının ilerlemesini sınırlamada önemli bir rol oynayabilir. Prebiyotikler, kolon mikrobiyotası tarafından fermente edilerek KZYA üretilmesini sağlar ve bağırsakların bariyer bütünlüğünü geliştirir (Şekil 10) (Snelson et al., 2021).



Şekil 10: Komensal mikrobiyota tarafından prebiyotik liflerin fermentasyonu, kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) üretimine yol açar. KZYA, enteroendokrin L hücrelerine bağlanarak bağırsakların sıkı bağlantı bütünlüğünü artıran GLP-2 üretir. Bütirat, GPR109a reseptörü yoluyla dendritik hücrelere bağlanarak, anti-inflamatuar T-regulatör hücrelerin (T_{reg}) aktivasyonunu destekleyen IL-10'un üretimine yol açar (Snelson et al., 2021).

Metabolik hastalıkların tedavisinde prebiyotiklerin kullanılması ümit verici olduğundan, gıda işleme stratejileri değiştirilerek prebiyotiklerin terapötik etkileri arttırılmaya çalışılmaktadır (Li et al., 2021). Örneğin, dirençli nişastanın (ince bağırsakta sindirilmeyen, kalın bağırsakta fermente olan bir karbonhidrat) obeziteye karşı etkisi, *Deinococcus geothermalis* amilosukrazı ile modifiye edildikten sonra yükseltilebilir (Lee et al., 2018). Ayrıca polifenoller gibi prebiyotiklerin, bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi yoluyla obezitenin ilerlemesini etkileyebileceği gösterilmiştir (Li et al., 2021)

4. Sinbiyotikler

Sinbiyotik kavramı ilk olarak 1995 yılında Gibson ve Roberfroid tarafından "bir veya birkaç sağlığı iyileştirici bakterinin metabolizmasını aktive ederek veya üremesini seçici olarak uyararak GİS'deki canlı mikrobiyal, beslenme takviyelerinin uygulanmasını sağlayarak konağa fayda sağlayan ve böylece konağın refahını arttıran bir prebiyotik ve probiyotik karışımı" olarak tanımlanmıştır (Sagar Reddy & Varsha Shriram, 2022). Bu tanım, Mayıs 2019'da ISAPP tarafından "konağa sağlık yararı sağlayan konak mikroorganizmaları tarafından seçici olarak kullanılan canlı mikroorganizmalar ve substratlardan oluşan bir karışım" olarak güncellenmiştir. Böylece sinbiyotikler, hem probiyotikleri (kalıcı flora veya dışarıdan alınan probiyotikler), hem de prebiyotikleri içermektedir (Swanson et al., 2020). Sinbiyotikler, bağırsakta canlı mikrobiyal diyet takviyelerinin hayatta kalmasını ve implantasyonunu arttırmaya yardımcı olmaktadır (Kerry et al., 2018).

Hem uygun mikrobiyal suşları, hem de sinerjistik prebiyotikleri içeren biyoterapötik formüller olan sinbiyotiklerin geliştirilmesi, ince bağırsakta ve kolonda probiyotik etkinin artmasına yol açabilir. Bu "geliştirilmiş" probiyotik ürünlerin öncekilerden daha etkili olabileceği ve koruyucu/ uyarıcı etkilerinin, ayrı ayrı uygulanan bileşenlerden daha üstün olabileceği belirtilmiştir (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Sinbiyotikler, hem probiyotik hem prebiyotik özelliklere sahip olup Gİ kanaldaki probiyotiklerin hayatta kalması ile ilgili olası zorlukların üstesinden gelmek için tasarlanmıştır. Sinbiyotikler, yalnızca gıdalara veya yemlere ilave edilen yararlı mikroorganizmaların hayatta kalmasını iyileştirmek için değil, aynı zamanda GİS'de bulunan spesifik doğal bakteri suşlarının çoğalmasının uyarılması için de kullanılmaktadır. Sinbiyotiklerin insan sağlığı üzerine etkisi, probiyotik ve prebiyotiklerin kombinasyonu ile ilişkilidir. İnsanlarda bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu için sinbiyotiklerin uygulanmasının umut verici olduğu belirtilmektedir. Ancak bir sinbiyotik formül oluşturulurken, ayrı ayrı kullanıldığında konağın sağlığı üzerinde olumlu etki gösteren uygun probiyotik ve prebiyotiklerin seçilmesine dikkat edilmelidir (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Prebiyotikler ve probiyotikler arasındaki simbiyotik ilişki, bağırsak sağlığına, hastalıkların önlenmesine ve tedavisine yönelik önemli faydalar sağladığından, sinbiyotik içeren fonksiyonel gıdalara artan bir ticari ilgi vardır. Günümüzde bu alandaki araştırmalar, sağlığı iyileştiren yeni yiyecekler geliştirmeye ve yeni prebiyotik formlarını sindirebilen yeni kültürlerin seçilmesine yönelmiştir (Tablo 4) (Kerry et al., 2018).

Tablo 4. Yaygın kullanılan sinbiyotikler ve mikrobiyal kaynakları (Kerry et al., 2018)

Sinbiyotikler	
Prebiyotikler	**Probiyotikler**
FOS	*Bifidobacteria, Bacteroides fragilis, Peptostreptococcaceae, Klebsiellae*
İnülin	*Bifidobacterium animalis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei*
IMOS	*Bifidobacteria, Bacteroides fragilis group*
Laktuloz	*Bifidobacteria lactis, Lactobacillus bulgaricus, L. acidophilus, L. rhamnosus*
Laktosukroz	*Zymomonas mobilis*
XOS	*Bifidobacterium adolescentis, L. plantarum*
GOS	*Bifidobacterium longum, B. catenulatum*
FOS	*Bifidobacterium bifidum, B. lactis*
Arabinoksilan ve AXOS	*Bifidobacterium spp.*
Dirençli nişasta-1,2,3,4	*Bacteroides, Eubacterium rectal*

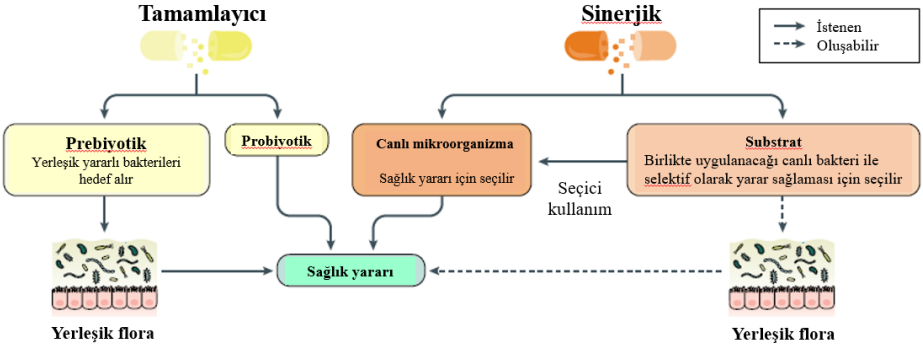
FOS: Frukto-oligosakkaritler GOS: Galakto-oligosakkaritler IMOS: İzo-malto oligosakkaritler XOS: Ksilooligosakkaritler AXOS: Arabino-ksilan-oligosakkaritler

4.1. Sinbiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotikler esas olarak ince ve kalın bağırsakta aktif olduğundan ve prebiyotikler etkilerini esas olarak kalın bağırsakta gösterdiğinden, sinbiyotikler sinerjik etkiye sahiptir. Prebiyotikler çoğunlukla probiyotik suşun üremesi, fermentasyonu ve bağırsağa geçişi için seçici bir ortam olarak kullanılır. Prebiyotiklerin kullanımı sayesinde, probiyotik mikroorganizmalar, bağırsaktaki oksijenasyon, pH ve sıcaklık gibi çevresel koşullara daha yüksek tolerans kazanmaktadır (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Sinbiyotiklerin iki etki mekanizması olduğu düşünülmektedir: Probiyotik mikroorganizmaların gelişmiş canlılığı yoluyla etki ve spesifik sağlık etkilerinin sağlanması yoluyla etki (Markowiak & Śliżewska, 2017). Sinbiyotikler "tamamlayıcı sinbiyotikler" veya "sinerjik sinbiyotikler" olarak iki şekilde tasarlanabilir (Şekil 11). Tamamlayıcı sinbiyotikleri oluşturan probiyotik ve prebiyotiklerin tanımlama kriterlerini karşılaması gerekir; yani probiyotiklerin yeterli miktarlarda uygulandığında konak için sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olması, prebiyotiklerin de konak mikroorganizma tarafından seçici olarak kullanıldığında sağlık yararı sağlayan bir substrat olması gerekir. Sinerjik sinbiyotikler ise, substratların,

birlikte uygulanan mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılmak üzere tasarlandığı sinbiyotiklerdir. Sinerjik sinbiyotikler, ortaya çıkan sağlık yararlarını sağlamak için bağımsız olarak değil, birlikte çalışır. Sinerjik sinbiyotiklerin içerdiği probiyotiklerin ve prebiyotiklerin tanımlama kriterlerini karşılaması gerekmez; ancak hem selektif olarak kullanılabilmeli, hem sağlık yararı sağlamalı, hem de hedef konakta denenmelidir (Swanson et al., 2020).



Şekil 11: Tamamlayıcı ve sinerjik sinbiyotiklerin etki mekanizmaları (Swanson et al., 2020).

4.2. Sinbiyotiklerin sağlık yararları

Sinbiyotik tedavilerle ilgili sistematik çalışmalar, daha çok damar sertliği, Crohn hastalığı (CH) ve kronik karaciğer hastalığının yanı sıra, kanser, kronik akciğer hastalığı ve kronik böbrek hastalığı ile ilgili çalışmalarla devam etmektedir (Bengmark & Martindale, 2005). Sinbiyotikler, günümüzde fonksiyonel gıdalar (sağlıklı beslenme için nutrasötik takviye katkı maddeleri) olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Aoun et al., 2020). Sinbiyotiklerin insanlar üzerinde birçok yararlı etkileri vardır. Bu etkiler dört grupta toplanabilir:

- *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin sayısının arttırılması ve bağırsak mikrobiyotası dengesinin korunması,
- Siroz hastalarında karaciğer fonksiyonlarının iyileştirilmesi,
- İmmün sistemin düzenlenmesi,
- Hastaların operasyon sonrası prosedürlerinde ve benzeri girişimlerde bakteriyel translokasyonun önlenmesi ve nozokomiyal enfeksiyon insidansının azaltılması (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Bu temel etkilerine göre sinbiyotiklerin obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet, alkolik olmayan karaciğer yağlanması, huzursuz bağırsak sendromu, diyare, *H. pylori* eradikasyonu,

atopik dermatit, laktoz intoleransının azaltılması ve çeşitli kanser türleri üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Markowiak & Śliżewska, 2017). Sinbiyotik takviyelerinin, fazla kilolu veya obez bireylerde trigliserid, total kolesterol, LDL, vücut ağırlığı, stres, kaygı ve depresyonda iyileşme gibi birçok sağlık yararı sağlayabileceği belirtilmiştir (Hadi, Sepandi, Marx, Moradi, & Parastouei, 2019). Örneğin kolonik polip öyküsü olan hastalarda prebiyotik inülin ve probiyotikler *L. rhamnosus* GG ve *Bifidobacterium lactis* Bb12'den oluşan bir sinbiyotik müdahale, gaita mikrobiyotasında değişikliklere (artmış *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*, azalmış *C. perfringens*) yol açmış, hücre proliferasyonu azalmış ve epitelyal bariyer fonksiyonu iyileşmiştir (Wong & Yu, 2019).

Metabolik hastalıkların önlenmesinde de sinbiyotiklerden faydalanılabilir. *Bifidobacterium lactis, L. rhammnosus* ve oligofruktozla zenginleştirilmiş inülin içeren sinbiyotiklerin, bağırsak mikroçevresini tekli bileşenlerden daha etkili bir şekilde düzenleyebileceği bildirilmiştir (Li et al., 2021). Probiyotik ve sinbiyotiklerin, özellikle düşük dozlarda, hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi, prediyabet, tip 2 diyabet, yağlı karaciğer hastalığı ve metabolik sendromu olan kişilerde çeşitli lipid parametrelerini ve dislipidemiyi iyileştirmede etkin olduğu belirtilmiştir (Ghorbani et al., 2023). Hipotiroidi hastalarında on haftalık sinbiyotik takviyesinin, yaşam kalitesini ve kan basıncını arttırmada etkili olabileceği bildirilmiştir (Ramezani, Reisian, & Sajadi Hezaveh, 2023). Alternatif veya tamamlayıcı tedavi olarak kullanıldığında, sinbiyotiklerin ÜK'li hastalara fayda sağladığı belirtilmiştir (Rufino et al., 2022).

5. Postbiyotikler

Bakteriyel ürünler, canlı organizmaların yokluğunda sinyal yolları ve bariyer işlevi üzerinde benzer etkilere sahip olabilir. Bunlar, canlı olmayan bakteriyel ürünler veya probiyotiklerden elde edilen metabolik yan ürünler olarak "postbiyotikler" şeklinde tanımlanabilir (Kerry et al., 2018). Daha yeni bir tanımlamayla postbiyotikler, kanıtlanmış sağlık yararlarına katkıda bulunan metabolitleri veya hücre bileşenleri olan veya kasıtlı olarak inaktive edilmiş mikrobiyal hücreler olup "konağa sağlık yararı sağlayan cansız mikroorganizmalar ve/veya onların bileşenleri" olarak tanımlanmıştır (Li et al., 2021; Salminen et al., 2021).

Genel olarak, postbiyotikler, bakteriyosinler, organik asitler, etanol, diasetil asetaldehitler ve H_2O_2 gibi bakteriyel metabolik yan ürünleri içerir. Bütirat, KZYA, muramil dipeptid ve ekzopolisakkaritler postbiyotiklere örnek olarak gösterilebilir (Tablo 5). Aynı zamanda bazı ısıyla öldürülmüş probiyotikler de konakta biyolojik aktivite gösterebilen önemli bakteriyel yapıları koruyabilir. Bu metabolik ürünler, patojen mikroorganizmalara karşı antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilir. Postbiyotikler, toksik ve patojen değildir ve memeli enzimleri

tarafından hidrolize dirençlidir. Bazı durumlarda, postbiyotikler *Saccharomyces boulardii* gibi türlere karşı bariyer fonksiyonunu arttırabilir (Kerry et al., 2018).

5.1. Postbiyotiklerin sağlık yararları

Postbiyotikler, bağırsakların bariyer özelliğini düzenleme potansiyeline sahiptir ve metabolik hastalıkları iyileştirebilir. (Li et al., 2021). Ancak postbiyotiklerin etki alanı bağırsaklarla sınırlı olmayıp, ağız boşluğu, cilt, ürogenital sistem veya nazofarinks gibi konak yüzeylerine de uygulanabilir (Salminen et al., 2021). Tip 2 diabetes mellitus tedavisine genellikle bağırsak bakteriyel metabolitlerinin düzenlenmesi eşlik ettiğinden, probiyotikler, prebiyotikler ve fekal mikrobiyota nakli (FMT) için alternatif bir terapötik ajan olarak postbiyotikler kullanılabilir (Li et al., 2021).

Tablo 5. Postbiyotikler ve doğal kaynakları (Kerry et al., 2018)

Postbiyotikler	**Doğal kaynakları**
Bakteriyosinler	*Lactobacillus plantarum* I-UL4
Isıyla öldürülmüş LGG*	*Lactobacillus rhamnosus*
Çözünür mediyatörler	*Lactobacillus paracasei*
Bütirat	*Faecalibacterium prausnitzii*
Polifosfat	*Lactobacillus brevis*
Ekzopolisakkaritler	*Lactobacillus pentosus*
KZYA'lar**	*Lactobacillus gasser*

**Lactobacillus rhamnosus* GG, **KZYA: Kısa zincirli yağ asidi

Postbiyotiklerin, amaçlanan kullanım için güvenli olması gerekliliği vardır. Ayrıca fermente gıdalar, özellikle uzun süreli depolama, pastörizasyon (örneğin, soya sosu) veya fırınlama (örneğin, maya ekmeği) gibi işlemlerden sonra önemli sayıda cansız mikrobiyal hücre içerebilir. Gıda fermentasyonunun (özellikle süt ve bitki bazlı gıdalar) birçok gıdanın fiziksel özellikleri ve potansiyel olarak sağlık etkileri üzerine büyük bir etkisi vardır. Fermentasyona, çoğunlukla laktik asit bakterileri (LAB) aracılık eder. LAB, insan sağlığıyla ilişkili bir dizi hücresel yapı ve metabolitler (çeşitli hücre yüzeyi bileşenleri, laktik asit, KZYA) üretir. LAB'lerinin bu efektör moleküllerinin probiyotikler tarafından üretilenlere benzer olduğu düşünülmektedir, ancak bu konu henüz kesinleşmemiştir (Salminen et al., 2021).

Bazı bitkilerde ve kırmızı şarapta bulunan, antioksidan özelliklere sahip ve olası anti-kanserojen etkileri araştırılmış bir polifenol bileşiği olan resveratrol ile beslenen farelere dayanan bir *in vivo* çalışma, resveratrolün obeziteye karşı yararlı olmasının nedeninin postbiyotikler olabileceğini düşündürmektedir. Ancak postbiyotiklerin insanlar üzerindeki spesifik etkinliği, daha fazla araştırılmaya ihtiyaç duyulan bir konudur (Li et al., 2021).

SON SÖZ

Probiyotik, prebiyotik, sinbiyotik ve postbiyotiklerle mikrobiyotaya yapılan müdahaleler, metabolik fonksiyonlar üzerinde önemli etkiler oluşturabilir. Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin mikrobiyota üzerine etkilerini inceleyen mevcut ve gelecek araştırmaların sonucunda, birçok hastalığın tedavisinde tek başına veya konvansiyonel tedavilere alternatif olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

Kaynaklar

Ahmed, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2012). Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug discovery today, 17*(17-18), 928-934.

Akutko, K., & Stawarski, A. (2021). Probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel diseases. *Journal of Clinical Medicine, 10*(11), 2466.

Aoun, A., Darwish, F., & Hamod, N. (2020). The influence of the gut microbiome on obesity in adults and the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for weight loss. *Preventive nutrition and food science, 25*(2), 113.

Becker, C., Neurath, M. F., & Wirtz, S. (2015). The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal, 56*(2), 192-204. doi:10.1093/ilar/ilv030

Bengmark, S., & Martindale, R. (2005). Prebiotics and synbiotics in clinical medicine. *Nutrition in clinical practice, 20*(2), 244-261.

Bottari, B., Castellone, V., & Neviani, E. (2021). Probiotics and COVID-19. *International journal of food sciences and nutrition, 72*(3), 293-299.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians, 68*(6), 394-424.

Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology, 13*(11), 790-801.

Bustamante, M., Oomah, B. D., Oliveira, W. P., Burgos-Díaz, C., Rubilar, M., & Shene, C. (2020). Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia microbiologica, 65*, 245-264.

Cash, B. D. (2014). Emerging role of probiotics and antimicrobials in the management of irritable bowel syndrome. *Current medical research and opinion, 30*(7), 1405-1415.

Cheng, Y., Ling, Z., & Li, L. (2020). The intestinal microbiota and colorectal cancer. *Frontiers in immunology, 11*, 615056.

Consortium, T. H. M. P. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *nature, 486*(7402), 207-214.

Cutting, S. M. (2011). Bacillus probiotics. *Food microbiology, 28*(2), 214-220.

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., . . . Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods, 8*(3), 92.

Eslami, M., Yousefi, B., Kokhaei, P., Moghadas, A. J., Moghadam, B. S., Arabkari, V., & Niazi, Z. (2019). Are probiotics useful for therapy of Helicobacter pylori diseases? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 64*, 99-108.

Fang, C.-Y., Chen, J.-S., Hsu, B.-M., Hussain, B., Rathod, J., & Lee, K.-H. (2021). Colorectal cancer stage-specific fecal bacterial community fingerprinting of the Taiwanese population and underpinning of potential taxonomic biomarkers. *Microorganisms, 9*(8), 1548.

Flach, J., van der Waal, M. B., van den Nieuwboer, M., Claassen, E., & Larsen, O. F. (2018). The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. *Critical reviews in food science and nutrition, 58*(15), 2570-2584.

Ghorbani, Z., Kazemi, A., UP Bartolomaeus, T., Martami, F., Noormohammadi, M., Salari, A., . . . Mahdavi-Roshan, M. (2023). The effect of probiotic and synbiotic supplementation on lipid parameters among patients with cardiometabolic risk factors: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Cardiovascular Research, 119*(4), 933-956.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., . . . Cani, P. D. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 14*(8), 491-502.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition, 125*(6), 1401-1412.

Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., . . . Loh, G. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods, 7*(1), 1-19.

Gionchetti, P., Calafiore, A., Riso, D., Liguori, G., Calabrese, C., Vitali, G., . . . Rizzello, F. (2012). The role of antibiotics and probiotics in pouchitis. *Annals of gastroenterology, 25*(2), 100.

Gkouskou, K. K., Deligianni, C., Tsatsanis, C., & Eliopoulos, A. G. (2014). The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology, 4*, 28.

Hadi, A., Sepandi, M., Marx, W., Moradi, S., & Parastouei, K. (2019). Clinical and psychological responses to synbiotic supplementation in obese or overweight adults: A randomized clinical trial. *Complementary therapies in medicine, 47*, 102216.

Han, S., Zhuang, J., Wu, Y., Wu, W., & Yang, X. (2020). Progress in research on colorectal cancer-related microorganisms and metabolites. *Cancer Management and Research, 12*, 8703.

He, X., Liu, W., Tang, F., Chen, X., & Song, G. (2023). Effects of Probiotics on Autism Spectrum Disorder in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Nutrients, 15*(6), 1415.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., . . . Salminen, S. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.

Islam, S. U. (2016). Clinical uses of probiotics. *Medicine, 95*(5).

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., & Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *The American journal of clinical nutrition, 73*(2), 444s-450s.

Ji, J., & Yang, H. (2020). Using probiotics as supplementation for Helicobacter pylori antibiotic therapy. *International journal of molecular sciences, 21*(3), 1136.

Jiang, T., Yang, T., Chen, Y., Miao, Y., Xu, Y., Jiang, H., . . . Mao, C. (2022). Emulating interactions between microorganisms and tumor microenvironment to develop cancer theranostics. *Theranostics, 12*(6), 2833.

Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., & Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet, 357*(9262), 1076-1079.

Karpiński, T. M., Ożarowski, M., & Stasiewicz, M. (2022). *Carcinogenic microbiota and its role in colorectal cancer development.* Paper presented at the Seminars in Cancer Biology.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices, 2013*.

Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis, 26*(3), 927-939.

Kjersti Aagaard, R. A. L., and James Versalovic. (2015). The Human Microbiome of Local Body Sites and Their Unique Biology. In R. D. John E. Bennett, Martin J. Blaser (Ed.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8. ed., pp. 11-18). Canada: Elseiver.

Lee, E.-S., Lee, B.-H., Shin, D. U., Lim, M.-Y., Chung, W.-H., Park, C.-S., . . . Seo, D.-H. (2018). Amelioration of obesity in high-fat diet-fed mice by chestnut starch modified by amylosucrase from Deinococcus geothermalis. *Food Hydrocolloids, 75*, 22-32.

Li, H.-Y., Zhou, D.-D., Gan, R.-Y., Huang, S.-Y., Zhao, C.-N., Shang, A., . . . Li, H.-B. (2021). Effects and mechanisms of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics on metabolic diseases targeting gut microbiota: a narrative review. *Nutrients, 13*(9), 3211.

Lolou, V., & Panayiotidis, M. I. (2019). Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. *Fermentation, 5*(2), 41.

Lv, Y., Qin, X., Jia, H., Chen, S., Sun, W., & Wang, X. (2019). The association between gut microbiota composition and BMI in Chinese male college students, as analysed by next-generation sequencing. *British journal of nutrition, 122*(9), 986-995.

Macfarlane, S. (2010). Prebiotics in the gastrointestinal tract. In R. Watson, Preedy, VR (Ed.), *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and prebiotics* (pp. 145-156). USA: Elsevier.

Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients, 9*(9), 1021.

Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology, 103*(16), 6463-6472.

Ng, Q. X., Loke, W., Venkatanarayanan, N., Lim, D. Y., Soh, A. Y. S., & Yeo, W. S. (2019). A systematic review of the role of prebiotics and probiotics in autism spectrum disorders. *Medicina, 55*(5), 129.

Norman-McKay, L. (2019). *Microbial Metabolism*. Roman: Pearson Education.

Oak, S. J., & Jha, R. (2019). The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition, 59*(11), 1675-1683.

Ozen, M., & Dinleyici, E. (2015). The history of probiotics: the untold story. *Beneficial microbes, 6*(2), 159-165.

Pandey, K., Naik, S., & Vakil, B. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology, 52*(12), 7577-7587.

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in nutrition, 10*(suppl_1), S49-S66.

Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., & Czuczwar, S. J. (2020). Gut microbiota and pro/prebiotics in Alzheimer's disease. *Aging (albany NY), 12*(6), 5539.

Pommerville, J. C. (2022a). The Host–Microbe Relationship and Infectious Disease Epidemiology. In J. C. Pommerville (Ed.), *Fundamentals of Microbiology* (12. ed.). Burlington USA: Jones-Bartlett Learning.

Pommerville, J. C. (2022b). The Human Body Has Its Own Microbiome. In J. C. Pommerville (Ed.), *Fundamentals of Microbiology* (12. ed.). Burlington, USA: Jones & Bartlett Learning.

Ramezani, M., Reisian, M., & Sajadi Hezaveh, Z. (2023). The effect of synbiotic supplementation on hypothyroidism: A randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Plos one, 18*(2), e0277213.

Ren, L., Ye, J., Zhao, B., Sun, J., Cao, P., & Yang, Y. (2021). The role of intestinal microbiota in colorectal cancer. *Frontiers in Pharmacology, 12*, 674807.

Reque PM, B. A. (2022). An introduction to probiotics. In A. Brandelli (Ed.), *Probiotics: Advanced Food and Health Applications* (pp. 1-18). United Kingdom: Elseiver.

Rufino, M. N., da Costa, A. L., Jorge, E. N., Paiano, V. F., Camparoto, M. L., Keller, R., & Bremer-Neto, H. (2022). Synbiotics improve clinical indicators of ulcerative colitis: Systematic review with meta-analysis. *Nutrition reviews, 80*(2), 157-164.

Ruggiero, P. (2014). Use of probiotics in the fight against Helicobacter pylori. *World journal of gastrointestinal pathophysiology, 5*(4), 384.

Sagar Reddy, P. B., Kawaljeet Kaur, Uttpal Anand,, & Varsha Shriram, a. V. K. (2022). Antimicrobial Resistance and Medicinal Plant Products as Potential Alternatives to Antibiotics in Animal Husbandry. In V. S. Vinay-Kumar, AtishPaul, ManseeThakur (Ed.), *AntimicrobialResistance Underlying Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Singapore: Springer.

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., . . . Szajewska, H. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 18*(9), 649-667.

Sanders, M., Merenstein, D., Merrifield, C., & Hutkins, R. (2018). Probiotics for human use. *Nutrition bulletin, 43*(3), 212-225.

Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M., Sartor, R. B., . . . Mayer, E. A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut, 62*(5), 787-796.

Sartor, R. B. (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology, 126*(6), 1620-1633.

Sheil, B., MacSharry, J., O'callaghan, L., O'riordan, A., Waters, A., Morgan, J., . . . Shanahan, F. (2006). Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clinical & Experimental Immunology, 144*(2), 273-280.

Sivamaruthi, B. S., Suganthy, N., Kesika, P., & Chaiyasut, C. (2020). The role of microbiome, dietary supplements, and probiotics in autism spectrum disorder. *International journal of environmental research and public health, 17*(8), 2647.

Smith, T. J., Rigassio-Radler, D., Denmark, R., Haley, T., & Touger-Decker, R. (2013). Effect of Lactobacillus rhamnosus LGG® and Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB-12® on health-related quality of life in college students affected by upper respiratory infections. *British journal of nutrition, 109*(11), 1999-2007.

Snelson, M., de Pasquale, C., Ekinci, E. I., & Coughlan, M. T. (2021). Gut microbiome, prebiotics, intestinal permeability and diabetes complications. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 35*(3), 101507.

Sundararaman, A., Ray, M., Ravindra, P., & Halami, P. M. (2020). Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. *Applied microbiology and biotechnology, 104*, 8089-8104.

Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., . . . Delzenne, N. M. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 17*(11), 687-701.

Thammarutwasik, P., Hongpattarakere, T., Chantachum, S., Kijroongrojana, K., Itharat, A., Reanmongkol, W., . . . Ooraikul, B. (2009). Prebiotics-A Review. *Songklanakarin Journal of Science & Technology, 31*(4).

Walker, W., A. (2017). Dysbiosis. In R. Y. Floch MH, Walker WA (Ed.), *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (pp. 227-232). United Kingdom: Elsevier.

Wang, S., Xiao, Y., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. *Journal of functional foods, 66*, 103838.

Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy, 67*(6), 449-458.

Wong, S. H., & Yu, J. (2019). Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 16*(11), 690-704.

Wroblewski, L. E., & Peek, R. M. (2016). Helicobacter pylori, cancer, and the gastric microbiota. *Stem Cells, Pre-neoplasia, and Early Cancer of the Upper Gastrointestinal Tract*, 393-408.

Yusefi, A. R., Lankarani, K. B., Bastani, P., Radinmanesh, M., & Kavosi, Z. (2018). Risk factors for gastric cancer: a systematic review. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 19*(3), 591.

Zhang, H., Yeh, C., Jin, Z., Ding, L., Liu, B. Y., Zhang, L., & Dannelly, H. K. (2018). Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. *Synthetic and systems biotechnology, 3*(2), 113-120.

6. BÖLÜM / CHAPTER 6

FEKAL MİKROBİYOTA TRANSPLANTASYONUNUN ÇOCUK HASTALARDA KULLANIMI

THE USE OF FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION IN PEDIATRIC PATIENTS

Tuğçe Göksu YILMAZ[1], Elif TÜRKMEN[2]

[1]İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: tugce.yilmaz@istanbul.edu.tr
[2]İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: elif.sag@istanbul.edu.tr

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.006

ÖZ

İntestinal mikrobiyota; metabolik, sistemik ve immünolojik birçok olayda önemli rol oynar. Bu bağlamda disbiyozisin; hem gastrointestinal sistem (GİS) ile ilgili hem de GİS dışı birçok hastalığın patogenezinde etkili olduğu kabul edilmektedir. Fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT); sağlıklı mikrobiyotaya sahip bir donörden alınan gaitanın, hasta bireyin GİS'ine transfer edilmesi işlemidir; böylece bozulmuş olan mikrobiyota sağlıklı bir flora ile değiştirilmiş olur. Transplantasyonun alıcıda yeni bir hastalık hali yaratmaması adına uygun endikasyonların konulması ve donörlerin ayrıntılı şekilde incelenmesi önem arz etmektedir. Pediatrik yaş grubunda FMT uygulaması erişkinlerden farklılıklar içermektedir. Tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonu, FDA onaylı bir tedavi yöntemi olup, FMT'nin en sık yapıldığı endikasyondur. Buna ek olarak hem erişkin hem pediatrik popülasyonda, başta inflamatuvar bağırsak hastalığı olmak üzere disbiyozisin neden olduğu birçok hastalıkta, kullanımı giderek yaygınlaşan, etkin ve güvenli bir tedavi yöntemidir..

Anahtar Kelimeler: Fekal mikrobiyota transplantasyonu, mikrobiyom, intestinal flora

ABSTRACT

Intestinal microbiota plays an important role in many metabolic, systemic and immunologic events. In this context, dysbiosis is recognized to be effective in the pathogenesis of many gastrointestinal and non-GI diseases. Fecal microbiota transplantation (FMT) is the process of transferring stool from a donor with a healthy microbiota into the GI tract of a sick individual, thus replacing the impaired microbiota with a healthy flora. It is important to establish appropriate indications and to thoroughly examine donors so that transplantation does not create a new

disease state in the recipient. FMT application in the pediatric age group includes differences from adults. Recurrent *Clostridium difficile* infection is an FDA-approved treatment method and is the most common indication for FMT. In addition, it is an effective and safe treatment modality that is increasingly being used in many diseases primarily inflammatory bowel diseases caused by dysbiosis in both adult and pediatric populations.

Keywords: Fecal microbiota transplantation, microbiome, intestinal flora

Extended Abstract

Intestinal microbiota acts as an organ that plays an important role in many metabolic, systemic, and immunological events. The microbiota is also known to be closely associated with many non-GI diseases such as functional bowel diseases, inflammatory bowel diseases, obesity, metabolic syndrome, diabetes mellitus, atherosclerosis, and many other non-GI diseases. Intestinal microbiota begins to form in the intrauterine period, before birth. After birth, the digestive system microorganisms continue to form in a dynamic balance, and after 3.5 years of age, the intestinal microbiota becomes similar to the adult microbiota. It is accepted that all factors that negatively affect the balance of intestinal microbiota lead to intestinal dysbiosis and dysbiosis is effective in the pathogenesis of many GI and non-GI diseases. GI diseases thought to be associated with intestinal dysbiosis include recurrent Clostridium difficile infection, inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome, hepatic encephalopathy, constipation, and malignant diseases (lymphoma, colorectal cancer). Among non-GI diseases; arthritis, asthma, atopy, eczema, allergic rhinitis, autism, autoimmune diseases, chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, diabetes mellitus and insulin resistance, hypercholesterolemia, obesity, metabolic syndrome, nonalcoholic fatty liver disease, idiopathic thrombocytopenic purpura, Parkinson's disease, multiple sclerosis have also been associated with dysbiosis. Fecal microbiota transplantation (FMT) (other names in the literature include fecal bacteriotherapy, fecal transfusion, and stool transplantation) is the process of transferring stool from a donor with a healthy microbiota into the GI tract of a sick individual. Fecal microbiota transplantation is an FDA-approved treatment method for recurrent Clostridium difficile infection; other indications are mainly IBD, irritable bowel syndrome, chronic diarrhea, constipation, chronic fatigue syndrome, diabetes, obesity, insulin resistance, idiopathic thrombocytopenic purpura, atherosclerosis, autism, myoclonic dystonia, multiple sclerosis, Parkinson's disease, hepatic encephalopathy, celiac disease and Hashimoto's thyroiditis. However, with the exception of recurrent Clostridium difficile infection, all applications are used to support treatment, not for complete cure. Especially in the last 20 years, with the increase in FMT application, positive effects of FMT on treatment

have been shown in both children and adult patients. Donors should be thoroughly examined to ensure that transplantation does not cause a new disease in the recipient. Even 30-50 g of fecal material is sufficient for a successful FMT; however, it is suggested that as the amount of stool increases, the quality and diversity of microbiota increases, which has a positive effect on recovery rates. Studies have not found a significant difference between fresh and frozen stools. The most preferred method is colonoscopy and ileal delivery of the material, but it can also be performed by nasogastric tube, nasoduodenal route, upper GI endoscopy, and retention enema. The most effective result is obtained if the administration method is chosen according to the anatomical localization of the disease. Regardless of the route of administration, the material must remain in the lumen for at least 4 hours and if possible 6-8 hours for transplantation to be effective. Since the microbiota distribution of children and adults is different from each other, immune aging-microbiome alteration may develop as a result of the administration of adult microbiota to children. Therefore, it is important to use age-matched donors in children to prevent long-term side effects. Clostridium difficile infection, which is the cause of pseudomembranous enterocolitis, is an FDA-approved treatment method and is the most common indication for FMT in the world and studies have reported successful results up to 90%. The second most common indication is IBD. With the proof of the efficacy of the FMT procedure in IBD, its inclusion in the basic treatment protocol, and the widespread use of the procedure; the frequency, dose, and duration of use of expensive immunosuppressive agents, the need for hospitalization and surgery can be reduced. In conclusion; FMT is a treatment method that has been widely used in the treatment of all diseases caused by dysbiosis in adult and pediatric patients in recent years, and can be applied for cure in recurrent *Clostridium difficile* infections and to support treatment in other GI and non-GI disease.

Giriş

İnsan vücudunda, mikrobiyotayı oluşturan, çoğunluğu bakterilerden oluşan toplam 10^{14} mikroorganizmanın kolonize olduğu bilinmektedir. Gastrointestinal sistem (GİS), geniş yüzey alanı ve zengin besin öğeleri içeriği yönünden kolonizasyon için oldukça uygun bir ortam oluşturmaktadır. Kolon tek başına vücudumuzdaki mikroorganizmaların %70'inden fazlasını barındırmaktadır ((Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Ayrıca GİS dışında; deri, genitoüriner sistem ve solunum sisteminde de kolonizasyon olduğu bilinmektedir.

İntestinal mikrobiyota; metabolik, sistemik ve immünolojik birçok olayda önemli rol oynayan bir organ gibi davranmaktadır. Mikrobiyotanın; fonksiyonel bağırsak hastalıkları, inflamatuar bağırsak hastalıkları, obezite, metabolik sendrom, diyabetes mellitus, ateroskleroz, gibi hem GİS hem de GİS dışı birçok farklı sistemi ilgilendiren hastalıkla da yakından ilişkili olduğu bilinmektedir ((Duncan et al., 2008); (Koren et al., 2011);(Choi & Cho, 2016);(H. J. Lee et al., 2017).

İntestinal mikrobiyota doğumdan önce, intrauterin dönemde oluşmaya başlar. Doğum şekline göre mikrobiyota şekillenir. Vajinal yolla doğan bebeklerde, bebeğin intestinal mikrobiyotasını annenin genitoüriner sistem mikroorganizmaları oluştururken, sezaryen ile doğumda deri mikroorganizmalarına benzer olduğu görülmüştür (Dominguez-Bello et al., 2010). İnfantlarda GİS mikrobiyotasını etkileyen önemli bir faktör beslenme şeklidir. Anne sütü ile beslenen infantlarda GİS mikrobiyotasının çoğunu *Bifidobakteriuslar* oluştururken, formül süt ile beslenen infantlarda *Escherichia coli, Clostridium difficile, Bacteroides fragilis* ve *Lactobacillus* baskındır (Penders et al., 2006). Bu dönemde mikrobiyota oluşumunu etkileyen diğer faktörler gestasyonel yaş, hospitalizasyon ve sık antibiyotik kullanımı olarak sıralanabilir. Doğumdan sonraki süreçte sindirim sistemi mikroorganizmaları dinamik bir denge içerisinde şekillenmeye devam eder ve 3.5 yaşından sonra artık intestinal mikrobiyota erişkin mikrobiyotasına benzer hale gelir (Toubon et al., 2023). Erişkin intestinal mikrobiyotasının yaklaşık %95'ini *Firmicutes* ve *Bacteroides'ler* oluşturur. Yaşlanma ile intestinal mikrobiyotanın çeşitliliğinde azalma meydana geldiği gibi; içerikteki değişikliklerin eşlik eden sistemik hastalıklar, diyet, kullanılan ilaçlar ve bireyin yaşadığı çevre ile de yakın ilişkili olduğu bilinmektedir (Claesson et al., 2011). İntestinal mikrobiyotanın dengesi üzerine olumsuz etki eden tüm faktörlerin intestinal disbiyozise yol açtığı ve disbiozisin hem GİS ile ilgili hem de GİS dışı birçok hastalığın patogenezinde etkili olduğu kabul edilmektedir.

1-İntestinal Disbiyozis ile İlişkili Olduğu Düşünülen Hastalıklar

İntestinal disbiyozis ile ilişkili olduğu düşünülen GİS hastalıkları; tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonu, inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), irritabl bağırsak sendromu, hepatik ensefalopati, konstipasyon ve malign hastalıklar (lenfoma, kolorektal kanser) olarak sıralanabilir (Evrensel & Ceylan, 2016). GİS dışı hastalıklardan; artrit, astım, atopi, egzama, allerjik rinit, otizm, otoimmün hastalıklar, kronik yorgunluk sendromu, fibromiyalji, diabetes mellitus ve insulin direnci, hiperkolesterolemi, obezite, metabolik sendrom, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, idiopatik trombositopenik purpura, Parkinson, multipl skleroz da disbiozis ile ilişkili bulunmuştur.

2-Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu Nedir?

Modern tıpta ilk olarak 1958 yılında, Eiseman B ve arkadaşları tarafından kullanılan fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT) (literatürdeki diğer isimleriyle fekal bakteriyoterapi, fekal transfüzyon, gaita transplantasyonu); sağlıklı mikrobiyotaya sahip bir donörden alınan gaitanın, hasta bireyin GİS'ine transfer edilmesi işlemidir (Eiseman, Silen, Bascom, & Kauvar, 1958). Nakilin temel amacı, bozulmuş olan mikrobiyotayı sağlıklı bir flora ile değiştirerek vücudun metabolik dengesinin tekrar düzenlenmesini sağlamaktır.

2.1. Endikasyonları

Fekal mikrobiyota transplantasyonu, tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonunda, FDA onayı alan bir tedavi yöntemi olup; bunun dışındaki endikasyonlar başta İBH olmak üzere; irritabl bağırsak sendromu, kronik diyare, konstipasyon, kronik yorgunluk sendromu, diyabet, obezite, insülin direnci, idiyopatik trombositopenik purpura, ateroskleroz, otizm, miyoklonik distoni, multipl skleroz, Parkinson hastalığı, hepatik ensefalopati, çölyak hastalığı ve Hashimato tiroiditi olarak sıralanabilir. Ancak tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonu haricindeki tüm uygulamalar, tam kür amaçlı değil, tedaviye destek amaçlı olarak kullanılmaktadır. Özellikle son 20 yılda FMT uygulamasının artmasıyla hem çocuklarda hem de erişkin hastalarda, FMT'nin tedavi üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir.

2.2. Donörlerin Hazırlığı

Donörün, sağlıklı akrabalardan olması tercih edilir ancak yabancı kişilerden toplanan gaita ve gaita bankalarından da gaita alınabilir. Transplantasyonun alıcıda yeni bir hastalık yaratmaması adına donörlerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir (Cammarota et al., 2017):

- Enfeksiyöz hastalıklar yönünden detaylı anamnez:
- Bilinen HIV, HBV, HCV, sifiliz, insan T-lenfotropik virüs I ve II, sıtma, Tripanozomiyaz, tüberküloz öyküsü
- Donör olunduğu sırada kontrol edilemeyen bilinen sistemik enfeksiyon
- Uyuşturucu kullanımı
- Riskli cinsel davranış
- Daha önce doku/organ nakli almış olmak
- Son 12 ay içinde kan ürünü alma öyküsü
- Son 6 ay içinde iğne batması kazası, vücut dövmesi, piercing, küpe, akupunktur öyküsü
- Yetersiz hijyenik koşullarda tıbbi tedavi alım öyküsü
- Prionların neden olduğu hastalıkların bulaşma riski
- Son zamanlarda parazitoz veya rotavirüs, *Giardia lamblia* ve GİS tutulumu olan diğer mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyon
- Son 6 ay içinde tropikal ülkelere, bulaşıcı hastalık veya seyahat ishali açısından yüksek risk taşıyan ülkelere seyahat öyküsü
- Son 6 ay içinde zayıflatılmış canlı bir virüsle temas öyküsü
- Sağlık çalışanları
- Hayvanlarla çalışan kişi
- Gastrointestinal, metabolik ve nörolojik hastalıklar yönünden detaylı anamnez:
- İrritabl bağırsak sendromu, İBH, fonksiyonel kronik kabızlık, çölyak hastalığı, diğer kronik gastrointestinal hastalıklar
- GİS tutulumu olan kronik, sistemik otoimmün hastalıklar
- GİS'de kanser veya polipozis öyküsü/yüksek riski (birinci derece akrabalarda olması)
- Yakın zamanda ishal, hematokezya öyküsü
- Nörolojik/nörodejeneratif hastalık öyküsü
- Psikiyatrik hastalık öyküsü

- Fazla tartı ve obezite
- Bağırsak mikrobiyotasını bozabilecek ilaçlar yönünden anamnez:
- Son 3 ay içinde antibiyotik, immunsüpresif, kemoterapi alma öyküsü
- Proton pompa inhibitörleri ile kronik tedavi
- Yakın zamanda başlayan riskli durumların donör olunan gün yeniden kontrol edilmesi:
- Yeni ortaya çıkan ateş, boğaz ağrısı, lenfadenomegali
- Mikrobiyotayı bozabilecek antibiyotik veya diğer ilaçların kullanımı
- Yeni cinsel partnerler veya yurt dışı seyahatleri
- Riskli ilaç kullanımı
- Tropik bölgelere seyahat
- İnsan kanıyla temas (Böcek sokması, yara, piercing, dövme)
- Cinsel açıdan yüksek riskli davranış
- Son 4 hafta içinde aile bireylerinde ishal (günde üçten fazla sıvı dışkılama)
- Donör kanında mutlak taranması gerekenler:
- Sitomegalovirüs (CMV)
- Epstein-Barr virüsü (EBV)
- HAV, HBV, HCV, HEV
- Sifiliz
- HIV-1 ve HIV-2
- Entamoeba histolytica
- Tam kan sayımı
- C-reaktif protein ve eritrosit sedimantasyon hızı
- Albümin
- Kreatinin ve elektrolitler
- Aminotransferazlar, bilirubin, gama-glutamiltransferaz, alkalin fosfataz
- Donör kanında özel durumlarda taranması gerekenler:

- İnsan T-lenfotropik virüs tip I ve II antikorları
- Strongyloides stercoralis
- Donör gaitasında mutlak taranması gerekenler:
- *Clostridium difficile*
- Salmonella, Shigella dahil enterik patojenler
- *Campylobacter, Escherichia coli O157 H7, Yersinia*, vankomisine dirençli enterokoklar, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
- Gram negatif çoklu ilaca dirençli bakteriler
- Norovirüs
- *Giardia lamblia* ve *Criptosporidium parvum* için antijenler ve/veya asitle hızlı boyama
- Protozoa (*Blastocystis hominis* dahil) ve helmintler
- Dışkıda gizli kan testi
- Donör gaitasında özel durumlarda taranması gerekenler:
- Vibrio cholera ve Listeria monocytogenes
- Isospora ve Microsporidia için antijenler ve/veya asitle hızlı boyama
- Fekal kalprotektin
- *Helicobacter pylori* dışkı antijeni
- Rotavirüs

Başarılı bir FMT için 30-50gr fekal materyal bile yeterlidir ancak; gaita miktarı arttıkça mikrobiyotanın kalitesinin ve çeşitliliğinin arttığı, bunun da iyileşme oranlarına olumlu etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda taze gaita ile donmuş gaita arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Tang, Yin, & Liu, 2017); (C. H. Lee et al., 2016). En çok tercih edilen yol kolonoskopi ile materyalin ileuma bırakılması olup nazogastrik tüp, nazoduodenal yol, üst GİS endoskopisi ve retansiyon enema ile de yapılabilir (15). Uygulama yöntemi, hastalığın anatomik lokalizasyonuna göre seçilirse en etkili sonuç alınmaktadır. Hangi yolla verilirse verilsin transplantasyonun etkili olabilmesi için materyalin en az 4 saat, mümkünse 6-8 saat lümende kalması gerekmektedir.

3. Pediatrik Yaş Grubunda FMT Uygulaması ve Erişkinden Farklılıkları

Çocuk ve erişkinlerin mikrobiyota dağılımı birbirinden farklı olduğu için erişkin mikrobiyotasının çocuklara uygulanması sonucu immun yaşlanma-mikrobiyom değişikliği gelişebilmektedir. Bu nedenle çocuklarda yaş uyumlu donörlerin kullanılması, uzun dönem yan etkilerin önüne geçebilmek için önemlidir. Yaş uyumlu FMT'nin, erişkin donörle yapılan FMT'ye göre, çocuk hastada (alıcıda) immün-yaşlanmaya neden olmayacağından, uzun dönem yan etki olasılığının (sistemik-kronik hastalıklar, malignite) daha az olacağı düşünülmektedir.

4. Fekal Mikrobiyota Transplantasyonunun Etkinliği

Psödomembranöz enterokolitin nedeni olan *Clostridium difficile* enfeksiyonu, FDA onaylı bir tedavi yöntemi olup, FMT'nin dünyada en sık yapılan endikasyonudur ve yapılan çalışmalarda %90'lara varan başarılı sonuçlar bildirilmiştir (Cammarota et al., 2017); (Gough, Shaikh, & Manges, 2011);(Drekonja et al., 2015);(Youngster et al., 2014). İkinci sırada İBH yer almaktadır. İBH'da FMT prosedürünün etkinliğinin kanıtlanması, temel tedavi protokolüne girmesi ve işlemin yaygınlaşmasıyla; biyolojik ajanlar gibi pahalı, azatioprin ve steroid gibi geniş spektrumlu ve sistemik yan etkisi yüksek immünsupresif ajanların kullanım sıklığı, dozu ve süresi azaltılabilir, dirençli vakalarda temel tedaviye eklenerek sinerjistik etki yaratılabilir, hastaneye yatış ve cerrahi ihtiyacının azalması sağlanabilir.

Literatürde bugüne dek FMT ile ilgili yapılmış çalışmalara bakılacak olursa; 1989 yılında, kortikosteroid ve aminosalisilatlara dirençli ülseratif kolit (ÜK) tanılı hastalara uygulanmış, 6 hafta sonra klinik, makroskobik ve mikroskopik iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (Bennet & Brinkman, 1989). 2012 ve 2014 yıllarında yapılan iki sistemik araştırmada remisyon oranları sırasıyla %63 ve %77.8 olarak bildirilmiştir (Anderson, Edney, & Whelan, 2012);(Sha et al., 2014). Colman RJ ve arkadaşlarının yayınladığı, 122 hastanın katıldığı 18 çalışmanın meta analizinde (9 kohort, 8 vaka bildirimi ve 1 randomize kontrollü çalışma), FMT sonrası klinik iyileşme vakaların %45'inde bildirilmiştir (Colman & Rubin, 2014). Paol Moayyedi ve arkadaşlarının 2015 yılında 70 hasta ile tamamladığı randomize kontrollü çalışmada FMT alan ÜK tanılı hastaların %24'ü remisyonu sağlarken, plasebo alan hastalarda bu oran yalnızca %5 olarak belirtilmiştir (Moayyedi et al., 2015). Bota Cui ve arkadaşlarının 2015 yılında 30 refrakter Crohn hastalığı (CH) tanılı hasta ile yaptıkları çalışmada; birinci ayda klinik iyileşme ve remisyon oranlarının sırasıyla %86.7 (26/30) ve %76,7 olduğu, FMT'den sonra hastaların vücut ağırlığının arttığı ve lipid profillerinin düzeldiği görülmüştür (Cui et al., 2015). Ahmet Uygun ve arkadaşlarının, 2017 yılında, 30 dirençli ÜK hastasına uygulanan FMT'nin klinik,

laboratuar ve endoskopik değerlendirilmesini içeren çalışmasında, klinik iyileşme %70 iken, tam iyileşme (klinik, laboratuvar ve endoskopik) oranı %43,3 olarak tespit edilmiştir (Uygun et al., 2017). Ning Li ve arkadaşlarının, 2017'de yayınlanan, şu ana kadarki en fazla sayıdaki FMT yapılmış yayını içeren 406 vakayı dahil eden çalışmalarında, FMT ile iyileşme oranları konstipasyon için (n=276 vaka) %40.2, tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonu için (n=61) %85.2, ÜK için (n=44) % 34.1, irritable bağırsak sendromu için (n=15) %46.7, CH için (n=10) %30 olarak bildirilmiştir (Li et al., 2017). Sudarshan Paramsothy ve arkadaşlarının, 2017'de, dünyada ilk kez mültidonörden hazırlanan FMT'nin 85 hastaya (42 aktif ülseratif kolit, 43 placebo) uygulandığı randomize kontrollü çalışmasında ÜK'li hastalardaki iyileşme %27 iken plaseboda yalnızca %8 olduğu görülmüştür (Paramsothy et al., 2017).

Pediatrik hasta grubunda yapılan çalışmalara göz atıldığında; Alka Goyal ve arkadaşlarının, 2018 yılında, İBH tanılı 21 pediatrik hastaya (14 ÜK, 7 CH) tek doz üst-alt GİS yoluyla FMT uyguladığı çalışmada, hastaların 1. ayda %57'sinde, 6. ayda %28'inde klinik yanıt gözlenmiştir. FMT sonrası gözlenen yan etkilerin hafif ve kendini sınırlayabilen semptomlar olduğu bildirilmiştir. Hastaların mikroanalizinde FMT öncesi flora çeşitliliğinin az olduğu, *Enterobacteriaceae, Enterococcus, Haemophilus* ve *Fusobacterium* türlerinin fazla olduğu belirlenmiş olup FMT'den 30 gün sonrasında mikrobiota çeşitliliğinin arttığı gözlenmiştir (Goyal et al., 2018). Konvansiyonel tedaviden fayda görmeyen ve kolektomi planı yapılan 11 yaşında ÜK tanılı kız hastaya, 10 ay, bir kez kolonoskopik ardından enema yoluyla, 2-4 haftada bir FMT uygulandığı, hastanın almakta olduğu tedavinin (biyolojik ajan, takrolimus, azatiyopürin) kademeli olarak kesildiği ve azatiyopürin monoterapisiyle kür olarak takip edildiği rapor edilmiştir (Shimizu et al., 2016).

Karen S W Leong ve arkadaşlarının, 2020 yılında, 87 obez adolesan ile tamamlanan randomize klinik çalışmasında, FMT'nin kilo kaybı üzerinde hiçbir etkisi olmamasına rağmen, FMT alan grupta abdominal adipozitede belirgin azalma gözlendiği bildirilmiştir (Leong et al., 2020).

Sonuç olarak; FMT son yıllarda erişkin ve çocuk hastalarda, disbiyozisin neden olduğu tüm hastalıkların tedavisinde kullanımı yaygınlaşan, tekrarlayan *Clostridium difficile* enfeksiyonunda kür amacıyla, diğer GİS ve GİS dışı hastalıklarda ise tedaviye destek olması amacıyla uygulanabilen bir tedavi yöntemidir.

Kaynakça / References

Anderson, J. L., Edney, R. J., & Whelan, K. (2012). Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther, 36*(6), 503-516. doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05220.x

Bennet, J. D., & Brinkman, M. (1989). Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet, 1*(8630), 164. doi:10.1016/s0140-6736(89)91183-5

Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., . . . Gasbarrini, A. (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut, 66*(4), 569-580. doi:10.1136/gutjnl-2016-313017

Choi, H. H., & Cho, Y. S. (2016). Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc, 49*(3), 257-265. doi:10.5946/ce.2015.117

Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., . . . O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108 Suppl 1*(Suppl 1), 4586-4591. doi:10.1073/pnas.1000097107

Colman, R. J., & Rubin, D. T. (2014). Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis, 8*(12), 1569-1581. doi:10.1016/j.crohns.2014.08.006

Cui, B., Feng, Q., Wang, H., Wang, M., Peng, Z., Li, P., . . . Zhang, F. (2015). Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: safety, feasibility, and efficacy trial results. *J Gastroenterol Hepatol, 30*(1), 51-58. doi:10.1111/jgh.12727

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(26), 11971-11975. doi:10.1073/pnas.1002601107

Drekonja, D., Reich, J., Gezahegn, S., Greer, N., Shaukat, A., MacDonald, R., . . . Wilt, T. J. (2015). Fecal Microbiota Transplantation for Clostridium difficile Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med, 162*(9), 630-638. doi:10.7326/m14-2693

Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond), 32*(11), 1720-1724. doi:10.1038/ijo.2008.155

Eiseman, B., Silen, W., Bascom, G. S., & Kauvar, A. J. (1958). Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery, 44*(5), 854-859.

Evrensel, A., & Ceylan, M. E. (2016). Fecal Microbiota Transplantation and Its Usage in Neuropsychiatric Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci, 14*(3), 231-237. doi:10.9758/cpn.2016.14.3.231

Gough, E., Shaikh, H., & Manges, A. R. (2011). Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis, 53*(10), 994-1002. doi:10.1093/cid/cir632

Goyal, A., Yeh, A., Bush, B. R., Firek, B. A., Siebold, L. M., Rogers, M. B., . . . Morowitz, M. J. (2018). Safety, Clinical Response, and Microbiome Findings Following Fecal Microbiota Transplant in Children With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis, 24*(2), 410-421. doi:10.1093/ibd/izx035

Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fåk, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., . . . Bäckhed, F. (2011). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108 Suppl 1*(Suppl 1), 4592-4598. doi:10.1073/pnas.1011383107

Lee, C. H., Steiner, T., Petrof, E. O., Smieja, M., Roscoe, D., Nematallah, A., . . . Kim, P. T. (2016). Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent Clostridium difficile Infection: A Randomized Clinical Trial. *Jama, 315*(2), 142-149. doi:10.1001/jama.2015.18098

Lee, H. J., Choi, J. K., Ryu, H. S., Choi, C. H., Kang, E. H., Park, K. S., . . . Hong, K. S. (2017). Therapeutic Modulation of Gut Microbiota in Functional Bowel Disorders. *J Neurogastroenterol Motil, 23*(1), 9-19. doi:10.5056/jnm16124

Leong, K. S. W., Jayasinghe, T. N., Wilson, B. C., Derraik, J. G. B., Albert, B. B., Chiavaroli, V., . . . Cutfield, W. S. (2020). Effects of Fecal Microbiome Transfer in Adolescents With Obesity: The Gut Bugs Randomized Controlled Trial. *JAMA Netw Open, 3*(12), e2030415. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.30415

Li, N., Tian, H., Ma, C., Ding, C., Ge, X., Gu, L., . . . Zhou, Y. (2017). [Efficacy analysis of fecal microbiota transplantation in the treatment of 406 cases with gastrointestinal disorders]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 20*(1), 40-46.

Moayyedi, P., Surette, M. G., Kim, P. T., Libertucci, J., Wolfe, M., Onischi, C., . . . Lee, C. H. (2015). Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology, 149*(1), 102-109.e106. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.001

Paramsothy, S., Kamm, M. A., Kaakoush, N. O., Walsh, A. J., van den Bogaerde, J., Samuel, D., . . . Borody, T. J. (2017). Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet, 389*(10075), 1218-1228. doi:10.1016/s0140-6736(17)30182-4

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., . . . Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics, 118*(2), 511-521. doi:10.1542/peds.2005-2824

Sha, S., Liang, J., Chen, M., Xu, B., Liang, C., Wei, N., & Wu, K. (2014). Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther, 39*(10), 1003-1032. doi:10.1111/apt.12699

Shimizu, H., Arai, K., Abe, J., Nakabayashi, K., Yoshioka, T., Hosoi, K., & Kuroda, M. (2016). Repeated fecal microbiota transplantation in a child with ulcerative colitis. *Pediatr Int, 58*(8), 781-785. doi:10.1111/ped.12967

Tang, G., Yin, W., & Liu, W. (2017). Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory Clostridium difficile infection: A meta-analysis? *Diagn Microbiol Infect Dis, 88*(4), 322-329. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.007

Toubon, G., Butel, M. J., Rozé, J. C., Nicolis, I., Delannoy, J., Zaros, C., . . . Charles, M. A. (2023). Early Life Factors Influencing Children Gut Microbiota at 3.5 Years from Two French Birth Cohorts. *Microorganisms, 11*(6). doi:10.3390/microorganisms11061390

Uygun, A., Ozturk, K., Demirci, H., Oger, C., Avci, I. Y., Turker, T., & Gulsen, M. (2017). Fecal microbiota transplantation is a rescue treatment modality for refractory ulcerative colitis. *Medicine (Baltimore), 96*(16), e6479. doi:10.1097/md.0000000000006479

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95*(12), 6578-6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578

Youngster, I., Sauk, J., Pindar, C., Wilson, R. G., Kaplan, J. L., Smith, M. B., . . . Hohmann, E. L. (2014). Fecal microbiota transplant for relapsing Clostridium difficile infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clin Infect Dis, 58*(11), 1515-1522. doi:10.1093/cid/ciu135

7. BÖLÜM / CHAPTER 7

PARKİNSON HASTALIĞINDA DEĞİŞMİŞ MİKROBİYOTA PROFİLİ

ALTERED MICROBIOTA PROFILE IN PARKINSON'S DISEASE

Gülsen BABACAN YILDIZ[1]

[1]Prof. Dr. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji AD, Emekli Öğretim Üyesi, İstanbul, Türkiye
E-mail: drgbabacan@gmail.com

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.007

ÖZ

Nörodejeneratif hastalıklar kronik ilerleyici ,geri dönüşümsüz hastalıklardır ve etiyolojileri ve tedavileri şu anda büyük ölçüde bilinmemektedir. İdiyopatik Parkinson hastalığı (PH), tremor, bradikinezi ve postural instabilite gibi tipik motor semptomlara yol açan bir nörodejeneratif hastalıktır. Nöropatolojik olarak, α-sinüklein (α-syn) içeren Lewy cisimciklerinin ve Lewy nöritlerinin substantia nigra pars compacta (SNpc) bölgesindeki inklüzyonları ile karakterizedir. Ancak, bu α-syn birikimleri yalnızca SNpc'de değil, aynı zamanda deri, kalp, tükürük bezleri, bağırsak mukozası gibi non-nöronal dokular-da da olduğu bildirilmiştir. PH'nin GIS'deki bu erken tutulumu, bağırsakların hastalığın başlamasında nöronal, immün, endokrin veya metabolik yollar aracılığıyla anahtar organ olabileceği şeklinde birçok teoriye yol açmıştır ve son yıllarda, bağırsak mikrobiyotasının PH'de beyin-bağırsak eksenini nasıl etkilediğinin araştırılmasına artan ilgi vardır. Bu ilişkinin anlaşılması, PH'nin etiyopatogenezini kavramak ve bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek veya değiştirerek yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek açısından önemlidir. Bununla birlikte, bu alanda daha fazla araştırma yapılması ve mevcut bulguların daha da doğrulanması gerekmektedir..

Anahtar Kelimeler: Nörodejeneratif hastalıklar, bağırsak mikrobiyotası, Parkinson hastalığı, mikrobiyal moleküller, kısa zincirli yağ asitleri

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are chronic progressive and irreversible diseases and their etiology and treatment are currently largely unknown. Idiopathic Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that causes typical motor symptoms of tremor, bradykinesia, and postural instability. It is neuropathologically characterized by the inclusions of Lewy bodies and Lewy neurites containing α-synuclein (α-syn) in the substantia nigra pars compacta (SNpc). However, these α-syn deposits have been reported not only in the SNpc, but also in the non-neuronal tissues such as skin, heart, salivary glands, intestinal mucosa. This early involvement of GIS in PD gave rise to several theories that the gut could be the key organ in the initiation of the disease, either via neural, immune,

endocrine, or meta-bolic pathways, and in recent years, there is increasing interest in investigating how gut microbiota changes the brain–gut axis in PD. Understanding this relationship is important for comprehending the etiopathogenesis of PD and developing new therapeutic approaches by regulating or modifying the gut microbiota. However, further research is needed in this field, and existing findings need to be further validated.

Keywords: Neurodegenerative diseases, gut microbiota, Parkinson's disease, microbial molecules, short-chain fatty acids

Extended Abstract

Neurodegenerative diseases are chronic progressive, irreversible diseases and their etiology and treatment are currently largely unknown. Idiopathic Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that causes characteristic motor symptoms of tremor, bradykinesia, and postural instability. Besides motor symptoms, PD patients have non-motor symptoms (NMS), particularly in gastrointestinal systems (GIS), including impaired gastric emptying, sialorrhea, dysphagia, nausea, abdominal bloating, and constipation.

PD is neuropathologically characterized by the inclusions of Lewy bodies and Lewy neurites containing α-synuclein (α-syn) in the substantia nigra pars compacta (SNpc). However, these α-syn deposits have been reported not only in the SNpc, but also in the non-neuronal tissues such as skin, heart, salivary glands, intestinal mucosa. This early involvement of GIS in PD gave rise to several theories that the gut could be the key organ in the initiation of the disease. In recent years, there are numerous assumptions regarding how inclusion bodies detected in the gastrointestinal system in PD pass into the brain and contribute to PD. It is believed that the immune system, endocrine system, enteric nervous system, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, vagus nerve, and microbiota products play a significant role in the interaction between the GIS, referred to as the gut-brain axis, and the central nervous system (CNS).

The GIS microbiota is mainly composed of bacteria varying in diversity and stability among individuals and they assist in various aspects of human health comprising fiber breakdown, vitamin production, metabolic regulation, and modulation of neurological functions. Intestinal dysbiosis, defined as the disruption of the normal balance between the gastrointestinal microbiota and the host, is a condition observed in all PD patients at different taxonomic levels. Some studies even suggest that dysbiosis begins before the onset of the disease's cardinal symptoms.

Understanding this relationship between PD and intestinal dysbiosis is important for comprehending the etiopathogenesis of PD and developing new therapeutic approaches by regulating or modifying the gut microbiota. However, further research is needed in this field, and existing findings need to be further validated.

1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar, santral ve/veya periferik sinir sisteminin spesifik bölgelerinde sıklıkla selektif nöronlarda ya da nöronlar arasında toplanan patolojik birikimler ile karakterize kronik ilerleyici ve geri dönüşümsüz hastalıklardır. Bu anormal patolojik protein birikimleri hücre iskeleti anormalliklerine, DNA ve RNA hasarlarına, sinaptik ve nöronal ağ disfonksiyonuna, enflamasyona ve sonuçta o bölgedeki nöronların ölümüne neden olur. Nörodejeneratif hastalıkların ortak özelliği, etkilenen bölgedeki nöronların zaman içinde fonksiyonlarını yerine getirememesi ve zamanla bu anormal protein birikimlerinin diğer beyin bölgelerine de yayılıp hastalığın progresyon göstermesidir.

Bugün için tüm kapsamlı araştırmalara rağmen nörodejeneratif hastalıkların etyolojisi, progresyonu ve tedavisi büyük oranda bilinmemektedir. Genetik faktörler, çevresel faktörler ve yaşlanma gibi faktörlerin bir kombinasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir. Araştırmalar, hastalıkların altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamayı, erken teşhis yöntemlerini geliştirmeyi ve yeni tedavi stratejileri bulmayı hedeflemektedir.

Kitabın bu bölümünde Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığında görülen mikrobiyota değişiklikleri ve bunun hastalığın etyopatogenezinde olası etkileri anlatılacaktır.

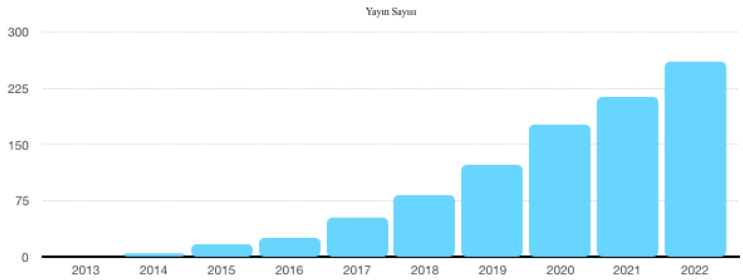
1.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) klinik olarak tremor, bradikinezi, rijidite ve postüral instabilite ile karakterizedir. PH'nın insidansı ve prevalansı yaşla birlikte artar ve 65 yaş üstü kişilerde %1 iken, 85 yaş üstünde ise bu oran %4–5'e çıkar (Goldman et al.,1998; Fahn et al., 2003). Ancak son 20 yılda hastalığın görülme sıklığının anlamlı derecede arttığı bildirilmektedir (Dorsey et al., 2018). Hastalık 40 yaşından önce başlarsa erken başlangıçlı Parkinson hastalığı (EOPH) olarak anılır ve bu vakalar tüm PH vakalarının %3-5'ini oluşturur (Schrag et al., 2006). PH, çoğu popülasyonda erkeklerde kadınlara göre iki kat daha yaygındır (Baldereschi et.al, 2000).

PH bir hareket bozukluğu olarak tanımlansa da, hemen hemen tüm hastalarda motor semptomların yanı sıra, bozulmuş mide boşalması, siyalore, disfaji, mide bulantısı, abdominal şişkinlik ve konstipasyon hiposmi, üriner fonksiyon bozukluğu, ortostatik hipotansiyon, kognitif bozukluklar, depresyon, ağrı ve uyku bozukluğu gibi motor olmayan semptomlar (NMS) olarak anılan çok farklı sistemlerin semptomları da vardır (Martinez-Martin, 2011). Bu semptomlar sıklıkla motor semptomlardan yıllar öncesinde başlar (Shannon et al., 2012; Abbott et al. 2001).

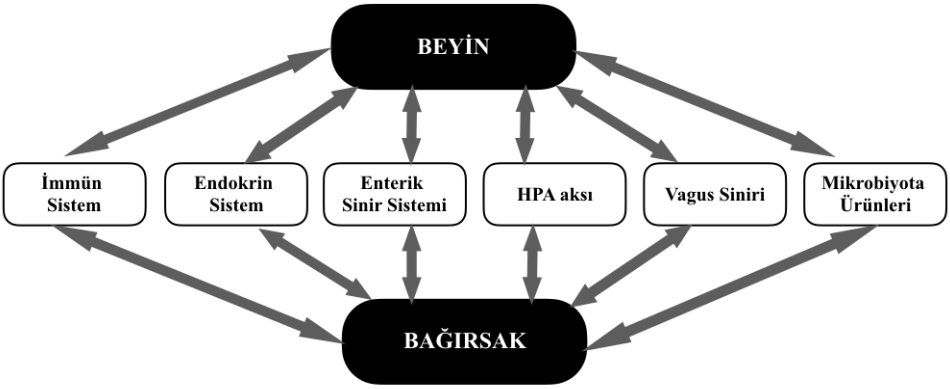
Nöropatolojik olarak, substantia nigra pars compacta (SNpc)'da intranöronal olarak α-sinüklein (α-syn) ve ubiquitin içeren Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritlerinin inklüzyonları görülür. Yanlış katlanmış α-syn'nin hücreden hücreye prion benzeri bir şekilde yayılma yeteneğine sahip olduğuna düşünülmektedir (Olanow et al. 2009; Goedert, 2015). Otopsi çalışmalarında α-syn birikimlerinin sadece SNpc'de değil aynı zamanda otonom sinir sisteminde, spinal kordda, serebral kortekste, olfaktor nöronlarda ve deri, kalp, tükrük bezleri, intestinal mukoza gibi nöronal olmayan dokularda da görüldüğü bildirilmiştir. Bu cisimcikler ayrıca gastrointestinal sistem (GİS) ve adrenal medullayı innerve eden sinir sisteminde de gösterilmiştir (Gelpi et al. 2014). GİS semptomlarının PH'daki bu erken katılımı, bağırsağın nöral, immün, endokrin veya metabolik yolaklar yoluyla hastalığın başlangıcında anahtar organ olabileceğine dair çeşitli teorilerin ortaya çıkmasına neden oldu. Çünkü PH etyolojisinde genetik ve birçok çevresel faktör sorumlu tutulsa da etyopatogenez tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, PH'de bağırsak mikrobiyotasının beyni nasıl değiştirdiğini araştırmaya artan bir ilgi vardır (Klingelhoefer et al., 2015; Menozzi et al., 2021) (Tablo 1).

Tablo 1. Pubmed'de "Parkinson Hastalığı ve Mikrobiyota" ile arama yapınca çıkan yayın sayıları.



2. Bağırsak-Beyin Ekseni

PH'da GİS'de tespit edilen inklüzyon cisimciklerinin nasıl beyne geçtiği ve PH'na neden olduğu ile ilgili çok sayıda varsayım bulunmaktadır. Bunda *bağırsak-beyin ekseni* olarak ifade edilen gastrointestinal sistem ile merkezi sinir sistemi (MMS) arasındaki immün sistem, endokrin sistem, enterik sinir sistemi, hipotalamik-pitüiter-adrenal eksen (HPA aksı), vagus siniri ve mikrobiyota ürünlerinin büyük önemi vardır (Şekil 1). Bunlar sayesinde beyinden gelen sinyaller bağırsağın sensorimotor ve salgı fonksiyonlarını, GİS'den gelen sinyaller de beyin fonksiyonunu değiştirir (Klingelhoefer et al., 2015; Menozzi et al., 2021).



Şekil 1: Bağırsak-Beyin eksenini oluşturan 6 olası bağlantı yolu

Bağırsak-beyin ekseninde çalışan ve bağırsakların beyni etkilemesinde önemli rolü olan başlıca faktörler şunlardır:

2.1. Değişmiş GİS Mikrobiyotası ve Bağırsak Disbiyozisi

Gastrointestinal mikrobiyota ile konakçı arasındaki normal dengenin bozulması olarak tanımlanan bağırsak disbiyozisi farklı taksonomik düzeylerde tüm Parkinson hastalarında görülen bir durumdur (Hasegawa et al., 2015; Keshavarzian et al., 2015; Unger et al., 2016). Disbiyozisin tam olarak nedeni bilinmemekle beraber beslenme biçimi, eksternal toksinler, kronik uykusuzluk ve kronik stres gibi pek çok faktör suçlanmaktadır. Sonuçta bu faktörler GİS mikrobiyotasını değiştirmekte ve bu da disbiyozise neden olmaktadır. Büyük bir analizde Parkinson hastalarında ve sağlıklı kontrollere göre tüm taksonomik düzeylerde değişen oranlarda değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Hatta hastalığın kardinal semptomları başlamadan önce disbiyozisin başladığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Disbiyozis hem bağırsak bariyer fonksiyonunu bozarak, immün aktivasyona ve sistemik inflamasyona hem de lokal bağırsak inflamasyonu yaparak enterik α-syn agregasyonuna neden olmaktadır.

GİS mikrobiyotasında en çok değişiklik bildirilen nörodejeneratif hastalık muhtemelen PH'dir. Hiç şüphe yok ki PH'da GİS miktobiyota profili yaş, cinsiyet, kullanılan ilaçlar, eşlik eden komorbid hastalıklar, hatta hastalık evresinden bile etkilenmektedir. Değişiklikler filum seviyesinden çok familya, cins ve tür düzeyinde gözlenmiştir. Parkinson hastalarında ülkeden ülkeye değişen bir GİS mikrobiyota profili bulunmakla beraber, beş ülkenin dahil edildiği büyük bir meta-analizde ülkeler arasında ortak bir sonuç olarak dört cinsde (*Akkermansia, Roseburia, Faecalibacterium, Lachnospiraceae ND3007 group*) ve bir ailede (*Akkermansia-*

ceae) değişiklik olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada bağırsak musin tabakasını parçalayarak bağırsak geçirgenliğini artıran ve bağırsak nöral pleksusu oksidatif strese yatkın hale getiren *Akkermansia'nın* arttığı ve kısa zincirli yağ asidi üreten *Roseburia ve Faecalibacterium'*un azaldığı bildirilmiştir (Nishiwaki et al., 2020).

Prevotella, kolonda yaygın olarak bulunur ve mukozadaki polisakkaritleri ve musin glikoproteinlerini parçalayabilir. Bu sayede de immün sistemle etkileşime giren simbiyotik bir bakteridir. Prevotella'nın aynı zamanda hem kısa zincirli yağ asitlerinin sentezinde, hem tiamin ve folatın biyosentezinde, hem de bağırsak geçirgenliğinde önemli rolü vardır. Açlık hormonu olarak da bilinen bir GİS hormonu olan ghrelinin SNpc'de dopamin fonksiyonunu düzenleyerek ve PH'deki nörodejenerasyonu kısıtlayabilme özelliği olduğu, ancak Parkinson hastalarında bu hormonun azaldığı bildirilmiştir (Unger et al., 2011). Ghrelinin düzeyinin azalmasının ise Prevotella bolluğunda azalma ve Lactobacillaceae bolluğunda artma ile ilişkilendirilmiştir. Pek çok çalışmada Prevotella'nın Parkinson hastalarında anlamlı olarak azaldığı rapor edilmiştir (Petrov et al., 2017; Lin et al., 2019). Bir çalışmada Prevotella'daki azalma ile Parkinson hastalığı kliniği arasında güçlü bir ilişki bulunmuş ve o nedenle de araştırmacılar bu azalmanın hastalık için ön bir biyomarker olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Scheperjans et al., 2015). Bizim yaptığımız bir çalışmada *Prevotellacea* bolluğunda azalma bulduk (Babacan-Yıldız et al., 2023). Bazı çalışmalarda ise PH'da bütirat üreten *Lactobacillaceae* taksonomi ailesinin azaldığı bildirilmiştir (Hillsburn et al.,2017; Keshavarzian et al., 2015; Barichella et al., 2019). Filum düzeyinde kontrollerle Parkinson hastaları arasındaki en önemli fark *Firmicutes* filumunda bildirilmiştir (Gerhardt et al., 2018). Ayrıca yine pek çok çalışmada filum *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* bolluğunun arttığı, *Bacteroides* filumunun bolluğunun ise azaldığı bildirilmiştir. Kontrollerle karşılaştırıldığında, çeşitli çalışmalarda Parkinson hastalarında *Verrucomicrobia* filumundan *Verrucomicrobiaceae* familyasında, *Akkermansia* türünde ve *Akkermansia* muciniphila cinsinde artma bildirilmiştir. *Lactobacillaceae* ailesinde ve *Lactobacillus* cinsinde artma ve *Lachnospiraceae* ailesinden *Blautia, Roseburia, Dorea* ve *Faecalibacterium* cinsinde azalma bildirilmiştir. Gram-negatif bir bakteri olan *Helikobakter pilori'ye* (H. pilori) karşı gelişen kronik sistemik inflamatuar yanıtın da Parkinson hastalığı riskini arttığı bildirilmiştir (Shen et al., 2017). Ayrıca *H. pilori'nin* Parkinson hastalığı tedavisinde en önemli ilaç olan levodopa emiliminde değişikliğe neden olarak, ilacın motor komplikasyon yan etkisinin ortaya çıkarmasına neden olduğu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Başka bir çalışmada da *H. pilori'*nin tedaviyle eredike edilmesinden sonra hastaların motor komplikasyonlarının azaldığı bildirilmiştir.

Hiç ilaç kullanmamış yeni tanı almış Parkinson hastalarında yapılan bir çalışmada, *Lach-*

nospiraceae ailesinin düzeylerinin normal kontrollere göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Barichella et al., 2019).

PH'da ayrıca hastalık süresi, kullanılan ilaçlar, hastalık tipi (tremor dominant vs rigidite dominant), hastalık şiddeti ve non-motor semptomların olup olmaması da mikrobiyota profilini etkilemektedir. Örneğin Heintz-Buschart ve ark. (2018) motor olmayan semptomlar ile *Akkermansia* arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise *Christensenellaceae* bolluğu artmış hastalarda daha fazla non-motor semptom olduğu bildirilmiştir. Aynı kohortta kognitif işlev bozukluğu daha fazla olanlarda Lactobacillaceae düzeylerinin daha artmış olduğu gösterilmiştir (Barichella et al., 2019). Biz de çalışmamızda anosmisi olan ve olmayan hastaları karşılaştırdığımızda Proteobakteriler, Gammaproteobakteriler*, Bacilli* ve Atopobiaceae*'nin* anosmisi olan hastalarda olmayanlara göre anlamlı derecede daha bol olduğunu bulduk. Konstipasyon olmayan PH hastalarına kıyasla, konstipasyon olan PH hastalarında *Ruminococcus gnavus* grubunun bolluğunda anlamlı bir artış gözlemledik. Rem uyku davranış bozukluğu olan hastalarda ise *Acidaminococcus* bolluğunda artma ve *Faecalibacterium* bolluğunda ise anlamlı azalma tespit ettik. Ayrıca hastalık süresi beş yıldan daha fazla olan hastalarda *Siyanobakteri* bolluğunda önemli bir azalma bulduk. (Babacan-Yıldız et al., 2023).

2.2. Bağırsak Geçirgenliğinde Artış

Sızdıran bağırsak olarak da bilinen bağırsak geçirgenliğinde artışın Parkinson hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla arttığı gösterilmiştir (Forsyth et al., 2011). Kolonda okludin düzeyinin azalması ve ZO-1'in hücre içi dağılımının bozulması Parkinson hastalarında barsak geçirgenliğindeki değişimde etkilidir. (Clairembault et al., 2015, van IJzendoorn et al., 2019) Geçirgenlikteki bu artışın sonucu olarak başta lipopolisakkaritler gibi çok çeşitli bakteriyel inflamatuar ürünlerin mukozaya, burdan da sistemik dolaşıma ve beyne geçişi söz konusu olabilir. (Buford-Kohler, 2017). Ayrıca bu artışın Parkinson hastalarının bağırsak mukozalarında IgA üreten B hücrelerinde ve intraepitelyal T lenfositlerde azalma gibi doğal ve edinsel immün sistemde de bozulmalara neden olabileceği bildirilmiştir (Duerkop et al., 2009). *Akkermansia* intestinal mukus tabakasını bozar ve bu bakterinin artması bağırsak geçirgenliğinin artmasına neden olur. Çok sayıda çalışmada Parkinson hastalarında *Akkermansia'nın* artışı bildirilmiştir (Forsyth et al., 2011; Keshavarzian et al., 2015; Bedarf et al., 2017; Hill-Burns et al., 2017). Kısa zincirli yağ asitlerinden olan bütirat, sıkı bağlantılar (tight junctions) sayesinde bağırsak bütünlüğünü sağlamada büyük önem taşır. Parkinson hastalarında bütirat üreten *Firmicutes* filumundan *Blautia*, *Coprococcus* ve *Roseburia'da* azalma olduğu ve bunun da bağırsak geçirgenliğinde artışa neden olabileceği bildirilmiştir (Plöger et al., 2012). Biz de çalışmamızda

Firmicutes filiumunda azalma tespit ettik (Babacan-Yıldız et al., 2023).

2.3. Lokal ve Sistemik İnflamasyon

Nörodejeneratif hastalıkların çok büyük bir kısmı sporadiktir ve hepsinde de tetikleyici faktörler ve agrege olmuş proteinler farklıdır. Ancak hepsinde ortak olan şey inflamasyondur. Parkinson hastalığında da hem lokal hem sistemik ve hem de MSS inflamasyonu söz konusudur. Ayrıca PH'de yaygın olarak görülen konstipasyon ve buna bağlı yavaşlamış transit toksik maddelere maruziyeti artırır ve bu da mikrobiyotanın ortamını değiştirerek inflamsayonu başlatır.

Parkinson hastalarında artmış *E. coli* ve bir proteobakteri olan *Ralstonia* düzeyleri, düşük plazma lipopolisakkarit bağlayıcı protein düzeyi ile birlikte daha yüksek endotoksin maruziyetini yansıtmakta ve bu da bağırsak lokal inflamasyonunu başlatmaktadır. Sonuçta da bunlar sistemik inflamasyonu tetiklemektedir. Büyük bir metaanalizde, Parkinson hastalarının kanlarında pro-inflamatuar interlökinler (TNF-α, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-1β) normal kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur (Qin et al., 2016; Chen et al.,2016). Mikrogliaların aktive olması, pro-inflamatuar sitokinlerin artışı ve birikimi, BOS'da tespit edilen oksitadif hasar bulguları gibi olaylar PH'da hem sistemik hem de MSS inflamasyonunun en önemli kanıtlarındandır. Ayrıca nükleer faktör kappa B (NF-κB) önemli bir transkripsiyon faktörüdür ve hem doğal hem de edinsel bağışıklık sisteminin korunmasında önemli rol oynar. PH'larında değişmiş olan GİS mikrobiyotası NF-κB sinyal sisteminde bozarak inflamasyona neden olmaktadır. Toll-like reseptörler (TLR) özellikle de TLR4 yanlış katlanmış α-syn ile etkileşime girerek proinflamatuar sitokin üretimini arttırır ve oksidatif strese neden olur. Tüm bunlar ve kan-beyin bariyerininin bozulması da nörodejenerasyonu başlatmaktadır (Fellner et al., 2013).

2.4. Bağırsak ve Beyin Arasındaki Nöroanatomik Yol

Bağırsak beyin ile iki anatomik yol ile iletişime geçer: Birincisi, medulla spinalisteki otonom sinir sistemi (OSS) ve vagus siniri aracılığıyla doğrudan bağırsak ve beyin arasında karşılıklı bilgi iletişimi yoludur. Diğeri ise bağırsakta enterik sinir sistemi (ESS) ile OSS ve vagus siniri arasında gerçekleşen çift yönlü iletişimdir. Bağırsak fonksiyonlarını kontrol eden sinir anatomik yolları, hiyerarşik olarak dört basamaklı bir organizasyonda gerçekleşir:

1. İlk basamak: Miyenterik ganglion, submukozal ganglion ve bağırsak glial hücreleri
2. İkinci basamak: Prevertebral gangliyon

3. Üçüncü basamak: Medulla spinalisde bulunan OSS ganglionlarında (T5-L2 sempatik sinir ve S2-S4 parasempatik sinir sistemi) ve beyin sapında yer alan nucleus tractus solitarius ve vagus sinirinin dorsal motor nukleusu
4. Dördüncü basamak; Beyin korteksi ve bazal ganglionlar

Vagus sinirinin %80'i afferent (GİS, solunum ve kardiyovasküler sistemlerden) %20'si ise efferent liflerden oluşur (Prechtl et al., 1990). Vagus sinirinin dorsal motor çekirdeğindeki nöronlarının içsel özelliklerine bağlı olarak, PH'den kaynaklanan hasara karşı savunmasız olduğu bilinmektedir. Alfa-sinükleinin enterik sinirden alt beyin sapındaki vagusun dorsal motor çekirdeğine ve oradan da SNpc'ye rostro kraniyal olarak yayıldığı öne sürülmüştür (Braak et al., 2003). Subdiyafragmatik trunkal vagotomi sonrası PH'nın görülmesinin de bunu desteklediği düşünülmektedir.

2.5. Alfa-sinükleinin İlk Olarak GİS'de Birikmesi

Enteroendokrin hücreler (EEH), gastrointestinal sistemin mukozasında (mideden rektuma kadar) yerleşik bulunan elektriksel olarak uyarılabilen endokrin hücreleridir. EEH'ler başta 5-hidroksitriptamin, kolesistokinin ve peptit Y olmak üzere pek çok hormon üretiminde rol oynar. Ayrıca anatomik konumu nedeniyle EEH'ler, afferent nöronlara sinyal göndermek için bağırsak mikrobiyotası ile sürekli iletişim kurar. EEH'lerin konumları ve girdikleri reaksiyonlar sayesinde α-syn'nin yanlış katlanmasına neden olduğu ve bunun da PH'nin başlamasında ilk adım olabileceği düşünülmektedir. Hareket Bozuklukları camiasında yaygın olarak kabul edilen Braak hipotezine (Braak et al., 2003) göre α-syn birikimi ilk olarak enterik nöronlarda başlamakta ve ardından aşağıdaki sırayla PH'na neden olmakta:

1. Disbiyozise neden olan mikrobiyota ve/veya ürünleri GİS mukozasına geçer.
2. Post-gangliyonik ENS'de α-syn yanlış katlanır ve GİS duvarında Lewy cisimcikleri toplanmaya başlar.
3. α-syn birikimleri vagus sinirinin dorsal motor nükleusuyla yayılır
4. α-syn SSS boyunca Lewy cisimciklerine yayılır ve locus seruleus ve SNpc'ya ulaşır ve nörodejenerasyon başlar.

Bunu destekleyen bulguları da şöyle sıralamaktalar; PH kliniği başlamadan yıllar öncesinde GİS sinir hücrelerinde α-syn'nin saptanması (Stokholm et al., 2016), hastaların kolon biyopsilerinde submukozal nöral pleksusta α-syn fibrillerinin anormal birikiminin gösterilmesi (Cersosimo, 2015), duodenal ülser için vagotomi yapılan hastalarda PH'ın görülme sıklığının

anlamlı olarak daha az olması gibi (Svensson et al. 2015). Hatta yakın zamanda PH'nin α-syn patolojisinin bağırsaklarda mı (aşağıdan yukarıya) yoksa beyinde mi (yukarıdan aşağıya) ilk olarak başladığına göre iki alt tip içerdiğini varsayan yeni bir çalışma da yayınlandı (Jacob Horsager et al., 2020).

2.6. GİS Mikrobiyotasının Salgıladığı Ürünler

Sağlıklı kişilerde bağırsak mikrobiyotası, bağırsak duvarından emilen ve bağırsak epiteli tarafından kullanılan vitaminler, hormonlar ve organik asitler gibi pek çok temel besin maddelerini ya kendi direk üretir ya da üretimine katkıda bulunur. Ayrıca pek çok ilacın metabolize olmasında da oldukça önemlidirler. Enterik sistemde aminler (asetilkolin, noradrenalin, serotonin), aminoasitler (GABA), peptidler (nöropeptid Y, galamin, kalsitonin gen ilişkili peptid…) gibi otuzdan fazla farklı tipte nörotransmitter (NT) salgılanmaktadır. Değişen mikrobiyota profili ise bu NT'lerin düzeylerini etkilemektedir. Örneğin *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinslerine ait bakteriler tarafından üretilen asetilkolin, GABA ve serotonin, beyni doğrudan ve dolaylı olarak etkileyebilir (Pokusaeva et al., 2017; Komatsuzaki et al., 2005). Ayrıca bağırsaklar toplam vücut serotonininin yaklaşık %95'ini sağlar ve bunun da çoğunluğu plazmada bulunur. Pek çok çalışmada, bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin hem serotonin düzeyini hem de serotoninin etkinliğini değiştirdiği gösterilmiştir.

Nöronal plastisite, nöronal göç ve farklılaşma, aksonal ve dendritik büyüme, sinaps oluşumu ve hipokampal nörogenez için önemli ilgili çok önemli bir protein olan ve beyinde bolca bulunan beyin kaynaklı nörotropik faktör (BDNF) disbiyozisi en çok etkilediği hormondur.

Parkinson hastalarında mikrobiyota metabolitlerinin doğrudan analizinden fenilalanin, lösin ve izolösin gibi çeşitli aminoasitlerin metabolizmasının anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Vascellari et al., 2020).

PH'da aynı zamanda lipid metabolizmasında da bozulmalar bildirilmiştir. Örneğin bir omega-6 çoklu doymamış yağ asidi olan linoleik asit ve ayrıca oleik asitte azalma olduğu ve bunun da oksitadif stresi arttırdığı düşünülmektedir (Hernando et al., 2019).

Simbiyotik bakteriler tarafından üretilen nikotinik asit (B_3 vitamini) ve pantotenik asitin (B_5 vitamini) antienflamatuar ve antioksidan etkileri vardır. Ayrıca koenzim A'nın aktif kısmını oluşturan pantotenik asit eksikliği sitrik asit döngüsünün bozulmasına neden olarak enerji metabolizmasında bozukluklara neden olmaktadır. PH'da bu vitaminlerin düşük olduğu ve bunun *Lachnospira, Pseudobutyrivibrio ve Roseburia* cinsleriyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir.

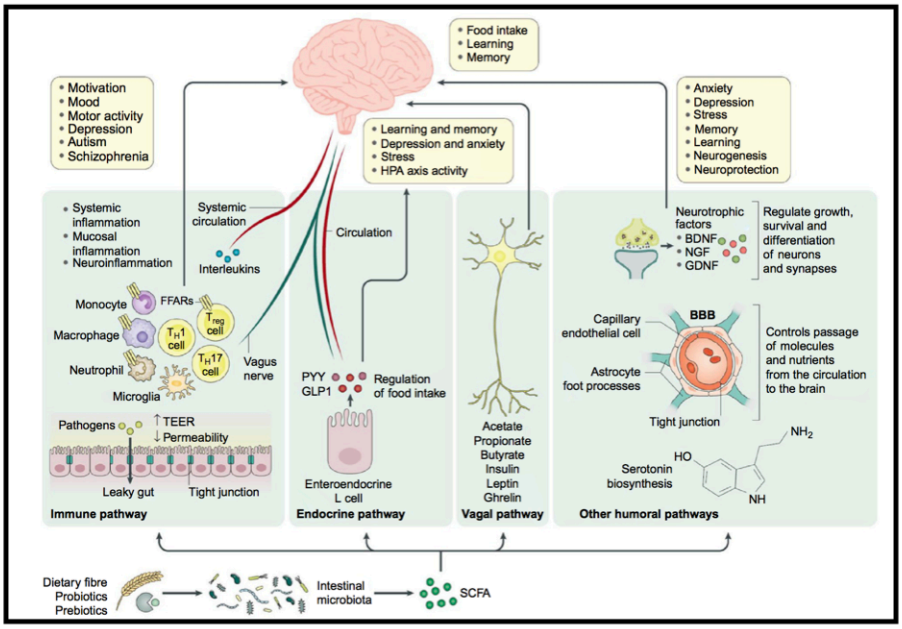
2.7. Kısa Zincirli Yağ Asitleri (KZYA)

KZYA kolonda sindirilmemiş şekerlerin ve diyet liflerinin fermantasyonundan elde edilen ana ürünlerdir ve bağırsak mikrobiyotası ürünlerinin önemli bir kısmını oluşturur. Bir ila altı karbon atomu arasında değişen bir zincir uzunluğuna sahip doymuş yağ asitleridir (Macfarlane et al., 2003). Farklı karbon zincir uzunluklarına göre KZYA'lar başlıca format (1), asetat (C2), propionat (C3) bütirat (C4), valerat (C5) ve kaproat (C6)'dır. Bunlar içinde en bol bulunan ve önemlileri asetat (C2), propionat (C3) ve bütirat (C4)'dır. Diyetin lif içeriğine bağlı olarak günde yaklaşık 500-600 mmol KZYA üretilir (Bergman, 1990) ve kolon hücreleri tarafından emilip hızla çok sayıda farklı taşıyıcılar ile beyne ve tüm bedene dağılır. KZYA'ler immün sistem, endokrin sistem, vagal sinir ve enterik sistem yoluyla hem direk hem de indirek olarak bağırsak-beyin ekseninde önemli rol alır (Şekil 2). KZYA'lar bağırsak mikrobiyotası üzerinde mukus sekresyonunun arttırarak bağırsak bariyer bütünlüğünü sağlamada oldukça önemlidir. Ayrıca bağırsak inflamasyonunu korunmada (Lewis et al., 2010), glukoz homeostazında, nötrofillerin, dendritik hücrelerin, makrofajların, monositlerin ve T hücrelerinin farklılaşmasını ve aktivasyonunu düzenlemeyle bağırsakta bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önemli görevler üstlenir. KZYA'ler histon deasetilasyonu (HDAC) inhibe ederek ve G-protein-bağlı reseptörleri (GPCR'ler) ise uyararak moleküler sinyal sisteminde önemli rol oynarlar. PH'da artmış bir histon deasetilasyonu sözkonusudur (Harrison et al., 2013). Ayrıca KZYA'leri glutamat, glutamin, GABA ve nörotrofik faktörler gibi nörotransmitterleri modüle edebilir. Propiyonat ve butirat ise hücre içi potasyum düzeylerinin değiştirerek hücre sinyal sisteminin etkilenmesine neden olur.

KZYA'leri ayrıca enteroendokrin hücrelerden bağırsak peptitlerinin salınımını ve enterokromaffin hücrelerinden gelen bağırsak kaynaklı serotonin sentezini düzenler.

PH hastaların gaitalarında normal sağlıklara göre daha düşük KZYA olduğu bildirilmiştir (Unger et al., 2016). Pek çok çalışmada bu hastalarda bol miktarda KZYA ürettiği bilinen *Lachnospiraceae* düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (Petrov et al.,2017; Kesarvezan et al., 2015). Ayrıca KZYA'lerinin sentezinde de rol alan *Prevotellaceae* düzeylerinin azalması KZYA'ne bağlı gen ekspresyonu ile bağlantılı hücre içi ve hücre dışı protein temizleme mekanizmalarının bozulmasına yol açmaktadır (De Vadder et al.,2014). Yine KZYA üretme potansiyeline sahip *Faecalibacterium prausnitzii* (Unger et al., 2016), *Veillonella parvula* ve *Ruminococcus torques* (Bedarf et al., 2017) düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir. Biz de kendi yaptığımız çalışmada benzer bulgular elde ettik (Babacan-Yıldız et al., 2023). Bir çalışmada ise KZYA üreten mikrobiyota desteğinin PH'nı önleyebileceği ve/veya hastalığı tersine çevire-

bileceği öne sürülmüştür. (Hill-Burns EM et al., 2017).



Şekil 2) KZYA'lerinin beyin fonksiyonunu modüle edebileceği potansiyel bağırsak-beyin yolları

Şekil.2: KZYA'lerinin beyin fonksiyonunu modüle edebileceği potansiyel bağırsak-beyin iletişim yolları (Dalile B et al., 2019, The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. Nat Rev Gastroenterol Hepatol).

2.8 Lipopolisakkaritler (LPS)

LPS'ler gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan toksik bir bileşendir. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında Parkinson hastalarının hem gaita örneklerinde LPS düzeyinin normalden daha yüksek olduğu hem de LPS bağlayıcı proteinin (LBP) plazma seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Hasegawa et al.,2015). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda LPS enjeksiyonu sonrası proinflamatuar sitokinler olan IL-1b, TNF-α, IL-6 ve nitrit oksit düzeylerinin substantia nigrada gösterilmiştir (Choi et al., 2018). LBP düşüklüğünün ise TNF-α'nın sentez ve salınımını arttırdığı ve inflamasyona neden olduğu bildirilmiştir (Gutsmann et al., 2018).

3. Oral ve Nazal Mikrobiyota

Parkinson hastalığında sadece GİS'de değil aynı zamanda oral ve nazal mikrobiyotada da normal populasyona göre farklılıklar bildirilmiştir. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında PH hastalarının oral mikrobiyotasında *Prevotella*, *Veillonella*, *Solobakterium*, Veillonellaceae,

Lactobacillaceae ve Coriobacteriaceae miktarlarında artma ve *Capnocytophaga*, *Rothia*, *Kingella*, *Leptotrichiaceae, Aktinomyces* ve *Leptotrichiaceae'nin* bolluklarında azalma olduğu rapor edilmiştir (Pereira et al., 2017).

4. Parkinson Hastalığında Sık Görülen GİS Problemleri

4.1. İnce Bağırsaklarda Aşırı Bakteri Çoğalması (Small Intestinal Bacteria Overgrowth-SIBO)

Parkinson hastalarında artmış SIBO sıklığı çok sayıda çalışmada bildirilmiştir (Gabrielli et al, 2011; Tan et al, 2014). SIBO'nun bağırsak geçirgenliğine artışa ve buna bağlı olarak GİS'de lokal bir inflamasyona neden olduğu düşünülmektedir. Bu da sonuçta periferik inflamatuar bir yanıta neden olmakta ve böylece mikroglial aktivasyonu tetikleyerek nörodejeneratif süreci hızlandırmaktadır. SIBO ayrıca levodopa emilimini bozmakta ve motor komplikasyonlara neden olmaktadır.

4.2. Konstipasyon

PH'da konstipasyon normal popülasyona göre altı kat daha fazla görülür (Edwards et al, 1991**)**. Konstipasyon bu hastalarda en sık görülen GİS semptomudur ve hastalığın kliniği başlamadan yıllar öncesinde başlar. Konstipasyonu olan hastalarda *Laktobasillus* cinsinin bolluğunda artma (Liu et al., 2017) ve *Faecalibacterium* cinsinin bolluğunda ise azalma olduğu bildirilmiştir (Parthasarathy et al., 2018; Blatchford et al.,2017)

5. Sonuç

Sonuç olarak, PH'da tespit edilen bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin hastalığın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu bugün için henüz tam aydınlatılamadı. Ancak üç konunun altını çizmek gerekiyor. Birincisi PH tanımlanmasından 200 yüzyıldan fazla zaman geçmiş olmasına rağmen maalesef halen hastalığın etyolojisi tam olarak açıklanamamış ve radikal tedavisi de bulunamamıştır. İkinci olarak PH'da hem MSS'de hem de periferik sinir sisteminde oluşan nöropatoloji hastalığın kliniğinin başlamasından yıllar öncesi başlar. Üçüncüsü bugüne kadar yapılan PH ve mikrobiyota çalışmalarının hepsinde mikrobiyotanın değiştiği bildirilmiştir, yani mikrobiyota PH'da dikkate değer bir role sahiptir. Tüm bu nedenler düşünüldüğünde konu ile ilgili çalışmaların arttırılması ve hastalığın kliniği başlamadan tanı konması ve ardından mikrobiyota değişikliği yapacak müdahaleler ve/veya tedavilerle hastalığın önlenebilmesi ya da en azından geciktirilmesi hayati öneme sahip olacaktır.

Kaynakça / References

Abbott RD, Petrovitch H, Masaki KH (2001). Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 57:456–462. doi: 10.1212/wnl.57.3.456.

Babacan Yildiz G, Kayacan ZC, Karacan I, Sumbul B, Elibol B, Gelisin O, Akgul O. (2023). Altered gut microbiota in patients with idiopathic Parkinson's disease: an age-sex matched case-control study. *Acta Neurol Belg.* 2023 Jun;123(3):999-1009. doi: 10.1007/s13760-023-02195-0. Jan 31.

Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca, WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, *et al*. (2000). Parkinson's disease and Parkinsonism in a longitudinal study: Two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* ;55. 1358-63. doi:10.1212/wnl.55.9.1358

Barichella, M., Severgnini, M., Cilia, R., Cassani, E., Bolliri, C., Caronni, S., Ferri, V. (2019). Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease and atypical Parkinsonism. *Mov. Disord*. 34 (3), 396–405. doi: 10.1002/mds.27581

Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna).* May;110(5):517-36. doi: 10.1007/s00702-002-0808-2.

Bedarf, J.R., Hildebrand, F., Coelho, L.P., Sunagawa, S., Bahram, M., Goeser, F., Bork, P., (2017). Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Med*. 9 (1), 39. doi.org/10.1186/s13073-017-0428-y

Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70, 567–590. doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.567.

Blatchford P, Stoklosinski H, Eady S, et al. (2017). Consumption of kiwi- fruit capsules increases Faecalibacterium prausnitzii abundance in functionally constipated individuals: a randomised controlled human trial. J Nutr Sci;6:e52. doi: 10.1017/jns.2017.52.

Buford, T.W., (2017). (Dis)Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease. *Microbiome* 5, 80. doi.org/10.1186/s40168-017-0296-0

Cersosimo MG. (2015). Gastrointestinal biopsies for the diagnosis of alpha- synuclein pathology in Parkinson's disease. *Gastroenterol Res Pract*: 476041. doi: 10.1155/2015/476041.

Chen X, Hu Y, Cao Z, Liu Q, Cheng Y (2018). Cerebrospinal fluid inflammatory cytokine aberrations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol.* 9:2122. doi: 10.3389/fimmu.2018.02122.

Choi, D. Y., Zhang, J., and Bing, G. (2010). Aging Enhances the Neuroinflammatory Response and Alpha-Synuclein Nitration in Rats. Neurobiol. Aging 31, 1649–1653. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.09.010

Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, et al. (2015). Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun;*3:12. doi: 10.1186/s40478-015-0196-0.

Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. (2019).The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* Aug;16(8):461-478. doi: 10.1038/s41575-019-0157-3.

De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchampt, A., et al. (2014). Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits Via Gut-Brain Neural Circuits. Cell 156, 84–96. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.016

Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR (2018). The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *J Parkinsons Dis*; 8: S3–8. doi: 10.3233/JPD-181474. PMID: 30584159

Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV (2009). Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 31 (3):368–376. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.009.

Edwards LL, Pfei er RF, Quigley EM, Hofman R, Ballu M. (1991). Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord*; 6:151-156. doi: 10.1002/mds.870060211.

Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 991, 1–14. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x.

Fellner L, et al. (2013).Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*. 2013;61:349–60.doi: 10.1002/glia.22437.

Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA et al (2011). Increased intestinal permeability corre- lates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. PLoS One 6(12):e28032. doi: 10.1371/journal.pone.0028032.

Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. (2014). Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol*.; 817:115–33. doi. org/10.1007/978-1-4939-0897-4.

Gabrielli M, Bonazzi P, Scarpellini E, et al. (2011). Prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. 26: 889–92. doi: 10.1002/mds.23566.

Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, et al. (2014). Multiple organ involve- ment by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord;* 29:1010-1017. doi: 10.1002/mds.25776.

Gerhardt S, Mohajeri MH (2018). Changes of colonic bacterial composition in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Nutrients* 10(6):E708 . doi: 10.3390/nu10060708.

Goldman SM, Tanner C. (1998). Etiology of Parkinson's's disease. In: Jankovic J, Tolosa E (Eds). *Parkinson's disease and movement disorders* (pp. 133-58). Baltimore, MD: Lippincott-Williams and Wilkins.

Goedert, M., (2015). Neurodegeneration Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein. *Science* 349, 1255555. doi: 10.1126/science.1255555.

Gutsmann T, Müller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U (2001) Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. Infect Immun 69(11):6942–6950. doi: 10.1128/IAI.69.11.6942-6950.2001.

Harrison IF, Dexter DT (2013). Epigenetic targeting of histone dea- cetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? *Pharmacol Ther.* 2013;140:34–52. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.05.010.

Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, Shibata A. (2015). Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS One 10*(11) e0142164. doi: 10.1371/journal.pone.0142164.

Heintz-Buschart, A., Pandey, U., Wicke, T., Sixel-D€oring, F., Janzen, A., Sittig-Wiegand, E., Trenkwalder, C., Oertel, (2018). The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. Mov. Disord. 33, 88–98. doi: 10.1002/mds.27105.

Hernando S, Requejo C, Herran E, Ruiz-Ortega JA, Morera-Herreras T, Lafuente JV, Ugedo L (2019). Beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids administration in a partial lesion model of Parkinson's disease: the role of glia and NRf2 regulation. *Neurobiol Dis* 121:252–262. doi: 10.1016/j.nbd.2018.10.001.

Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, Wissemann WT, Lewis MR, Wallen ZD et al (2017). Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord* 32(5):739–749. doi: 10.1002/mds.26942.

Jacob Horsager, Katrine B Andersen, Karoline Knudsen, Casper Skjærbæk, Tatyana D Fedorova, Niels Okkels, (2020). Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study, *Brain*, Volume 143, Issue 10, October, Pages 3077–3088. doi: 10.1093/brain/awaa238. Keshavarzian, A., Green, S.J., Engen, P.A., Voigt, R.M., Naqib, A., Forsyth, C.B., Mutlu, E. (2015). Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. Mov. Disord. 30, 1351–1360. doi: 10.1002/mds.26307.

Komatsuzaki Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Mukai H, Tanabe N, Mitsuhashi K, et al. (2005). Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:1002–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.173

Klingelhoefer L, Reichmann H (2015). Pathogenesis of Parkinson disease—the gut-brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol 11*(11):625–636. doi: 10.1038/nrneurol.2015.197.

Lewis, K. et al. (2010). Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm. Bowel. Dis.* 16, 1138–1148. doi: 10.1002/ibd.21177.

Lin CH, et al. (2019). Altered gut microbiota and inflammatory cytokine responses in patients with Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*.;16:129. doi.org/10.1186/s12974-019-1528-y

Liu HN, Wu H, Chen YZ, Chen YJ, Shen XZ, Liu TT (2017). Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: a systematic review and meta-analysis. Dig Liver Dis 49(4):331–337. doi: 10.1016/j.dld.2017.01.142.

Martinez-Martin, P., (2011). The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci*. 310 (1), 12–16. doi: 10.1016/j.jns.2011.05.006.7;2017:41–5.

Macfarlane, S. & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 67–72. doi: 10.1079/PNS2002207.

Menozzi E, Macnaughtan J, Schapira AHV (2021). The gut-brain axis and Parkinson disease: clinical and pathogenetic relevance. Ann Med 53:611–625. doi: 10.1080/07853890.2021.1890330.

Nishiwaki H, Ito M, Ishida T, Hamaguchi T, Maeda T, Kashihara K, Tsuboi Y, et al. (2020). Meta-Analysis of Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease. Mov Disord. Sep;35(9):1626-1635. doi: 10.1002/mds.28119.

Olanow, C.W., Prusiner, S.B., (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 106, 12571–12572. doi.org/10.1073/pnas.0906759106

Pereira PAB, Aho VTE, Paulin L, Pekkonen E, Auvinen P, Scheperjans F. (2017). Oral and nasal microbiota in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.*;38:61–7. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.02.026.

Prechtl, J., & Powley, T. (1990). B-Afferents: A fundamental division of the nervous system mediating homeostasis? *Behavioral and Brain Sciences, 13*(2), 289-300. doi:10.1017/S0140525X00078729

Petrov VA, et al. (2017) Analysis of gut microbiota in patients with Parkinson's disease. *Bull Exp Biol Med.* 2017;162:734–7. doi: 10.1007/s10517-017-3700-7.

Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke JD, Gabel G, Martens H, Shen Z, Günzel D, Aschenbach JR (2012). Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. Ann N Y Acad Sci 1258:52–59. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06553.x.

Pokusaeva K, Johnson C, Luk B, Uribe G, Fu Y, Oezguen N, et al. (2017). GABA- producing Bifidobacterium dentium modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterol Motil* 29:1–14. doi: 10.1111/nmo.12904

Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E et al. (2012). Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:709–715. doi: 10.1002/mds.23838

Shen, X., Yang, H., Wu, Y., Zhang, D., and Jiang, H. (2017). Meta-Analysis: Association of Helicobacter Pylori Infection With Parkinson's Diseases. *Helicobacter 22,* e12398. doi: 10.1111/hel.12398

Scheperjans F, et al. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord.*;30:350–8. doi: 10.1002/mds.26069.

Svensson E, Horvath-Puho E, Thomsen RW, et al. (2015). Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* ;78: 522–529. doi: 10.1002/ana.24448

Vascellari S, Palmas V, Melis M, Pisanu S, Cusano R, Uva P, Perra D. (2020). Gut microbiota and metabolome alterations associated with Parkinson's disease.mSystems. 2020 Sep 15;5(5):e00561-20. doi: 10.1128/mSystems

Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, Borghammer P. (2016). Pathological alpha-synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Ann Neurol* 2016; 79: 940–9. doi: 10.1002/ana.24648

Schrag A, Schott JM. (2006) Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset Parkinsonism, *Lancet Neurol*; 5:355-63. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70411-2

Parthasarathy G, Chen J, Chen X, et al. (2016). Relationship between microbiota of the colonic mucosa vs feces and symptoms, colonic transit, and methane production in female patients with chronic con- stipation. *Gastroenterology*; 150:367-379.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.005

Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y (2016). Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol* 73 (11):1316–1324. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2742.

Tan AH, Mahadeva S, Thalha AM, Gibson PR, Kiew CK, Yeat CM et al.(2014). Small intestinal bacterial overgrowth in Parkin- son's disease. Parkinsonism Relat Disord 20(5):535–540. doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.02.019.

Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Burmann J et al. (2016). Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age- matched controls. *Parkinsonism Relat Disord* 32:66–72. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.08.019.

Unger MM, Moller JC, Mankel K, et al. (2011). Postprandial ghrelin response is reduced in patients with parkinson's disease and idiopathic REM sleep behaviour disorder: a peripheral biomarker for early Parkinson's disease? *J Neurol;* 258:982–990. doi: 10.1007/s00415-010-5864-1.

van IJzendoorn SCD, Derkinderen P. (2019). The Intestinal Barrier in Parkinson's Disease: Current State of Knowledge. *J Parkinsons Dis.;* 9(s2):S323-S329. doi: 10.3233/JPD-191707.

8. BÖLÜM / CHAPTER 8

MİKROBİYOTA, AŞILAR VE PATOJENLERE KARŞI KORUYUCU BAĞIŞIKLIĞI ETKİLER Mİ?

DOES IT AFFECT PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST MICROBIOTA, VACCINES AND PATHOGENS?

Oral ÖNCÜL[1], Zerrin AKTAŞ[2]

[1]Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: oraloncul@istanbul.edu.tr

[2]Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: zaktas@istanbul.edu.tr

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.008

ÖZ

Küresel aşılama programları yılda tahmini 2-3 milyon ölümü önlemekle birlikte, hastalık morbiditesini önemli ölçüde azaltmaktadır. Aşılar kas içine, deri altına, ağızdan veya deri içine uygulanır. Giderek artan sayıda çalışma, diğer etkileşimli değişkenlerle birlikte bağırsak mikrobiyotasının enfeksiyon ve aşılamaya karşı hem humoral hem de hücresel tepkileri modüle edebildiğine dair kanıtları desteklemektedir. Bazı aşıların zayıf immünojenite ve sınırlı mukozal ve hücre aracılı immünite etkilerini indükleme kapasitesi sergiledikleri rapor edilmiştir. Zayıf immünojenite sergileyen aşıları gruplandırmak zordur, çünkü aşılara karşı immün yanıtlar birçok faktörden etkilenmektedir. Örneğin, aşılara verilen erken yaşam bağışıklık yanıt tepkileri ve tepkinin büyüklüğünün yaşa bağlı sınırlamaları ile karakterize edildiği rapor edilmiştir. Aşılamaya karşı bağışıklık yanıtları, insan popülasyonundaki bireyler arasında farklılık gösterebilir. Bu aşı tepkisi değişimiyle ilişkili faktörlerden birisi mikrobiyota bileşimidir. İnsan bağırsağı mikrobiyotası, diyet bileşenlerini metabolize ederek ve bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere, konakçı hücrelerle etkileşime giren, çoklu metabolitleri sentezleyerek konakçı fizyolojisini etkileyebilen trilyonlarca ortakçı mikroorganizmadan oluşur. Bağırsak mikrobiyal topluluğu, yaşamın erken dönemlerinde en kapsamlı bağışıklık sistemi koleksiyonuyla birlikte gelişir ve vücuttaki hücreler, bağırsakla ilişkili lenfoid doku, birbirlerinin gelişimini etkilerler. Ayrıca mikrobiyomun bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri, bağırsakta lokal yanıt olarak kalmasının ötesine geçer. Bakteri fragmentleri ve metabolitler bağırsak bariyerini geçerek dolaşıma girebilir ve bağışıklık hücrelerini etkileyebilecekleri akciğerler de dahil olmak üzere uzak organlara ulaşabilir.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, Mikrobiyal adjuvanlar, aşı etkinliği, mikrobiyota etkisi

ABSTRACT

Global immunization programmes prevent an estimated 2–3 million deaths per year and markedly reduce disease morbidity. Vaccines are administered intramuscularly, subcutaneously, orally or intradermally. An increasing number of studies is supporting the evidence that gut microbiota, along with other interplaying variables, is able to modulate both humoral and cellular responses to infection and vaccination. Some vaccines have been reported to exhibit poor immunogenicity and a limited capacity to induce mucosal and cell mediated immunity effects. It is difficult to group vaccines that exhibit poor immunogenicity because immune responses to vaccines can be affected by numerous factors. For example early life immune responses to vaccines have been reported to be characterized by age dependent limitations of the magnitude of the responseImmune responses to vaccination can vary among individuals in the human population. One factor associated with this vaccine response variation is the microbiota composition. The human gut microbiota is composed of trillions of commensal microorganisms that can impact host physiology by metabolizing dietary components and synthesizing multiple metabolites that interact with host cells, including immune cells.The gut microbial community develops during early life together with the most extensive collection of immune cells in the body, the gut-associated lymphoid tissue, where they can influence the development of each other However, the effects of the microbiome on the immune system go beyond acting locally in the intestine. Bacterial fragments and metabolites can translocate across the intestinal barrier, entering the circulation and reaching distant organs, including the lungs, where they can influence immune cells.

Keywords: Microbiota, Microbial adjuvants, vaccine effectiveness, microbiota effect

Extended Abstract

Many factors influence vaccine effectiveness, including nutrition, age, sex, and genetics. The majority of infections occur at peripheral tissues such as the gut, skin, or lung. These sites contain a complex microbiota, as well as an intricate network of immune cells that are positioned to rapidly respond to invading pathogens. The microbiota represents a powerful adjuvant of the immune system that is able to promote adaptive responses against a wide range of bacterial, viral, fungal, and parasitic infections. Microbiota control of the immune system occurs via numerous mechanisms, including the generation of metabolites that activate lymphocytes or antigen-presenting cells, the activation of the inflammasome in innate cell populations, and by directly acting on epithelial cells. A possible link between the microbiota and vaccine efficacy was first shown in a model of oral vaccination using heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli as adjuvant (Hall et al., 2008) (Norton, Lawson, Freytag, & Clements, 2011).

Microbiome could be a possible explanation for the differences in response to vaccination, and understanding the exact mechanism has the potential to benefit global health greatly. The efficacy of many vaccines varies significantly by geographical region, and microbiome composition also changes similarly. While the overall effect of microbiota in determining immune alterations and, thus, altering vaccination response is clear, some studies have

focused on specific alterations and specific vaccines. Most studies focus on the impact of microbiota composition on orally administered vaccines, particularly oral rotavirus vaccine, yet vaccinations administered through the intramuscular route have also been influenced by microbiota composition. It has been well documented that nutrition can impact upon the function of the mammalian adaptive immune system, and thus the responses to vaccines. Many micronutrients are important for immune function and vaccine effectiveness, including vitamin A and zinc. It is well known that oral vaccines are not as effective in regions of the world where malnutrition is prevalent. The role of the commensal microbiota could be particularly important when considering vaccine-induced immune responses in low- to middle-income countries. For instance, oral vaccines for Rotavirus, Poliomyelitis, Vibrio cholerae, and Shigella administered to children in low- to middle-income countries often fail to protect with the same degree of efficacy as in high-income countries (Grassly et al., 2009; Hallander et al., 2002); (Jiang, Jiang, Tate, Parashar, & Patel, 2010); (Levine, 2010); (Valdez, Brown, & Finlay, 2014). The intramuscular route have also been influenced by microbiota composition. Influenza vaccination, for instance, seems to be more effective in those with Prevotella colonisation. Interestingly, antibiotic use and dysbiosis were linked to lower response to influenza vaccination, which could mean that diets improving microbiota composition may help sustain vaccination response.

Also, different studies have been designed to evaluate the role of probiotics in modulating the response to vaccines, particularly those used for mucosal immunisation. Some direct effects are related to changes in the gut microbiota and an alteration of the PAMPs presented to the gastrointestinal immune system. Indirect effects are probably mediated by microbial products, such as short chain fatty acids (SCFAs. Probiotics can affect intestinal epithelial cells (IECs) in multiple ways, by enhancing barrier function via tight junctions, increasing mucin production, inducing antimicrobial and heat shock protein production, interfering with pathogenic organisms and modulating signalling pathways, and cell survival (Di Renzo et al., 2022).

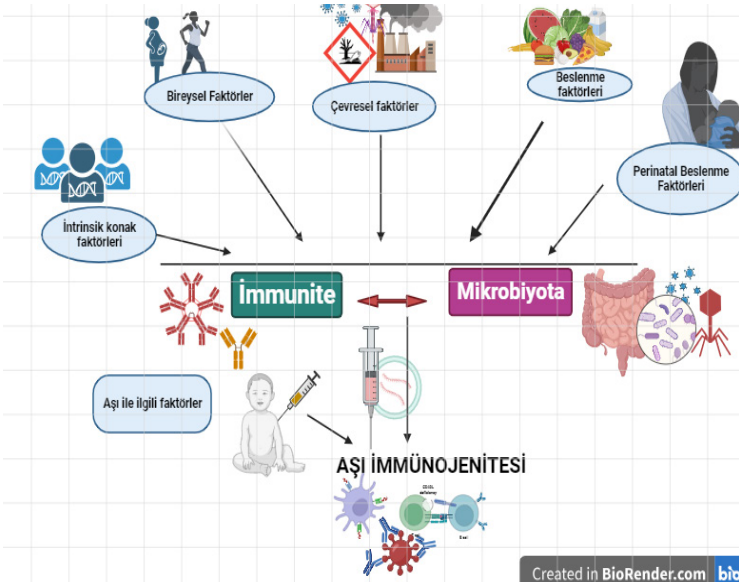
Further studies are needed to understand the microbiome-immune interaction and how this influences vaccine response. Although the gut microbiota is known to modulate both B cell and T cell responses to vaccination, additional work is necessary to move from correlation to causation by defining clinically relevant microbiota-dependent immunomodulatory mechanisms. Further understanding the impact of the intestinal microbiota on vaccine effectiveness in situations of malnutrition would be first step towards improving the efficacy of vaccines worldwide. Areas for improvement include; 1) designing appropriate interventional

studies focused on early life across a broad geographical and socioeconomic spectrum; (2) using systems vaccinology approaches to help navigating through the complexity of microbiota-immune response interactions; and (3) identifying immunomodulatory taxa of clinical relevance to prove a causal relationship and to elucidate the mechanisms of action on the immune response by using gnotobiotic models. Potentially, these advances could pave the way for the discovery of important signatures and pathways leading to microbial immune-enhancing interventions of general and vaccine-related importance.

1. Mikrobiyota, çevresel faktörler ve aşı immünojenitesine etkileri

İnsan gastrointestinal mikrobiyotası, gastrointestinal homeostazı koruyarak, bağışıklık sistemi gelişimini düzenleyerek, besin maddelerini metabolize ederek ve patojen kolonizasyonunu önleyerek tüm yaşam boyunca insan sağlığını etkileyen karmaşık bakteri, virüs, arke ve mantar topluluklarından oluşur. Bağırsak mikrobiyotası ayrıca doğal bir adjuvan görevi görür, konakçının bağışıklık tepkilerini düzenleyebilir ve çapraz reaksiyonu tetiklemek ve aşı etkinliğini etkilemenin diğer yollarını sağlamak için aşı antijenlerine benzer epitoplar taşıyabilir.

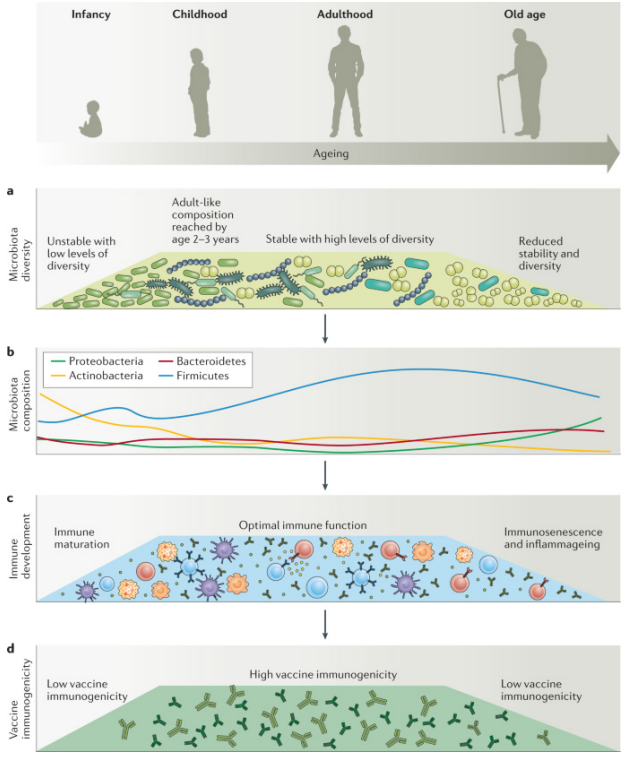
Aşının neden olduğu adaptif bağışıklık yanıtları, B hücresi/antikor aracılı ve T hücresi/hücresel aracılı bağışıklık yanıtları olarak sınıflandırılır (Clem, 2011). Kanda dolaşan veya mukozaya salgılanan antikorlar, patojenlere veya toksinlere bağlanarak onları nötralize eder. Bu nedenle, belirli eşiklerin üzerindeki nötralize edici antikor titreleri, aşının koruyucu etkinliğinin güvenilir belirleyicileri olarak kabul edilir. T hücreleri, hafıza B hücresi oluşumunu ve yüksek afiniteli antikorların üretimini destekleyen sitokinler ve ortak uyarıcı sinyaller sağlar. Sitotoksik T hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri doğrudan öldüren çeşitli sitotoksik moleküller salgılar.



Şekil.1: Mikrobiyota, çevresel faktörler ve aşı immünojenitesine etkileri.

Mikrobiyota, aşı yanıtlarının büyüklüğü ile ilişkili birbirine bağlı belirleyicilerden yalnızca biridir. Genetik ve çevresel değişkenler (örneğin, diyet, stres, enfeksiyonların varlığı, yaş, vd.) dahil olmak üzere diğer faktörler, bireylerin fizyolojik durumunu ve antijen uyarımı-

na tepkilerini şekillendirir (Şekil 1) (Pulendran, 2014). İnsan gastrointestinal mikrobiyotası, gastrointestinal homeostazı koruyarak, bağışıklık sistemi gelişimini düzenleyerek, besin maddelerini metabolize ederek ve patojen kolonizasyonunu önleyerek tüm yaşam boyunca insan sağlığını etkileyen birçok fonksiyona katkıda bulunur. Bağırsak mikrobiyotası ayrıca doğal bir adjuvan görevi görebilir, konakçının bağışıklık tepkilerini düzenleyebilir ve çapraz reaksiyonu tetiklemek ve aşı etkinliğini etkilemenin diğer yollarını sağlamak için, aşı antijenlerine benzer epitoplar taşıyabilir (Jordan, Carding, & Hall, 2022; Lynn, Benson, Lynn, & Pulendran, 2022). Mikrobiyotanın çeşitliliği ve stabilitesi bebeklik döneminde oldukça değişkendir ve yaşlandıkça azalır; bu da immünojenitesinin azalmasıyla ilişkilidir (Şekil 2).



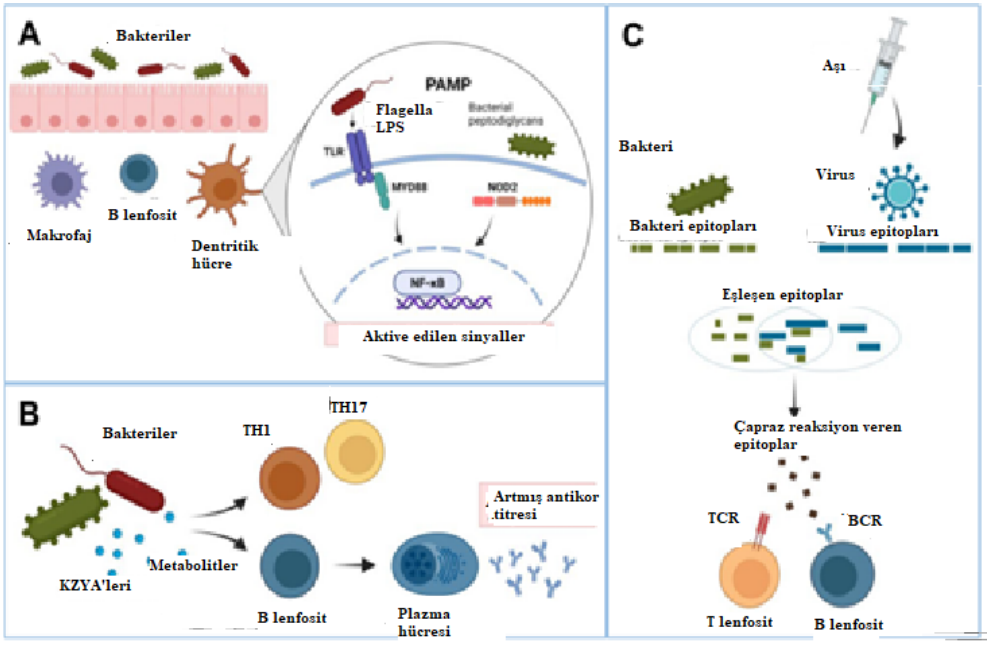
Şekil.2: Mikrobiyotanın çeşitliliği ve stabilitesi bebeklik döneminde oldukça değişkendir ve yaşlandıkça azalır; bu da immünojenitesinin azalmasıyla ilişkilidir (Lynn, Benson, Lynn, & Pulendran, 2022).

Yaşamın erken dönemindeki gastrointestinal mikrobiyota, bebeğin mukozal ve sistemik bağışıklık sistemlerinin gelişimi ve olgunlaşması için kritik öneme sahiptir. Yaşamın erken döneminde bağırsak mikrobiyotasının bileşimi stabil değildir ve düşük düzeyde çeşitliliğe sahiptir, az sayıda bakteri ailesi baskın olma eğilimindedir. Zamanla bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliği, 2 ila 3 yaşları arasında yetişkinlere benzer bir komposizyona ulaşılıncaya kadar

artar. Yetişkin bağırsak mikrobiyotası bebeklik dönemine göre daha karmaşıktır (daha yüksek düzeyde çeşitlilik), ancak aynı zamanda bireyler arasında daha homojendir ve dış kaynaklı nedenlerin (antibiyotikler gibi) yokluğunda genellikle oldukça stabildir (Şekil 2a). İnsanlar yaşlandıkça bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliği ve stabilitesi azalır. Ayrıca inflamasyonla ilişkili Proteobakterilerin göreceli bolluğunda artış ve Actinobakterilerde azalma vardır (Şekil 2b). Bağırsak mikrobiyotasının bileşimi, bağışıklık fonksiyonunu ve aşılama sırasındaki bağışıklık sisteminin temel durumunu güçlü bir şekilde etkileyebilir. Çeşitli çalışmalarda temel bağışıklık durumunun aşılamaya verilen yanıtların belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (Şekil 2c) (Macpherson, 2018). Bağırsak mikrobiyotasının bileşimi, bağışıklık fonksiyonunu ve aşılama sırasındaki bağışıklık sisteminin temel durumunu güçlü bir şekilde etkileyebilir (Şekil 2 d). (Lynn et al., 2022).

1- Mikrobiyotanın Aşı Etkinliğini Etkilediği Olası Mekanizmalar

Mikrobiyotanın, immünomodülatör moleküllerin üretimi, immünomodülatör sitokinlerin üretiminin düzenlenmesi, immünomodülatör metabolitlerin üretimi ve aşı tarafından kodlanan epitoplarla çapraz reaksiyona girecek epitopların kodlanması dahil olmak üzere, aşı immünojenitesini modüle edebileceği çeşitli potansiyel mekanizmalar vardır (Lynn et al., 2022). Günümüzde, mikrobiyotanın aşıların etkinliğini etkilediği mekanizmalar tam olarak açıklanmamış olsa da, mikrobiyotanın doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık tepkilerinin derecesini modüle eden doğal adjuvanların kaynağı olabileceği ileri sürülmektedir (Ciabattini, Olivieri, Lazzeri, & Medaglini, 2019). Aşı yanıtında, aşının türü (canlı zayıflatılmış, inaktive edilmiş, protein, viral vektör veya mRNA), bağışıklama yolu, dozajı, aşılama programı ve aşılama stratejisi (homolog bağışıklama veya heterolog prime-boost), aşının belirlenmesinde kritik öneme sahip faktörlerdir (Zimmermann & Curtis, 2019). Parenteral ve mukozal (oral) aşılar farklı tipte adjuvanlar gerektirir ve uygun bir adjuvanın seçilmesi, aşının uzun vadeli koruyucu etkinliğini büyük ölçüde etkileyebileceğinden dolayı kritik öneme sahiptir. Bağırsak mikrobiyomunun aşıların etkinliğini etkilediği tahmin edilen mekanizmalar çeşitli hayvan deneyleri veya klinik çalışmalardan elde edilen verilerle açıklanmaktadır (Hong, 2023).



Şekil 3: Aşı etkinliğini etkileyebilecek veya düzenleyebilecek olası mikrobiyota kaynaklı yolaklar.

Mikrobiyota tarafından üretilen lipopolisakkardler (LPS) veya peptidoglikan tabakanın bileşenleri gibi patojenle ilişkili moleküler moleküller (PAMP'ler), bağışıklık hücreleri tarafından ifade edilen Toll Like Reseptörler (TLR'ler) ve NOD2 gibi Pattern Tanıma Reseptörleri (PRR) tarafından tanınabilir (Şekil 3A). Sinyalleme basamakları, transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve gen ekspresyonunu indükler; bu da aşıların adjuvan etkilerini kolaylaştırabilir. Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) gibi mikrobiyotadan türetilen metabolitler, Th1 veya Th17 hücrelerinin farklılaşmasını teşvik edebilir ve antikor üretimini artırabilir (Şekil 3 B). Mikrobiyotadan gelen epitoplar, hedef aşı antijenlerinden türetilen epitoplarla çapraz reaksiyona girebilir (Şekil 3C) (Hong, 2023).

1.1. Adjuvanlar

Aşıların etkileri, antijene özgü bağışıklık tepkilerinin indüklenmesiyle sağlanır, ancak aşı antijenlerinin kendisi genellikle zayıf immünojeniktir, dolayısıyla yeterli bir bağışıklık tepkisi elde etmek için adjuvanlara ihtiyaç vardır. Adjuvanlar immünojeniteyi ve aşı etkinliğini arttırabilir (Lynn et al., 2022). Adjuvanlar antijene özgü bağışıklık tepkilerini hızlandırma, uzatma veya geliştirme işlevi gören farmakolojik veya immünolojik maddelerdir (Şekil 4).

Adjuvanlar iki sınıfa ayrılabilir. Birinci sınıf; "immunostimülanlar" adı verilen konakçı bağışıklık sistemini doğrudan uyaran bileşikler/moleküllerdir. Alimünyum ve kalsiyum tuzları gibi mineral tuzları, MF 59 gibi lipit partikülleri, mikro partiküller (virüs benzeri partiküller, virozomlar) bunlara örnek verilebilir. İkinci sınıf adjuvanlar; bakteri veya virüs gibi attenüe edilmiş aşı formülasyonlarında dolaylı olarak etkili olan bileşikler; saflaştırılmış antijenler (rekombinant proteinler); alt üniteler (toksoid, fraksiyona edilmiş virüsler, patojen fragmentleri) örnek verilebilir (Apostolico, Lunardelli, Coirada, Boscardin, & Rosa, 2016). İmmünomodülatörler veya immün güçlendiriciler; MPLA, LPS'ler, Flagellin, CpG, Poly IC ve QS21 gibi moleküllerden oluşur. Ayrıca, bakteriyel toksinler (kolera toksini, *E. coli* ısıya duyarlı toksin), adjuvan sistemleri (AS01, AS03, AS04), Tip I IFN, antimikrobiyal peptidler, kemokinler ve nanopartiküller mukozal adjuvanlar olarak kullanılmaktadır (Apostolico et al., 2016).



Şekil 4: Adjuvan çeşitleri.

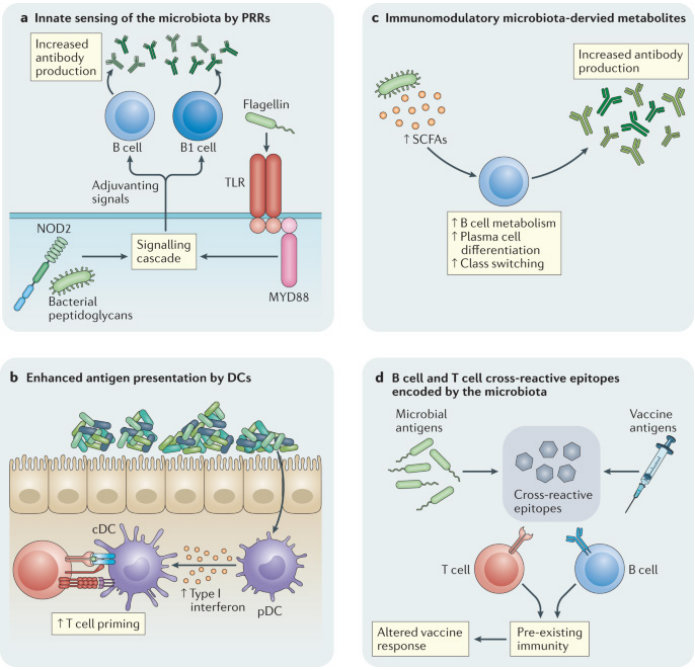
1.2. Mikroorganizma temelli adjuvanlar

Bakteri veya mantarlardan türetilmiş partiküller, immunijetesi azaltılan antijenlerle verildiğinde mukozal membranlardan alımını kolaylaştırmakta, bağışıklık tepkisi üzerinde ilave bir etki oluşturmaktadır. Gram negatif bakterilerdeki lipopolisakkaridler (LPS), bunun türevi olan monofosforil lipid A (MPL), toksinler, bakteri spesifik DNA fragmentleri, kommensal mikroorganizmalar (probiyotikler), özellikle patojen aracılı bağışıklık sistemini uyararak aşının etkinliğini arttırmaktadır. Yine mikroorganizma tabanlı adjuvanlar arasında Gram negatif bakterilerden türetilen bakteriyel hayaletler (bacterial ghosts-BG), birçok doğal immünostimülatör agonisti içerirler, doğal ve adaptif immünitede yer alan çok çeşitli hücre tiplerinin güçlü aktivatörleridir (Hajam, Dar, Won, & Lee, 2017). Adjuvan olarak etkinliklerinin yanı sıra, çeşitli immün ve immün olmayan hücre tipleriyle proinflamatuar sitokin üretimini indükleme

yetenekleri vardır. Bu proinflamatuar sitokinler, T ve B lenfositlerinin lenf düğümlerinde, konjuge antijenleri ile karşılaşma şansını en üst düzeye çıkararak, potansiyel bağışıklık tepkilerinin oluşmasını tetiklerler (Christensen, 2016). Aşı antijeni olarak kullanılabilen bakteri hücre duvarı yapıları, bakteri DNA'sı ve viral RNA, farklı Toll Like Reseptörleri (TLR'leri) ve TLR ifadesini aktive edebileceğinden, TLR ligandları (TLRL'ler), yıllardır aşılarda kullanılmaktadır. Farklı TLRler (TLR2, 3, 4, 5, 7/8, 9, 11 gibi) farklı antijenik (bakteriyel DNA, lipopeptid, lipoprotein, flagellin, bakteriyel toksinler gibi) uyarım ile farklı immun uyarımlara (Th1, NK aktivasyonu, antikor oluşumu) neden olabilmektedir (Duthie, Windish, Fox, & Reed, 2011). TLR'lerin aktivasyonu, T hücresi farklılaşmasında yer alan belirli sitokinlerin ekspresyonunu indükleyerek, antijene spesifik immünitenin indüklenmesine katkıda bulunurlar.

Muramil dipeptid (MDP) bakteri hücre duvarında yüksek oranda korunmuş bir fragmandır. MDP, karbonhidrat modifikasyonları nedeniyle, çeşitli formlarda oluşabilir ve immün yanıt oluşturulmasında bilinen en küçük peptidoglikan fragmanı olarak tanınır. Tek başına, artan NF-κB aktivasyonuna ve ardından proinflamatuar sitokinlerin üretimine yol açar. Lipozomlarla veya gliserol ile birlikte kullanıldığında ise hücresel bağışıklığı uyarır (Aguilar & Rodríguez, 2007; Guerrero Manriquez & Tuero, 2021).

Mikrobiyota bulunan ve bazı bakteriler tarafından üretilen flagellin ve peptidoglikan gibi immünomodülatör moleküllerin, Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve NOD2 gibi model tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından algılanan doğal adjuvanlar olarak, aşı yanıtlarını modüle ettiği hayvan modellerinde gösterilmiştir. Lipopolisakkarit gibi diğer immünomodülatör moleküller de benzer şekilde antikor yanıtlarını modüle edebilir. T hücreleri ve B hücreleri tarafından ifade edilen PRR'ler de bu molekülleri doğrudan algılayabilir (Şekil 5a). Dendritik hücreler (DC'ler), aşı antijenlerini T hücrelerine sunarak ve immünomodülatör sitokinleri salgılayarak aşılamaya karşı immün tepkilerde çok önemli bir role sahiptir. Mikrobiyota, plazmasitoid DC'ler (pDC'ler) tarafından tip I interferonların üretimini düzenler; bu da konvensiyonel DC'lerde (cDC'ler) T hücresi hazırlığını artıran spesifik bir metabolik ve epigenomik duruma talimat verir (Şekil 5b).



Şekil 5: Mikrobiyota bulunan ve bazı bakteriler tarafından üretilen flagellin ve peptidoglikan gibi immünomodülatör moleküller, Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve NOD2 gibi model tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından algılanan doğal adjuvanlar olarak aşı yanıtlarını düzenler.

Bu moleküller antikor tepkilerini arttırmak için, bir aşıyla etkili bir şekilde birleştirilebilir. Çeşitli çalışmalarda, bağırsağa özgü mikrobiyota ve türevlerinin, bağışıklık sistemi gelişimini ve bağışıklık yanıtlarını düzenleyebileceğini ve mikrobiyotayı hedeflemenin, konakçı bağışıklık yanıtlarını iyileştirme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır. Artan veriler, mikrobiyotanın, patojen tarafından kodlanan veya aşı tarafından kodlanan epitoplarla çapraz reaksiyon veren epitopları kodlayabildiğini göstermektedir. Çapraz reaksiyon veren B veya T hücrelerinin varlığı, aşılamaya verilen yanıtları potansiyel olarak değiştirebilir (Şekil 5 c-d).

Bağırsak mikrobiyotasının, aşı etkinliğini etkileyebilecek doğal adjuvanların sürekli bir kaynağı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, germ free veya antibiyotikle tedavi edilen farelerin, üç değerlikli inaktive grip aşısı ile aşılanmasından sonra, periferik kanda bu aşıya karşı özgü antikor titreleri ve plazma hücrelerinde azalma gözlenmiştir. Ancak bağırsak

mikrobiyotasının flagella içeren *E. coli*'nin ağız yoluyla yeniden oluşturulmasıyla, aşının etkinliğini geri kazandıracağı iddia edilmiştir. Bu olayda temel mekanizma, bakteriyel

flagellanın Toll benzeri reseptör (TLR) 5'e bağlanmasının, makrofajların interlökin (IL)-6, proliferasyonu indükleyen ligand ve TNF-a salgılamasını tetiklemesi ve bunun sonucunda plazma hücre farklılaşmasının artması olarak açıklanmıştır.

Bir başka çalışmada, TLR5 aracılı mikrobiyota algılamasının, aynı zamanda inaktive edilmiş çocuk felci aşısına verilen antikor tepkilerini etkilediği, ancak adjuvan kullanılan aşı ve canlı zayıflatılmış sarı humma aşısını etkilemediği gösterilmiştir (Oh et al., 2014). Chac ve arkadaşları, oral kolera aşısından sonra, bağırsakta yüksek *Clostridium* bolluğu ve düşük *Enterobacteriaceae* bolluğu olan bireylerin, *Vibrio cholera*'nın O antijenine spesifik polisakkaridi hedef alan IgG ve IgA salgılayan hafıza B hücresi yanıtlarını arttırma olasılığının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek hafızalı B hücresi yanıtı olan bireylerde, barsak kaynaklı makrofajlar tarafından IL-1β ve IL-6 salgılanma seviyelerinin, daha az yanıt veren bireylerdekilerden önemli ölçüde farklı olduğunu bildirmişlerdir (Chac et al., 2021). Stražar ve arkadaşları, bağırsakta kommensal bakteri olan *Rothia*'nın, fenilalanin metabolizmasını etkileyerek, BCG'nin neden olduğu non-spesifik immün sitokinler IL-6, IL-1β ve TNF-a'nın üretimini engelleyebileceğini, *Eggertia*'nın ise BCG'nin indüklediği spesifik T hücresi aracılı bellek yanıtıyla pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Stražar et al., 2021).

İnce bağırsağın alt kısmındaki epitel hücrelerine bağlanan parçalanmış filamentli bakteriler, yalnızca IgA tepkisini uyarmakla kalmayıp, aynı zamanda lamina propriadaki dendritik hücreleri ve makrofajları IL-1β, IL-6, IL-23 ve RORgt alt grup hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip olan bağırsak mukozasına özgü Th17 hücre popülasyonunun oluşumunu indüklerler (Macpherson, 2018).

COVID-19 pandemisinde, antimikrobiyal ve immünomodülatör aktivitelere sahip probiyotikler gibi besin takviyeleri, D vitamini, laktoferrin ve çinko takviyesinin yapılması hem SARS-CoV-2 enfeksiyonunun önlenmesinde hem de enfekte hastalarda klinik seyrin hafifletilmesinde, bağışıklık aracılı organ hasarının önlenmesinde umut verici terapötik adjuvanlar olarak bildirilmiştir (Costagliola, Spada, Comberiati, & Peroni, 2021). Orta Avrupa'da, COVİD-19 hastalarındaki düşük ölüm oranının, birçok *Lactobacillus* türünü içeren fermente ürünlerin tüketimiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Bousquet et al., 2021). Bu nedenle *Lactobacillus* cinsi bakteriler, SARS-CoV-2 tedavisinde adjuvan olma potansiyeline sahip olabilir.

Tüm bu çalışmalarda, bağırsak mikrobiyotasının aşılara karşı bağışıklık tepkisini etkilediğini ve iyi bir doğal bağışıklık adjuvanları kaynağı olduğu öne sürülmektedir.

2. Mikrobiyotadan Türetilmiş Metabolitler

Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA'leri) çeşitli bağışıklık hücrelerinde immünomodülatör fonksiyonlara sahip en iyi bilinen metabolitlerden biridir (Corrêa-Oliveira, Fachi, Vieira, Sato, & Vinolo, 2016). KZYA'leri asetil-CoA'yı, oksidatif fosforilasyonu, glikolizi ve yağ asidi sentezini arttırarak, antikor üretiminin yapı taşını arttırır (Kim, Qie, Park, & Kim, 2016). Eş zamanlı olarak KZYA'leri, plazma hücre farklılaşması ve antikor sınıfı değişimi için moleküllerin gen ekspresyon profillerini düzenler (Şekil 3c). Bir çalışmada, azalan diyet lifi veya mikrobiyal eksiklik nedeniyle düşük KZYA üretimi olan farelerde, patojen spesifik antikor yanıtlarının ve *Citrobacter rodentium* enfeksiyonuna karşı artan duyarlılığın saptandığı bildirildi (Kim et al., 2016). Bununla birlikte başka bir çalışmada, KZYA'lerinin, intragastrik olarak uygulanan ovalbümin ve otoantikor yanıtlarına karşı antikor yanıtlarını azalttığı bildirildi ((Sanchez et al., 2020).

KZYA'leri ayrıca bağırsak, dalak ve lenf düğümlerindeki Th1 ve Th17 hücrelerinin farklılaşmasını da destekler (Park et al., 2015). Ayrıca KZYA'leri, ILC3 ve CD4+ T hücreleri tarafından IL-22 üretimini (Yang et al., 2020; Zhao et al., 2020), CD8+ T hücrelerinin IFN-y üretimini ve sitotoksisitesini arttırır (Luu ve diğerleri, 2021). Dolayısıyla KZYA'leri, T hücrelerinin aktivitesini veya farklılaşmasını etkileyerek, aşı etkinliğini düzenleyebilir. Ayrıca, bağırsakta kommensal bakteriler tarafından üretilen KZYA'leri kan dolaşımından geçerek, kemik iliğinde bağışıklık hücresi gelişimini tetikleyebilir ve akciğer bağışıklık tepkilerini etkileyebilir (Silva et al., 2022).

Bifidobacterium, Bacteroides thetaiotaomicron, *Lactobacillus casei* ve *Enterobacter cloacae* tarafından üretilen riboflavin türevleri, MHC kompleksi ile ilişkili protein-1 yoluyla mukoza ile ilişkili T hücrelerini aktive eder (Wang et al., 2022). Mikroorganizmaya spesifik T hücreleri, bağırsakla ilişkili lenfoid dokudaki foliküler B hücrelerine özel sinyaller sağlayabilir, böylece çeşitliliği ve seçici izotip değişimini artırabilir (Littman, 2018).

3. Mikrobiyotadan Türetilmiş Antijenlerin Çapraz Reaksiyonu

Mikrobiyota kendi antijenleri, tümör antijenleri ve patojene özgü antijenlerle çapraz reaksiyona girerek bağışıklık tepkilerini modüle eder. *Roseburia* cinsinde bulunan bakteriler β2-glikoprotein I ile çapraz reaksiyona giren proteinlere sahiptir. *Bifidobacterium breve*, B16 melanom hücrelerine yapay olarak eklenen bir tümör antijeni ile çapraz reaksiyona giren peptitleri eksprese eder (Zitvogel & Kroemer, 2021). Kendi kendine veya tümör antijenlerine ek olarak, patojenden türetilen antijenler, mikrobiyotadan türetilen antijenlerle çapraz reaksiyon oluşturabilir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, SARS-CoV-2'nin S2 bölgesine özgü antikorların, bağırsak bakterileriyle çapraz reaksiyona girebileceği gösterildi (Jia et al., 2022). Dolayısıyla bu çapraz reaksiyon veren antijenik yapılar, T veya B hücreleri, patojenlere ve aşılara karşı bağışıklık tepkilerini modüle edebilir. SARS-COV-2 aşıları üzerinde yapılan araştırmalar, insan ve fare bağırsak bakterilerinden türetilen mikrobiyal proteinlerin (*Escherichia coli*'den türetilen ısı şoku proteini 60 ve ısı şoku proteini 70 gibi) SARS-COV-2 proteini S2'nin bağlanma alanına benzer olduğunu buldu. Önceden yüksek seviyelerde S2 çapraz reaktif antikorlara sahip fareler, SARS-COV-2 S DNA aşısı ile immünizasyondan sonra, daha yüksek S proteinine (özellikle S2'ye) özgü antikorları ürettiği bildirildi. Benzer şekilde, önceden var olan S2 ve P144'e özgü antikor seviyeleri, insanlarda iki doz inaktif SARS-COV-2 aşısının aşılanmasının ardından, reseptör bağlanma alanına özgü antikor titreleri ile pozitif korelasyon gösterdi (Jia et al., 2022). Bu çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının, aşı benzeri epitoplar taşıyarak çapraz bağışıklığı indükleyerek aşının etkinliğini etkileyebileceğini öne sürmektedir (Huang, Wang, & Li, 2023).

Bazı klinik çalışmalar, mikrobiyota ile oral yoldan verilmeyen diğer aşılara yanıt verme arasında bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bangladeş'te yapılan prospektif bir çalışmada, bebeklerde dışkıda *Bifidobacterium* bolluğunun, CD4+ T hücresi ve BCG, Tetanoz toksoidi ve hepatit B virüsü aşılarına verilen antikor yanıtları ile pozitif ilişkili olduğunu gösterdi (Huda et al., 2019).

Bağırsak mikrobiyotası, antikor tepkilerini ortak bakteriyel antijenlere benzer koruyucu olmayan aşı antijenlerine karşı yönlendirerek aşı etkinliğini olumsuz yönde de etkileyebilir.

4.1. Mikrobiyotada Bulunan Bakteriler ve Aşı Etkinliği ile Değişiklikleri

Klinik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonu ve fonksiyonlarının, aşılamanın immün tepkilerini modüle etmede çok önemli olduğunu ileri sürmektedir. Bağırsak mikrobiyomu karşılıklı olarak konakçı bağışıklık sistemini düzenler ve aşılara verilen yanıtları modüle eder. Yapılan çalışmalarda diferansiyel temel bakteri türlerinin daha yüksek aşı yanıtıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Mukozal veya sistemik mikrobiyotaya maruz kalma, aşılamaya verilen yanıtların düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahip olan T ve B hücre repertuarlarını şekillendirir. Bangledeş'te bebeklerde Oral polio aşısı (OPV), Bacillus Calmette-Guerin (BCG), (tetanoz toksoid aşısı) (TTV) ve Hepatit B (HBV) aşılarından sonra, mikrobiyota ile etkileşimde; *Bifidobacterium longum* alt türlerinin bolluğu OPV, BCG, TTV ve HBV etkinliği ile pozitif korelasyon gösterdi; *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* ve

Pseudomonas bolluğu aşı etkinliği ile ters orantılı bulundu (Huda et al., 2019). Nikaragua'da SARS-CoV-2 aşıları (CoronaVac ve BNT162b2) ile aşılamadan sonra; CoronaVac alıcılarında BNT162b2 aşılarına göre anlamlı derecede daha düşük bir bağışıklık tepkisi bulundu ($p<0,05$). *Bifidobacterium adolesanis*, CoronaVac aşısına karşı yüksek düzeyde nötralize edici antikorları olan kişilerde kalıcı olarak daha yüksekti ($p=0,023$) ve başlangıç bağırsak mikrobiyomları, karbonhidrat metabolizmasıyla ilişkili yolaklar da zenginleşti. BNT162b2 aşılarındaki nötralize edici antikorlar, *Roseburia faecis* dahil flagella ve fimbrialı bakterilerin toplam bolluğu ile pozitif korelasyon gösterdi ($p=0,028$). *Prevotella copri* ve iki *Megamonas* türünün bolluğu, aşılardan herhangi birisi yapıldıktan sonra, daha az yan etkisi olan bireylerde zenginleşti; bu durum bakterilerin konakçı immün yanıtında anti-inflamatuar bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Ng et al., 2022). Yine aynı ülkede Rotavirus (RV) aşısından sonra *Proteus* ve *Egella* bolluğu aşı etkinliği ile pozitif korelasyon gösterdi, ancak *Fusobacterium* ve *Enterobacteriaceae* aşı etkinliği ile negatif korelasyon gösterdi (Fix et al., 2020). Zimbabwe'de bebeklerde RV aşısından sonra *Bacteroides multiforme* serum anti-rotavirüs IgA titresi ile ilişkilendirildi (Robertson et al., 2021). Başka bir ülkede Gana'da bebeklere yapılan RV aşısından sonra antikor düzeyleri *Streptococcus bovis* bolluğunun artması ve *Bacteroidetes* filumunun bolluğunun azalması ile ilişkilendirildi (Harris et al., 2017).

4.2. SARS-CoV-2 Enfeksiyonu Sırasında Mikrobiyotadaki Değişiklikler

COVID-19 hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2 enfeksiyonu, bilinen immünomodülatör potansiyellere sahip bağırsak kommensal bakterilerinin (*Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* ve *Bifidobacteriacea* familyalarından birkaç cins ve *Faecalibacterium prausnitzii, Eubacterium rectale* dahil) daha düşük bolluğuyla ilişkilendirildi. Diğer taraftan bakteriyemiye neden olduğu bilinen fırsatçı patojenlerin (*Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus* ve *Bacteroides nordii* gibi) göreceli olarak daha fazla bolluğu gözlendi (Demidowich et al., 2020; Zuo et al., 2020) ; (Yeoh et al., 2021). COVID-19 hastaları üzerinde yapılan kesitsel bir çalışmada, *Coprobacillus, Clostridium ramosum* ve *Clostridium hathewayi*'nin başlangıçtaki bolluğu ile COVID-19 hastalığının şiddeti arasında bir korelasyon olduğu öne sürüldü. Bazı mikrobiyal türler (*F. prausnitzii* ve *Bifidobacterium bifidum* gibi) hastalığın ciddiyeti ile ters orantılıydı. Bağırsak mikrobiyom bileşimindeki bu değişiklikler, solunum semptomlarının iyileşmesinden sonra bile devam ettiği çalışmalarda gösterildi (Zuo et al., 2020); (Yeoh et al., 2021). SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan pediatrik hastalarda bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler hakkında başka bir çalışmada, çocukların bağırsak mikrobiyotasının *Faecalibacterium* açısından zengin olduğu gösterildi. Aynı zamanda, yetişkin popülasyona kıyasla akut

fazda ve iyileşme aşamasında daha hafif semptomlar gösterdiği vurgulandı (Romani et al., 2022). COVİD pandemisi sırasında yapılan bu çalışmalar, viral enfeksiyonların mikrobiyotanın bileşiminde değişikliklere neden olduğunu göstermesi yanı sıra, aynı şekilde viral aşıların da bu değişikliklere neden olabileceği hipotezini desteklemektedir.

5. Probiyotiklerin Aşı Etkinliğine Etkisi

Probiyotiklerin immünomodülatör etkileri aşılara verilen yanıtı etkileyebilir (Zimmermann & Curtis, 2018). *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii* ve *Escherichia coli*'nin birkaç spesifik türü dahil olmak üzere birçok probiyotiğin faydalı özellikleri gösterilmiştir. Probiyotikler arasında en yaygın kullanılanı 200'den fazla bakteri türünü içeren *Lactobacillus* cinsine ait mikroorganizmalardır. Doğal immünobiyotikler olarak *Lactobacillus* cinsinin mükemmel immünomodülatör işlevi vardır ve gastrointestinal, oral ve vajinal bozuklukları iyileştirme yetenekleri zaten iyi bilinmektedir.

Yenidoğanlara probiyotik uygulamasının humoral aşı yanıtlarına etkisi, toplam 573 bebekte yapılan dört çalışmada araştırılmıştır. Çalışmalarda probiyotikler 4 ila 12 ay arasında bir süre boyunca uygulanmıştır (Mullié et al., 2004); (Wu, Yang, Xu, & Wang, 2016); (Soh et al., 2010)[(Taylor et al., 2006); (Kukkonen, Nieminen, Poussa, Savilahti, & Kuitunen, 2006). Bu çalışmalardan birisinde, yaşamın ilk 6 ayı için. dört probiyotik suşunun (*B. breve*, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* ve *P. freudenreichii* (2–5 × 10^9 cfu herbirinden) kombine olarak uygulanmasından sonra, *Haemophilus influenzae* tip b-spesifik immünoglobulin G için daha yüksek bir serokonversiyon oranı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada, ilk 4 ay boyunca *B. breve* ve *Streptococcus* thermophiles (doz belirtilmemiş) kombinasyonunun uygulanmasından sonra, dışkıda yüksek seviyede poliomyelit-spesifik IgA seviyeleri saptandı (Mullié et al., 2004). Diğer iki çalışmada probiyotiklerin rutin aşılardaki spesifik IgG düzeyleri üzerinde herhangi bir etkisi bulunmadı (difteri, tetanoz, boğmaca, polio) (Wu et al., 2016).

Başka bir çalışmada, *Actinobacteria* bolluğunun (*B. longum* dahil) BCG, çocuk felci ve tetanoz toksoid aşılarına karşı geliştirilmiş humoral ve T hücresi cevabını artması ile ilişkili bulunurken, bakteriyel çeşitlilik, Enterobacteriales, Pseudomonadales ve Clostridiales'in bolluğu daha düşük aşı yanıtlarıyla ilişkili olarak bulunmuştur (Huda et al., 2014). Rotavirüs aşısına serolojik yanıtı araştıran bir başka çalışma sonuçları, *Streptococcus bovis* bolluğunun artmasına karşı, Bacteroidetes filumundaki azalmanın aşıya yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Harris et al., 2017).

Yenidoğan döneminde olmayan 541 çocuğu içeren beş çalışmada, probiyotiklerin uygulanmasından sonra, aşı yanıtları sonuçları bildirildi. Çalışmalar arasında, probiyotiklerin başlatıldığı yaş (2 aydan 10 yaşa kadar) önemli ölçüde farklılık göstermekle birlikte, bunların uygulanma süresi de önemli ölçüde farklılık göstermiştir (6 gün ile 9 ay arasında). Bu çalışmalardan üçü, probiyotiklerin parenteral aşılara verilen yanıtlar üzerindeki etkisini araştırdı. Bir çalışmada, her bir bireye dokuz ay boyunca *L. paracasei spp paracasei* (10^8-10^{10} cfu) uygulandıktan ve aşılamadan 6,5 ay sonra, difteriye özgü IgG seviyelerinin daha yüksek olduğu bildirildi (West et al., 2008). Diğer iki çalışma sonuçlarında, probiyotiklerin kızamık-kabakulak-kızamıkçık-suçiçeği, tetanoz ve pnömokok aşısına verilen yanıtlar üzerinde hiçbir etkisi olmadığı bildirildi (Pérez et al., 2010; Youngster, Kozer, Lazarovitch, Broide, & Goldman, 2011). Başka bir çalışmada altı gün boyunca *L. casei* (10^{11} cfu) verilmesinden sonra, oral Rotavirus aşılamasının etkileri incelenmiş ve aşılamadan sekiz gün sonra daha yüksek sayıda Rotavirus'a özgü IgM salgılayan hücre ($p = 0,020$) ve IgA serokonversiyon oranları saptanmıştır (Isolauri, Joensuu, Suomalainen, Luomala, & Vesikari, 1995). Diğer bir çalışmada, üç hafta boyunca probiyotik olarak *B. breve* verildikten sonra, oral kolera aşılamasını takiben 42 gün sonra ($p = 0,016$) kolera toksin B alt birimi IgA düzeyleri daha düşük olarak bulunmuştur (Matsuda et al., 2011). Buna karşılık yetişkinlerde yapılan küçük çaplı bir çalışmada, bağırsak mikrobiyotası daha çeşitlilik gösteren bireylerin, oral tifo aşısına karşı hücre aracılı bağışıklık tepkilerinin daha üstün olduğunu gösterilmiştir (Eloe-Fadrosh et al., 2013).

Oral olarak uygulanan probiyotikler, TLR'ler gibi immünolojik reseptörleri epitelyal ve immün hücreler üzerinde uyararak doğrudan etkilere sahip olabilir ve/veya immünomodülatör etkileri olan kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) gibi metabolitleri salgılayabilir (Belkacem et al., 2017). Ayrıca M hücreleri tarafından alınabilir, işlenebilir ve daha sonra DC'lere sunulabilir. Bu şekilde probiyotikler, DC polarizasyonunu ve fonksiyonunu modüle ederek, lokal ve ekstraintestinal seviyelerde sonraki T ve B hücre yanıtlarını etkiler (Lehtoranta, Latvala, & Lehtinen, 2020). Probiyotik etkiler, endojen bakteri sayısının daha az olduğu ince bağırsakta daha belirgindir ancak vücudun diğer bölgelerinde de mevcuttur.

6. Antibiyotiklerin Aşı Etkinliğine Etkileri

Küçük bebek veya çocukların sıklıkla boğaz ağrısı, göz ve kulak enfeksiyonları gibi bakteriyel enfeksiyonlar geçirmesi nedeniyle, çoğu zaman antibiyotiklerle tedavi edilir. Yaşamın ilk iki yılında antibiyotik kullanılmasının, bebeklerin belirli aşılara karşı güçlü bir bağışıklık tepkisi geliştirmesini engelleyebileceği çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır. Antibiyotiklerin aşıların etkinliğini etkileyip etkilemediği konusunda çeşitli çalışmalar yapılmaktadır ve çalşmaların sonuçları farklılık göstermektedir.

Melbourne'da bebeklerle yapılan bir çalışmada, aşılamadan önce antibiyotik tedavisinin Difteri-Tetanoz-Boğmaca, Hepatit B (HepB), Hib, Poliovirus ve Konjuge Pnömokok (PCV)13 aşılarına karşı antikor seviyelerini ve serokonversiyonu önemli ölçüde etkilemediği gösterildi (Zimmermann ve ark., 2020). Hindistan'da yapılan başka bir çalışma sonuçları, azitromisin tedavisinin OPV'nin immünojenitesini arttırmadığını ortaya çıkardı (Grassly et al., 2016). Chapman ve arkadaşlarının, 2006- 2016 yılları arasında, 6-24 aylık çocukların aşılama sonuçlarını (n=560) retrospektif olarak değerlendirildiği bir çalışmada, 9-12 aylıkken antibiyotik kullanan çocukların daha düşük antikor seviyelerine sahip olduğunu gösterdi (Chapman, Pham, Bajorski, & Pichichero, 2022).

Bir çalışmada, mevsimsel grip aşısından önce ve sonra sağlıklı yetişkinlere geniş spektrumlu antibiyotik uygulandı. Bağırsak bakteri yükünde 10.000 kat azalmaya ve bakteri çeşitliliğinde uzun süreli azalmaya rağmen, antikor tepkileri önemli ölçüde etkilenmedi. Bununla birlikte, önceden düşük antikor titreleri olan denekler üzerinde yapılan ikinci bir denemede, H1N1'e özgü nötralizasyonda ve IgG1 ve IgA bağlanma yanıtlarında önemli bir bozulma vardı. Ek olarak, her iki çalışmada da antibiyotik tedavisiyle, daha önce yaşlılarda gözlemlenen inflamatuar belirtilerde (AP-1/NR4A ekspresyonu dahil) artış ve dendritik hücre aktivasyonunda artışla sonuçlandı; serum sekonder safra asitlerinde 1000 kat azalma ile farklı metabolik yörüngeler; AP-1/NR4A sinyallemesi ve inflamatuar aktivasyonu ile yüksek oranda korele olarak bulundu (Hagan et al., 2019).

Antibiyotik kullanımı ile bir doz BNT162b2 aşılaması ve sonrasında bozulmuş erken aşı immünojenitesi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada, BNT162b2'nin serokonversiyon oranı antibiyotik kullananlarda ve kullanmayanlarda sırasıyla %82,8 ve %91,3 olarak bulunmuştur. Ancak karşılaştırma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte, aşı tepkisini etkileyebilecek potansiyel değişkenleri (örn., yaş, cinsiyet, DM) içeren çok değişkenli analizden sonra, antibiyotik kullanımının, bir doz BNT162b2 ile aşılama sonrasında, %74 daha düşük serokonversiyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. (Cheung et al., 2022).

7. Sonuç

Sonuç olarak; mikrobiyota, aşı yanıtlarının büyüklüğü ile ilişkili birbirine bağlı belirleyicilerden yalnızca biridir. Genetik ve çevresel değişkenler (örneğin, diyet, stres, enfeksiyonların varlığı, yaş, vd.) dahil olmak üzere diğer faktörler, bireylerin fizyolojik durumunu ve antijen uyarımına tepkilerini şekillendirir. Mikrobiyom-bağışıklık etkileşimi ve bunun aşı yanıtını nasıl etkilediğini anlamak için daha fazla veriye ihtiyaç vardır. Bağırsak mikrobiyotasının aşılamaya karşı hem B hücresi hem de T hücresi tepkilerini modüle ettiği bilinmesine rağmen,

klinik olarak ilgili mikrobiyotaya bağımlı immünomodülatör mekanizmaları tanımlayarak, korelasyondan nedenselliğe geçmek için ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Yetersiz ve dengesiz beslenme durumlarında bağırsak mikrobiyotasının aşı etkinliği üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması, aşıların dünya çapındaki etkinliğini artırmaya yönelik ilk adım olacaktır. İyileştirilecek alanlar şunları içermelidir: 1) geniş bir coğrafi ve sosyoekonomik yelpazede erken yaşama odaklanan çalışmaların tasarlanması; (2) mikrobiyota-bağışıklık tepkisi etkileşimlerinin karmaşıklığında mekanizmaları anlamak için sistem aşı bilimi yaklaşımlarını kullanması, (3) nedensel bir ilişkiyi kanıtlamak ve gnotobiyotik modelleri kullanarak bağışıklık tepkisi üzerindeki etki mekanizmalarını aydınlatılması için klinik öneme sahip immünomodülatör sınıfların tanımlanması gerekmektedir. Potansiyel olarak bu ilerlemeler, genel ve aşıyla ilgili öneme sahip mikrobiyal bağışıklığı güçlendirici müdahalelere yol açan önemli imzaların ve yolların keşfedilmesine yol açacaktır.

Kaynakça / References

Gül, B. & Yurdakök Dikmen, B. (2019). AŞI ADJUVANLARI ve İSTENMEYEN ETKİLERİ . Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni , 10 (2) , 91-105 . Retrieved from https://dergipark.org.tr/tr/pub/vetfarmatoksbulten/issue/47597/589723.

Aguilar, J. C., & Rodríguez, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine, 25*(19), 3752-3762. doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.111

Apostolico, J. D., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH, 2016*. doi:10.1155/2016/1459394

Belkacem, N., Serafini, N., Wheeler, R., Derrien, M., Boucinha, L., Couesnon, A., . . . Bourdet-Sicard, R. (2017). Lactobacillus paracasei feeding improves immune control of influenza infection in mice. *PLoS One, 12*(9), e0184976. doi:10.1371/journal.pone.0184976

Bousquet, J., Anto, J. M., Czarlewski, W., Haahtela, T., Fonseca, S. C., Iaccarino, G., . . . Zuberbier, T. (2021). Cabbage and fermented vegetables: From death rate heterogeneity in countries to candidates for mitigation strategies of severe COVID-19. *Allergy, 76*(3), 735-750. doi:10.1111/all.14549

Chac, D., Bhuiyan, T. R., Saha, A., Alam, M. M., Salma, U., Jahan, N., . . . Weil, A. A. (2021). Gut Microbiota and Development of Vibrio cholerae-Specific Long-Term Memory B Cells in Adults after Whole-Cell Killed Oral Cholera Vaccine. *Infect Immun, 89*(9), e0021721. doi:10.1128/iai.00217-21

Chapman, T. J., Pham, M., Bajorski, P., & Pichichero, M. E. (2022). Antibiotic Use and Vaccine Antibody Levels. *Pediatrics, 149*(5). doi:10.1542/peds.2021-052061

Cheung, K. S., Lam, L. K., Zhang, R., Ooi, P. H., Tan, J. T., To, W. P., . . . Leung, W. K. (2022). Association between Recent Usage of Antibiotics and Immunogenicity within Six Months after COVID-19 Vaccination. *Vaccines (Basel), 10*(7). doi:10.3390/vaccines10071122

Christensen, D. (2016). Vaccine adjuvants: Why and how. *Hum Vaccin Immunother, 12*(10), 2709-2711. doi:10.1080/21645515.2016.1219003

Ciabattini, A., Olivieri, R., Lazzeri, E., & Medaglini, D. (2019). Role of the Microbiota in the Modulation of Vaccine Immune Responses. *Front Microbiol, 10*, 1305. doi:10.3389/fmicb.2019.01305

Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology, 5*(4), e73. doi:10.1038/cti.2016.17

Costagliola, G., Spada, E., Comberiati, P., & Peroni, D. G. (2021). Could nutritional supplements act as therapeutic adjuvants in COVID-19? *Ital J Pediatr, 47*(1), 32. doi:10.1186/s13052-021-00990-0

Demidowich, A. P., Levine, J. A., Apps, R., Cheung, F. K., Chen, J., Fantoni, G., . . . Yanovski, J. A. (2020). Colchicine's effects on metabolic and inflammatory molecules in adults with obesity and metabolic syndrome: results from a pilot randomized controlled trial. *Int J Obes (Lond), 44*(8), 1793-1799. doi:10.1038/s41366-020-0598-3

Duthie, M. S., Windish, H. P., Fox, C. B., & Reed, S. G. (2011). Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev, 239*(1), 178-196. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00978.x

Eloe-Fadrosh, E. A., McArthur, M. A., Seekatz, A. M., Drabek, E. F., Rasko, D. A., Sztein, M. B., & Fraser, C. M. (2013). Impact of oral typhoid vaccination on the human gut microbiota and correlations with s. Typhi-specific immunological responses. *PLoS One, 8*(4), e62026. doi:10.1371/journal.pone.0062026

Fix, J., Chandrashekhar, K., Perez, J., Bucardo, F., Hudgens, M. G., Yuan, L., . . . Becker-Dreps, S. (2020). Association between Gut Microbiome Composition and Rotavirus Vaccine Response among Nicaraguan Infants. *Am J Trop Med Hyg, 102*(1), 213-219. doi:10.4269/ajtmh.19-0355

Grassly, N. C., Praharaj, I., Babji, S., Kaliappan, S. P., Giri, S., Venugopal, S., . . . Kang, G. (2016). The effect of azithromycin on the immunogenicity of oral poliovirus vaccine: a double-blind randomised placebo-controlled trial in seronegative Indian infants. *Lancet Infect Dis, 16*(8), 905-914. doi:10.1016/s1473-3099(16)30023-8

Guerrero Manriquez, G. G., & Tuero, I. (2021). Adjuvants: friends in vaccine formulations against infectious diseases. *Hum Vaccin Immunother, 17*(10), 3539-3550. doi:10.1080/21645515.2021.1934354

Hagan, T., Cortese, M., Rouphael, N., Boudreau, C., Linde, C., Maddur, M. S., . . . Pulendran, B. (2019). Antibiotics-Driven Gut Microbiome Perturbation Alters Immunity to Vaccines in Humans. *Cell, 178*(6), 1313-1328. e1313. doi:10.1016/j.cell.2019.08.010

Hajam, I. A., Dar, P. A., Won, G., & Lee, J. H. (2017). Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Vet Res, 48*(1), 37. doi:10.1186/s13567-017-0442-5

Harris, V. C., Armah, G., Fuentes, S., Korpela, K. E., Parashar, U., Victor, J. C., . . . de Vos, W. M. (2017). Significant Correlation Between the Infant Gut Microbiome and Rotavirus Vaccine Response in Rural Ghana. *J Infect Dis, 215*(1), 34-41. doi:10.1093/infdis/jiw518

Hong, S. H. (2023). Influence of Microbiota on Vaccine Effectiveness: "Is the Microbiota the Key to Vaccine-induced Responses?". *J Microbiol, 61*(5), 483-494. doi:10.1007/s12275-023-00044-6

Huang, B., Wang, J., & Li, L. (2023). Correction: Recent five-year progress in the impact of gut microbiota on vaccination and possible mechanisms. *Gut Pathog, 15*(1), 34. doi:10.1186/s13099-023-00560-1

Huda, M. N., Ahmad, S. M., Alam, M. J., Khanam, A., Kalanetra, K. M., Taft, D. H., . . . Stephensen, C. B. (2019). Bifidobacterium Abundance in Early Infancy and Vaccine Response at 2 Years of Age. *Pediatrics, 143*(2). doi:10.1542/peds.2018-1489

Huda, M. N., Lewis, Z., Kalanetra, K. M., Rashid, M., Ahmad, S. M., Raqib, R., . . . Stephensen, C. B. (2014). Stool microbiota and vaccine responses of infants. *Pediatrics, 134*(2), e362-372. doi:10.1542/peds.2013-3937

Isolauri, E., Joensuu, J., Suomalainen, H., Luomala, M., & Vesikari, T. (1995). Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by Lactobacillus casei GG. *Vaccine, 13*(3), 310-312. doi:10.1016/0264-410x(95)93319-5

Jia, L., Weng, S., Wu, J., Tian, X., Zhang, Y., Wang, X., . . . Wan, Y. (2022). Preexisting antibodies targeting SARS-CoV-2 S2 cross-react with commensal gut bacteria and impact COVID-19 vaccine induced immunity. *Gut Microbes, 14*(1), 2117503. doi:10.1080/19490976.2022.2117503

Kim, M., Qie, Y., Park, J., & Kim, C. H. (2016). Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host Microbe, 20*(2), 202-214. doi:10.1016/j.chom.2016.07.001

Kukkonen, K., Nieminen, T., Poussa, T., Savilahti, E., & Kuitunen, M. (2006). Effect of probiotics on vaccine antibody responses in infancy--a randomized placebo-controlled double-blind trial. *Pediatr Allergy Immunol, 17*(6), 416-421. doi:10.1111/j.1399-3038.2006.00420.x

Lehtoranta, L., Latvala, S., & Lehtinen, M. J. (2020). Role of Probiotics in Stimulating the Immune System in Viral Respiratory Tract Infections: A Narrative Review. *Nutrients, 12*(10). doi:10.3390/nu12103163

Littman, D. R. (2018). Do the Microbiota Influence Vaccines and Protective Immunity to Pathogens? If So, Is There Potential for Efficacious Microbiota-Based Vaccines? *Cold Spring Harb Perspect Biol, 10*(2). doi:10.1101/cshperspect.a029355

Lynn, D. J., Benson, S. C., Lynn, M. A., & Pulendran, B. (2022). Modulation of immune responses to vaccination by the microbiota: implications and potential mechanisms. *Nat Rev Immunol, 22*(1), 33-46. doi:10.1038/s41577-021-00554-7

Macpherson, A. J. (2018). Do the Microbiota Influence Vaccines and Protective Immunity to Pathogens? Issues of Sovereignty, Federalism, and Points-Testing in the Prokaryotic and Eukaryotic Spaces of the Host-Microbial Superorganism. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 10*(2). doi:10.1101/cshperspect.a029363

Matsuda, F., Chowdhury, M. I., Saha, A., Asahara, T., Nomoto, K., Tarique, A. A., . . . Qadri, F. (2011). Evaluation of a probiotics, Bifidobacterium breve BBG-01, for enhancement of immunogenicity of an oral inactivated cholera vaccine and safety: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Bangladeshi children under 5 years of age. *Vaccine, 29*(10), 1855-1858. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.133

Mullié, C., Yazourh, A., Thibault, H., Odou, M. F., Singer, E., Kalach, N., . . . Romond, M. B. (2004). Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of Bifidobacterium longum-infantis and Bifidobacterium breve in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr Res, 56*(5), 791-795. doi:10.1203/01.Pdr.0000141955.47550.A0

Ng, S. C., Peng, Y., Zhang, L., Mok, C. K., Zhao, S., Li, A., . . . Tun, H. M. (2022). Gut microbiota composition is associated with SARS-CoV-2 vaccine immunogenicity and adverse events. *Gut, 71*(6), 1106-1116. doi:10.1136/gutjnl-2021-326563

Oh, J. Z., Ravindran, R., Chassaing, B., Carvalho, F. A., Maddur, M. S., Bower, M., . . . Pulendran, B. (2014). TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity, 41*(3), 478-492. doi:10.1016/j.immuni.2014.08.009

Park, J., Kim, M., Kang, S. G., Jannasch, A. H., Cooper, B., Patterson, J., & Kim, C. H. (2015). Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. *Mucosal Immunol, 8*(1), 80-93. doi:10.1038/mi.2014.44

Pérez, N., Iannicelli, J. C., Girard-Bosch, C., González, S., Varea, A., Disalvo, L., . . . Cravero, R. (2010). Effect of probiotic supplementation on immunoglobulins, isoagglutinins and antibody response in children of low socio-economic status. *Eur J Nutr, 49*(3), 173-179. doi:10.1007/s00394-009-0063-5

Robertson, R. C., Church, J. A., Edens, T. J., Mutasa, K., Min Geum, H., Baharmand, I., . . . Manges, A. R. (2021). The fecal microbiome and rotavirus vaccine immunogenicity in rural Zimbabwean infants. *Vaccine, 39*(38), 5391-5400. doi:10.1016/j.vaccine.2021.07.076

Romani, L., Del Chierico, F., Macari, G., Pane, S., Ristori, M. V., Guarrasi, V., . . . Putignani, L. (2022). The Relationship Between Pediatric Gut Microbiota and SARS-CoV-2 Infection. *Front Cell Infect Microbiol, 12*, 908492. doi:10.3389/fcimb.2022.908492

Sanchez, H. N., Moroney, J. B., Gan, H., Shen, T., Im, J. L., Li, T., . . . Casali, P. (2020). B cell-intrinsic epigenetic modulation of antibody responses by dietary fiber-derived short-chain fatty acids. *Nat Commun, 11*(1), 60. doi:10.1038/s41467-019-13603-6

Silva, F., Enaud, R., Creissen, E., Henao-Tamayo, M., Delhaes, L., & Izzo, A. (2022). Mouse Subcutaneous BCG Vaccination and Mycobacterium tuberculosis Infection Alter the Lung and Gut Microbiota. *Microbiol Spectr, 10*(3), e0169321. doi:10.1128/spectrum.01693-21

Soh, S. E., Ong, D. Q., Gerez, I., Zhang, X., Chollate, P., Shek, L. P., . . . Aw, M. (2010). Effect of probiotic supplementation in the first 6 months of life on specific antibody responses to infant Hepatitis B vaccination. *Vaccine, 28*(14), 2577-2579. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.020

Stražar, M., Mourits, V. P., Koeken, V., de Bree, L. C. J., Moorlag, S., Joosten, L. A. B., . . . Xavier, R. J. (2021). The influence of the gut microbiome on BCG-induced trained immunity. *Genome Biol, 22*(1), 275. doi:10.1186/s13059-021-02482-0

Taylor, A. L., Hale, J., Wiltschut, J., Lehmann, H., Dunstan, J. A., & Prescott, S. L. (2006). Effects of probiotic supplementation for the first 6 months of life on allergen- and vaccine-specific immune responses. *Clin Exp Allergy, 36*(10), 1227-1235. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02553.x

Wang, B., Zhang, L., Wang, Y., Dai, T., Qin, Z., Zhou, F., & Zhang, L. (2022). Alterations in microbiota of patients with COVID-19: potential mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther, 7*(1), 143. doi:10.1038/s41392-022-00986-0

West, C. E., Gothefors, L., Granström, M., Käyhty, H., Hammarström, M. L., & Hernell, O. (2008). Effects of feeding probiotics during weaning on infections and antibody responses to diphtheria, tetanus and Hib vaccines. *Pediatr Allergy Immunol, 19*(1), 53-60. doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00583.x

Wu, B. B., Yang, Y., Xu, X., & Wang, W. P. (2016). Effects of Bifidobacterium supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World J Pediatr, 12*(2), 177-182. doi:10.1007/s12519-015-0025-3

Yang, W., Yu, T., Huang, X., Bilotta, A. J., Xu, L., Lu, Y., . . . Cong, Y. (2020). Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat Commun, 11*(1), 4457. doi:10.1038/s41467-020-18262-6

Yeoh, Y. K., Zuo, T., Lui, G. C., Zhang, F., Liu, Q., Li, A. Y., . . . Ng, S. C. (2021). Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut, 70*(4), 698-706. doi:10.1136/gutjnl-2020-323020

Youngster, I., Kozer, E., Lazarovitch, Z., Broide, E., & Goldman, M. (2011). Probiotics and the immunological response to infant vaccinations: a prospective, placebo controlled pilot study. *Arch Dis Child, 96*(4), 345-349. doi:10.1136/adc.2010.197459

Zhao, T., Li, J., Fu, Y., Ye, H., Liu, X., Li, G., . . . Yang, J. (2020). Influence of gut microbiota on mucosal IgA antibody response to the polio vaccine. *NPJ Vaccines, 5*(1), 47. doi:10.1038/s41541-020-0194-5

Zimmermann, P., & Curtis, N. (2018). The influence of probiotics on vaccine responses - A systematic review. *Vaccine, 36*(2), 207-213. doi:10.1016/j.vaccine.2017.08.069

Zimmermann, P., & Curtis, N. (2019). Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Rev, 32*(2). doi:10.1128/cmr.00084-18

Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2021). Cross-reactivity between cancer and microbial antigens. *Oncoimmunology, 10*(1), 1877416. doi:10.1080/2162402x.2021.1877416

Zuo, T., Zhang, F., Lui, G. C. Y., Yeoh, Y. K., Li, A. Y. L., Zhan, H., . . . Ng, S. C. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology, 159*(3), 944-955. e948. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.048

9. BÖLÜM / CHAPTER 9

DOĞAL MINERALLI SULARIN BAĞIRSAK İNFLAMASYONU VE BAĞIRSAK MUKOZASI İLE İLİŞKİLİ MİKROBİYOTA ÜZERİNE FAYDALI ETKİLERİ

BENEFICIAL EFFECTS OF NATURAL MINERAL WATERS ON INTESTINAL INFLAMMATION AND THE MUCOSA-ASSOCIATED MICROBIOTA

Sevinç BABA[1]

[1]Dr. Öğr. Üyesi, İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İstanbul, Türkiye

E-mail: sbaba@gelisim.edu.tr

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.009

ÖZ

Doğal mineralli sular mikrobiyolojik açıdan sağlıklı sular olarak tanımlanmıştır. Doğal kaynaktan çıkan sular steril olmayıp çeşitli mikroorganizmaları barındırmaktadır. Farklı maden sularının ana parametrelerin analizine dayalı olarak sınıflandırılması için fiziksel ve kimyasal özellikleri kullanılmaktadır. Mineral bileşimi, maden suların; bikarbonatlı, sülfatlı, klorürlü, magnezyumlu, florürlü, kalsiyumlu, demirli ve sodyumlu maden suları olarak sınıflanırılmasını sağlamaktadır. Bu minerallerin insan vücudunda farklı birçok yararlı etkisi bulunmaktadır. Mineral eksikliklerinin gidermenin yanı sıra insan vücudunda farklı biyolojik işlevlerle olumlu etki oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda şişelenmiş maden sularında mikrobiyolojik risk bildirilmemiştir. Doğal su kaynağında ve pazarlaması sırasında Avrupa Birliği Mevzuatına göre mikrobiyolojik olarak taşıması gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Maden su kaynaklarında bakteri sayısı düşük olsa da çok çeşitli mikroorganizmaların (*Pseudomonas, Acinetobacter, Stenotrophomonas, Alcaligenes, Comamonas, Acidovorax, Paucimonas, Brevundimonas, Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter, Arthrobacter ve Corynebacterium*) varlığı bildirilmiştir. Doğal mineralli suların sindirim sistemi üzerinde yararlı etkileri olduğu ve anti-inflamatuvar etki gösterdiği bilinmektedir. Segmentli filamentöz bakterileri arttırarak bağırsak mukozasıyla ilişkili dengeli bir mikrobiyota oluşumuna katkı sağlamakta ve antimikrobiyal etki oluşturmaktadır. Sonuç olarak, minerallerin bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkilerinin olabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş, ancak bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. .

Anahtar Kelimeler: Doğal mineralli su, bağırsak inflamasyonu, mikrobiyota, antimikrobiyal ve anti-inflamatuvar etki

ABSTRACT

Natural mineral waters are defined as microbiologically healthy waters. The waters coming out of the natural source are not sterile and contain various microorganisms. Physical and chemical properties are used to classify different mineral waters based on analysis of main parameters. The mineral composition enables the mineral waters to be classified as bicarbonate, sulfate, chloride, magnesium, fluoridated, calcium, ferrous and sodium mineral waters. These minerals have many beneficial effects on the human body. In addition to eliminating mineral deficiencies, it has a positive effect on the human body with different biological functions. No microbiological risk was reported in bottled mineral waters in the studies. According to the European Union Legislation, there are some microbiological features that must be carried in the natural water source and during its marketing. Although the number of bacteria is low in mineral water sources, the presence of a wide variety of microorganisms (*Pseudomonas, Acinetobacter, Stenotrophomonas, Alcaligenes, Comamonas, Acidovorax, Paucimonas, Brevundimonas, Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter, Arthrobacter and Corynebacterium*) have been reported. It is known that natural mineral waters have beneficial effects on the digestive system and have an anti-inflammatory effect. By increasing segmented filamentous bacteria, it contributes to the formation of a balanced microbiota associated with the intestinal mucosa and creates an antimicrobial effect.

Keywords: Natural mineral water, intestinal inflammation, microbiota, antimicrobial and anti-inflammatory effect

Extended Abstract

Natural mineral waters contain different types of microorganisms and are considered suitable for use with their positive effects on human health. Minerals found in mineral waters have different functions in the human body. For example, while calcium plays a role in bone development and muscle contraction; iodine is an essential mineral for the synthesis of hormones involved in body development and growth. Apart from this, it is known that mineral waters have important roles in digestion processes, absorption of nutrients, elimination of metabolic wastes and proper functioning of the circulatory system. In addition, mineral waters are classified according to their properties such as pH and temperature.

According to the European Union Directive, mineral waters are defined as microbiologically healthy water. It aims to ensure the absence of *Escherichia coli* and other coliform bacteria, *Enterococcus* species, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus,* sulfate-reducing bacteria, other parasites and pathogenic microorganisms in suspected contamination cases with routine microbiological analysis. The source of natural mineral waters is not sterile and disinfection is not applied to these waters. Natural mineral waters must have certain properties in their microbiological analysis at their source and during marketing. No microbiological risk was determined from the bottled mineral waters examined in the studies. To date, no relationship has been found between human diseases and the microorganisms found in natural mineral water. The microbial diversity in natural mineral waters is generally thought to be

related to the types of organisms found in an environment. Bacterial counts are generally low in mineral water springs, but a wide variety of species (*Pseudomonas, Acinetobacter, Stenotrophomonas, Alcaligenes, Comamonas, Acidovorax, Paucimonas, Brevundimonas, Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter, Arthrobacter* and *Corynebacterium*) have been reported.

The microbiota associated with the intestinal mucosa is responsible for the chronicity of the disorders in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel diseases. Natural mineral waters affect intestinal immunity and appear to exhibit anti-inflammatory properties. It has also been shown that by increasing segmented filamentous bacteria, it creates a more balanced microbiota associated with the intestinal mucosa. It suggests that natural mineral waters may have an effect on bacteria in the gastrointestinal tract. Apart from this, changes in microbial diversity have also been shown after spa treatments. in skin diseases. The increase in the number of microorganisms in the *Xanthomonadaceae* family belonging to the *Proteobacteria* phylum has been associated with clinical improvements observed after dermatological treatment in the spa care facility. It has been explained that the minerals and non-pathogenic microorganisms in these waters will have therapeutic benefits when used in the treatment of inflammatory skin diseases. The available literature, has indicated the positive effects of bacteria on the bioavailability of minerals and their effects on the human gut microbiota, but the mechanisms have not yet been elucidated.

1. Giriş

Doğal mineralli sular, genetik çeşitliliğe sahip farklı bakterileri içeren karmaşık ekosistemlerdir. Avrupa Birliği Mevzuatına göre, doğal mineralli sular sterilizasyon ve dezenfeksiyon işlemine tabi tutulamamaktadır. Bu nedenle doğal mineralli sular, kaynağın özgün mikrobiyotasını içermektedir (Casanovas-Massana & Blanch, 2012).

Doğal mineralli suları kullanan tedavilerin yararlı etkileri dispepsi ve irritabl bağırsak sendromu gibi çeşitli gastrointestinal sistem hastalıkları üzerinde görülmektedir. Termomineral tedavilerin sonucunda inflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişilerde sindirim semptomlarında iyileşme gözlenmiştir (Barnich et al., 2021; Rocca et al., 2007). Bu tedavi etkilerini değerlendirmedeki en büyük zorluk, spesifik değerlendirilen patolojilerin, özellikle fonksiyonel patolojilerin biyolojik belirteçleri ve bu hastalıkların nedenlerine ilişkin net pato-fizyolojik açıklamaların olmamasıdır. Bu sorunlar, kaplıca tedavisinin ardından koşullara özgü biyolojik parametrelerdeki nesnel değişiklikleri göstermedeki zorluğu açıklamaktadır. Son zamanlarda, kronik hastalıkların fizyopatolojisinde bağırsak mikrobiyotasının rolünü içeren çalışmalar yapılmıştır. Bağırsakta bulunan mikroorganizmalar, koruyucu, sindirim ve bağışıklık fonksiyonları dahil olmak üzere birçok temel bağırsak fonksiyonunda yer almaktadır (Barnich et al., 2021; Khan et al., 2019; Ni, Wu, Albenberg, & Tomov, 2017).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları 3,5 milyondan fazla insanı etkilemekte ve dünya çapında insidansı artmaktadır (Kaplan, 2015). En yaygın formları Crohn hastalığı ve ülseratif kolit olan bu hastalıklar, gastrointestinal sistemin veya kolonun kronik inflamasyonu ile karakterizedir. Bu koşullar konak, mikrobiyal ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır (Hugot et al., 2001) (Ananthakrishnan, 2015; Morgan et al., 2012). İnsan genomundaki inflamatuvar bağırsak hastalıkları etkenleri birçoğu konak-mikroorganizma etkileşimlerinden sorumlu olan 200'den fazla risk içermektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları olan bireylerin bağırsak mikrobiyomunda yaygın görülen değişiklikler arasında *Escherichia coli* dahil olmak üzere fakültatif anaeroplarda artış görülmektedir (Ananthakrishnan, 2015; Knights et al., 2014; Morgan et al., 2012).

Çoğu gastrointestinal sistem hastalıkları, mikrobiyota bileşimindeki değişikliklerle karakterize edilmektedir. İnsan mikrobiyotasında *Bacteroidetes, Firmicutes* ve *Actinobacteria* olmak üzere üç filum hakimdir ve farklı varyasyonlar gastrointestinal sistem hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, mikrobiyal çeşitlilik bir hastanın bireysel mikrobiyal profiline dayalı immünosupresif tedaviye koruyucu olarak kullanılabilmektedir. Bu çeşitlilik, insanlarda besinlerin sindirilmesi, vitaminler ve diğer koruyucu metabolitlerin üretilmesi, bağırsak ve

sistemik bağışıklık tepkilerinin aktive edilmesi, mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonun önlenmesi gibi birçok faydanın elde edilmesini sağlamaktadır (Oka & Sartor, 2020). Bununla birlikte inflamatuvar bağırsak hastalıkları olanlarda mantarlar ve bakteriyofajlar artarken, bakteri çeşitliliğinin önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Lewis et al., 2015; Lloyd-Price et al., 2019; Norman et al., 2015). İnsan bağırsak mikrobiyotasının metagenomunun bilinmesiyle, kaplıcalarda uygulanan tedaviden sonra mikrobiyota değişiklikleri günümüzde izlenebilmektedir (Barnich et al., 2021).

1.1. Doğal Mineralli Suların Kimyasal Özellikleri

Avrupa Birliği Mevzuatına (2009/54/EC) göre doğal mineralli su, "yeraltı suları veya birikintisinden kaynaklanan ve bir veya daha fazla doğal kaynaktan çıkan, mikrobiyolojik açıdan sağlıklı su" olarak tanımlanmaktadır. Bu yönergeye göre maden suları, bikarbonat (içeriği 600 mg/L'den fazla), sülfat (içeriği 200 mg/L'den fazla), klorür (içeriği 200 mg/L'den fazla), kalsiyum (içeriği 150 mg/L'den fazla), magnezyum (içeriği 50 mg/L'den fazla)), florür (içeriği 1 mg/L'den fazla), demir (içeriği 1 mg/L'den fazla), serbest karbon dioksit (içeriği 250 mg/L'den fazla) ve sodyum (içeriği 200 mg/L'den fazla) içermektedir. Bazı maden suları bebek mamasının hazırlanması ve düşük sodyumlu (içeriği 20 mg/L'den az) bir diyet için uygun olabilir, ayrıca idrar söktürücü olarak kullanılabilir ("Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters (Recast) (Text with EEA relevance),"). Bunun dışında maden suları pH, sıcaklık gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre gruplandırılmaktadır. Özellikle pH'a bağlı olarak, maden suları pH<7 ise asitli ve pH>7 ise alkali su olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca kaynağın sıcaklığına göre mineralli sular soğuk (<20 °C), hipotermal (20–30 °C), mezotermal (30–40 °C) ve hipertermal (>40 °C) sular olarak tanımlanmaktadır. Mineralli sular, bir litre suyun 180 °C'de buharlaşmasından sonra kalan mineral tuzlarının mg cinsinden miktarına göre dört kategoride toplanmaktadır (Tablo 1) ("Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters (Recast) (Text with EEA relevance)," ; Quattrini, Pampaloni, & Brandi, 2016).

Tablo 1. Doğal mineralli suların 180 °C'deki kuru kalıntılarına göre yapılan sınıflandırma.

180 oC'deki kuru kalıntılar	**Tanım**
<50 mg/L	Çok düşük mineralli sular
50-500 mg/L	Düşük mineralli sular
500-1500 mg/L	Orta mineralli sular
>1500 mg/L	Zengin mineralli sular

1.2. Doğal Mineralli Suların Mikrobiyolojik Özellikleri

Doğal mineralli sular, kimyasal ve fiziksel özellikleri sayesinde her türlü kirlilik riskinden korunmasıyla mikrobiyolojik olarak sağlıklı su olarak tanımlanmaktadır. Rutin mikrobiyolojik analizlerle, şüpheli kontaminasyon vakalarında *Escherichia coli* ve diğer koliform bakterilerin, *Enterococcus* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, sülfat indirgeyen bakteriler, diğer parazitler ve patojen mikroorganizmaların bulunmamasını sağlamayı amaçlamaktadır (Totaro et al., 2018).

Doğal maden suyunun kaynağı steril değildir, ancak mikrobiyolojik kontaminasyon olmaması gerekmektedir. Biyolojik bileşenlerini değiştiren veya ortadan kaldıran herhangi bir dezenfeksiyon işlemi uygulanmamaktadır. Bu nedenle, her zaman bu suların kaynağında bulunan bakterileri içermektedir ve şişelenme aşamasından sonra oluşabilecek toplam koloni sayılarının kaynaktaki bakteri sayılarıyla uygun olması, kaynağın kontaminasyona karşı korunduğuna dair tatmin edici kanıtlar sunması gerektiği mevzuatta belirtilmiştir.

Sular şişelere alındıktan sonra kaynaktaki toplam koloni sayısı agarda 20-22 ^{o}C'de 72 saatte mililitrede 100'ü ve 37 ^{o}C'de 24 saatte mililitrede 20'yi geçmemelidir. Toplam koloni sayısı 4 ^{o}C ± 1^{o}C olan ortamda bırakılan sudan alınan örneklerle 12 saat içinde belirlenmelidir. Bunun yanısıra doğal kaynaklarda normalde 20-22 °C'de 72 saatte mililitrede 20'yi ve 24 saatte 37°C'de mililitrede beşi geçmemelidir. Bu sayılar izin verilen maksimum sınır ölçütleri değil, rehberde yer alan değerlerdir.

Doğal mineralli suların, kaynağında ve pazarlaması sırasında mikrobiyolojik analizlerinde belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler;

a) Parazit ve patojen mikroorganizmaların olmadığının gösterilmesi,

b) Kontaminasyonun tespiti için kantitatif koloni sayımı:

- 37 °C ve 44,5 °C'de 250 ml'de *Escherichia coli* ve diğer koliform bakterilerin olmaması,

- 250 ml'de *Enterococcus* türlerinin olmaması,

- 50 ml'de sülfat indirgeyen anaerop bakterilerin olmaması,

- 250 ml'de *Pseudomonas aeruginosa'*nın olmamasıdır.

c) Bir ml suda oluşan toplam koloni sayısının agarda 20-22 ^{o}C'de 72 saatte ve 37 ^{o}C'de 24 saatte belirlenmesidir ("Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters (Recast) (Text with EEA relevance),").

Yapılan çalışmalarda incelenen şişelenmiş maden sularından herhangi bir mikrobiyolojik risk belirlenmemiştir. Bugüne kadar, insan hastalıkları ile doğal maden suyunda bulunan mikroorganizmalar arasında hiçbir ilişki bulunamamıştır (Leclerc & Moreau, 2002).

Doğal maden sularındaki mikrobiyal çeşitliliğin genellikle bir çevrede bulunan organizma türleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Maden sularının kaynaklarında bakteri sayısı genellikle düşüktür ancak çok çeşitli türler (*Pseudomonas, Acinetobacter, Stenotrophomonas, Alcaligenes, Comamonas, Acidovorax, Paucimonas, Brevundimonas, Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter, Arthrobacter* ve *Corynebacterium*) rapor edilmiştir.

1.3. Doğal Mineralli Suların İnsan Sağlığına Etkileri

Doğal mineralli suların hem mineral eksikliklerini giderme hem de farklı sistemlerde olumlu etkileri bulunmaktadır. Maden sularını içmek susuzluğu gidermek, biyokimyasal reaksiyonların ve fizyolojik süreçlerin doğal seyri için su ile birlikte kalsiyum, sodyum, magnezyum, kükürt, bikarbonat ve flor gibi oligo-elementlerin alınması sağlanmaktadır (Quattrini et al., 2016). Örneğin kalsiyum açısından zengin maden suları kemik yapımı biyobelirteçleri ve dansitometrik parametreleri üzerinde olumlu etkileri olan yüksek düzeyde biyoyararlanımlı bir kalsiyum kaynağıdır (Vannucci et al., 2018). Yeterli magnezyum alımı ile aterosklerozu ve insülin direncini önleme, ayrıca kemik sağlığının korunması ile osteoporozu önlemeye katkı sağlamaktadır (Maraver, Vitoria, Ferreira-Pego, Armijo, & Salas-Salvado, 2015). Bunun dışında maden sularının sindirim süreçlerinde, besinlerin emiliminde, metabolik atıkların atılmasında ve dolaşım sisteminin düzgün işleyişinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir (Bankir, Perucca, Norsk, Bouby, & Damgaard, 2017; Bothe, Coh, & Auinger, 2017; Toxqui & Vaquero, 2016). Özellikle ileri yaşlarda kalsiyum açısından zengin doğal maden suyu içmenin uykusuzluğu, osteoporozu ve diş kaybını önlediği; magnezyum açısından zengin suların ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı, aritmiler, ani ölüm ve serebrovasküler hastalıklara karşı koruma sağladığı görülmektedir. Sodyum bikarbonat içeriği zengin maden suyunun içilmesiyle, kolesterol ve glisemide önemli bir azalma gösterdiği belirtilmiştir (Liu et al., 2022).

Maden suyunun birçok metabolik yolakta, farklı mineralleri taşıma ve sağlama üzerinde etkisi gösterilmiştir. Mineraller, kemik ve diş mineralizasyonu, hücresel değişimlerin düzenlenmesi, çeşitli metabolik yolların aktivasyonu gibi biyolojik temel işlevleri olan inorganik bileşiklerdir (Tablo 2) (Quattrini et al., 2016).

Tablo 2. Bazı maden sularında bulunan minerallerin insan vücudundaki işlevleri.

Mineral	**Biyolojik işlevlere örnekler**
Kalsiyum	Kemik gelişimi, kas kasılması ve miyokard aktivitesinin düzenlenmesi, kanın pıhtılaşması, sinir uyarılarının iletimi ve hücre geçirgenliğinin düzenlenmesi.
Klor	Hidroklorik asit oluşumu (sindirim süreçleri için sindirim sıvıları).
Fosfor	Protein sentezi, ATP sentezi ve biyolojik sistemlerde enerjinin taşınması.
Magnezyum	Kemik oluşumu, sinir ve kas aktiviteleri, lipid metabolizması ve protein sentezi, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma.
Potasyum	Kas ve miyokard işlevleri, nöromüsküler uyarılabilirlik, asit-baz dengeleme, su tutma, ozmotik basınç.
Sodyum	Hücrenin geçirgenliğinin ve vücut sıvılarının düzenlenmesi (aşırı alımı yüksek tansiyon ile ilişkilendirilebilir).
Sülfür (Sülfat)	Temel aminoasitler, kıkırdak, saç ve tırnak oluşumu, redoks süreçlerinde ve hücresel solunumda enzim aktivitesi, bağırsak peristaltizmi.
Kobalt	B12 vitamini bileşeni: büyüme faktörü, nükleik asit sentezi, hematopoez.
Krom	Karbonhidratların, lipidlerin ve proteinlerin metabolizmasında yer alan enzimatik reaksiyonlar.
Demir	Kan ve kas dokuları: hemoglobin, miyoglobin.
Florür	Diş çürümesinin önlenmesi, dişlerin korunması, kemik gelişimi.
İyot	Vücut gelişimine ve büyüme sürecine katılan hormonların sentezi için gerekli.
Manganez	Proteinlerin ve şekerlerin metabolizmasında görevli çeşitli enzimlerin sentezi, kemik gelişimi.
Molibden	Ürik asitle ilişkili enzimlerin üretimi.
Bakır	Kan ve kaslardaki çeşitli enzimler üzerine etkili.
Selenyum	Kas zarı bütünlüğünün korunması, antioksidan.

Doğal maden sularının mineral içeriğine göre sınıflandırılması ve belirli rahatsızlıklar için farklı türde suların kullanılmasına yönelik araştırmalar bulunmaktadır (Tablo 3) (Quattrini et al., 2016).

Tablo 3. Başlıca doğal maden sularının özellikleri ve genel terapötik endikasyonları.

Maden suyunun cinsi	**Ana mineral içeriği (mg/L)**	**Terapötik uygulamaları**
Bikarbonat	>600	Mide asiditesini nötralize etmesi nedeniyle sindirimi düzenler.
Sülfat	>200	Hafif yumuşatıcı etkisiyle hepatobiliyer hastalıklar için önerilmektedir.
Klorür	>200	Karaciğer, safra kanalları ve bağırsak dengesi sağlar, laksatif etki gösterir.

Kalsiyum	>150	Gençler, hamileler, süt ürünleri tüketmeyenler ve yaşlı erkekler için önerilir, osteoporoz ve hipertansiyonun önlenmesine katkıda bulunur.
Magnezyum	>50	Sindirimi düzenler.
Florür	>1	Dişlerin yapısını güçlendirir ve çürümelerini önler, osteoporozun önlenmesine yardımcı olur.
Demir	>1	Kansızlık ve demir eksikliği için önerilir.
Sodyum	>200	Yoğun fiziksel aktivite yapanlara (terleme ile kaybedilen tuzları almak için) önerilir.
Düşük sodyumlu	<20	Hipertansiyon durumunda önerilir.

Son yıllarda metabolik sendromda maden suyunun potansiyel terapötik özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada, suyun minimum düzeyde mineralize olduğunu ve düşük kalorili bir diyetle kombinasyon halinde, belirli makronütrientler (bikarbonat, sülfat ve magnezyum) açısından zengin olduğunu göstermiş, glikoz seviyelerinin ve kan lipidlerinin kontrolüne katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (Narciso et al., 2022). Maden suyunun bağırsak iltihabındaki olası rolünü araştırmak için yapılan bir başka çalışmada, kalsiyum, magnezyum sülfat, sodyum klorür ve bikarbonatın bağırsak iltihabı ve mukoza ile ilişkili mikrobiyota üzerinde olumlu etkileri olduğu doğrulanmıştır (Barnich et al., 2021).

1.4. Doğal Mineralli Suların Mikrobiyota Üzerine Etkileri

Sülfat veya demir içeren doğal maden suları anti-inflamatuvar özellikler göstermekte ve bikarbonat iyonunun hayati sistemlerde önemli bir rolü olduğu bildirilmektedir. Bikarbonatların iletimi ile ilgili eksikliklerde; bağışıklık bozuklukları, kistik fibröz, tümör oluşumu, böbrek hastalıkları, beyin fonksiyonunun bozukluğu, diş kırılmaları, hipertansiyon ve üreme sistemi hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açtığı bildirilmiştir (Lee & Hong, 2020).

Bikarbonatların sindirim sisteminde koruyucu bir bariyer olarak etkili olduğu ve bağırsak onarımına da katkı sağladığı gösterilmiştir (Said & Kaunitz, 2016; Seidler, 2013).

Sülfat indirgeyen bakteriler, bağırsakta sülfat iyonlarını kullanarak hidrojen sülfüre indirgemekte ve bu bileşik anti-inflamatuvar etki göstermektedir (Wallace, Vong, McKnight, Dicay, & Martin, 2009). Demir takviyesi, bağırsak üzerinde anti-inflamatuvar yağ asitlerinin lokal konsantrasyonlarını arttırarak ve inflamasyonu azaltarak fayda sağlamaktadır (Dostal et al., 2014) (Kortman et al., 2015).

Bağırsak mukozası ile ilişkili mikrobiyota, irritabl bağırsak sendromu ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarında rahatsızlıkların kronikleşmesinden sorumludur. Doğal mineralli sularının bağırsak bağışıklığını etkilediği ve anti-inflamatuvar özellikler sergilediği görülmektedir. Ayrıca segmentli filamentöz bakterileri arttırmasıyla bağırsak mukozasıyla ilişkili daha dengeli bir mikrobiyota oluşturduğu gösterilmiştir (Barnich et al., 2021).

Segmentli filamentöz bakterilerin birçok bağışıklık hücresinin bulunduğu ince bağırsağın terminal kısmında kolonize oldukları bilinmekte ve yardımcı Th17 hücreleri (Th17) hücre farklılaşmasını güçlü bir şekilde tetiklemeleri ile immünomodülatör rollerini açıkça ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (Ericsson, Hagan, Davis, & Franklin, 2014) (Ivanov et al., 2009; Schnupf, Gaboriau-Routhiau, Sansonetti, & Cerf-Bensussan, 2017). Kemokin ve antimikrobiyal bileşenlerin üretiminin uyarılması, bağırsak lenfoid dokusunun uyarılması ve fekal IgA'da güçlü bir artış dahil olmak üzere geniş bir etki yelpazesine sahiptirler (Umesaki, Setoyama, Matsumoto, Imaoka, & Itoh, 1999). Bununla birlikte immün yetmezlikli farelerde yapılan bir çalışmada, segmentli filamentöz bakterilerin immün hücrelerden bağımsız olarak rotavirüs enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Shi et al., 2019).

Cilt hastalıklarında kaplıca tedavilerinden sonra mikrobiyal çeşitlilikte değişiklikler gösterilmiştir. *Proteobacteria* filumuna ait *Xanthomonadaceae* ailesindeki mikroorganizmaların sayısındaki artış, kaplıca bakım tesisinde dermatolojik tedavi sonrası gözlemlenen klinik iyileşmelerle ilişkilendirilmiştir (Martin, Henley, Sarrazin, & Seite, 2015). Atopik dermatitli hastalar, *Staphylococcus aureus* 'un neden olduğu bakteriyel enfeksiyona yatkındır. Hidroterapi derinin nem içeriğini arttırmakta, atopik dermatit lezyonlarında inflamasyonunu ve *S. aureus* kolonizasyonunu azaltmaktadır (Casas et al., 2011). Bu durum asidik kaplıca suyunun *S. aureus* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkileri ile açıklanabilmektedir (Akiyama, Yamasaki, Tada, Kubota, & Arata, 2000). Klinik çalışmalar bu tesisteki doğal mineralli suların Gram pozitif bakterilerde azalma ile Gram negatif bakterileri arttırdığı ve derinin mikrobiyal çeşitliliğindeki gelişmeleri göstermiştir. Bu sulardaki minerallerin ve patojen olmayan mikroorganizmaların, inflamatuvar deri hastalıklarını tedavi etmede kullanıldığında terapötik fayda alınacağı açıklanmıştır (Zeichner & Seite, 2018).

1.5. Minerallerin Bağırsak Mikrobiyotası ile Etkileşimi

Mineraller, bağırsak mikrobiyotasının yapısını ve bileşimini yeniden şekillendiren bakteriyel fizyolojik süreçlerle ilişkilendirilmektedir. Buna ek olarak mineraller, kommensal bakterilerin bağırsakta sayılarının artmasına veya azalmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle konak ile mikroorganizmalar arasındaki homeostasiste mineral alımının etkisi görülmektedir

(Gentile & Weir, 2018; Lopez & Skaar, 2018; Zackular et al., 2016). Bağırsak mikrobiyotası ile özellikle temel mineraller arasında yer alan kalsiyum, magnezyum, demir, çinko ve selenyumun etkileşimini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (Bielik & Kolisek, 2021).

Bağırsak mikrobiyotası, kalsiyumun emilimini arttırabilmekte ve bağırsakta üretilen serotonini düzenleyebilmektedir. Ayrıca kalsiyumun absorpsiyonu, *Bacteroides, Butyricicoccus*, *Oscillibacter* ve *Dialister* cinsi mikroorganizmalar ile pozitif korelasyon göstermiştir (Whisner et al., 2014). Bunun dışında kalsiyum prebiyotik bir etki sağlayabilmektedir. Yapılan bir çalışmada kalsiyumla beslenen farelerde *Bifidobacterium*, *Bacteroides* ve *Prevotella* cinsi bakterilerde artış gösterilmiştir (Chaplin, Parra, Laraichi, Serra, & Palou, 2016). Kalsiyum biyoyararlılığının yüksek olması, probiyotikler tarafından bağırsaklarda daha fazla kalsiyum emilimi sağladığı belirtilmiştir. (Sharifi-Rad et al., 2020).

Magnezyum eksikliği sistemik ve bağırsak inflamasyonu ile ilişkilendirilmiş ancak bu bulguların mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamıştır (Trapani et al., 2018). Önerilen miktarda magnezyum alımı, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini ve konağın metabolizmasını olumlu yönde etkileyebilmektedir (Piuri et al., 2021).

Demir alımı bağırsak mikrobiyotasının yapısını değiştirmektedir (Constante, Fragoso, Lupien-Meilleur, Calve, & Santos, 2017). Bir başka önemli bir mineral çinko; farelerde yapılan bir çalışmayla, eksikliğinin mikrobiyota bileşimini ve işlevini olumsuz yönde değiştirdiği gösterilmiştir (Sauer & Grabrucker, 2019). Bağırsaktaki kommensal bakteriler çinko ve demirin biyoyararlılığını arttırmaktadır (Celis & Relman, 2020). Ayrıca selenyum ve çinko ile zenginleştirilmiş probiyotiklerin biyoyararlanımı ve emilimi arttırdığı belirtilmiştir (Mogna et al., 2012)

Sonuç olarak, minerallerin bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkilerinin olabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş, ancak bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut literatür, bakterilerin minerallerin biyoyararlılığı üzerindeki olumlu etkilerini ve insan bağırsak mikrobiyotasındaki etkilerini göstermiş, ancak ilgili mekanizmalar henüz açıklanamamıştır. Zengin mineral içeriğine sahip doğal maden sularının biyoyararlı besin takviyeleri olarak alınabileceğini düşündürmekte ve bu alanda yapılacak çalışmaların önemini vurgulamaktadır.

Kaynakça / References

Akiyama, H., Yamasaki, O., Tada, J., Kubota, K., & Arata, J. (2000). Antimicrobial effects of acidic hot-spring water on Staphylococcus aureus strains isolated from atopic dermatitis patients. *J Dermatol Sci, 24*(2), 112-118. doi:10.1016/s0923-1811(00)00091-8

Ananthakrishnan, A. N. (2015). Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a review. *Dig Dis Sci, 60*(2), 290-298. doi:10.1007/s10620-014-3350-9

Bankir, L., Perucca, J., Norsk, P., Bouby, N., & Damgaard, M. (2017). Relationship between Sodium Intake and Water Intake: The False and the True. *Ann Nutr Metab, 70 Suppl 1*, 51-61. doi:10.1159/000463831

Barnich, N., Rodrigues, M., Sauvanet, P., Chevarin, C., Denis, S., Le Goff, O., . . . Alric, M. (2021). Beneficial Effects of Natural Mineral Waters on Intestinal Inflammation and the Mucosa-Associated Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(9). doi:ARTN 4336

10.3390/ijms22094336

Bielik, V., & Kolisek, M. (2021). Bioaccessibility and Bioavailability of Minerals in Relation to a Healthy Gut Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(13). doi:10.3390/ijms22136803

Bothe, G., Coh, A., & Auinger, A. (2017). Efficacy and safety of a natural mineral water rich in magnesium and sulphate for bowel function: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Nutr, 56*(2), 491-499. doi:10.1007/s00394-015-1094-8

Casanovas-Massana, A., & Blanch, A. R. (2012). Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. *International Journal of Food Microbiology, 153*(1-2), 38-44. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.012

Casas, C., Ribet, V., Alvarez-Georges, S., Sibaud, V., Guerrero, D., Schmitt, A. M., & Redoules, D. (2011). Modulation of Interleukin-8 and staphylococcal flora by Avene hydrotherapy in patients suffering from chronic inflammatory dermatoses. *J Eur Acad Dermatol Venereol, 25 Suppl 1*, 19-23. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03898.x

Celis, A. I., & Relman, D. A. (2020). Competitors versus Collaborators: Micronutrient Processing by Pathogenic and Commensal Human-Associated Gut Bacteria. *Mol Cell, 78*(4), 570-576. doi:10.1016/j.molcel.2020.03.032

Chaplin, A., Parra, P., Laraichi, S., Serra, F., & Palou, A. (2016). Calcium supplementation modulates gut microbiota in a prebiotic manner in dietary obese mice. *Mol Nutr Food Res, 60*(2), 468-480. doi:10.1002/mnfr.201500480

Constante, M., Fragoso, G., Lupien-Meilleur, J., Calve, A., & Santos, M. M. (2017). Iron Supplements Modulate Colon Microbiota Composition and Potentiate the Protective Effects of Probiotics in Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis. *Inflamm Bowel Dis, 23*(5), 753-766. doi:10.1097/MIB.0000000000001089

Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters (Recast) (Text with EEA relevance). 27 December 2022). Retrieved from https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32009L0054

Dostal, A., Baumgartner, J., Riesen, N., Chassard, C., Smuts, C. M., Zimmermann, M. B., & Lacroix, C. (2014). Effects of iron supplementation on dominant bacterial groups in the gut, faecal SCFA and gut inflammation: a randomised, placebo-controlled intervention trial in South African children. *Br J Nutr, 112*(4), 547-556. doi:10.1017/S0007114514001160

Ericsson, A. C., Hagan, C. E., Davis, D. J., & Franklin, C. L. (2014). Segmented filamentous bacteria: commensal microbes with potential effects on research. *Comp Med, 64*(2), 90-98. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24674582

Gentile, C. L., & Weir, T. L. (2018). The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science, 362*(6416), 776-780. doi:10.1126/science.aau5812

Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., . . . Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature, 411*(6837), 599-603. doi:10.1038/35079107

Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., . . . Littman, D. R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell, 139*(3), 485-498. doi:10.1016/j.cell.2009.09.033

Kaplan, G. G. (2015). The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 12*(12), 720-727. doi:10.1038/nrgastro.2015.150

Khan, I., Ullah, N., Zha, L., Bai, Y., Khan, A., Zhao, T., . . . Zhang, C. (2019). Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens, 8*(3). doi:10.3390/pathogens8030126

Knights, D., Silverberg, M. S., Weersma, R. K., Gevers, D., Dijkstra, G., Huang, H., . . . Xavier, R. J. (2014). Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med, 6*(12), 107. doi:10.1186/s13073-014-0107-1

Kortman, G. A., Mulder, M. L., Richters, T. J., Shanmugam, N. K., Trebicka, E., Boekhorst, J., . . . Tjalsma, H. (2015). Low dietary iron intake restrains the intestinal inflammatory response and pathology of enteric infection by food-borne bacterial pathogens. *Eur J Immunol, 45*(9), 2553-2567. doi:10.1002/eji.201545642

Leclerc, H., & Moreau, A. (2002). Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev, 26*(2), 207-222. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00611.x

Lee, D., & Hong, J. H. (2020). The Fundamental Role of Bicarbonate Transporters and Associated Carbonic Anhydrase Enzymes in Maintaining Ion and pH Homeostasis in Non-Secretory Organs. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(1). doi:10.3390/ijms21010339

Lewis, J. D., Chen, E. Z., Baldassano, R. N., Otley, A. R., Griffiths, A. M., Lee, D., . . . Bushman, F. D. (2015). Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe, 18*(4), 489-500. doi:10.1016/j.chom.2015.09.008

Liu, L., Zheng, Y., Ruan, H., Li, L., Zhao, L., Zhang, M., . . . He, S. (2022). Drinking natural water unchangeably is associated with reduced all-cause mortality in elderly people: A longitudinal prospective study from China. *Front Public Health, 10*, 981782. doi:10.3389/fpubh.2022.981782

Lloyd-Price, J., Arze, C., Ananthakrishnan, A. N., Schirmer, M., Avila-Pacheco, J., Poon, T. W., . . . Huttenhower, C. (2019). Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature, 569*(7758), 655-662. doi:10.1038/s41586-019-1237-9

Lopez, C. A., & Skaar, E. P. (2018). The Impact of Dietary Transition Metals on Host-Bacterial Interactions. *Cell Host Microbe, 23*(6), 737-748. doi:10.1016/j.chom.2018.05.008

Maraver, F., Vitoria, I., Ferreira-Pego, C., Armijo, F., & Salas-Salvado, J. (2015). Magnesium in tap and bottled mineral water in Spain and its contribution to nutritional recommendations. *Nutr Hosp, 31*(5), 2297-2312. doi:10.3305/nh.2015.31.5.8589

Martin, R., Henley, J. B., Sarrazin, P., & Seite, S. (2015). Skin Microbiome in Patients With Psoriasis Before and After Balneotherapy at the Thermal Care Center of La Roche-Posay. *J Drugs Dermatol, 14*(12), 1400-1405. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26659932

Mogna, L., Nicola, S., Pane, M., Lorenzini, P., Strozzi, G., & Mogna, G. (2012). Selenium and zinc internalized by Lactobacillus buchneri Lb26 (DSM 16341) and Bifidobacterium lactis Bb1 (DSM 17850): improved bioavailability using a new biological approach. *J Clin Gastroenterol, 46 Suppl*, S41-45. doi:10.1097/MCG.0b013e318268861d

Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., . . . Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol, 13*(9), R79. doi:10.1186/gb-2012-13-9-r79

Narciso, L., Martinelli, A., Torriani, F., Frassanito, P., Bernardini, R., Chiarotti, F., & Marianelli, C. (2022). Natural Mineral Waters and Metabolic Syndrome: Insights From Obese Male and Female C57BL/6 Mice on Caloric Restriction. *Front Nutr, 9*, 886078. doi:10.3389/fnut.2022.886078

Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L., & Tomov, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 14*(10), 573-584. doi:10.1038/nrgastro.2017.88

Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., . . . Virgin, H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell, 160*(3), 447-460. doi:10.1016/j.cell.2015.01.002

Oka, A., & Sartor, R. B. (2020). Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci, 65*(3), 757-788. doi:10.1007/s10620-020-06090-z

Piuri, G., Zocchi, M., Della Porta, M., Ficara, V., Manoni, M., Zuccotti, G. V., . . . Cazzola, R. (2021). Magnesium in Obesity, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes. *Nutrients, 13*(2). doi:10.3390/nu13020320

Quattrini, S., Pampaloni, B., & Brandi, M. L. (2016). Natural mineral waters: chemical characteristics and health effects. *Clin Cases Miner Bone Metab, 13*(3), 173-180. doi:10.11138/ccmbm/2016.13.3.173

Rocca, G., Dioni, F., Rocca, N., Oliveri, F., Brunetto, M. R., & Bonino, F. (2007). Thermal care of functional dyspepsia based on bicarbonate-sulphate-calcium water: a sequential clinical trial. *Evid Based Complement Alternat Med, 4*(3), 381-391. doi:10.1093/ecam/nel100

Said, H., & Kaunitz, J. D. (2016). Gastrointestinal defense mechanisms. *Curr Opin Gastroenterol, 32*(6), 461-466. doi:10.1097/MOG.0000000000000316

Sauer, A. K., & Grabrucker, A. M. (2019). Zinc Deficiency During Pregnancy Leads to Altered Microbiome and Elevated Inflammatory Markers in Mice. *Front Neurosci, 13*, 1295. doi:10.3389/fnins.2019.01295

Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Sansonetti, P. J., & Cerf-Bensussan, N. (2017). Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world. *Curr Opin Microbiol, 35*, 100-109. doi:10.1016/j.mib.2017.03.004

Seidler, U. E. (2013). Gastrointestinal HCO3- transport and epithelial protection in the gut: new techniques, transport pathways and regulatory pathways. *Curr Opin Pharmacol, 13*(6), 900-908. doi:10.1016/j.coph.2013.10.001

Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanovic-Radic, Z., Dimitrijevic, M., Aleksic, A., Neffe-Skocinska, K., . . . Calina, D. (2020). Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. *Medicina (Kaunas), 56*(9). doi:10.3390/medicina56090433

Shi, Z., Zou, J., Zhang, Z., Zhao, X., Noriega, J., Zhang, B., . . . Gewirtz, A. T. (2019). Segmented Filamentous Bacteria Prevent and Cure Rotavirus Infection. *Cell, 179*(3), 644-658 e613. doi:10.1016/j.cell.2019.09.028

Totaro, M., Casini, B., Valentini, P., Miccoli, M., Lopalco, P. L., & Baggiani, A. (2018). Assessing natural mineral water microbiology quality in the absence of cultivable pathogen bacteria. *J Water Health, 16*(3), 425-434. doi:10.2166/wh.2018.183

Toxqui, L., & Vaquero, M. P. (2016). An Intervention with Mineral Water Decreases Cardiometabolic Risk Biomarkers. A Crossover, Randomised, Controlled Trial with Two Mineral Waters in Moderately Hypercholesterolaemic Adults. *Nutrients, 8*(7). doi:10.3390/nu8070400

Trapani, V., Petito, V., Di Agostini, A., Arduini, D., Hamersma, W., Pietropaolo, G., . . . Scaldaferri, F. (2018). Dietary Magnesium Alleviates Experimental Murine Colitis Through Upregulation of the Transient Receptor Potential Melastatin 6 Channel. *Inflamm Bowel Dis, 24*(10), 2198-2210. doi:10.1093/ibd/izy186

Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., Imaoka, A., & Itoh, K. (1999). Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infect Immun, 67*(7), 3504-3511. doi:10.1128/IAI.67.7.3504-3511.1999

Vannucci, L., Fossi, C., Quattrini, S., Guasti, L., Pampaloni, B., Gronchi, G., . . . Brandi, M. L. (2018). Calcium Intake in Bone Health: A Focus on Calcium-Rich Mineral Waters. *Nutrients, 10*(12). doi:10.3390/nu10121930

Wallace, J. L., Vong, L., McKnight, W., Dicay, M., & Martin, G. R. (2009). Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology, 137*(2), 569-578, 578 e561. doi:10.1053/j.gastro.2009.04.012

Whisner, C. M., Martin, B. R., Nakatsu, C. H., McCabe, G. P., McCabe, L. D., Peacock, M., & Weaver, C. M. (2014). Soluble maize fibre affects short-term calcium absorption in adolescent boys and girls: a randomised controlled trial using dual stable isotopic tracers. *Br J Nutr, 112*(3), 446-456. doi:10.1017/S0007114514000981

Zackular, J. P., Moore, J. L., Jordan, A. T., Juttukonda, L. J., Noto, M. J., Nicholson, M. R., . . . Skaar, E. P. (2016). Dietary zinc alters the microbiota and decreases resistance to Clostridium difficile infection. *Nat Med, 22*(11), 1330-1334. doi:10.1038/nm.4174

Zeichner, J., & Seite, S. (2018). From Probiotic to Prebiotic Using Thermal Spring Water. *J Drugs Dermatol, 17*(6), 657-662. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29879253

10. BÖLÜM / CHAPTER 10

MİKROBİYOM ANALİZİ

MICROBIOME ANALYSIS

Uğur SEZERMAN[1], Ali ARSLAN[2], Pınar ONAT[3], Berkay Yekta EKREN[4]

[1]Prof, Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: Ugur.Sezerman@acibadem.edu.tr

[2]MSc, Epigenetiks Genetik Biyoinformatik Yazılım A.Ş, İstanbul, Türkiye
E-mail: aliarslan@epigenetik.com.tr

[3]MSc, Epigenetiks Genetik Biyoinformatik Yazılım A.Ş, İstanbul, Türkiye
E-mail: pinaronat@epigenetiks.com.tr

[4]MSc, Epigenetiks Genetik Biyoinformatik Yazılım A.Ş, İstanbul, Türkiye
E-mail: berkayekren@epigenetiks.com.tr

DOI: 10.26650/B/LS34CH11CH22/2024.011.010

ÖZ

Moleküler biyolojik araştırmalar, başarılı sonuçlar elde etmek için bir dizi hassas adım içerir. Örnek alımı ve laboratuvara taşınma koşulları, numunelerin doğru toplanması ve taşınmasının yanı sıra laboratuvar kontaminasyonunu önlemek açısından kritiktir. DNA izolasyonu, doğru kit seçimi ile beraber genetik materyalin saflaştırılmasını sağlar, bu da sonraki adımlarda güvenilir verilerin temelini oluşturur. PCR öncesi ve sonrası hazırlık adımları, kontaminasyon riskini azaltmak için özenle yapılmalıdır. Kütüphane hazırlama aşamasında ortaya çıkabilecek problemler, sonuçların güvenilirliğini etkileyebilir. Dizileme öncesi ve sonrası hazırlık basamaklarındaki potansiyel sorunlar, dizileme verilerinin kalitesini etkileyebilir. Dizileme temelli problemler, veri analizi sırasında karşılaşılabilir. Büyük veri miktarının yönetimi ve yorumlanması zorlu olabilir. İleri biyoenformatik ve istatistik analizler, bu verilerin anlamlı sonuçlara dönüştürülmesine yardımcı olur. Son olarak, mikrobiyom analizleri de genetik araştırmaların önemli bir yönünü oluşturur. Mikrobiyom, vücuttaki mikroorganizmaların toplamını ifade eder ve sağlık durumuyla ilişkilendirilebilir. Bu analizler, sindirim, bağışıklık ve diğer birçok sürecin anlaşılmasına katkı sağlar, böylece hastalıkların tanınması ve tedavisi daha iyi hedeflenebilir..

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyom, Mikrobiyota, Yeni Nesil Dizileme, DNA

ABSTRACT

Molecular biological research involves a series of delicate steps to achieve successful results. Specimen collection and transport to the laboratory conditions are critical to the correct collection and transport of specimens, as well as to avoid laboratory contamination. DNA isolation, together with the right kit selection, ensures the purification of the genetic material, which forms the basis of reliable data in the next steps. Pre- and post-PCR preparation steps must be performed with care to reduce the risk of contamination. Problems that may arise during library preparation may affect the reliability of the results. Potential problems in the pre- and post-sequencing preparation steps can affect the quality of the sequencing data. Sequencing-based problems can be encountered during data analysis. Managing and interpreting large amounts of data can be challenging. Advanced bioinformatics and statistical analysis help transform these data into meaningful results. Finally, microbiome analyzes form an important aspect of genetic research. Microbiome refers to the totality of microorganisms in the body and can be associated with health status. These analyzes contribute to the understanding of digestion, immunity, and many other processes so that disease recognition and treatment can be better targeted.

Keywords: Microbiome, Microbiota, Next Generation Sequencing, DN

Extended Abstract

Molecular biological research is a pivotal endeavor encompassing a sequence of intricate stages designed to unravel and manipulate genetic material. This comprehensive process spans from sample acquisition to data interpretation, with each phase demanding meticulous forethought and skillful execution. The groundwork of research rests upon the conditions governing sample procurement and transport to the laboratory. The precision of sample collection and storage bears significant influence on result credibility, while concurrently mitigating the risks of contamination during transit to the laboratory. The preservation of suitable temperature, humidity, and other environmental parameters assumes paramount importance in sample transportation. At the nucleus of this process lies DNA isolation, a fundamental stride for purifying genetic material. Optimal kit selection is pivotal in attaining efficient and dependable outcomes. The selection of an appropriate isolation technique hinges upon the sample type and research objectives. High-quality DNA isolation constitutes an essential prerequisite for ensuing steps. PCR (Polymerase Chain Reaction) is a technique employed to amplify target segments of genetic material. However, pre- and post-PCR phases necessitate careful consideration of multiple factors. Diligent measures must be adopted to diminish contamination risks, enhance reaction specificity, and avert erroneous conclusions. Preceding sequencing, library preparation stands as a pivotal juncture. This stage entails amalgamating genetic material with adapters and indices. Careful attention is vital to circumvent sample intermixing, adapter dimers, and suboptimal library efficiency. The caliber of library preparation bolsters the reliability of sequencing data. Equally crucial are the pre- and post-sequencing preparation stages. Factors such as DNA quality, library

efficiency, and sequencing platform selection bear implications on the quality of sequencing outcomes. Following sequencing, rectification of erroneous bases and excision of low-quality regions amplify data fidelity. Predominantly, challenges arise during data analysis stages. The manipulation and interpretation of voluminous data sets present formidable hurdles. Processes encompassing data alignment, variant detection, and derivation of meaningful inferences necessitate a proficient grasp of bioinformatics. The complexities inherent in the data analysis phase impel researchers to optimize data utilization to yield accurate results. Advanced bioinformatics and statistical analyses empower the elucidation of meaningful insights from genetic data. Applications encompassing gene expression analysis, pathogen detection, and phylogenetic studies find their foothold in this domain. The judicious selection of parameters in analyses is pivotal to ensure result reliability. Beyond these genetic research stages, microbiome analyses emerge as a pivotal facet. The microbiome encapsulates the entirety of microorganisms inhabiting the body. Its influence pervades various processes including digestion, immunity, and overall well-being. Microbiome analyses catalyze the development of precise and tailored approaches to disease diagnosis and treatment. In essence, molecular biological research constitutes a multi-pronged journey from sample collection to data interpretation. Rigorous and meticulous planning of each phase stands as a cornerstone for accruing accurate outcomes. Furthermore, it remains essential to recognize that microbiome analyses represent a pivotal extension of genetic research. These analyses furnish a pivotal tool for comprehending human health, and for augmenting our insight into disease management and mitigation.

1. Örnek Alımı ve Laboratuvara Taşınma Koşulları

İnsan vücudunun çeşitli bölgelerinde (örneğin ağız, boğaz, solunum yolları, gastrointestinal sistem (GI), deri ve genitoüriner sistem), hastalık oluşturmayan mikroorganizmalar bulunur. Önceden normal flora olarak adlandırılan bu durum artık mikrobiyota veya mikrobiyom terimleriyle ifade edilmektedir.

Mikrobiyota terimi ilk olarak insan vücudunda yaşayan mikroorganizmaların sağlık ve hastalık üzerindeki önemini vurgulayan Lederberg ve McCray tarafından tanımlanmıştır. Bu mikrobiyal nüfus sayımı, ağırlıklı olarak 16S rRNA genlerinin, 18S rRNA genlerinin veya diğer işaretleyici genlerin ve genomik bölgelerin, verilen biyolojik örneklerden amplifiye edilmiş ve dizileme analizine dayanan moleküler yöntemler kullanılarak oluşturulur. Taksonomik atamalar, filumdan türe farklı taksonomik seviyelerde her diziyi bir mikrobiyal taksona (bakteri, arke veya alt ökaryotlar) atayan çeşitli araçlar kullanılarak gerçekleştirilir (Lederberg ve McCray, 2001).

Mikrobiyom terimi ise mikroorganizmalar (bakteriler, arkeler, alt ve üst ökaryotlar ve virüsler), genomları (yani genler) ve çevredeki çevresel koşullar dahil olmak üzere tüm habitatı ifade eder. Bu tanım, belirli ortamların biyotik ve abiyotik faktörleri olan "biyom" tanımına dayanmaktadır. Alandaki diğer tanımlamalar, mikrobiyomu mikrobiyota üyelerinin genlerinin ve genomlarının toplanmasıyla sınırlar. Çevre ile birleşerek mikrobiyomu oluşturan metagenomun tanımının bu olduğu ileri sürülür. Mikrobiyom, klinik veya çevresel meta verilerle birleştirilmiş metagenomik, metabolomik, metatranskriptomik ve metaproteomiklerden birinin veya kombinasyonlarının uygulanmasıyla karakterize edilir (Marchesi ve Ravel, 2015).

İnsan vücudunun mikrobiyotasında özellikle bağırsakta meydana gelen değişikliklerin birçok hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Nükleik asit dizi analizi tekniklerinin gelişmesiyle birlikte, mikroorganizmaların çeşitliliği ve bolluğu ölçülebilir hale gelmiş ve bu konuda birçok bilimsel araştırma başlatılmıştır. Bu tür çalışmalarda en önemli adımlardan biri, hatta belki de en önemli basamak; örneklerin toplanması, transferi, uygun koşullarda saklanması ve uygun koşullarda dizilemeye hazır hale getirilmesidir. Bu aşamalarda meydana gelebilecek hatalar ve eksiklikler, çalışmanın sonucunu önemli ölçüde etkiler (Körooğlu, 2017). Kısaca mikrobiyom çalışmaları, aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır; Farklı çalışma gruplarının oluşturulması ve vakaların seçimi, örneklerin uygun yöntemlerle elde edilmesi (toplanması, taşınması, stabilizasyonu ve saklanması), uygun nükleik asit izolasyonu yapılması, moleküler çalışmaların gerçekleştirilmesi (amplifikasyon- dizileme analizi), elde edilen sonuçların analizi ve yorumlanması ve gerektiğinde raporlanması. Kontrol grubu

için seçilecek bireyler, araştırmanın amacına bağlı olarak özenle seçilmeli ve kontrollü bir dahil edilme ve dışlama kriterlerine dayanmalıdır.

Bu kriterler kısaca;yaş, cinsiyet, antibiyotik kullanımı geçmişi, glisemik kontrol ilaçları (metformin vb.), mide asit düzenleyicileri, kortikosteroidler, sitokinler, immün baskılayıcı ilaçlar veya doğru suş seçimi olmadan önerilen ve kullanılan probiyotikler gibi faktörler dışında, menopoz, ergenlik gibi hormonal durumlar, sigara ve alkol tüketimi alışkanlıkları, diyet alışkanlıkları, diyet takviyeleri kullanımı ve yakın zamanda yapılan diyet değişiklikleri, beslenme eksiklikleri, fiziksel aktiviteler, kilo (vücut kitle indeksi), kanser, bağışıklık sisteminin zayıflaması, belirlenmiş kronik hastalık öyküsü, ağız ve diş sorunları (örneğin; sekiz (8) 'den fazla diş eksikliği olan bireyler bazı çalışmalarda dışlanmıştır (Körooğlu, 2017).

Literatürde, bu alandaki çoğu çalışma bağırsak mikrobiyotası üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmalarda incelenebilecek örnekler arasında dışkı, rektal sürüntü, doku örnekleri, mukozal biyopsi ve bağırsak mukozal lavaj örnekleri bulunabilir. Genellikle bağırsak mikrobiyota çalışmalarında dışkı örneği kullanılmaktadır. Ancak, dışkı mikrobiyotasının gastrointestinal sistemdeki diğer bölgelerin mikrobiyotasından farklı olduğu unutulmamalıdır. Gastrointestinal sistemde farklı bölgelerde farklı sayılarda bakteriler bulunmaktadır. Bununla birlikte, dışkı örneğinin kullanılmasının nedenleri vardır.

Dışkı örneği hastalardan direkt olarak alınmaktadır, nispeten kolay toplanabilir (hasta evde kendi kendine alabilir) ve maliyet açısından daha uygundur. Dışkının kolon mikrobiyotasındaki genel varyasyonları yeterince iyi yansıttığı düşünülmektedir. Ancak, planlanan çalışmada bağırsak lümenine erişim sağlayan endoskopik veya cerrahi bir girişim varsa, dışkı örneği alınmayabilir. Bağırsak mikrobiyota çalışmaları için dışkı örneklerinin toplanması konusunda tamamen standardize edilmiş bir örnek türü veya yöntem olmasa da, referans yöntem olarak hızlı dondurma (şok yöntemi) kullanılabilir. Bu yöntemde dışkı örneği doğrudan -80°C'de hızlı bir şekilde dondurulur. Bazı bakterilerin miktarlarında değişiklikler olabilir, ancak DNA taze bir örnekten izole edildiğinde önemli bir fark görülmez. Hızlı şok dondurma sürecinde, hücre bütünlüğü normalden daha az korunabilir veya yok olabilir. Hastalar evde örneği -20°C'de dondurabilir ve daha sonra laboratuvara getirebilir. Ancak, nakliye sırasında soğuk zincir koşullarının sağlanması zor olabilir. Bu nedenle, dışkı örneklerinin doğrudan hastanede dondurulması daha uygundur. Çözdürme-dondurma işlemi, DNA izolasyonu yapılmadan önce gerçekleştirilmemelidir, çünkü bu DNA'nın bozulmasına neden olabilir. Birden fazla örnek almak, tek bir örneğin kullanılmasından daha yararlıdır. Dışkı örneğinin dondurulmasıyla ilgili teknik sınırlamalar olduğundan, alternatif çözümler de uygulanabilir. Bazı çalışmalar, dışkı örneğinin aerobik koşullarda iki saate kadar bekleyebileceğini ve 16S rRNA'nın 20°C'de

bir (1) veya yirmi iki 22 gün boyunca bozulmadan kalabildiğini bulmuştur (Körooğlu, 2017). Ancak bu durum, örneğin oda sıcaklığında saklanan sürüntü örnekleri için geçerli değildir ve mantar üremesi gibi sorunlarla karşılaşılabilmektedir. Bu sorunlar göz önüne alındığında, alternatif çözüm yollarından biri, örneklerin +4°C'de kısa süreli (ve <12 saat) depolanması ve mümkünse dondurulması veya kesinlikle anaerobik koşullar altında (DNA ekstraksiyonundan önce oksijene duyarlı bakterilere zarar vermemek için) saklanması olabilir (Körooğlu, 2017). Diğer bir seçenek ise stabilizasyon tamponunu kullanmaktır.

Son zamanlarda, bağırsak mikrobiyotası çalışmaları için rektal ve fekal sürüntüler kullanılmıştır. Dışkı örneklerine göre küçük farklılıklar olduğu belirtilmiş ve bu örneklerin daha kullanışlı, eldesi daha basit ve dolayısıyla daha büyük araştırmalar için uygun olduğu ifade edilmiştir (Körooğlu, 2017). Aynı kişilerden alınan dışkı örnekleri ve sürüntü örneklerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, yeterli araştırma yapılmadığı için dışkı örneğinin yerini tam olarak tutamaz. Bağırsak mikrobiyota çalışmaları genellikle ağız, genitoüriner sistem, cilt, solunum yolu, burun, plasenta, anne sütü ve göz gibi farklı bölgelere odaklanmaktadır. Ürogenital sistem mikrobiyota çalışmalarında idrar, vajinal sürüntü, servikal sürüntü, üretral sürüntü, penil sürüntü, deri sürüntüsü ve fırça örnekleri (cytobrush) gibi uygun örnekler kullanılabilir. Diğer vücut bölgelerinden ise ağız, dil, dişler, diş eti altı/supragingival bölgelerinden oral örnekler, burun sürüntüleri, diğer solunum örnekleri, göz örnekleri, plasenta, anne sütü örnekleri ve diğer birçok sürüntü veya doku örneği mikrobiyota çalışmaları için kullanılabilir. Bağırsak mikrobiyota analizi için uygun olan tek bir DNA ekstraksiyon yöntemi bulunmamaktadır. Yüksek kaliteli ve saf DNA elde edilmesi gerekmektedir.

Avrupa MetaHIT konsorsiyumu ve Amerikan İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) tarafından kullanılan DNA ekstraksiyon protokollerinin sırasıyla daha iyi ökaryotik veya prokaryotik DNA geri kazanımı elde edildiği bildirilmiştir (Thomas et al., 2015).

Dışkı örneği toplamada önemli olan kriterler içerisinde, örneğin kurumasını önlemek ve bir fiksatif içine konulması bulunmaktadır. Konsantrasyon için, stabilizasyon tamponunda seyreltilmiş numunelerin, DNA ekstraksiyonundan önce konsantre edilmesi gerekebilir. İş amaçlarına uygun çözümler düşünülmelidir. Numunelerin temizlenmesi de önemlidir; potansiyel inhibitör maddelerin (dışkı, aromatik asitler vb.) uzaklaştırılması gerekmektedir. Ticari ürünler bu özelliklere sahiptir ve polivinil polipirolidon (PVPP) gibi maddeler genellikle manuel prosedürlerde kullanılır. Dışkının PCR ve nükleik asit dizileme sonuçlarını etkileyebilecek birçok inhibitör madde içerdiği düşünüldüğünde, bu adımın önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Etkili ve verimli bir mikrobiyom profillemesi için, DNA miktarını ve kalitesini en üst düzeye çıkaran örnekleme yöntemlerine ihtiyaç vardır. Sürüntü yönteminin, dışkı DNA'sını

örneklemek için diğer metodlara göre daha etkili olduğu ve daha uygun saklama koşullarını içerdiği bulunmuştur. Bu yöntem, dışkı örneklerinin dış kısmındaki hücreleri de hedeflediğinden tam pelet toplamayla ilişkili laboratuvar işlem süresini azaltır ve daha yüksek kalitede veri sağlar (Körooğlu, 2017).

1.1 Depolama Yöntemleri

1.1.1 Kuru depolama: Kuru toplanan numuneler daha küçüktür ve etanol içindeki numuneler veya swablardan daha hafiftir, bu da uzak saha çalışmalarında taşınmalarını daha uygun hale getirir. Ancak, koruyucu tampon olmadan kuru olarak saklanan numuneler, silika kurutma paketlerinde veya buzdolabında bile nemin devam etmesine ve birkaç hafta içinde küflenme eğilimi göstermelerine neden olur. Bu nedenle, kuru toplanan numuneler anında ekstraksiyon için uygundur, ancak daha uzun süre bekleyebilecek numuneler için önerilmez. Ayrıca, kuru numunelerin laboratuvar ortamında ekstraksiyonu daha zahmetli olabilir. Dışkı parçacıkları genellikle DNA ekstraksiyonu sırasında kolonları tıkar ve yalnızca DNA'dan oluşan bir çözeltiye girmesini önlemek zordur. Kurutulmuş dışkı topakları, ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılan lizis tamponunu emebilir. Bu da daha fazla reaktif kullanımını gerektirerek, daha pahalı bir ekstraksiyon işlemine yol açabilir.

1.1.2 Etanol ile depolama: Etanol içindeki numuneler, dışkı materyalinden DNA toplamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, kuru numunelerin uzun süreli saklama sorunlarına sahip olmamasına rağmen hem numune toplama hem de laboratuvar işlemi sırasında kendi zorluklarına yol açar. Numune toplama aşamasında, sahaya etanol getirilmesi gerekmektedir, bu da ek ağırlık ve malzeme gerektirir. Etanolün sahada kullanılması, dökülmelere ve numune kontaminasyonuna yol açabilecek olumsuzluklar yaratabilmektedir. Ayrıca, etanolün sahada temin edilmesi ve depolanması lojistik zorluklar oluşturabilir. Bunun yanı sıra, büyük miktarlarda etanol taşınması güvenlik endişeleri doğurur ve özel saklama ve taşıma gerektirebilir. Laboratuvara getirildikten sonra etanol içinde saklanan numuneler, kuruma veya küflenmeye eğilimli olmadıkları için kuru numunelere göre daha kolay yönetilebilir. Ancak, kuru numuneler gibi, etanol içinde depolanan dışkı topaklarının işlenmesi, nihai DNA ekstraksiyonunda inhibisyon riskini artırır. Bu nedenle, etanol içindeki numunelerin kullanılması, avantajları ve dezavantajları dikkate alınarak tercih edilmelidir. Her bir yöntemin laboratuvar protokolleri ve özel gereksinimleri olduğu unutulmamalıdır.

1.1.3 Sürüntü yöntemi ile depolama: Sürüntü başlıklarının lizis tamponunda saklanması, sahada kuru veya etanol yöntemlerine kıyasla daha fazla zaman almasına rağmen daha güvenli ve kontaminasyon oranı daha düşüktür. Sürüntü numuneleri, konak hücrelerin doğrudan

depolama tamponunda parçalandığı için toplama sonrasında titreşim, güneş ışığı, ısı veya nemden kaynaklanan bozunmaya karşı daha az hassasiyet gerektirir. Ayrıca, kuru numunelerin aksine, sürüntü numuneleri laboratuvara hemen geri gönderilmek zorunda değildir. Sürüntü numuneleri daha küçük ve daha hafif oldukları için taşınması daha kolaydır ve dolayısıyla tek bir saha gezisi sırasında etanol örneklerine kıyasla daha fazla sayıda sürüntü örneği toplamak da mümkündür. Bu da sahada daha fazla veri toplama imkânı sağlar. Bu nedenlerle, sürüntü numuneleri genellikle daha az endişe verici bir seçenek olarak değerlendirilir. Ancak, her bir yöntemin avantajları ve dezavantajları dikkate alınarak çalışma amaçlarına uygun olan yöntem seçilmelidir. Laboratuvar ortamında, sürüntülenmiş numuneler kuru ve etanol numunelerine kıyasla daha az reaktif gerektirir ve bütün peletlerden ekstraksiyon yaparken gözlemlediğimiz lojistik problemlere daha az eğilimlidir. Sürüntü yöntemi, birçok ayrı numunenin toplu olarak işlenmesine en uygun olduğu için laboratuvar süresi açısından en az yoğun olan yöntemdir. Hücre parçalanması doğrudan sahada hazırlanan numune tüpünde meydana geldiği için, tekrarlayıcı pipet, ayarlanabilir genişlikte çok kanallı pipet ve plaka bazlı silika kolon ekstraksiyonları gibi araçlar kullanılarak ekstraksiyon prosedürü büyük ölçüde hızlandırılabilir. Bu araçların birlikte kullanılmasıyla, 96 numune için tüm izolasyon prosedürünün üç saatlik bir çalışma süresi kadar kısa sürede tamamlanması mümkündür. Bununla birlikte, dışkı peletlerinin daha az verimli bir şekilde işlenmesi ve inkübasyon süresi nedeniyle kuru ve etanol numunelerinin ekstraksiyonu yaklaşık iki ila üç kat daha uzun sürebilir. Verimlilik kazanımları için diğer potansiyel yöntemler arasında silika plakalar, vakum manifoldları ve ekstraksiyon robotları yerine manyetik boncuk ekstraksiyonları da yer alır.

1.2 Ek hususlar

1.2.1 Saklama süresi: Sürüntü örnekleriyle yapılan genişletilmiş çalışmada, örnekleri 4-59 gün aralığında depoda tutulmuş ve sahadan toplama ile laboratuvarda DNA ekstraksiyonu arasında geçen sürenin uzamasıyla genotipleme performansında çok hafif düşüşler bulunmuştur. Bu nedenle, DNA'nın depolama sırasında zamanla bozulabileceği görüldüğünden, numunelerin toplandıktan sonra mümkün olan en kısa sürede ekstrakte edilmesi önerilir. Ancak, iki ay boyunca bekleyen numuneler için bile başarı oranlarının çok yüksek olduğu da bilinmektedir. (Bach et al., 2022)(**Tablo 1**).

1.2.2 İnhibisyon: Yüksek bir genotip geri kazanım başarısı elde edilmesine rağmen, sürüntülenmiş numuneler de dahil olmak üzere diğer yöntemlerde ve dışkı numunelerinde de, DNA ekstraktlarının 6-9-12 ay periyotlarında azalmalar meydana geldiği ayrıca saklama koşullarının uygun olmadığı durumlarda (uygun olmayan ısı, uygun olmayan dondurma aralıkları +4,-20,-40,-80 °C) seçildiğinde örneklerin inhibe olduğu görülmüştür. Özellikle elektrik

kesilmelerinin fark edilmemesi yahut jeneratör sistemlerinin devreye girmemesi durumlarında eriyen örneklerin maruz kaldığı sıcaklık ile de inhibisyon görülmektedir.

1.2.3 Örneğin Taşınması

Taze dışkıdan anında DNA ekstraksiyonu veya -80°C'de hızlı dondurma, mikrobiyom çalışmalarında altın standart olarak kabul edilen prosedürlerdir, ancak uygulanmaları zor olabilir. Şimdiye kadar, birkaç numune koruyucu madde bildirilmiştir, ancak çoğu koruyucu, canlı veya ölü hücrelerden elde edilen DNA arasında ayrım yapamaz ve bakterilerin kültürlenmesini engeller. Cary-Blair besiyeri gibi besin içermeyen tamponlar, bakteriyel aşırı büyümeyi baskılar, potansiyel enterik patojenlerin uzun süreli hayatta kalmasına izin verir ve bu nedenle organizmaların izolasyonunda kullanılabilir.

Cary-Blair besiyerinin kullanımının bir diğer avantajı, belirli hastalıklarla ilişkili organizmaların izolasyonunda kullanılabilmesidir (Lagier et al., 2015). Bununla birlikte, çoğu koruyucu madde canlı veya ölü hücrelerden elde edilen DNA'yı ayırt etme yeteneğine sahip değildir (Song et al., 2016). Bu hipotezi test etmek amacıyla, koruyucu madde içermeyen taze ve -80°C numunelerle Cary-Blair besiyeri veya RNAlater (RNA Stabilizasyon Kimyasalı) ortamındaki bakteri hayatta kalma sayıları incelenmiştir. Sonuçlar, hayatta kalma sayılarının RNAlater (RNA Stabilizasyon Kimyasalı) numunelerinde Cary-Blair numunelerine göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu avantaja ek olarak, Cary-Blair besiyeri mikrobiyom çalışmalarında kullanılan koruyucular arasında en ucuz olanıdır, kap başına maliyeti 0,50 ABD dolarından daha azdır (Nagata et al., 2019).

Yapılan çalışmalar, koruma yöntemlerinin dışkı örneklerinden geri kazanılan bağırsaktaki anaerop bakterilerin zenginliğini ve taksonomik çeşitliliğini kısmen belirlediğini göstermektedir. Bu nedenle, mevcut standart uygulama olan dışkı numunelerinin kuru koşullarda dondurularak saklanması yöntemi, DMSO'lu Cary-Blair ortamı gibi diğer koruma koşullarıyla tamamlanmalıdır. Bu şekilde, bağırsakla ilişkili kültür koleksiyonlarındaki tür çeşitliliğinin arttırılabileceği belirtilmektedir (Biclot et al., 2022).

Tablo 1. DNA toplanma ve saklanmasına yönelik yöntemlerin artıları ve eksileri (Bach et al., 2022)

Depolama ve Örnek Alma Metodları	Avantaj	Dezavantaj
Etanol	• En uzun depolama • Mantar sorunu olmaması • DNA ekstraksiyonu sırasında kuru numunelere göre daha az lizis tamponu gerektirir.	• Alanda etanol depolama zorluğu • Numuneler ağır olabilir (etanol ve pelet ağırlığı) • Etanolün sızma ve buharlaşma potansiyeli • Son derece yanıcı ve zehirli • DNA ekstraksiyonundan önce etanolü buharlaştırmak için zaman gerekir. • DNA ekstraksiyonu sırasında bazı tıkanmış kolonlar • Daha taze durumdaki numuneler, etanol içinde topaklanma nedeniyle beklenenden daha düşük başarı oranı gösterebilir. • Malzeme ve işçilik maliyetleri nedeniyle nispeten daha pahalı
Kuru	• Sahada kolay toplama, yalnızca zarf gerektirebilir. • Nispeten kompakt depolama • Düşük yanıcılık ve toksisite	• Depolama sırasında, özellikle numuneler ıslak toplandığında küflenebilir • Uzun süreli depolamada DNA'nın bozulması • En düşük başarı oranı • Ekstraksiyonlar için gereken en uzun süre • Malzeme ve işçilik maliyetleri nedeniyle nispeten daha pahalı
Süründü (Swab)	• Dışkı peletleri toplamaya gerek olmaması • Küf sorunu olmaması • Kuru numunelerden daha uzun süre depoda kalabilmesi • Depolamanın kompakt olması • Düşük yanıcılık ve toksisite • Mikrosatelit analizinde en büyük başarı elde edilmesi • Laboratuvarda dışkı malzemesiyle uğraşma derdinin olmaması • Ekstraksiyon yöntemlerinin en hızlısı • Ekstraksiyon sırasında maliyetli lizis buffer eklemesi gerekmemesi • Malzeme ve işçilik açısından en düşük maliyet	• Daha fazla malzeme gerektirir (süründü, tüp, tampon, peletleri tutmak için alet) • DNA ekstraksiyonundan önce inkübatörde daha fazla zaman gerektirir • Tekrar edilme şansı olmayan örneklerin olması • Belirli swab ve tüp kombinasyonları, pipetlemede zorluk yaratır (daha küçük bir swab veya daha yuvarlak bir alt tüp olması en iyisidir)

2. DNA İzolasyonu ve Uygun Kit Seçimi

Numune toplama, saklama koşulları ve DNA ekstraksiyon yöntemleri, mikrobiyom profili sonuçlarını etkileyebilmektedir (Neuberger-Castillo et al., 2020). Dışkı örnekleri, gastrointestinal sistem (GİS) mikroorganizmaların analizi için invazif olmayan bir örnek olması nedeniyle avantaj sağlar. GİS mikrobiyotası, gıda sindirimi ve besin alımı, patojenlerin nötralize edilmesi ve bağışıklık sistemimizin şekillendirilmesi gibi sağlığımıza ve esenliğimize önemli katkılar sağlayan yüz trilyon bakteriyi içerir (Tappenden ve Deutsch, 2007). Bu nedenle, GİS mikrobiyotasının kapsamlı bir şekilde karakterize edilmesi için çeşitlilik analizi ve fonksiyonel metagenomik için son zamanlarda geliştirilen yüksek verimli araçlar kullanılmaktadır (Salonen et al., 2010; Zoetendal et al., 2008).

Dışkı mikrobiyotası bireye özgüdür ve çoğunlukla Firmicutes (Bacillota), Bacteroidetes (Bacteroidota), Actinobacteria (Actinomycetota), Proteobacteria (Pseudomonadota) ve Verrucomicrobia (Verrucomicrobiota) şubelerine ait binlerce tür düzeyinde filotiplerden oluşur (Dethlefsen et al., 2008; Rajilić-Stojanović et al., 2007). GI ekosistemine hâkim olan Gram-pozitif bakterilerin yanı sıra, Bacteroidetes, Proteobacteria ve Verrucomicrobia gibi Gram-negatif bakteriler de baskın taksonlardır. Bakteriyel çeşitlilikte olduğu gibi, bağırsak arkeleri sadece *Methanobrevibacter smithii* ve *Methanosphaera stadtmanae*'den oluşur (Eckburg et al., 2005; Scanlan et al., 2008). Bu metanojenler, bağırsak besin ağının son seviyesinde hidrojen ve diğer fermantasyon ürünlerini metabolize ederek bağırsak ekosisteminin dinamiklerini düzenlerler (Samuel et al., 2007). Metanojenlerin yaygınlığı %33 ila %96 arasında değişir ve taşıyıcının sağlık durumunu yansıtabilir (Scanlan et al., Schwiertz et al., 2009; Dridi et al., 2009; Zhang et al., 2009).

Dışkı örneğinin düzensiz fiziko-kimyasal yapısı ve heterojen mikrobiyota bileşimi, temsili metagenomik DNA'nın elde edilmesini zorlaştırır (Swidsinski et al., 2008). Dışkı numunelerindeki bakterileri parçalamak için farklı yaklaşımlar kullanılabilir, bu yaklaşımlar mekanik, enzimatik ve kimyasal basamakları içerebilir ve tek başına veya kombinasyon halinde kullanılabilir. Yüksek basınç veya ultrasonik yöntemler de uygulanabilir, ancak mekanik parçalama yöntemleri genellikle bilye vuruşlarına dayanır. Dışkı DNA ekstraksiyonunda boncuk vurma yönteminin avantajı, etkinliği ve aynı anda numune homojenizasyonunu sağlamasıdır. Bu sayede, lizis tamponunun dışkı örneğine kıvamına bağlı olarak eşit şekilde nüfuz etmesi sağlanır. Ancak, mekanik parçalamanın bir dezavantajı, DNA'nın kesilmesine neden olan mekanik hasarın, bozulmamış kromozomlara dayanan uygulamaların kullanımını sınırlamasıdır (de Lipthay et al., 2004). Kimyasal ve enzimatik lizis yöntemleri daha hassastır, ancak dışkıdan

tüm hedef organizmalara sınırlı mekansal erişim ve farklı hücre tipleri için seçicilik nedeniyle ekstraksiyon farklılığına yol açabilir (Morita et al., 2007).

Mevcut fekal DNA ekstraksiyon yöntemlerinin bazıları, hücre lizis etkinlikleri (Morita et al., 2007), DNA verimi ve PCR performansı (Nechvatal et al., 2008; Yu ve Morrison, 2004; Anderson ve Lebepe-Mazur, 2003) gibi faktörlere dayanarak karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar, DNA ekstraksiyon yönteminin sonuçta ortaya çıkan mikrobiyota kompozisyonunu etkilediğini göstermiştir, ancak metodolojik varyasyonun, bireyler arasındaki varyasyona kıyasla daha az olduğu belirtilmiştir (Li et al., 2007; Scupham et al., 2007). Bununla birlikte, uygulanan teknikler, çıkarılan taksonların farklılaşmasını tanımlamaya izin vermemiştir. Test edilen yöntemler arasında Qiagen'in ticari QIAamp Stool Kit'i, yüksek ekstraksiyon verimliliği ve PCR uyumluluğu göstermiştir (Nechvatal et al., 2008; McOrist et al., 2002; Scupham et al., 2007). Bu yöntem, insan dışkısından topluluk DNA'sının ekstraksiyonunda sıkça kullanılmaktadır (Dethlefsen et al., 2008; Li et al., 2007; Zoetendal et al., 2006; Eckburg et al., 2005; Zhang et al., 2009; Khachatryan et al., 2008; Palmer et al., 2007).

Sağlıklı bireylerin dışkı örneklerinin bakteri kompozisyonları, çeşitli gruplar arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin, Bacteroidetes türleri veya Actinobacteria gibi bazı gruplar, sağlıklı bireylerin dışkılarında farklı seviyelerde bulunabilir (Andersson et al., 2008; Gill et al., 2006; Eckburg et al., 2005; Khachatryan et al., 2008; Palmer et al., 2007). Bu farklılıkların biyolojik varyasyondan kaynaklanabileceği gibi, DNA ekstraksiyonu gibi numune hazırlama yöntemlerinin de gözlemlenen varyasyonda rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, DNA ekstraksiyon yönteminin toplam mikrobiyota kompozisyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, dört farklı dışkı DNA ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemlerle elde edilen dışkı örnekleri, İnsan Bağırsak Yolu (HIT) Çipi gibi bir mikrodizi ile profillendirilmiş ve filotip, cins veya şube seviyesinde daha ayrıntılı analizler yapılmıştır (Rajilić-Stojanović et al., 2009). Kantitatif PCR (qPCR), bakteri ve metanojenik arke miktarını ölçmek için kullanılmıştır. İlk taramadan sonra, en iyi performans gösteren iki yöntem seçilerek detaylı olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, bu iki yöntem arasında bakterilerin büyük çoğunluğunun benzer şekilde geri kazanıldığını, ancak mekanik DNA ekstraksiyon yönteminin en yüksek bakteriyel çeşitlilik ve arkeal DNA ekstraksiyon verimliliği ile teknik tekrarlanabilirlik açısından üstün olduğunu göstermiştir.

Çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilen bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıklar, kültürden bağımsız yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Bu nedenle, güvenilir nükleik asit ekstraksiyonu, dışkı mikrobiyotasının bileşimini belirlemede önemli bir adımdır. Bu amaçla, beş farklı ticari DNA ekstraksiyon kiti (QIAsymphony® Virus/Bacteria Midi Kit- QS kit, ZR Fecal DNA

MiniPrep™ - Z kit, QIAamp® DNA Stool Mini Kit - QA kit, Ultraclean® Fekal DNA İzolasyonu Kit - U kit, PowerSoil® DNA İzolasyon Kiti - P kit) kullanılarak insan dışkı örnekleri üzerinde değerlendirme yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, Z kit (H' = 2.30 ve 1.27) ve QS kit (H' = 2.16 ve 0.94) kullanılarak elde edilen DNA'nın diğer kitlere göre en yüksek verimi ve çeşitlilik puanlarını sağladığı belirtilmiştir (Claassen et al., 2013).

Boncuk vuruşlu DNA ekstraksiyon protokolü içinde önemli bir adımdır, çünkü mikrobiyal hücrelerin tam olarak parçalanması ve mikrobiyomun bolluğunun ve bileşiminin doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Boncuk vuruşunun etkisi, OTU'ların filum ve sınıf düzeyinde geri kazanılması üzerinde incelenmiştir, ancak tür düzeyinde mikrobiyom geri kazanımı konusunda net bir anlayışa sahip değiliz. Son gelişmeler, dizileme teknolojisindeki ilerlemeler sayesinde, mikrobiyomun tür düzeyinde çözümlenmesine olanak sağlamıştır. Bu amaçla, fare ve insan dışkı örneklerinde tam uzunlukta 16S rRNA geninin yanı sıra V3-V4 hiperdeğişken bölgesi dizilenmiş ve boncuk vuruş yöntemine karşı farklı hassasiyet seviyeleri sergileyen başlıca bağırsak bakteri kümeleri belirlenmiştir. Tam uzunlukta 16S rRNA gen dizilimi, fare ve insan bağırsak mikrobiyomundaki geniş tür çeşitliliğini ortaya çıkarmış ve bazı sınıflandırılmamış OTU'ların karakterizasyonuna olanak sağlamıştır. Bu çalışmada, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Blautia*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Roseburia*, *Helicobacter* ve *Ruminococcus* cinslerine ait gibi birçok ana bağırsak kommensal tür tanımlanmıştır. Ayrıca, *Blautia hominis* ve *Streptococcus parasanguinis* türlerinin, bu cinslerdeki diğer türlerden boncuk vuruş işlemine farklı şekilde tepki verdikleri gözlemlenmiştir (Zhang et al., 2021).

Dizileme tabanlı meta-omik yaklaşımlar, mikrobiyal nükleik asitler, DNA ve RNA'dan toplanan bilgilere dayanır. Daha da önemlisi, dışkı numunelerindeki nükleik asit bütünlüğü, numune işleme sırasında sıcaklık, süre, nükleazların varlığı ve bozunmadan etkilenebilir (Reck et al., 2015; Szóstak et al., 2022). Dışkı örneklerinin toplandıktan hemen sonra dondurulmasının ve taşıma sırasında soğuk zincirin sürdürülmesinin pratik olmaması nedeniyle, kaotropik reaktifler genellikle uzun süreli depolama sırasında nükleik asitleri stabilize etmek ve aşırı bozunmayı önlemek için kullanılır. Bu, guanidinyum tiyosiyanat veya diğer kaotrop (Shen, 2019) ile denatürasyon yoluyla nükleazları (örnek içinde ve çevresindeki ortamda bulunur) etkisiz hale getirerek gerçekleştirilir. Dışkı mikrobiyomu araştırmalarında kullanılan yaygın stabilizasyon reaktifleri arasında OMNIgene® GUT (DNA Genotek, Bethlehem, PA, ABD), RNAlater™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD; Costea et al., 2017), RNAprotect (Qiagen, Germantown, MD, ABD; Reck et al., 2015) ve DNA/RNA Shield (Zymo Research, Irvine, CA, ABD; Koorakula et al., 2022); diğer çalışmalarda dışkıdaki nükleik asitleri stabilize etmek için %100 etanol (Franzosa et al., 2014; Lloyd-Price et al.,

2019), guanidinyum tiyosiyanat (Dore et al., 2015) veya diğer tamponlar kullanılır. Yukarıda sıralananlar da dahil olmak üzere ticari kitlerde tipik olarak, açıklanmayan başka reaktiflerin bir karışımı içinde guanidinyum tiyosiyanat kullanır. Oda sıcaklığında saklama sırasında nükleik asit bütünlüğünü koruma kabiliyeti nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından metagenomik numune stabilizasyonu için RNALater önerilmiştir (Zoetendal et al., 2006; Costea et al.,2017).

Dışkı örneklerindeki karışık mikrobiyal topluluklardan nükleik asit izolasyonu zorlu bir süreçtir, çünkü mevcut mikrobiyoloji yaklaşımları genellikle belirli bir organizma veya hücre özellikleri için optimize edilmiştir (örneğin, Gram-pozitif veya Gram-negatif hücre duvarı yapısı). Bu nedenle, dışkıdan mikrobiyom nükleik asit izolasyonu için yaygın bir yaklaşım, numunenin mekanik olarak homojenleştirilmesiyle gerçekleştirilen mekanik hücre parçalanmasıdır. Bu işlem, küçük inert boncukların (milimetre aralığında) varlığında gerçekleştirilir ve karışık hücre topluluklarını etkili bir şekilde parçalayabildiği gösterilmiştir (Santiago et al., 2014; Tourlousse et al., 2021). Bununla birlikte, ticari kitler genellikle kimyasal, enzimatik, ısıya dayalı veya bu yaklaşımların bir kombinasyonu kullanarak hücre zarlarını bozan veya sindiren yöntemler içerir. Örneğin, yüksek pH, tuz veya deterjanlar kullanarak kimyasal parçalanma, lizozim ve/veya proteinaz K kullanarak enzimatik parçalanma gibi yöntemler yaygın olarak kullanılır. Metagenomik araştırmalar, Gram-pozitif / Gram-negatif oranının boncuk atma süresiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Szóstak et al., 2022). Bu da gözlemlenen taksonomik profillerin nükleik asit ekstraksiyon metodolojisinden etkilendiğini gösterir. Bu nedenle, mikrobiyal toplulukların doğru bir şekilde temsil edilmesi için nükleik asit izolasyonunda kullanılan yöntemin dikkatlice seçilmesi önemlidir.

Metagenomik çalışmalar için ticari olarak geliştirilen nükleik asit ekstraksiyon kitleri, hücre lizis yöntemleri ve izolasyon yaklaşımları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle, standart protokollerin oluşturulması ve güncellenmesi önemlidir. Uluslararası İnsan Mikrobiyom Standartları (IHMS) Projesi ve İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) gibi büyük ölçekli projeler, dışkı metagenomikleri için standart protokollerin geliştirilmesine çalışmıştır. Ancak, ticari satıcılar kitlerin adlarını ve bileşenlerini sık sık değiştirebilir veya belirli kitleri durdurabilir, bu da protokollerin hızla geçerliliğini yitirebileceği anlamına gelir. Bu nedenle, araştırmacılar ve laboratuvarlar, en son güncellemeleri takip etmeli ve nükleik asit ekstraksiyonu için uygun protokolleri seçmelidir. Mekanik hücre parçalanması yoluyla boncuk vuruşunun, stabilize edici bir madde ile saklanan dışkı örneklerinden parçalanması zor olan Gram-pozitif bakteriyel rRNA'ların geri kazanımını iyileştirdiği gösterilmiştir (Pratt, 2022). Bu, taksonomik profillerin doğru bir şekilde temsil edilmesi için önemli bir adımdır ve mekanik hücre parçalanması kullanılarak nükleik asit izolasyonu gerçekleştiren metagenomik çalışmalarda dikkate alınmalıdır.

2.1 DNA konsantrasyonu ve DNA kalitesi

Nükleik asitler ve proteinler, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında belirli absorbans değerlerine sahiptir. Bu nedenle, bu dalga boylarındaki absorbans oranları, nükleik asit ve protein ekstraksiyonlarında saflık ölçüsü olarak kullanılır. Genellikle, DNA için ~1.8 oranı "saf" olarak kabul edilirken, RNA için ~2.0 oranı "saf" kabul edilir. Aynı şekilde, 230 nm absorbansı, diğer kontaminasyonların bir göstergesi olarak kabul edilir ve bu nedenle genellikle A260/A230 oranı da hesaplanır. 260/230 değerleri genellikle 260/280 değerlerinden daha yüksektir ve "saf" nükleik asit için beklenen 260/230 değerleri genellikle 2.0-2.2 aralığındadır (Scientific, 2012). Nükleik asit ekstraksiyon prosedürlerinden kaynaklanan kimyasal kontaminasyon, nükleik asit konsantrasyonunun yanlış tahmin edilmesine ve/veya sonraki analizin olumsuz etkilenmesine neden olabilir. Bu nedenle, doğru ve temiz bir nükleik asit ekstraksiyonu için uygun metodoloji ve dikkatli kontaminasyon önlemleri gerekebilmektedir.

2.2 Kontaminasyonların Tanımlanması

Numune spektrumlarının incelenmesi, numune saflığıyla ilgili bir sorunun var olduğunu belirlemede faydalı olabilir (Scientific, 2012). Her numune ölçümünden sonra aşağıdakilerin gözden geçirilmesi önerilir:

• 260/230 oranı – düşük bir oran, 230 nm veya daha düşük bir kirletici madde emiliminin sonucu olabilir.

• 260/280 oranı – düşük bir oran, 280 nm veya daha düşük bir kirletici madde emiliminin sonucu olabilir.

• Numune spektrumundaki çukurun dalga boyu – bu ~230 nm'de olmalıdır. Düşük bir dalga boyunda bir kirletici madde tarafından absorbans, tipik olarak oluğun dalga boyunu değiştirir.

• Numune spektrumundaki tepe noktasının dalga boyu – bu 260 nm'de olmalıdır. Bir kirletici madde tarafından absorbans, tepe absorbans dalga boyunu değiştirebilir.

2.2.1 260/230 Absorbans Oranları

Bazı kirleticilerin karakteristik profilleri vardır, örn. fenol, ancak birçok kirletici benzer özellikler gösterir: 230 nm veya daha az absorbans. Anormal 260/230 absorbans değerleri, numunede veya ekstraksiyon prosedüründe bir sorun olduğunu gösterebilir, bu nedenle her ikisini de dikkate almak önemlidir (Scientific, 2012). Bir nükleik asidin 260 nm'de absorbansı genellikle bir plato üzerinde olmasına rağmen, 280 nm'de absorbans eğrisi oldukça dik

eğimlidir. Dalga boyu doğruluğundaki hafif bir kayma, 260/280 oranları üzerinde büyük bir etkiye sahip olacaktır. Her ikisi de 1 nm dalga boyu doğruluk spesifikasyonu içinde olan iki spektrofotometrede aynı nükleik asit örneğini ölçerken 260/280 oranında 0,4'e varan bir fark görmek mümkündür (Matlock, 2015).

Düşük bir A260/A230 absorbans oranı aşağıdakilerin sonucu olabilir:

• Karbonhidrat taşınması (genellikle bitkilerde görülen bir sorun).

• Nükleik asit ekstraksiyonundan kalan fenol.

• Kalıntı guanidin (sıklıkla sütun bazlı kitlerde kullanılır).

• Çökeltme için kullanılan glikojen.

Yüksek bir A260/A230 absorbans oranı aşağıdakilerin sonucu olabilir:

• Kirli bir kaide üzerinde boş ölçüm yapma

• Boş ölçüm için uygun olmayan bir çözelti kullanmak. Boş çözelti, örnek çözelti ile aynı pH değerinde ve benzer bir iyonik kuvvette olmalıdır.

2.2.2 260/280 absorbans Oranları

Anormal 260/280 absorbans oranları genellikle örneğin protein veya fenol gibi bir reaktifle kontamine olduğunu veya ölçümle ilgili bir sorun olduğunu gösterir (Scientific, 2012).

A260/A280 oranının düşük olmasının nedeni şunlar olabilir:

• Ekstraksiyon protokolüyle ilişkili artık fenol veya diğer reaktif

• Çok düşük konsantrasyonda (>10 ng/µL) nükleik asit yüksek 260/280 saflık oranları bir sorunun göstergesi değildir.

Saflık oranları ve spektral profiller, numune kalitesinin önemli göstergeleri olmasına rağmen, DNA veya RNA kalitesinin en iyi göstergesi, ilgili alt uygulamadaki işlevselliktir. Saflık oranı beklenenden önemli ölçüde yüksekse, birincil sorun giderme aracı olarak spektral profili gözden geçirmek en iyisidir. Saflık oranlarının beklenen sınırlar içinde olduğu, ancak numuneyle ilgili bir sorun olduğu durumlar görülebileceğine de değinmek gerekir.

2.2.3 Numune Asitliğindeki Değişiklik

Solüsyonun pH'ındaki küçük değişiklikler 260/280'in değişmesine neden olur. Asidik solüsyonlar 260/280 oranını 0,2-0,3 kadar az temsil ederken, bazik bir solüsyon oranı 0,2 oranında fazla temsil eder -0.3. Bir NanoDrop spektrofotometre kullanılarak elde edilen sonuçların

diğer spektrofotometreler kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması durumunda, cihazımızda ölçülen seyreltilmemiş bir numunenin pH'ının, geleneksel spektrofotometrede ölçülen seyreltilmiş numune ile aynı pH ve iyonik kuvvette olmasını sağlamak önemlidir (Scientific, 2012).

2.3 Doğru Kit Seçimi

Mikrobiyom analizlerinde, mikroorganizma açısından zengin veya fakir ortamlar için birçok farklı ticari kit ve DNA izolasyon protokolü geliştirilmiştir. Bu protokollerin özelleştirilmesi, ilgili ortamlarda mikrobiyal bileşimin daha temsil edici bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Ancak, farklı DNA izolasyon yöntemleri, DNA geri kazanımı ve kalitesinde değişkenlik gösterir. Yapılan çalışmalar, farklı DNA izolasyon protokollerinin kullanımının mikrobiyal kompozisyonda önemli farklılıklara yol açtığını göstermiştir. DNA izolasyonunun mikrobiyal kompozisyonu etkileme potansiyeli, mikroorganizma açısından zengin ve fakir topluluklarda devam etmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, diğer mikrobiyal nişlerde DNA ekstraksiyon yöntemleri arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır. Çoğu çalışma, eksik hücresel lizis ve PCR inhibitörlerinin varlığının DNA ekstraksiyon protokolleri arasındaki temel engeller olduğunu belirtir. Gram pozitif bakteriler ve mantarlar gibi daha sağlam hücre duvarlarına sahip organizmaların tam anlamıyla parçalanmaması, mikrobiyal kompozisyon analizlerinde yanıltıcı bir etken olabilir. Bu nedenle, DNA izolasyon yöntemlerinin çeşitliliği ve seçimi önemlidir ve mikrobiyal analiz sonuçlarını etkileyebilir. İdrar numunelerinde farklı DNA izolasyon kitlerinin kullanılmasının sonuçlarının doğrudan karşılaştırılmadığına dikkat çeken çalışmalar da mevcuttur. Bu bağlamda, mikroorganizmaların geri kazanılmasının DNA izolasyon protokolüne bağlı olarak farklılık gösterip göstermediğini değerlendirmek önemlidir (Karstens et al., 2018, Karstens et al., 2019, Moustafa et al., 2018,Wojciuk et al.,2019, Ackerman & Underhill, 2017).

Bugün, yüksek verimli DNA ekstraksiyonu için çeşitli seçenekler incelenmelidir. Yüksek verimli DNA ekstraksiyonu, araştırmacılara ve klinisyenlere yüksek kaliteli genomik DNA sağlamak için otomatik, robotik bir sistem şeklinde de kullanılabilir. Bu yöntemin ana avantajları, daha kısa uygulama süresi, daha yüksek tutarlılık ve daha düşük manuel hata olasılığıdır. Yüksek verimli ekstraksiyon genellikle işlenecek çok sayıda numune olduğunda tercih edilir. Ayrıca, Otomasyon sonuçlarda verimlilik ve tutarlılık elde etmenin harika bir yoludur.

2.3.1 Otomatik DNA izolasyonu

Otomatik DNA izolasyonu için iki tür robot vardır: açık sistemler ve kapalı sistemler. Hangi robotun sizin için doğru olduğunu seçerken, öncelikle açık bir sistemin mi yoksa kapalı

bir sistemin mi ihtiyaçlarınıza en uygun olduğunu düşünmeniz önemlidir. Açık bir sistem, birçok farklı konfigürasyona uyarlanabilen ve çeşitli sağlayıcılardan satın alınan ekstraksiyon kimyasallarıyla çalışabilen temel bir sıvı taşıma robotu (örn. Tecan Freedom Evo veya Hamilton STAR) olarak tasarlanmıştır. Bu tür bir platform, muazzam bir esneklik sağlar ve DNA izolasyonu işleminizi gerçekten özelleştirmenize olanak tanır. Bu tür bir sistem, alikotlama ve PCR kurulumu gibi laboratuvarla ilgili diğer sıvı işleme faaliyetlerini gerçekleştirmek için de yapılandırılabilir. Bunun aksine, kapalı bir sistem belirli uygulamalar için tasarlanmıştır ve genellikle tanımlanmış protokoller ve belirli kimyasallarla gelir (örn. DNA veya RNA için Chemagic MSM 1 ve Qiagen QIAsymphony). Bu robotlar belirli görevler için tasarlanmıştır ve belirli reaktifler kullanılarak ilgili özel uygulama için tamamen geliştirildiklerinden genellikle daha kullanıcı dostu bir arayüz sunarlar.

2.3.2 Otomatik DNA izolasyonlarında verim

Gerekli iş hacmini belirlemek oldukça basittir. İlk numunenizin ne kadar büyük olduğunu ve günde kaç numune işlemeniz gerektiğini bilmeniz gerekir. İlk numune hacmi göz önüne alındığında, robotik sistemlerin genellikle belirli bir pipetleme aralığını hedeflediğini unutmamak önemlidir, bu nedenle seçtiğiniz robotun numune hacminizi işleyebileceğinden emin olmanız gerekir. Çoğu platform, 1 mL'ye kadar numune alikotuyla çalışır. 4 mL'lik bir tükürük örneğinin tamamını işlemek isterseniz, bu zorluğun üstesinden gelebilecek birkaç robot vardır: Qiagen Autopure veya 12 veya 24 çubuk başlı Chemagen Chemagic MSM 1 bunlardan birkaçıdır.

Önemli nokta, giriş hacmini artırdığımızda, tek seferde işleyebileceğiniz örnek sayısını da azaltmış olmanızdır. Örneğin, tipik küçük hacimli otomasyon bir seferde ~250µL veya daha fazla 96 parça çalıştırılırken, büyük hacimli otomasyon bir seferde 16-24 ~1mL numune ile sınırlandırılabilir.

2.3.3 Giriş Gereksinimleri

Girdi hacmi ve elüsyon hacmi ile birlikte DNA ekstraksiyonu için kullanılan teknoloji, ekstrakte edilen DNA numunesi nitelikleri üzerinde bir etkiye sahip olacaktır. Yüksek DNA veriminin gerekli olduğu uygulamalar için, deneyimlerimiz en yüksek verimin genellikle DNA Genotek'in prepIT•L2P veya Qiagen Autopure ile açık sistem gibi etanol çökeltme tabanlı yaklaşımlar kullanılarak elde edildiğini göstermektedir. Alternatif olarak, bazı manyetik boncuk yöntemleri de oldukça iyi performans gösterir. DNA kalitesinin en önemli olduğu uygulamalar için sütun veya manyetik boncuk tabanlı sistemleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Her zaman olduğu gibi, DNA ekstraksiyonu için en iyi seçim, genellikle ihtiyacınız olan sonuçlara en basit ve en hızlı şekilde ulaşmanızı sağlayan yöntemdir.

3. PCR Öncesi ve Sonrası Hazırlık Basamakları ile İlgili Problemler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) saptanması amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş, yüksek ölçüde duyarlı ve özgün bir teknik olarak tanımlanmıştır. DNA'nın belirli bir bölgesinin *in vitro* olarak çoğaltılması işlemidir.

DNA dizi analizinde ve DNA haritalanmasında, Genetik hastalıkların teşhisinde, DNA parmak izi analizinde, İnsan Genom Projesi ve diğer Genom Projelerindeki araştırmalarda, Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde, Tarımda, Sistematik ve evrim çalışmalarında kullanılmaktadır. PCR tekrarlanan üç (3) basamak şeklinde gerçekleşir. Bu basamaklar;

- Amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu,
- Primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıktaki annealing-birleşme reaksiyonu,
- Taq DNA polimeraz enziminin yüksek aktivite gösterdiği sıcaklıkta primerlerin uzaması-tamamlayıcı zincir sentezi olarak tanımlanabilir.

Döngü süreleri ve sıcaklıklar, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işleminin temel parametrelerindendir. PCR, genetik materyalin hızlı ve seçici bir şekilde amplifikasyonunu sağlayan önemli bir moleküler biyoloji tekniğidir. Her bir amplifikasyon döngüsünde, DNA örneğinin iki katına çıkması beklenir ve bu süreç belirli bir sıcaklık profili altında gerçekleşir. Denatürasyon, eşleşme ve uzatma aşamaları, belirli sıcaklık aralıklarında gerçekleşir ve bu aşamaların her birinin süresi ve sıcaklığı, PCR verimliliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yanlış döngü süreleri veya sıcaklık ayarları, PCR verimliliğini azaltabilir ve sonuçların doğruluğunu etkileyebilir. Bu nedenle, PCR protokollerinin tasarımında dikkatli bir şekilde döngü süreleri ve sıcaklık profillerinin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesini sağlar ve moleküler biyoloji araştırmalarında başarı için temel oluşturur (Illumina, 2013) (Tablo 2).

PCR işlemi sırasında kullanılan bileşenlerin kalitesi ve miktarı, deneyin başarısını etkileyebilecek kritik faktörlerdir. DNA örneği kalitesi, primerlerin spesifikliği, polimerazın aktivitesi ve tampon bileşenlerin dengesi gibi faktörler, PCR verimliliğini doğrudan etkiler. Kontamine edilmiş veya düşük kaliteli bileşenler, yanlış sonuçlara veya tekrarlanabilir olmayan sonuçlara neden olabilir. Optimal PCR performansı için, tüm bileşenlerin dikkatle

seçilmesi ve kalite kontrolünden geçirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, bileşenlerin doğru konsantrasyonlarda kullanılması da önemlidir, çünkü aşırı veya yetersiz miktarda bileşen eklenmesi, amplifikasyon verimliliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, PCR deneyleri için bileşenlerin kalitesi, miktarı ve dengesi titizlikle ayarlanmalıdır (Illumina, 2013) (Tablo 3).

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) işlemi, başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için kullanılan bileşenlerin kalitesi ve doğru miktarı oldukça önemlidir. DNA örneği kalitesi, primerlerin seçiciliği, polimerazın aktivitesi ve tampon bileşenlerin uygun dengesi gibi faktörler, PCR verimliliğini etkileyebilir. Kontamine veya düşük kaliteli bileşenlerin kullanımı, yanlış sonuçlara neden olabilir ve tekrarlanabilirliği azaltabilir. Optimal sonuçlar elde etmek için, bileşenlerin kalitesi titizlikle kontrol edilmeli ve doğru konsantrasyonlarda kullanılmalıdır. Böylece PCR deneylerinde güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik sağlanabilir (Illumina, 2013) (Tablo 4).

Son dönemdeki DNA dizileme teknolojisinde ilerlemeler, klinik mikrobiyoloji alanında devrim niteliğinde bir etki yaratmıştır. Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi, büyük miktarda doğru veri üretmek için DNA'nın paralel olarak dizilenmesini sağlar. Bu teknoloji son yıllarda klinik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Metagenomik dizileme, geleneksel kültür tabanlı yöntemlere kıyasla patojenik bakterilerin tespitinde birçok avantaj sunar ve kültürlenemeyen bakterileri ve yeni patojenleri karakterize etmek için özellikle faydalıdır. 16S ribozomal RNA (rRNA) geninin amplikon dizilemesi, bakteri analizlerinde güvenilir ve etkili bir taksonomik sınıflandırma yöntemi olarak kanıtlanmıştır. Bakteri tanımlaması için 16S rRNA geni, korunmuş bölgelere birleşen primerlerle PCR ile çoğaltılıp ardından dizilenir. Dizileme verileri, değişken bölgelerin kullanıldığı biyoenformatik analizlerle bakteriyel taksonlar arasındaki farkları ortaya çıkarır. İnsan mikrobiyomlarının kesin karakterizasyonu, insan sağlığı ve hastalıklarındaki konak-mikroorganizma etkileşimlerini anlamak için önemli bir adımdır. Bakteri topluluklarının karakterizasyonunda yeni nesil dizileme (NGS) tekniklerinin geliştirilmesiyle mikroorganizmalar daha detaylı taksonomik seviyelere kadar ayrıştırılabilir hale gelmiştir (Matsuo et al.,2021, Lloyd-Price et al., 2016; Mohajeri et al., 2018; Rozas et al., 2021, Kchouk et al., 2017).

Bakterilerin tanımlanmasında en yaygın kullanılan ve güvenilir bir dizi stratejisi, 16S rRNA geninin analizine dayanmaktadır. 16S rRNA geni, bakteri dünyasında önemli bir role sahiptir ve 1500 baz çiftinden oluşan 9 hiperdeğişken bölge (V1-V9) içerir. Bu bölgelerin tamamı veya bir kısmı, korunmuş dizilere uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Elde edilen amplikonlar, bir referans nükleotid veritabanı ile karşılaştırılır ve sonucunda bakteriyel taksonomik bir gruba atanır. Matsuo protokolüne göre, 16S rRNA geninin V1-V9 bölgesi, dört primerli bir PCR reaksiyonuyla amplifiye edilir. Bu reaksiyonda, universal primer setleri

olan 27F ve 1492R kullanılır ve tamamlayıcı ve bağlantı bölgeleriyle birlikte amplifikasyon gerçekleştirilir (Matsuo et al.,2021).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), mikrobiyal topluluk profillerinin yüksek verimli dizileme çalışmalarında kullanılan temel bir yöntemdir. Ancak, PCR'nin bu tür çalışmalarda bir yanlılık kaynağı olduğu bilinmektedir. Özellikle sayısal bilgi hedefleyen 16S rRNA ile mikrobiyal topluluk çalışmalarında PCR yanlılığı önem arz edebilir. Mock topluluk deneyleri, belirli 16S rRNA şablonlarının aşırı amplifikasyonunun, genellikle 3,5 katın üzerinde tercihli bir şekilde gerçekleşebildiğini göstermiştir. Primerlerle şablonlar arasındaki tek nükleotid uyumsuzlukları bile 10 kata kadar tercihli amplifikasyona neden olabilir. Ancak, PCR yanlılığının karakterize edilmesi ve düzeltilmesi konusunda henüz sınırlı ilerleme kaydedilmiştir. Yüksek doğruluklu polimeraz ve ikili indeksleme amplifikasyonu, mikrobiyom çalışmalarında PCR yanlılığının azalmasına katkıda bulunabilir. (Silverman et al., 2019).

Tablo 2. Döngü Süreleri ve Sıcaklıklarla İlgili Sorunlar

Çok az döngü kullanılması	Çok az sayıda PCR döngüsü kullanılması yetersiz amplifikasyona yol açabilir. 20–35 döngü. Şablon konsantrasyonu yüksek olduğunda daha az döngü kullanın ve şablon konsantrasyonu düşük olduğunda daha fazla döngü kullanılmalıdır.
Uzama süresinin çok kısa olması	Uzama süresi çok kısaysa, hedefin tamamen kopyalanması için yeterli süre olmayacaktır. Genel olarak, 1 dk/kb'lik bir uzatma süresi kullanılmalıdır.
Bağlanma süresinin çok kısa olması	Bağlanma süresi çok kısaysa, primerlerin kalıba bağlanmak için yeterli zamanı yoktur. En az 30 saniyelik bir tavlama süresi kullanılmalıdır.
Bağlanma sıcaklığının çok yüksek olması	Bağlanma sıcaklığı çok yüksekse, primerler kalıba bağlanamaz. Temel kural, primerin Tm değerinden 5°C daha düşük bir bağlanma sıcaklığı kullanmaktır. Primer Tm'yi hesaplamak; www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html adresindeki aracı varsayılan tuz konsantrasyonu ve 0,2–1 μM primer (reaksiyon koşullarınıza bağlı olarak) ile kullanılmalıdır. Bağlanma sıcaklığını hesaplarken en düşük primer Tm'yi kullanılmalıdır. Daha fazla doğruluk için, termal gradyan kullanarak bağlanma sıcaklığını optimize edilmelidir. Primer Tm eksi 5°C, uzatma sıcaklığına (72°C) yakınsa, iki aşamalı bir PCR protokolü çalıştırmayı düşünün. bağlanma sıcaklığı uzatma sıcaklığını geçmemelidir.
Denatürasyon sıcaklığının çok düşük olması	Denatürasyon sıcaklığı çok düşükse, DNA tamamen denatüre olmayacak ve amplifikasyon verimliliği düşük olacaktır. 95°C'lik bir denatürasyon sıcaklığı kullanılmalıdır.
Denatürasyon süresinin çok uzun olması	Denatürasyon süresi çok uzunsa, DNA bozulabilir. İlk denatürasyon için 95°C'de 3 dakika kullanılmalıdır; döngü sırasında denatürasyon için 95°C'de 30 sn kullanılmalıdır.
Denatürasyon süresinin çok kısa olması	Denatürasyon süresi çok kısa ise, DNA tamamen denatüre olmayacak ve amplifikasyon verimliliği düşük olacaktır. İlk denatürasyon için, polimerazı etkinleştirmek için 3 dakika kullanmalıdır; döngü sırasında kalıp DNA'yı denatüre etmek için 30 saniye kullanılmalıdır.

Tablo 3. PCR Bileşenleriyle İlgili Sorunlar	
dNTP konsantrasyonunun çok yüksek olması	dNTP konsantrasyonu çok yüksekse, Mg2+ tükenmesi meydana gelir. Her dNTP, son reaksiyonda 200 uM'de bulunmalıdır.
dNTP konsantrasyonunun çok düşük olması	Her dNTP, son reaksiyonda 200 uM'de bulunmalıdır.
PCR ürünü yüksek GC içeriğine sahiptir (>%65)	GC açısından zengin PCR ürünlerinin çoğaltılması zordur. Amplifikasyonu iyileştirmek için tavlama sıcaklığını artırılmalıdır. Daha fazla doğruluk için, termal gradyan kullanarak tavlama sıcaklığını optimize edilmelidir. DMSO veya başka bir ikincil yapı dengeleyici eklenebilir (%10'u geçmemelidir).
Kalıp DNA hasar görmüş veya inhibitör içermesi	Kalıp DNA kesilmiş olabilir veya PCR inhibitörleri içerebilir. İnhibitörlerden şüpheleniliyorsa mevcut kalıp DNA'yı seyreltin; aksi takdirde, yeni kalıp DNA kullanın ve döngüleri artırın. Herhangi bir inhibitör etki olup olmadığını belirlemek için kalıp DNA'nın eklenmesiyle birlikte saf bir plazmit kullandığınız bir kontrol reaksiyonunu deneyiniz.
Saf olmayan primerlerin kullanılması	Primerlerdeki kontaminantlar PCR'yi inhibe edebilir. Tuzdan arındırılmış primerler veya daha fazla saflaştırılmış primerler kullanılmalıdır. Önleyici etkilerin olup olmadığını belirlemek için primerleri seyreltmeyi deneyebilirsiniz, ancak her primerden 0,02 µM'den az eklenmemelidir.
Tepkimede yeterli iskelet DNA'nın olmaması	Başlangıç kalıp DNA'nın miktarı çok düşükse yetersiz amplifikasyon meydana gelebilir. Amplifikasyon döngülerinin sayısını 5 döngülük artışlarla artırın veya mümkünse kalıp DNA miktarını artırınız.
Saf olmayan dNTP'ler kullanılması	dNTP karışımındaki kirleticiler, eksik veya yanlış amplifikasyona veya PCR inhibisyonuna yol açabilir. Yüksek kaliteli dNTP'ler kullanınız.
Primer konsantrasyonunun yüksek olması	Aşırı konsantrasyonda primer kullanılması, primerlerin spesifik olmayan bir şekilde kalıp DNA üzerindeki istenmeyen bölgelere veya birbirlerine bağlanma şansını artırabilir. Nihai reaksiyonda 0,2–1 µM'de iyi tasarlanmış astarlar kullanın. Ayrıca, doğru konsantrasyonun üretici tarafından sağlandığını doğrulayınız.
Primer konsantrasyonunun çok düşük olması	Primer konsantrasyonu çok düşükse, tavlama verimsiz olabilir. Nihai reaksiyonda 0,2–1 µM'de iyi tasarlanmış astarlar kullanın. Ayrıca, doğru konsantrasyonun üretici tarafından sağlandığını doğrulanmalıdır.
Enzim konsantrasyonunun çok düşük olması	TAq polimeraz konsantrasyonu çok düşükse, tüm PCR ürünleri tamamen kopyalanmayacaktır. Optimal enzim konsantrasyonu, şablonun uzunluğuna ve zorluğuna bağlıdır.
Primerlerin, kullanıcı veya üretici tarafından yanlış tasarlanmış veya sentezlenmiş olması	Primerlerin doğru diziye sahip olduğunu ve kalıp DNA'yı tamamlayıcı nitelikte olduğunu doğrulayın. Tekrarlayan dizilerden, yüksek tamamlayıcılığa sahip bölgelerden vb. kaçınmak için bir primer tasarım programı kullanılmalıdır. Hedeflenen genleri çoğaltabilecek veya istenmeyen bölgeleri başlatabilecek primerlerden kaçınmak için bir BLAST araması yapılmalıdır. Tm'yi hesaplamak için varsayılan tuz konsantrasyonu ve 0,2–1 µM primer (reaksiyon koşullarınıza bağlı olarak) ile www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html adresindeki aracı kullabilir. Primerlerin en düşük Tm'sini kullanılması önerilmektedir.
Hedefin çok uzun olması	PCR bileşen konsantrasyonları ve/veya döngü koşulları, daha uzun hedef diziler için yeterli olmayabilir. Mevcut test protokolünüzü yeniden optimize edin ve/veya özellikle uzatma adımı olmak üzere PCR adımlarının süresini artırılmalıdır.

Suyun saf olmaması	Önceki pipetleme olayları sırasında su kirlenmiş olabilir. Taze ve nükleaz içermeyen su kullanılaibilir.
Yeterli Mg2+ yok	Yetersiz veya atlanmış magnezyum, PCR ürününün olmaması veya azalmasıyla sonuçlanacaktır. Son reaksiyonda 1,5 mM kullanılabilir.

Tablo 4. Atlanan Bileşenlerle İlgili Nedenler	
dNTP'ler eklenmemesi	Her dNTP, son reaksiyonda 200 uM'de bulunmalıdır.
Primerlerin eklenmemesi	Nihai reaksiyonda 0,2–1 μM'de iyi tasarlanmış primerler kullanılabilir.
Kalıp DNA eklenmemesi	Kalıp DNA eklenmesi ile çözülebilir.
Enzim eklenmemesi veya etkin olmaması	Yeterli miktarda enzim kullanılmalıdır. Enzimin inaktif olabilir, farklı bir partiden taze Taq polimeraz ile test tekrarlanmalıdır.
Mg2+ ilave edilmemesi	Yetersiz veya atlanmış magnezyum, PCR ürününün olmaması veya azalmasıyla sonuçlanacaktır. Son reaksiyonda 1,5 mM kullanılmalıdır.

Taq polimeraz, PCR söz konusu olduğunda denenmiş ve gerçek standarttır, ancak bu, yüksek hassasiyetli uygulamalar için en doğru polimeraz olduğu anlamına gelmez. Bunun yerine, aslına uygun polimerazlar olarak bilinen alternatif enzimler, daha sıkı baz okuma ve redaksiyon aktivitelerinin bir kombinasyonu sayesinde PCR'den kaynaklanan amplikonlarda daha yüksek doğruluklar sunar. Her zaman aslına uygun polimerazların sunduğu gelişmiş doğruluğa ihtiyacınız olmasa da, mükemmel dizilere sahip amplikonlara sahip olmak, PCR ürünlerinizi akış aşağı klonlama veya dizileme uygulamaları için kullanmayı planladığınızda büyük bir fark yaratabilir. Bir sonraki deneyinizin başarılı olması amacıyla yüksek kaliteli bir polimerazın gerekli olup olmadığına karar vermenize yardımcı olması için, polimeraz doğruluğu ile tam olarak neyin kastedildiğine, bu enzimlerin nasıl çalıştığına ve yüksek kaliteli polimerazların Taq polimeraza göre ne zaman avantajlar sunduğuna bir göz atalım.

3.1 Yüksek Doğruluklu Polimeraz nedir ve nasıl çalışır?

Yüksek doğruluk terimi, Normal Taq polimerazdan daha az hata eğilimli olan herhangi bir DNA polimerazı tanımlar. Şu anda piyasada bulunan yüksek kaliteli polimerazların çoğu, 10 ila 50 kat daha düşük hata oranlarına sahiptir. Taq (Cline et al.,1996). 3kb hedef dizisi için, yüksek kaliteli bir polimeraz kullanıldığında amplikonların %5'inden daha azının bir hataya sahip olacağı anlamına gelir.

Yüksek kaliteli bir polimeraz karışımının hata oranı, birkaç faktöre bağlıdır. Standart yüksek doğruluklu polimerazlar genellikle *Pyrococcus furiosus* arkebakterisinden saflaştırılan doğal Pfu polimerazını içerir. Pfu polimeraz, son derece doğru olmasına rağmen Taq polimeraza göre daha yavaş replikasyon yapar. Bu nedenle, birçok yüksek doğruluklu PCR karışımı, doğruluk ve hız dengesi için hem Pfu hem de Taq polimerazını içerir. Pfu polime-

razın özelliklerini değiştirerek tasarlanmış yüksek doğruluklu polimerazlar da mevcuttur, bu da hem doğruluğu daha fazla artırabilir, hem de verimliliği artırabilir. Ancak, bu polimerazlar genellikle daha yüksek maliyetlidir (Remolar, 2019).

Yüksek doğruluklu polimerazlar, uyumsuzluk oranlarını azaltmak için iki önemli strateji kullanır. İlk olarak, bu polimerazların bağlanma bölgeleri, doğru baz için Taq polimerazdaki bağlanma bölgelerine göre daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu, büyüyen DNA zincirine doğru nükleotid yerleştirme olasılığını artırır. Ancak, başlangıçta yanlış bir nükleotid polimeraza girse bile, uyumsuz nükleotid için bağlanma bölgesinin optimal olmayan yapısı, uzama reaksiyonunun daha yavaş ilerlemesine neden olur. Bu da hatalı nükleotidin polimerazdan ve uzama sürecinden ayrılması için daha fazla zaman sağlar, böylece doğru nükleotidin (Remolar, 2019; Joyce & Benkoviz, 2004) tekrar bağlanma bölgesine girerek uzamaya devam etmesini sağlar.

İkinci olarak, yüksek doğruluklu polimerazlar, DNA zinciri boyunca hareket ederken düzeltme okuması (proof reading) yapabilir. Enzimin ikincil bir bölgesi, yapısal bir bozulma olduğunda aktive olan 3’→5’ ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Bu ekzonükleaz bölgesi, polimerazın geriye doğru hareket etmesine, eşleşmeyen bazları çıkarmasına ve doğru bazın (Reha-Krantz, 2010) uzama reaksiyonunu yeniden başlatmasına izin verir. Bu sayede, hatalı nükleotidlerin düzeltilmesi ve doğru nükleotidlerin yerleştirilmesi sağlanır.

3.2 Yüksek Doğruluklu Polimeraz’a Ne Zaman İhtiyacınız Var?

Yüksek doğruluklu polimerazlar, özellikle hassas downstream uygulamalar için standart Taq polimeraza göre daha uygun hale getirilmiştir. Taq polimerazda bulunan uyumsuzluklar, dizileme verilerinin analizini etkileyebileceğinden, yüksek doğruluklu polimerazlar kullanılarak PCR ile yeterli DNA kütlesi oluşturulması yaygın bir uygulamadır. Uzun hedef dizilerinde Taq polimeraz daha fazla hata üreteceğinden, amplikon uzunluğuna bağlı olarak yüksek doğruluklu polimerazların kullanımı önemlidir. Protein kodlayan dizilerin amplifikasyonu için yüksek kaliteli polimerazlar tercih edilmelidir, çünkü ikame mutasyonları eksprese edilen proteini etkileyebilir veya değiştirebilir. Genel olarak, yüksek doğruluklu polimerazlar, herhangi bir uygulama için Taq polimerazın kullanıldığı durumlarda kullanılabilir. Ancak, DNA uyumsuzluklarının önemli olmadığı uygulamalarda örneğin, bir klonun varlığının veya yokluğunun kontrol edilmesi, yüksek doğruluklu polimerazın daha pahalı olduğunu ve daha uzun süre gerektiğini unutmamak önemlidir. Düzeltme polimerazları, daha yavaş uzama hızları nedeniyle toplam PCR döngü süresini uzatabilir.

Yüksek doğrulukta DNA polimerazlar, hassas downstream uygulamaları olan amplikonla-

rın PCR ile üretilmesinde standart Taq polimeraza göre daha doğru bir seçenek sunar. Doğru polimeraz seçimi için, hata oranlarını ve verimlilik oranlarını karşılaştırarak doğruluk, hız ve maliyet arasında bir denge bulunması önemlidir.

4. Kütüphane Hazırlama Basamakları ile İlgili Olası Sorunlar

Dizileme için kütüphane hazırlığı yaparken, iyi moleküler biyoloji uygulamalarına dikkat etmek her zaman önemlidir. Protokolü baştan sona okuyarak, gerekli tüm malzemelerin ve ekipmanların mevcut olduğunu ve kullanıma hazır olduğunu doğrulamak önemlidir. Bu adımlar, doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için gereklidir.

4.1 PCR Ürün Kontaminasyonunu Önlenmesi

PCR işlemi, laboratuvarda belirli DNA dizilerini çoğaltmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak, uygun laboratuvar hijyenine dikkat edilmediğinde, PCR ürünü kontaminasyonu riski ortaya çıkar. Bu kontaminasyon, reaktifler, cihazlar ve genomik DNA örneklerinin istenmeyen maddelerle kirlenmesine ve sonuç olarak hatalı ve güvenilmez sonuçların elde edilmesine neden olabilir. PCR ürünü kontaminasyonu, laboratuvar işlemlerinin durmasına ve normal sürecin önemli ölçüde gecikmesine yol açabilir. Bu nedenle, PCR ürünü kontaminasyonu riskini azaltmak için laboratuvarın uygun şekilde düzenlendiğinden emin olunmalıdır (Illumina, 2013).

4.2 Fiziksel Olarak Ayrılmış PCR Öncesi ve PCR Sonrası Alanlar

PCR ürünlerinin hazırlandığı ve işlendiği laboratuvar alanı, PCR öncesi işlemlerin gerçekleştirildiği fiziksel olarak ayrı bir laboratuvar alanından oluşmalıdır. Bu, potansiyel kontaminasyon riskini azaltmak için önemlidir ve PCR öncesi ve PCR sonrası işlemlerin birbirinden ayrılmasını sağlar. PCR öncesi ve PCR sonrası kullanılacak malzemeleri yıkamak için aynı lavabo asla kullanılmamalıdır. Bunun yanı sıra, PCR öncesi ve PCR sonrası süreçler için ayrı su arıtma sistemleri kullanılmalı ve bu sistemler asla paylaşılmamalıdır. Bu, kontaminasyon riskini minimize etmek için önemlidir ve doğru laboratuvar hijyeninin sağlanmasına yardımcı olur. Protokollerde kullanılan tüm malzemeler PCR öncesi alanda saklanmalı ve gerektiğinde PCR sonrası alana taşınmalıdır. Bu, kontaminasyon riskini azaltmak için önemlidir ve malzemelerin uygun şekilde kullanılmasını ve korunmasını sağlar (Illumina, 2013).

4.3 Özel Ekipman ve Malzemelerin Kullanılması ve Yere Düşen Malzemeler

PCR öncesi ve PCR sonrası laboratuvar süreçlerinin ayrılması ve ekipmanların paylaşılmaması çok önemlidir. Bu nedenle, ekipman ve malzemeler (pipetler, santrifüjler, fırın, ısı

bloğu vb.) her süreç için ayrılmış laboratuvar alanlarında kullanılmalıdır. PCR öncesi ve PCR sonrası sarf malzemeleri için ayrı saklama alanları tahsis edilmelidir, böylece kontaminasyon riski en aza indirilir. PCR öncesi laboratuvar alanında, amplifikasyon öncesi reaktiflerin ambalajından çıkarılması ve uygun PCR sonrası saklama alanına taşınması önemlidir. PCR sonrası alana gelen kişilerin ayakkabılarından kaynaklanabilecek kontaminasyon riski göz önünde bulundurulmalı ve yere düşen herhangi bir şey kontamine olarak değerlendirilmelidir. Yere düşen tek kullanımlık malzemeler atılmalı, yere düşen tek kullanımlık olmayan maddeler ise hemen temizlenmelidir. Kontaminasyonu gidermek için %0.5 Sodyum Hipoklorit (%10 Çamaşır Suyu) solüsyonu kullanılmalı ve laboratuvar yüzeyleri temizlenmelidir. Ayrıca, kirlenmiş maddeyle temas etmiş olan kişilerin laboratuvar eldivenlerini atması ve yeni eldiven kullanmaları gerekmektedir (Illumina, 2013).

4.4 PCR Öncesi ve Sonrası Alanların Günlük ve Haftalık Temizliği

PCR öncesi alandaki kontaminasyon riskini azaltmak için günlük olarak %0.5 Sodyum Hipoklorit (%10 Ağartıcı) solüsyonu ile temizlik yapılmalıdır. Bu solüsyon, PCR öncesi alana giren PCR ürünlerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olur. Yüksek riskli alanları belirlemek ve bu alanları temizlemek önemlidir. Bu alanlar termal döngüleyiciler, amplifiye DNA işlemek için kullanılan tezgah alanı, tezgahlar, kapı kolları, buzdolabı/dondurucu kapı kolları, bilgisayar fareleri, klavyeler vb. olabilir. Haftalık temizlik rutinine ek olarak, tüm tezgahlar ve laboratuvar yüzeyleri düzenli olarak temizlenmeli, her gün temizlenmeyen tüm aletlerin kontrol edilmesi sağlanmalı ve laboratuvar zeminleri iyice temizlenmelidir. Haftalık temizlikten sorumlu personel, PCR ürünü kontaminasyonunu önleme konusunda uygun şekilde eğitilmelidir (Illumina 2013).

Ultraviyole (UV) radyasyon, görünür ışıktan daha kısa dalga boyuna sahip bir elektromanyetik radyasyondur ve X-ışınlarından daha uzun dalga boyuna sahiptir. Bu radyasyonun dalga boyu yaklaşık 10 ila 400 nanometre arasında değişir. UV radyasyon, dalga boyuna bağlı olarak yakın-UV (380-200 nm) ve uzak-UV (200-10 nm) olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Kısa dalga boyu ve yüksek enerjisi nedeniyle UV radyasyon, çeşitli mikroorganizmaları öldürme yeteneğine sahiptir (Açu et al., 2014).

UV ışığın en etkili antimikrobiyal etkisi, 250-260 nm (253.7 nm) dalga boyu aralığındadır. Bu dalga boyu, DNA tarafından en etkili şekilde emilen dalga boyudur. Hücresel DNA tarafından absorbe edilen UV radyasyonun enerjisi, yan yana bulunan timin bazları arasında kimyasal kovalent bağlar oluşturarak timin dimerleri oluşmasına yol açar. Bu oluşan timin dimerleri, hücresel UV hasarının temel mekanizmasını oluşturur. Bu nedenle, hücre bölünmesi

öncesinde kromozom replikasyonu bozulur; genlerin transkripsiyonu ve ekspresyonu gerçekleşemez. UV radyasyonun bu doğrudan antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra, ortamda ozon (O_3) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikallerin oluşarak dolaylı etkisinin olduğu da belirtilir. Mikrobiyal inaktivasyonun sağlanabilmesi için gıdanın en az 0,04 J/cm^2 enerjiye maruz kalması gerekmektedir (Açu et al., 2014).

Örneklerin taşıma ve taşımadan kaynaklanan kontaminasyonunu azaltmak amacıyla ayrıca çalışmanın gerçekleştirilecek alan yahut laminer kabin içerisinde çalışma yapmadan önce ve çalışma sonrasında UV sterilizasyonu gibi adımlar kullanılmalıdır.

4.5 Sıvıların Taşınması

Kütüphane ölçerken veya konsantre kütüphaneleri seyreltirken, doğru hacimlendirme çok önemlidir. Küçük hacim farklılıkları (±0.5 µl) bile küme sayılarında (~100,000) büyük farklılıklara yol açabilir. Bu nedenle, standart eğrilerin oluşturulması veya kesin hacimlerin gerektiği protokollerde, küçük hacimli pipetleme potansiyel bir hata kaynağı olabilir. Küçük hacimli pipetleme gerekiyorsa, pipetlerin doğru şekilde kalibre edildiğinden emin olunmalı ve performans özelliklerinin uç noktalarında kullanılmamasına dikkat edilmelidir. Pipetleme hatalarını en aza indirmek için özellikle küçük hacimli enzim ilavelerinde, reaktifleri birden fazla numune için aynı anda hazırlamak önemlidir. Böylece, birden fazla numunede standardizasyon sağlanabilir ve tek bir pipetleme hareketinde numuneler tek tek bölünebilir (Illumina 2013).

4.6 Manyetik Boncukların Kullanılması

Boncukların oda sıcaklığına gelmesine izin verilmelidir. Her kullanımdan önce taze boncuklar eklenmeli ve boncuklar tekrar kullanılmamalıdır. Boncuklar kullanımdan hemen önce iyice dağıtılmalı ve sıvının homojen olması sağlanmalıdır. Boncuklar pipetlenirken, yavaşça pipetlenmeli ve viskoziteye dikkat edilmelidir. Boncuk kaybını en aza indirmeye özen gösterilmelidir, çünkü bunun verim üzerinde etkisi olabilir. Kontaminasyonu önlemek için her numune için pipet uçları değiştirilmelidir. Karıştırılmış numuneler, protokolde belirtilen süre boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmelidir. Süpernatant alırken, boncuklara temas ettirmeden, tek veya çok kanallı pipet kullanılmalıdır. Elüsyondan sonra boncukların taşınmasını önlemek için süpernatantın bir miktarının boncuk pelletinde kalmamasına dikkat edilmelidir. Kontaminasyonu önlemek için kuyuların dibindeki etanol tamamen uzaklaştırılmalıdır. Boncuk kaybını önlemek için reaksiyon plakası manyetik stand üzerinde tutulmalı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmalıdır. Boncukları aşırı kurutmaktan kaçınılmalıdır, verimi etkileyebilir. Kuyunun kenarından boncukları pipet ucunu kullanarak kazımamaya dikkat

edilmelidir. Numune geri kazanımını arttırmak için numune/boncuk karışımı oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmelidir (Illumina 2013).

4.7 Çapraz Bulaşmayı Önleme

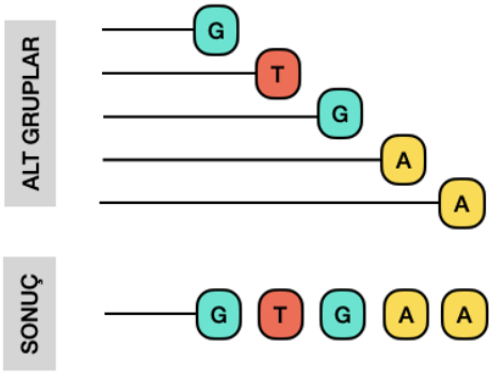
Her seferinde sadece bir adaptör tüpü açılmalıdır, böylece çapraz kontaminasyon riski azalır. Numuneler için her seferinde uçlar değiştirilmelidir, böylece adaptörler arasında kontaminasyon önlenir. Pipetleme işlemi dikkatlice yapılmalıdır, dökülmeleri önlemek için. Farklı adaptör stokları kullanılıyorsa, pipetler ve eldivenler temizlenmeli ve değiştirilmelidir. İşlemden önce ve sonra çalışma yüzeyleri temizlenmelidir, böylece kontaminasyon riski azalır.

4.8 Potansiyel DNA Kirleticileri, Teçhizat ve Sıcaklık Hususları

PCR amplikonları hazırlarken ve işlerken, PCR kontaminasyonunu önlemek için en iyi uygulamaları kullanmak önemlidir. Termal döngüleyici kullanım kılavuzunuzdaki programlama talimatlarını dikkatlice inceleyerek, uygun şekilde programlandığından emin olunmalıdır. Isıtılmış kapak işlevi kullanılması önerilir ve termal döngüleyici, izlemeli ısıtma kapağı işlevini desteklemelidir. Sıcaklık, kütüphane oluşturmak için önemlidir ve aksi belirtilmediği sürece ≤37°C sıcaklıkta tutulmalıdır. Reaktifler oda sıcaklığında çözüldükten sonra hemen buza koyulmalıdır (Illumina, 2013).

5. Dizileme Temelli Sorunlar

Bilim insanlarının, ribonükleazlar gibi kesme bölgeleri bilinen enzimleri kullanarak RNA üzerinde çalışmalar yapmasıyla başlayan nükleik asit tanılama hedefi, yıllar içindeki bilgi ve teknoloji gelişimiyle günümüz dizileme metotlarına evrilmiştir. Dizileme teknolojilerinin temeli olarak kabul edilebilecek Sanger Dizileme (Birinci Nesil Dizileme) yöntemi, 1977 yılında keşfedilmiştir. Sanger Dizileme, radyoaktif işaretli dideoksinükleotit (ddNTP) kullanarak zincir durdurma yöntemine dayanır. Hidroksil grubu eksik olan ddNTP'ler, nükleik asit zinciri boyunca eklenince zincirin uzamasını engeller. Bu sayede hedeflenen nükleik asit zinciri, farklı uzunluklarda durdurulmuş ve sonunda radyoaktif işaretli bir baz bulunan alt gruplara ayrılır (**Şekil 1).** Poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak bu diziler sıralanır ve jelin otoradyografik olarak incelenmesiyle ana zincirin dizisi belirlenebilir (Heather & Chain, 2016).



Şekil 1: Radyoaktif işaretli bazların gösterimi (Onat et al., 2023)

5.0.1 Sanger Dizileme

Kolaylığı ve doğruluğu sayesinde, uzun yıllar boyunca çok tercih edilen bir dizileme yöntemi olmuştur. Sanger dizilemenin bir problemi ise, uzun zincirlerin okumasının zorluğudur. Bulunan her baz için bir alt zincir elde edilmesi gerektiğinden, dizilemenin reaksiyon yükü yoğun olmaktadır.

Birinci Nesil Dizileme'den sonra gelişen İkinci Nesil Dizileme teknolojilerinin öncüsü Pyro-dizileme, Birinci Nesil Dizileme'den farklı olarak nükleotit belirleme için radyo veya floresan etiketli nükleotitler yerine luminogens (ışık yayan maddeler) kullanarak pyro-fosfat sentezini ölçer. Nükleotitler zincire eklenirken ortaya çıkan pyro-fosfat, ATP Sulfurilaz enzimi tarafından ATP'ye dönüştürülür ve bu ATP, Lusiferaz enzimi tarafından ışık üretimi için kullanılır. Tek tek eklenen nükleik asitlerin ışık üretimine yol açtığı ve ne kadar ışık ürettiği kaydedilir. Her adımda, Apiraz enzimi kullanılarak reaksiyondaki nükleik asitler temizlenir. Pyro-dizileme, sentezleme ile dizileme temelli bir teknolojidir, yani nükleik asit sentezi yöntemiyle çalışır. Bu teknoloji, 454 firması tarafından üretilen ve birçok dizinin aynı anda dizilenmesine olanak sağlayan 454 Pyro-dizileme makineleri ile uygulanmıştır. Bu paralel dizileme yeniliği, daha uzun dizilerin bölünerek tek seferde dizilenmesini mümkün kılmış ve daha sonra gelen dizileme teknolojileri tarafından da benimsenmiştir (Heather & Chain, 2016).

5.0.2 Illumina/Solexa Dizileme

Günümüzde de sıkça kullanılan dizileme teknolojilerindendir. Bu platform ile uygulanan dizileme prosedürü, kütüphane hazırlığı ile başlar, köprü amplifikasyonu ile devam eder, ve sentezleme-ile-dizileme yöntemi ile tamamlanır (Heather & Chain, 2016, Cacho et al., 2016). Örneklerden elde edilen 16S rRNA gen bölgesi dizileri, sonifikasyon yöntemi ile rastgele çift

sarmallı parçalara ayrıldıktan sonra uçlarına ligasyon yöntemi ile adaptörler bağlanır. Adaptörlü dizilerin çoğaltımı için PCR uygulanır, çift sarmallı yapılar denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir, ve eklenen adaptörler yardımı ile, Illumina'nın cam flowcell (akış hücresi) lerinin üstünde bulunan eşleşimli adaptörlerle kovalent bağ ile bağlanır (Cacho et al., 2016). DNA dizilerinin ucundaki iki farklı adaptör, ve ısı değişimleri aracılığıyla köprü amplifikasyon süreci gerçekleşir, ve dizileme sonunda her bir DNA parçasının flowcell'in farklı bölgeleri üzerinde küçük topluluklar halinde kopyası elde edilir, ve adaptör aracılığı ile flowcell camına bağlı olmayan DNA iplikleri yıkanarak atılır. Sürecin paralelliği, büyük DNA dizisinin küçük parçalarının farklı bölgelerde aynı anda dizilenmesinden gelir, bu şekilde flowcell'in farklı bölgelerinde farklı dizilere ait topluluklar bulunur, ve süreç hızlandırılmış olur. Dizi kopyaları topluluklar halinde elde edildikten sonra, ortamda bulunan terminatör bazlar sayesinde, flowcell'e yapışık olan tek iplikli DNA parçaları polimeraz enzimi ile sentezlenirken her baz eklendiğinde süreç duraksar, ve lazer aracılığı ile floresan ışık elde edilerek resim alınır, komputasyonel resim işleme teknikleri ile baz tespiti yapılıp, terminatör bazlar geri alınır, ve süreç bir sonraki baz ile devam eder (Cacho et al., 2016).

5.0.3 Oxford Nanopore Dizileme

Üçüncü Nesil Dizilemeyi Birinci ve İkinci Nesil Dizilemeden ayıran temel fark, tekli molekül sentezleme yöntemi ile çalışmalarıdır (Heather & Chain, 2016). Tekli molekül sentezleme yöntemlerinin en büyük avantajı, öncü yöntemlerdeki hata payı yüksek olan flowcell üstü amplifikasyon aşamasını elimine etmesi ve dolayısıyla hata payını azaltmasıdır (Wang et al., 2015).

Üçüncü Nesil Dizilemenin en yaygın ve ünlü elemanı olan Oxford Nanopore Teknolojileri (ONT), nano boyutta kuyular barındıran bir flowcell kullanır ve her bir kuyucuğa tek bir molekülün girmesi ile bu kuyudaki elektrik sinyallerini okur. Flowcell'e verilen iki iplikli DNA dizileri, bir helikaz enzimi yardımı ile açılarak, kuyulardan tek bir iplik geçmesi sağlanır. Tek iplikli DNA kuyucuklardan geçerken, iki tarafı farklı iyonize olmuş kuyucuktan her bir baz için bir elektrik sinyali kaydedilir. Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin bazlarının büyüklüğü ve yükü farklı olduğu için, hepsinden alınan elektrik rezistans sinyali farklı olur, böylece bazlar ayırt edilebilir.

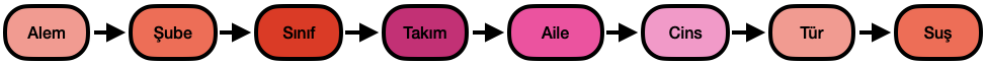
5.1 Platform Temelli Problemler

Bu dizileme teknolojilerinden, 16S mikrobiyom analizi için en sık kullanılan ikisi Illumina dizileme ve Oxford Nanopore dizilemedir. Bu iki teknoloji arasındaki en temel farklılık, Illumina dizilemenin kısa okumalar (~150 bp), Oxford Nanopore dizilemenin ise uzun okumalar elde etmesidir.

Bakteriyel ribozomun 16S rRNA gen bölgesinin V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 ve V9 olarak ayrılan hiper değişken (hypervariable) bölgeleri bulunur. Bu gen bölgeleri, farklı bakteri türleri arasında kayda değer derecede farklılık gösterir, dolayısıyla bakteriyel okumaları birbirinden ayırmak için idealdir.

Kısa okumaların bir dezavantajı, okumaların referans dizisine eşleşimi sırasında problem yaratabilmesidir. Okumalardaki baz sayısı azaldıkça, rastgele (ait olduğu yerden başka bir bölgeye) eşleşme ihtimali artar. Dolayısıyla, daha uzun dizilerin dizilemesi için, uzun okuma yapan dizileme yöntemleri tercih edilir. Illumina dizileme teknolojisinin kısa okumalar yapması sebebi ile, genellikle V1-V9 bölgelerinden ya yalnızca V4 bölgesi, ya da V3-V4 bölgeleri tercih edilmektedir. Hiper değişken bölgenin yalnızca bir kısmının kullanılması durumunda, bölgenin ayırıcı özelliği azalmakta, ve çoğunlukla aynı cins'e ait farklı türlerin ayrımı yapılamamaktadır (Heikema et al., 2021) (Şekil 2). Aynı cins kategorisinde bulunan farklı türlerin birbirinden patojenlik, enflamatuvar ve koruyuculuk özellikleri açısından bir hayli farklı karakter gösterebilmesi sebebi ile, yalnızca cins seviyesine kadar bilgi veren analizler, mikrobiyotanın önemli birçok karakteristiğini gözlem dışı bırakmaktadır (Heikema et al., 2021).

Evrimin değişen süreci içerisinde, *E. coli* ve *Shigella* spp.'nin doğru bir biçimde sınıflandırılmasının önemi, uygun klinik yönetim ve doğru epidemiyolojik veriler elde etmek için büyük bir gerekliliktir. Moleküler teknikler (çift zincirli gerçek zamanlı PCR, 16S rRNA analizi, çoklu lokus sekans tiplemesi - MLST ve genomun tam dizilimi - WGS) ile bunun yanı sıra moleküler olmayan yöntemler (matris destekli desorpsiyon iyonizasyonu - uçuş süresi kütle spektrometrisi, MALDI-TOF) kullanılarak tanımlamanın doğruluğu ele alınmaktadır. *Escherichia coli* ve *Shigella* türleri oldukça yakın ilişkilidir ve genetik olarak aynı türü oluştururlar. Bu nedenle, bu iki patojeni ayırt etmek ve doğru bir şekilde tanımlamak oldukça zorlu bir görevdir.



Şekil 2: Taksonomik seviyeler (Onat et al., 2023)

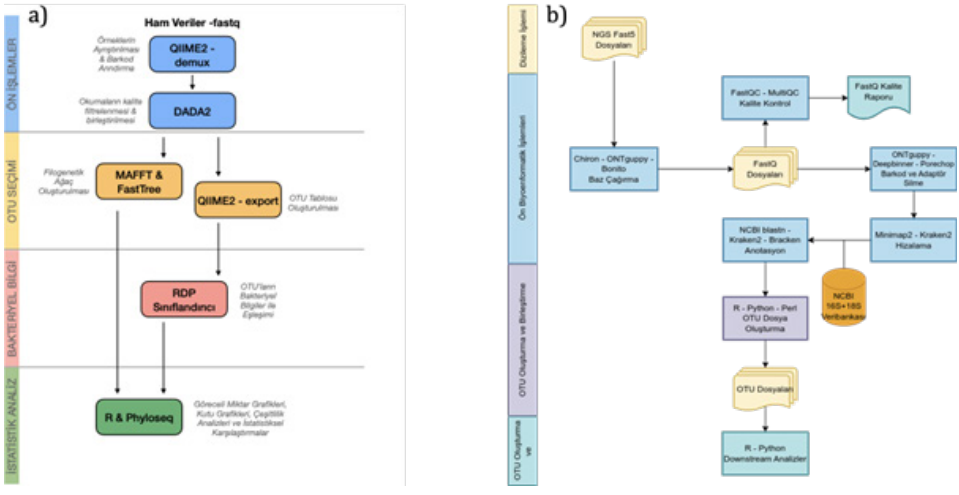
Uzun okuma yapabilen Oxford Nanopore Ve PacBio teknolojileri kullanıldığında, V1-V9 bölgesinin tümü kullanıma alınabilmekte, ve bunun sonucunda aynı cinse ait türlerin bir çoğunun ayrımı yapılabilmektedir.

5.2 Biyoenformatik Analiz Temelli Problemler

Dizileme işlemleri sonucu elde edilen verilerin işlenebilir ve analizlenebilir hale getirilmesi için, fast5 veya bcl uzantılı elde edilen ham verilerin, bir biyoenformatik akış hattından (pipeline) geçirilmesi gerekir. Bu akış hatları, platforma bağlı olarak değişmekle birlikte genel hatlarıyla; base calling (baz çağırma), hata düzeltme ve kalite filtreleme, ve Operasyonel Taksonomik Ünite (OTU) oluşturma adımlarından oluşmaktadır. Dizileme sonrasında elde edilen sinyal tiplerinin farklılığı, dizilerin uzunluğu ve kalitesinin farklılığı, dizilerin tek veya iki yönlü okunması gibi çeşitli değişkenlerden dolayı, farklı dizileme platformlarından elde edilen ham veriler, farklı akış hatları ile işlenmektedir. Hatta, bir işlemi gerçekleştirmek için geliştirilen birden fazla program ve algoritma olması sebebiyle tek bir platform için bile kullanılan farklı akış hatları vardır. Bu akış hatlarından Illumina dizileme ve Oxford Nanopore dizileme için hazırlanmış olan örnek görselleştirmeler **Şekil 3'**de sunulmuştur. Illumina platformu için sıkça kullanılan QIIME2 akış hattı, Nanopore platformu için ise EPI2ME akış hattı görselleştirilmiştir.

5.2.1 Baz Çağırma

Dizileme sırasında elde edilen ışık, kimyasal veya elektrik sinyallerin işlenip, bu veriden DNA bazlarının elde edilmesine base calling (baz çağırma) adı verilir. Illumina dizileme sonunda elde edilen ham veri, ışıma verisi tipindedir ve bcl uzantılıdır, Oxford Nanopore dizileme sonunda elde edilen ham veri, elektrik akımı verisi tipindedir ve fast5 uzantılıdır.



Şekil 3: Illumina ve Oxford Nanapore Dizilemelerinde Baz Çağırma QIIME2 ve EPI2ME akış şemaları (Onat et al., 2023)

Illumina dizileme sonucunda elde edilen ham veri bir matriksten ibarettir. Bu matrikste her ışımanın farklı bazların floresan frekansı için çekilmiş resminin, dörtlü (her baz için) numaralandırması, ışımanın flowcell üzerindeki koordinatları ve Illumina'nın temel baz çağırma programı olan Bustard'ın numaralandırmalar ile eşleştirdiği bazlar bulunur.

Birincil baz çağırma aşamasında, Illumina teknolojisinin özünden kaynaklanan belirli hatalar görülebilir. Bu hatalar gecikme, öncüleme, sinyal kaybı ve çapraz-konuşmadır. Gecikme, herhangi bir topluluktaki bir DNA ipliğinin sentezi sırasında, enzimsel problemlerden dolayı geri kalmasıdır. Bunun sonucunda, baz inkorperasyonu sırasında zamanlanmış resimler çekildiğinde bu ipliğin kaymalara ve yanlış baz çağırmalara sebep olabilmesidir. Öncüleme, gecikmeye benzer şekilde sentezlemede bir hata olması sonucu iki bazın aynı anda dizi zincirine eklenmesi sonucunda floresan resimlemede hatalar olmasıdır. Sinyal-kaybı, birçok toplulukta aynı anda sentezlemeler devam ederken, ortamdaki sentezleme materyallerinin azalması sonucu, elde edilen sinyallerde azalma görülmesidir. Çapraz-konuşma ise, her baz için farklı ışıma yapan floresan ışıma emisyonlarının birbirini uyarması sonucunda yanlış sinyal alınmasıdır (Cacho et al., 2016).

Farklı baz çağırma programları, bu olası hataları düzeltmek için farklı yöntemler kullanmaktadır, ancak hepsinin ortak bir noktası olarak, bu hataları modelleme yöntemi temel alınır. Bazı programlar (Bustard, Sfirm) parametrik modelleme yöntemleri kullanırken, bazı programlar ise (AYB) herhangi bir dağılım önkoşul gerektirmeyen parametrik olmayan modelleme yöntemlerini kullanır.

Oxford Nanopore dizileme sonucunda elde edilen ham veri elektrik rezistans sinyali şeklindedir ve baz çağırma programlarının amacı bu sinyallerden baz tahmini yapmaktır. Flowcell'de çok sayıda kuyu olması, kuyudan geçen DNA ipliğinin hızının değişmesi, ve kuyuların büyüklüğünden dolayı birden çok bazın elektrik rezistansını etkilemesi sebebiyle elde edilen ham veri gürültülü ve kirli olmaktadır (Wick et al., 2016,Lin et al., 2021). Bu sebeple, nanopore teknolojisi kullanan dizileme yöntemleri, daha yüksek oranda ham veri hatalarına sahiptir (%5-%15) (Wick et al., 2016). Bu hataları düzeltmek amacıyla ONT tarafından geliştirilen baz çağırma programları (Albacore, Guppy, Bonito), deep learning modelleme yöntemlerini kullanmaktadır.

5.2.2 Kalite Çalışmaları: Filtreleme & Hata Düzeltme

Kalite kontrolü ve düzeltme aşaması, elde edilen okumalardan en yararlılarının kullanılması için kritik bir aşamadır. Bu aşamada, elde edilen okumalar, uzunluklarına ve kalitelerine göre filtrelenir, Illumina veya Nanopore dizileme için eklenen adaptörler/barkodlar silinir ve

dizileme platformları temelli ve baz çağırma programları tarafından yakalanamamış hatalar düzeltilir veya elimine edilir.

Hem Illumina platformunda hem de Nanopore platformunda kullanılabilen bir hata eliminasyon yöntemi Operasyonel Taksonomik Ünite (OTU) oluşturmadır. Bu konuyla ilgili daha detaylı bilgi, bölümün "OTU/ASV Oluşturma" kısmında verilmiştir.

Illumina dizileme platformu için kullanılan hata düzeltme ve adaptör silme programlarından iki tanesi DADA2 ve Deblur programlarıdır. DADA2, dizileme hatalarını düzeltmek amacıyla her dizileme işlemi için ayrı bir parametrik hata modeli oluşturur ve sonucunda ASVler elde edilir. Bu hata modeli sayesinde, bir dizilemedeki her okuma için, bu okumanın rastgele olma ihtimalini hesaplayan bir p değeri elde edilir ve okumalar buna göre filtrelenir (Zymo, 2023). Bu işlemin avantajı, modelin dizilemeye özel olmasından gelir ve dolayısıyla o dizilemeye özel hataları yakalayabilir (Nearing et al., 2018). Deblur programı ise DADA2 den farklı olarak, hataları düzeltme yerine hataları elimine etme yöntemini izler. Sabit ve statik bir hata modeli kullanan Deblur, bu modeli kullanarak hatalı oluşturulduğunu belirlediği dizileri elimine eder (Nearing et al., 2018). DADA2'nin her yürütme için kurduğu farklı modeller, farklı çalışmalardan birleştirilen veri setleri olduğunda birden çok model kurulumu gerektirmesi sebebi ile komputasyonel güç gereksinimini arttıracaktır. Bu sebeple çok projeli çalışmalarda Deblur kullanımı tercih edilebilmektedir.

Oxford Nanopore dizileme platformunda kullanılan hata düzeltme ve adaptör filtreleme adımı, Guppy isimli ONT baz çağırma programı tarafından bir önceki adım sırasında gerçekleştirilir. Buna ek olarak, uzun okuma işlemi yapılması sebebi ile çok kısa okumaların (sadece adaptör okumaları) ve çok uzun (art arda eklenmiş birden çok okumanın) elimine edilmesi gerekir. Bu kısa ve uzunluğun limitleri, okunması hedeflenen bölgelerin uzunluğuna göre işlem öncesinde belirlenebilir.

5.2.3 OTU/ASV Oluşturma

16S rRNA mikrobiyom dizileme yöntemlerinde, bakteriyel bilgi eldesi sırasında ASV (Amplikon Sekans Varyant) ve OTU (Operasyonel Taksonomik Ünite) isimli iki yaklaşım uygulanabilir. OTUlar, 16S dizileri birbirine belli bir dereceden daha fazla yakın olan bakterileri, bir OTU/ünite adı altında birleştirme ile elde edilir. Bu yöntem sayesinde, dizileme platformları ve PCR amplifikasyonu sırasında dizilere inkorpore edilmiş minimal hatalar görmezden gelinmiş olur (Callahan et al., 2015). OTU oluşturma adımının dizileme prosedürüne kattığı bir problem ise, tahmin edilebileceği gibi, bu gruplama sırasında birbirine atasal orijin olarak çok yakın olan farklı türlerin ve suşların tek bir OTU olarak gruplanması, ve sonucunda doğan bilgi kaybıdır (Nearing et al., 2018, Callahan et al., 2015).

ASV yaklaşımı ise OTU yaklaşımının tam tersi olarak görülebilir. Bu yaklaşımda, birbirinden farkı olan her okuma ayrı bir ünite olarak ele alınır (Callahan et al., 2015, Zymo, 2023) Hatalara olan açıklığı yüzünden, bu yaklaşımı uygulamadan önce hata eliminasyonu şarttır ve genelde Illumina dizileme gibi hata oranı daha düşük olan dizileme platformları ile uygulanır (Callahan et al., 2015).

OTU oluşumu sırasında karar verilmesi gereken önemli iki nokta; ünite oluşturma sınırının yüzde kaç seçileceği ve açık referans mı yoksa kapalı referans mı OTU seçimi yapılacağıdır. Ünite oluşturma sınırı, en az yüzde kaç benzerliğe sahip olan okumaların tek bir ünite olarak ele alınacağını belirler. Bu sınır belirlenirken, PCR amplifikasyon adımının hata oranı, dizileme platformunun olası hata oranı ve kullanılan hata düzeltme metodlarının başarısı ele alınmalıdır. Açık referans veya kapalı referans OTU seçimine karar verirken ise, en önemli konsiderasyon, komputasyonel güçtür. Açık referans OTU seçimi de novo olarak yapılırken, kapalı referans OTU seçimi, belirli bir veri bankası ile yapılır. Kapalı referans OTU seçimi, komputasyonel olarak daha hafiftir ve çok daha kısa sürer (Zymo, 2023), ancak elde edilen OTUlara veri bankası temelli bir yanlılık eklenmiş olur. Bağırsak mikrobiyomu gibi üstüne bolca çalışılmış ve İnsan Mikrobiyom Projesi (Gevers et al., 2012) gibi geniş çaplı araştırmaların yapıldığı mikrobiyom analizlerinde kapalı referans kullanmanın dezavantajı, beklenen taksonomik kompozisyonun çoğunlukla bilinmesinden dolayı minimize olmuştur (Zymo, 2023). Dolayısıyla bu yöntem komputasyonel avantajı sebebiyle çoğu araştırmacı tarafından tercih edilmektedir.

Hem OTU hem de ASV yaklaşımında, elde edilen dosyaların temel içeriği, OTU veya ASVlere karşılık gelen dizilerin, dizileme prosedürü sırasında kaç kere okunduğudur. Bu okumalar, OTU veya ASV oluşumu sonrasında bakteriyel veri bankaları ile eşleştirip, bakteriyel kompozisyon yüzdeleri hesaplanır.

5.3 Veri Bankası Temelli Problemler

OTU/ASV oluşturulmasından sonra, bakteriyel bilgi eldesi amacı ile elde edilen OTU veya ASV dizilerinin bakteriyel bir veri bankası ile eşleştirilmesi gerekir. Bu amaçla erişime açık birden çok veri seti bulunmaktadır. SILVA (Quast et al., 2015), Greengenes (Balvočiūtė, 2017), NCBI (Federhen, 2012) ve RDP (Balvočiūtė, 2017) veri setleri bunlara örnek olarak verilebilir. NCBI veri seti, NCBI'a araştırmacılar tarafından yüklenen diziler ile eşleştirilen bakteriyel bilgilerden oluşur ve günlük olarak güncellenir (Balvočiūtė, 2017). Greengenes veri setinde filogenetik ağaç bazlı otomatik bir bakteri klasifikasyonu yapılır. Bu klasifikasyon için erişime açık veri setlerinden toplanan 16S rRNA dizileri bir kalite filtrelemesinden geçirilip kullanılır (Balvočiūtė, 2017). RDP veri seti ise GenBank, EMBL gibi büyük internasyonal veri

setlerinden alınan dizi bilgilerini içerir (Balvočiūtė, 2017). SILVA ve NCBI veri setleri manuel olarak seçilip elenmiş bakterilerden oluşur. Farklı veri setlerinin farklı isimlendirmeleri ve farklı anotasyon yöntemleri sebebi ile, farklı veri setleri ile elde edilmiş taksonomik dosyaların karşılaştırılması veya birleştirilmesi mümkün olmamaktadır. Bu farklılıklar çeşitli mikrobiyom çalışmalarının ortak yorumlanması konusunda problem yaratabilmektedir. Qiime2 programı içeriğinde kullanılabilen, dolayısıyla lllumina dizileme verisi ile en sık kullanılan veri setleri SILVA ve Greengenes veri setleridir. Aralarındaki en temel farklılık, SILVA'nın 16S, 18S ve Arke verisi barındırması, Greengenes'in ise yalnızca 16S ve Arkea verisi barındırmasıdır. Dolayısıyla bu bölümün konusu olan 16S dizileme için ikisi de uygundur, ancak 18S dizileme için SILVA kullanılabilir. Veri setlerinin performansı konusunda oldukça önemli bir kıstas, ne kadar sürede bir güncellendiğidir. Bu konuda SILVA veri seti daha başarılı olup, sıkça güncellenmekte ve yeni keşfedilen veya isimlendirilen bakteri tür ve cinsleri veri setine eklenmektedir. Ancak Greengenes veri seti, en son 2013 yılında güncellenmiştir. Bu güncellenmeler sebebi ile, yapılan çalışmalarda kullanılan veri setinin tarihinin verilmesi büyük önem arz eder, ve aynı veri seti ile farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda bile farklılıklar ve karşılaştırma problemleri görülebilmektedir. Veri seti seçilirken değerlendirilmesi gereken başka bir konu ise veri setlerinin büyüklüğüdür. Greengenes'e göre daha büyük bir veri seti olan SILVA, daha çok bakteriyel veri içerse de, büyüklüğü sebebi ile hafıza ve komputasyonel güç gereksinimini arttırmaktadır. Bu da, bazı durumlarda veri setinin kapsamlılığını, ve dolayısıyla OTU eşleştirmenin başarısını, araştırmacıların ellerindeki komputasyonel güce göre limitlemesi gerekebileceği sonucunu doğurur. Hem SILVA hem de Greengenes veri setlerinin yüzdesel seçenekleri bulunmaktadır. En sık kullanılanlar, %97 veri setleridir. Bu veri setleri, dizileri tek bir topluluk halinde gruplamak için %97 sınırını kullanır (Ceccarani ve Severgnini, 2023). Belirli bir çalışma için hangi veri setinin seçilmesi gerektiğine karar vermek için karşılaştıracak birden çok özellik olsa da, genelde bu seçimi belirleyen faktör hangi akış hattının kullanıldığı olmaktadır. Örneğin, Illumina dizileme uygulanıp Qiime2 akış hattının kullanılması durumunda bu veri setleri arasından yalnızca SILVA ve Greengenes kullanılabilmektedir. MEGAN akış hattı NCBI veya SILVA kullanımına izin verirken, mothur akış hattı RDP, SILVA veya Greengenes kullanımını mümkün kılar (Ceccarani ve Severgnini, 2023). Bu sebeple seçilen dizileme platformu da kullanılabilecek veri setlerini kısıtlamaktadır. Örnek olarak, Oxford Nanopore verisi ile Qiime2 akış hattı kullanılmamaktadır.

6. İleri Biyoenformatik Analizler

6.1 İstatistiksel Analizler

Mikrobiyom verisinin istatistiksel analizlerinde karşımıza çıkan bir problem, elde edilen taksonomi verisinin seyrek ve dağınık olması, yani bolca sıfır değeri barındırmasıdır. Bu sebeple, elde edilen bakteri yüzde veya okuma sayısı dağılımları, çoğunlukla normal dağılıma uymamaktadır. En sık kullanılan istatistiksel testlerin (t-test, ANOVA test vb.), veride normal dağılıma uyma ön koşulu barındırmasından dolayı, bu testlerin aritmetik ortalama yerine medyanı temel alan parametrik olmayan eşlenikleri (Wilcoxon test, Mann Whitney-U test, Kruskal-Wallis test vb.) mikrobiyom verisinde sıkça kullanılmaktadır. Parametrik olmayan testlerin kullanımı normal dağılım önkoşulu problemini çözse de, bu testlerin uygulanmasında da sıfırların taksonomi verisindeki çokluğu problem yaratabilmektedir. Örneğin, iki grubun karşılaştırılmasında bütün örneklerin okuması sıfır ise, medyan da sıfıra eşit olmakta, ve iki sıfır medyan arasında karşılaştırma yapılamamaktadır. Dağınık veri problemi aynı zamanda, özellikle örnek sayısı yüksek olmadığı durumlarda, uygulanan testlerin istatistiksel gücünün düşük olmasına yol açabilmektedir (Pan, 2021).

Dağınık ve seyrek veriyi oluşturan sebepler birden fazladır. Birincil olarak, verinin kendisi zaten seyrektir. Kişilerin bağırsak mikrobiyom kompozisyonları çok farklı olabildiğinden dolayı, belirli çoğu kişide görülen tür ve cinsler dışında, popülasyondaki birkaç kişide görülüp başkalarında görülmeyen bakteriler çokça mevcuttur. İkincil bir sebep ise, örnekleme hatalarıdır. Gaita örneği alımı sırasında alım bölgeleri çeşitlendirilmediği durumlarda az miktarda bulunan bakteriler analiz sırasında görülemeyebilir, bu da verideki sıfır oranını olduğundan fazla arttırır. Üçüncül bir sebep ise, dizileme prosedürlerindeki teknik hatalardır. Her ne kadar önceki bölümlerde de anlatıldığı üzere dizileme prosedürlerindeki okuma hatalarını düzeltme yöntemleri mevcut olsa da, yakalanamayan, veya düzeltilemeyip elimine edilen hatalar sonucunda, bağırsakta zaten az miktarda bulunan belli başlı bakterilerin değeri sıfır olarak görülebilmekte, bu da sıfır oranını arttırmaktadır. Verinin kendisinden kaynaklanan sorunlar dışında, dizileme ve örneklemeden kaynaklanan yanlılıkları düzeltmek adına verinin model bazlı normalizasyonu da mümkündür. Bunun için hazırlanan erişime açık program ve paketler mevcuttur. Örnek olarak sıfır-enflasyonlu olasılıklı PCA (ZIPPCA) modeli kullanan mbDenoise programı verilebilir (Zeng et al., 2022).

6.2 Yolak ve Metabolit Analizleri

Metagenomik analizlere odaklanarak yüksek boyutlu sınıf karşılaştırmalarını desteklemek için doğrusal diskriminant analizi (LDA) etki büyüklüğü (LEfSe) yöntemini sunulmakta-

dır. LEfSe, istatistiksel anlamlılık için standart testleri biyolojik tutarlılık ve etki ilişkisini kodlayan ek testlerle birleştirerek, sınıflar arasındaki farklılıkları açıklaması muhtemel olan özellikleri (örneğin organizmalar, sınıflar, operasyonel taksonomik birimler, genler veya işlevler) belirlemektedir. Sınıf karşılaştırma yöntemleri tipik olarak sıfır hipotezini ihlal eden özelliklerden oluşan biyobelirteçleri tahmin eder. Ayrıca, algoritmik olarak kodlanmış bir biyolojik hipotezle uyumlu bolluk modellerine sahip özelliklerin alt kümesi saptanır ve önemli varyasyonların boyutları tahmin edilir. Özellikle, etki büyüklüğü, her karakterize edici özelliğe bağlı olarak gözlemlenen fenomenin büyüklüğünün bir tahminini sağlayarak, farklı biyolojik yönlerin ilişki düzeyini sıralamak ve daha ileri araştırmaları ve analizleri ele almak için değerli bir araçtır. Yöntemde önceki biyolojik bilginin tanıtılması, analizi kısıtlamaya ve geleneksel olarak yüksek boyutlu veri madenciliği ile bağlantılı zorlukların ele alınmasına katkıda bulunur. Bu nedenle LEfSe, biyobelirteç keşfi karşılaştırmalı ve hipotez güdümlü araştırmalarda ilgilenilen fenotipleri (iki veya daha fazla) farklılaştıran etkinin çoğunu açıklayan biyobelirteçler önererek biyologları desteklemeyi amaçlar. Taksonomik ağaçlarda keşfedilen biyobelirteçlerin görselleştirilmesi, sonuçları biyolojik olarak anlamlı bir şekilde özetlemek için etkili bir araç sağlar. Çünkü bu, 16S tabanlı taksonomilerde/filojenilerde veya yolların ontolojilerinde ve biyomoleküler fonksiyonlarda bulunan hiyerarşik ilişkileri hem istatistiksel hem de görsel olarak yakalar (Segata et al., 2011).

Mikroorganizma adlandırmasından sonra istatistiksel analizler dışında taksonomik veriye yolak analizleri ve metabolomik analizler uygulanabilir. Bulunan mikroorganizmaların çevrelerine ne şekilde bir etkileri olduğu bu şekilde bulunabilmektedir. Elde edilen OTU verileri üzerinden yapılan ileri analizlerde farklı yöntemler ve veri bankaları kullanılarak sadece mikroorganizma isimleri dışında daha ayrıntılı sonuçlara ulaşmak mümkündür. Bu bilgiler, yolak analizleri ve metabolomik analizler ile birleştirilerek mikroorganizmaların yolakları ve bu yolakların sonucunda ortaya çıkan metabolitler görülebilmektedir. Yolak analizleri farklı veri bankaları kullanılarak uygulanabilir. Bu veri bankalarının en sık kullanılanları KEGG (Kanehisa et al., 2000) (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri bankası ile prokaryotlar için NCBI COG (Tatusov et al., 1997) (Clusters of Orthologous Genes) ve ökaryot organizmalar için ise KOGdur (Tatusov et al., 2003) (euKaryotic orthologous groups).

16S rRNA dizileme yönteminin yolak ve metabolit analizlerine getirdiği önemli bir sorun, dizileme sonucunda gen okumaları elde edilmediği için direkt olarak bir yolak ve metabolit analizi yapılamamasıdır. Bakteriyel tüm genom dizilemeye (WGS) dayalı mikrobiyom kompozisyonu çalışmalarında araştırmacıların elinde aynı zamanda bakteriyel gen okumaları olmakta ve bu genlerin anotasyonu sonrasında KEGG ve benzeri veri bankaları kullanılarak

gen okuma sayılarından yolak bollukları hesaplanabilir. 16S dizilemede ise, yalnızca 16S gen bölgesi okunduğundan ötürü, herhangi bir bakteriyel gen bilgisi bulunmamakta, dolayısıyla yolak ve metabolit analizleri yalnızca tahmin modelleri üzerinden yürütülebilmektedir. Illumina dizileme verisini işlemek için kullanılan Qiime2 akış hattı sonucunda elde edilen verilerle en sık kullanılan yolak analiz programı PICRUSt2 (Langille et al., 2013), atasal modelleme kullanarak bakteriyel bilgiden yolak bolluk verisi tahmini yapar. Bunun için girdi olarak eldeki tür veya cinslerin bir filogenetik ağacını alır (Qiime2 akış hattı sonucunda bu ağaç elde edilebilmektedir), ve türlerin birbirine atasal yakınlığına bakarak taşıdıkları genleri tahmin eder. Bu yolla, genlerin yolaklarla eşleştirilmesi sonucu yolak tahmini yapılmış olur. PICRUSt2 programına bir alternatif olarak, filogenetik ağaç girişi almayan iVikodak (Nagpal et al., 2019) isimli platform kullanılabilmektedir. iVikodak platformu, literatürdeki bakteri ve fonksiyon eşleşim bilgisini kullanarak bakteri kompozisyon verisinden (taksonomik bilgi) yolak bolluğu tahmini yapar. Benzer bir tahmin modeli, metabolit tahmini için MelonnPan (Mallick et al., 2019) (Model-based Genomically Informed High-dimensional Predictor of Microbial Community Metabolic Profiles) programı tarafından kullanılmaktadır. MelonnPan, metabolit- mikrobiyal bilgi eşleşmesi olan bir veri seti ile model eğitilip, ortaya çıkan modelle yeni bir mikrobiyal bilgi ile metabolit bolluğu tahmin eder. Modeli eğitmek amacı ile kullanılan mikrobiyal bilgi- metabolit eşleşim veri seti, kullanıcı tarafından verilip, model özelleştirilebilir.

Kaynakça / References

Ackerman, A. L., & Underhill, D. M. (2017). The mycobiome of the human urinary tract: potential roles for fungi in urology. *Annals of translational medicine*, *5*(2).

Açu, M., Yerlikaya, O., Kınık, Ö. (2014). Gıdalarda Isıl Olmayan Yeni Teknikler ve Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi, 14, 23-35.

Amplicon, P. C. R., Clean-Up, P. C. R., & Index, P. C. R. (2013). 16S Metagenomic sequencing library preparation. Illumina: San Diego, CA, USA.

Anderson, K. L., & Lebepe-Mazur, S. (2003). Comparison of rapid methods for the extraction of bacterial DNA from colonic and caecal lumen contents of the pig. Journal of applied microbiology, 94(6), 988-993.

Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., & Engstrand, L. (2008). Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PloS one, 3(7), e2836.

Bach, B. H., Quigley, A. B., Gaynor, K. M., McInturff, A., Charles, K. L., Dorcy, J., & Brashares, J. S. (2022). Identifying individual ungulates from fecal DNA: a comparison of field collection methods to maximize efficiency, ease, and success. Mammalian Biology, 1-12.

Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT—how do these taxonomies compare?. *BMC genomics*, *18*(2), 1-8.

Biclot, A., Huys, G. R., Bacigalupe, R., D'hoe, K., Vandeputte, D., Falony, G., ... & Raes, J. (2022). Effect of cryopreservation medium conditions on growth and isolation of gut anaerobes from human faecal samples. Microbiome, 10(1), 1-12.

Cacho, A., Smirnova, E., Huzurbazar, S., & Cui, X. (2016). A comparison of base-calling algorithms for illumina sequencing technology. *Briefings in bioinformatics*, *17*(5), 786-795.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2015). DADA2: High resolution sample inference from amplicon data. *BioRxiv*, 024034.

Ceccarani, C., & Severgnini, M. (2023). A comparison between Greengenes, SILVA, RDP, and NCBI reference databases in four published microbiota datasets. *bioRxiv*, 2023-04.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, *69*(2), 330-339.

Claassen, S., du Toit, E., Kaba, M., Moodley, C., Zar, H. J., & Nicol, M. P. (2013). A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. Journal of microbiological methods, 94(2), 103-110.

Cline, J., Braman, J. C., & Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic acids research, 24(18), 3546-3551.

Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., ... & Tiedje, J. M. (2003). The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic acids research*, *31*(1), 442-443.

de Lipthay, J. R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J., & Sørensen, S. J. (2004). Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. Soil Biology and Biochemistry, 36(10), 1607-1614.

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. PLoS biology, 6(11), e280.

Dridi, B., Henry, M., El Khechine, A., Raoult, D., Drancourt, M., 2009. High prevalence of Methanobrevibacter smithii and Methanosphaera stadtmanae detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. PLoS ONE. 4, e7063.

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. science, 308(5728), 1635-1638.

Federhen, S. (2012). The NCBI taxonomy database. *Nucleic acids research*, *40*(D1), D136-D143.

Gevers, D., Knight, R., Petrosino, J. F., Huang, K., McGuire, A. L., Birren, B. W., ... & Huttenhower, C. (2012). The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome.

Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., ... & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. science, 312(5778), 1355-1359.

Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, *107*(1), 1-8.

Heikema, A. P., Horst-Kreft, D., Boers, S. A., Jansen, R., Hiltemann, S. D., de Koning, W., ... & Hays, J. P. (2020). Comparison of illumina versus nanopore 16S rRNA gene sequencing of the human nasal microbiota. *Genes*, *11*(9), 1105.

Himel Mallick, Eric A. Franzosa, Lauren J. McIver, Soumya Banerjee, Alexandra Sirota-Madi, Aleksandar D. Kostic, Clary B. Clish, Hera Vlamakis, Ramnik Xavier, Curtis Huttenhower (2019).

Human Microbiome Project Consortium. (2012). Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature, 486(7402), 207-14.

J.M., Ram, J.L., Basson, M.D., Namprachan, P., Niec, S.R., Badsha, K.Z., Matherly, L.H., Majumdar, A.P., Kato, I., 2008. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces. J. Microbiol. Methods. 72, 124–132.

Joyce, C. M., & Benkovic, S. J. (2004). DNA polymerase fidelity: kinetics, structure, and checkpoints. Biochemistry, 43(45), 14317-14324.

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, *28*(1), 27-30.

Karstens, L., Asquith, M., Caruso, V., Rosenbaum, J. T., Fair, D. A., Braun, J., ... & McWeeney, S. K. (2018). Community profiling of the urinary microbiota: considerations for low-biomass samples. *Nature Reviews Urology*, *15*(12), 735-749.

Karstens, L., Asquith, M., Davin, S., Fair, D., Gregory, W. T., Wolfe, A. J., ... & McWeeney, S. (2019). Controlling for contaminants in low-biomass 16S rRNA gene sequencing experiments. *MSystems*, *4*(4), e00290-19.

Karstens, L., Siddiqui, N. Y., Zaza, T., Barstad, A., Amundsen, C. L., & Sysoeva, T. A. (2021). Benchmarking DNA isolation kits used in analyses of the urinary microbiome. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-9.

Khachatryan, Z. A., Ktsoyan, Z. A., Manukyan, G. P., Kelly, D., Ghazaryan, K. A., & Aminov, R. I. (2008). Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. PloS one, 3(8), e3064.

Köroğlu, M. (2017). Mikrobiyota çalışmalarında örnek alımı ve DNA izolasyonu. Journal of Biotechnology and Strategic Health Research, 1, 50-55.

Lagier, J. C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., ... & Raoult, D. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. Clinical Microbiology and Infection, 18(12), 1185-1193.

Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., ... & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, *31*(9), 814-821.

Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The scientist*, *15*(7), 8-8.

Li, F., Hullar, M. A., & Lampe, J. W. (2007). Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRF-LP) analysis of human gut microbiota. Journal of microbiological methods, 68(2), 303-311.

Lin, B., Hui, J., & Mao, H. (2021). Nanopore technology and its applications in gene sequencing. *Biosensors*, *11*(7), 214.

Mallick, H., Franzosa, E. A., Mclver, L. J., Banerjee, S., Sirota-Madi, A., Kostic, A. D., ... & Huttenhower, C. (2019). Predictive metabolomic profiling of microbial communities using amplicon or metagenomic sequences. *Nature communications*, *10*(1), 3136.

Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, *3*, 1-3.

Matlock, B. (2015). Assessment of nucleic acid purity. Technical Note, 52646, 1-2.

Matsuo, Y., Komiya, S., Yasumizu, Y., Yasuoka, Y., Mizushima, K., Takagi, T., ... & Hirota, K. (2021). Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. BMC microbiology, 21(1), 1-13.

McOrist, A. L., Jackson, M., & Bird, A. R. (2002). A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. Journal of microbiological methods, 50(2), 131-139.

Morita, H., Kuwahara, T., Ohshima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., Takami, H., 2007. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. Microbes Environ. 22, 214–222.

Moustafa, A., Li, W., Singh, H., Moncera, K. J., Torralba, M. G., Yu, Y., ... & Telenti, A. (2018). Microbial metagenome of urinary tract infection. *Scientific reports*, *8*(1), 4333.

Nagata, N., Tohya, M., Takeuchi, F., Suda, W., Nishijima, S., Ohsugi, M., ... & Hattori, M. (2019). Effects of storage temperature, storage time, and Cary-Blair transport medium on the stability of the gut microbiota. Drug discoveries & therapeutics.

Nagpal, S., Haque, M. M., Singh, R., & Mande, S. S. (2019). iVikodak—A platform and standard workflow for inferring, analyzing, comparing, and visualizing the functional potential of microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 3336.

Nearing, J. T., Douglas, G. M., Comeau, A. M., & Langille, M. G. (2018). Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ*, *6*, e5364.

Neuberger-Castillo, L., Hamot, G., Marchese, M., Sanchez, I., Ammerlaan, W., & Betsou, F. (2020). Method validation for extraction of DNA from human stool samples for downstream microbiome analysis. Biopreservation and Biobanking, 18(2), 102-116.

Oxford Nanopore Technologies. Nanopore sequencing 101 Q&A. https://nanoporetech.com/events/nanopore-sequencing-101-online-event-qa. Accessed 01.02.2023.

Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS biology, 5(7), e177.

Pan, A. Y. (2021). Statistical analysis of microbiome data: the challenge of sparsity. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, *19*, 35-40.

PCR Fidelity Calculator. Thermo Fisher. www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/pcr-fidelity-calculator.html

Pratt, M. (2022). The effect of sample processing methodology on observed metagenomic and metatranscriptomic microbiome profiles from healthy human stool.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, *41*(D1), D590-D596.

Rajilić-Stojanović, M., Smidt, H., & De Vos, W. M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. Environmental microbiology, 9(9), 2125-2136.

Reha-Krantz, L. J. (2010). DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1804(5), 1049-1063.

Remolar, M. (2019). Highly accurate variant detection for identification of tumor mutations and mosaic variants (Doctoral dissertation, Universitat Pompeu Fabra).

Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R. A., ... & de Vos, W. M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. Journal of microbiological methods, 81(2), 127-134.

Sezerman U, Arslan A, Onat P, Ekren, B (2023). Mikrobiyota, Probiyotikler ve Akılcı Beslenme. Mikrobiyom Analizi (s. 527-535). İstanbul: Nobel Yayınları

Scanlan, P. D., Shanahan, F., & Marchesi, J. R. (2008). Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis. BMC microbiology, 8(1), 1-8.

Schwiertz, A., Taras, D., Schafer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2009). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity. 2010; 18 (1): 190–5.

Scientific, T. (2012). Interpretation of nucleic acid 260/280 ratios. *T123 Technical Bulletin. Wilmington, DE, USA: Thermo Scientific*.

Scupham, A. J., Jones, J. A., & Wesley, I. V. (2007). Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. Journal of applied microbiology, 102(2), 401-409.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, *12*, 1-18.

Silverman, J. D., Bloom, R. J., Jiang, S., Durand, H. K., Mukherjee, S., & David, L. A. (2019). Measuring and mitigating PCR bias in microbiome data. BioRxiv, 604025.

Song, S. J., Amir, A., Metcalf, J. L., Amato, K. R., Xu, Z. Z., Humphrey, G., & Knight, R. (2016). Preservation methods differ in fecal microbiome stability, affecting suitability for field studies. MSystems, 1(3), e00021-16.

Swidsinski, A., Loening–Baucke, V., Verstraelen, H., Osowska, S., & Doerffel, Y. (2008). Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. Gastroenterology, 135(2), 568-579.

Szóstak, N., Szymanek, A., Havránek, J., Tomela, K., Rakoczy, M., Samelak-Czajka, A., ... & Philips, A. (2022). The standardisation of the approach to metagenomic human gut analysis: from sample collection to microbiome profiling. Scientific Reports, 12(1), 1-21.

Tappenden, K. A., & Deutsch, A. S. (2007). The physiological relevance of the intestinal microbiota-contributions to human health. Journal of the American College of Nutrition, 26(6), 679S-683S.

Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., ... & Natale, D. A. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC bioinformatics*, *4*(1), 1-14.

Tatusov, R. L., Koonin, E. V., & Lipman, D. J. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science*, *278*(5338), 631-637.

Thomas, V., Clark, J., & Doré, J. (2015). Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future microbiology*, *10*(9), 1485-1504.

Wang, Y., Yang, Q., & Wang, Z. (2015). The evolution of nanopore sequencing. *Frontiers in genetics*, *5*, 449.

Wick, R. R., Judd, L. M., & Holt, K. E. (2019). Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome biology*, *20*, 1-10.

Wojciuk, B., Salabura, A., Grygorcewicz, B., Kędzierska, K., Ciechanowski, K., & Dołęgowska, B. (2019). Urobiome: in sickness and in health. *Microorganisms*, *7*(11), 548.

Xue, M., Wu, L., He, Y., Liang, H., & Wen, C. (2018). Biases during DNA extraction affect characterization of the microbiota associated with larvae of the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. *PeerJ*, *6*, e5257.

Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotechniques, 36(5), 808-812.

Zeng, Y., Li, J., Wei, C., Zhao, H., & Tao, W. (2022). mbDenoise: microbiome data denoising using zero-inflated probabilistic principal components analysis. *Genome Biology*, *23*(1), 1-29.

Zhang, B., Brock, M., Arana, C., Dende, C., van Oers, N. S., Hooper, L. V., & Raj, P. (2021). Impact of bead-beating intensity on the genus and species level characterization of gut microbiome using amplicon and complete 16S rRNA gene sequencing. Frontiers in cellular and infection microbiology, 11, 585.

Zhang, H., Dibaise, J.K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M.D., Wing, R., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., 2009. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 2365–2370.

Zoetendal, E.G., Rajilić-Stojanović, M., de Vos,W.M., 2008. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. Gut. 57, 1605–1615.

Zymo (2023). https://zymoresearch.eu/blogs/blog/microbiome-informatics-otu-vs-asv Erişim Tarihi: 12/07/2023.