

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(DOKTORA TEZİ)**

**GASTROÖZOFAJİYAL REFLÜ HASTALIĞINDA
DİSTAL ÖZOFAGUS MİKROBİYOTASI**

Esra KAYAR DOĞAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr.Özlem ABACI GÜNYAR

**Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu : 405.05.00
Sunuş Tarihi : 2017**

Bornova-İzmir

Esra KAYAR DOĞAN tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan
“Gastroözofajiyal Reflü Hastalığında Distal Özofagus Mikrobiyotası” başlıklı
bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri
Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan
değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09.02.2017 tarihinde yapılan tez
savunma sınavında aday oybirliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Güven ÖZDEMİR

.....

Üye : Doç. Dr. Alev HALİKİ UZTAN

.....

Üye : Doç. Dr. Emrah ALPER

.....

Üye : Doç. Dr. Evrim ÖZKALE

.....

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xvii
TEŞEKKÜR	xxi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii

1.GİRİŞ.....	1
--------------	---

2.LİTERATÜR ÖZETİ.....	7
------------------------	---

2.1. Reflünün Epidemiyolojisi	7
-------------------------------------	---

2.2. Reflünün Patogenezi	9
--------------------------------	---

2.3. Reflü Tanısı	11
-------------------------	----

2.4. Reflü Tedavisi	14
---------------------------	----

2.5. Mikrobiyotanın Hastalıklar ile İlişkisi	14
--	----

2.5.1. Obezite, Diyabet ve Mikrobiyota	15
--	----

2.5.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ve Mikrobiyota.....	17
--	----

2.5.3. Alkolik Olmayan Karaciğer Yağlanması ve Mikrobiyota	19
--	----

2.5.4. Gastroözofajiyal Reflü Hastalığı ve Mikrobiyota	20
--	----

2.6. Çalışmada Araştırılan Mikroorganizmalar	21
--	----

2.6.1. <i>Prevotella intermedia</i>	21
---	----

2.6.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	22
--	----

2.6.3. <i>Veillonella parvula</i>	23
---	----

2.6.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	24
---	----

2.6.5. <i>Fusobacterium nucleatum</i>	25
---	----

2.6.6. <i>Candida albicans</i>	26
--------------------------------------	----

2.6.7. <i>Bacteroides fragilis</i>	27
--	----

2.6.8. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	27
---	----

2.6.9. <i>Neisseria meningitidis</i>	28
--	----

2.7. Real Time PCR.....	30
-------------------------	----

2.7.1. Ct Değeri	30
------------------------	----

2.7.2. Tm (Erime Eğrisi) Analizi	31
--	----

2.7.3. Standart Eğri Oluşturulması	32
--	----

2.7.4. Eğimin Hesaplanması ve PCR Etkinliği	32
---	----

İÇİNDEKİLER (devam)

2.7.5. İdeal bir Real Time PCR için Olması Gerekenler	33
2.7.6. Özgül Olmayan Belirleme Sistemi Çift iplikli DNA İnterkalasyon ajanları.....	33
2.7. 7. Özgül Belirleme Sistemi	35
2.7. 7.1. Hidroliz probu olan Taqman Probe Yöntemi.....	35
2.7. 7.2. Moleküler Boncuk Yöntemi.....	36
2.7.7.3. Sunrise primerleri.....	37
2.7.7.4. Scorpion Primerleri	38
2.7.7.5. Light- up Probları	39
2.7. 7.6. Hibridizasyon Prob Yöntemi	40
2.8. Moleküler Klonlama.....	41
2.8.1. Konukçu Organizma ve Vektörün Seçimi.....	44
2.8.2. Vektör DNA'nın Hazırlanması	44
2.8.3. Klonlanacak Olan DNA'nın Hazırlığı	45
2.8.4. DNA ligaz ile Rekombinant DNA Oluşumu.....	45
2.8.5. Konukçu Hücrenin içine Rekombinant DNA'nın Girişi.....	45
2.8.6. İnsert Edilen DNA'nın Taranması ve Biyolojik Özellikleri	46
3. MATERYAL ve METODLAR	46
3.1. MATERYAL	46
3.1.1. Çalışma Grubu.....	46
3.1.2. Besiyerleri	47
3.1.3. Tampon ve Çözeltiler.....	48
3.1.4. Kullanılan Kitler ve İçerikleri	51
3.1.5. Kullanılan Başlıca Cihazlar	56
3.2. METOD	57
3.2.1. Örneklerin Alımı ve Laboratuvara Getirilmesi	57
3.2.2. Biyopsi Örneklerinin Patolojik İncelemesi	57
3.2.3. Biyopsi Materyallerinden Yapılacak Olan Moleküler Analizler.....	58
3.2.3.1. Biyopsi Materyallerinden DNA İzolasyonu	58
3.2.3.2. Biyopsi Materyallerinden İzole edilen DNA'ların Safılık ve Miktar Tayini	59

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2.4. Total Bakteri Sayımı için Yapılan Moleküler Çalışmalar	60
3.2.4.1. Klonlanacak Hedef Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	60
3.2.4.2. Amplifiye Edilen Bölgenin Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	61
3.2.4.3. Klonlama, Ligasyon, Transformasyon	61
3.2.4.4. Rekombinant Plazmitin İzolasyonu	63
3.2.4.5. Rekombinant Plazmid DNA hedef gen bölgesinin amplifikasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	64
3.2.5. Total Bakteri Sayısının Hesaplanması İçin Real Time PCR ile Standart Eğrinin Oluşturulması ve Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi	64
3.2.6. Seçilen Mikroorganizmaların Varlığının Real Time PCR Araştırılması	65
3.3. İstatistiksel veriler	69
4. BULGULAR.....	69
4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Bireyler.....	69
4.2. Biyopsi Örneklerinin Patolojik İncelemesi	72
4.2.1. Biyopsi Örneklerinden Hazırlanan Preparatların Histopatolojik Bulgularının Mikroskopik İncelenmesi	75
4.3. Biyopsi Materyallerinden Yapılmış Olan Moleküler Analizlerin Değerlendirilmesi.....	76
4.3.1. Biyopsi Materyallerinden DNA izolasyonu, Saflık ve Miktar ölçümü	76
4.4. Total Bakteri Sayımı İçin Yapılan Moleküler Çalışmaların Değerlendirilmesi	78
4.4.1. Klonlanacak Hedef Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Agaroz Jelde Görüntülenmesi	78
4.4.2. Ligasyon ve Transformasyon sonuçları	79
4.4.3. Rekombinant Plazmitin İzolasyonu ve Plazmitin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.....	79

İÇİNDEKİLER (devam)

4.4.4. Klonlama Sonrasında Amplifiye Edilen Gen Bölgesinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi.....	80
4.5. Total Bakteri Sayısının Hesaplanması İçin Real Time PCR ile Standart Eğrinin Oluşturulması	81
4.5.1. Klonlanmış Gen Kopya Sayılarının Değerlendirilmesi.....	83
4.6. Seçilen Mikroorganizmaların Varlığının Değerlendirilmesi	85
4.7. İstatistiksel Veriler	97
4.7.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasında Klonlama ile Saptanan Gen Kopya Sayısının Karşılaştırılması	97
4.7.2. Saptanan Mikroorganizma Yüzdeleri ve Karşılaştırmalı Demografik Veri Analizleri.....	97
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	104
KAYNAKLAR	125
Ek 1: Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Özelliklerine Ait Sorgulama Formu	147
ÖZGEÇMİŞ.....	148

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Gram negatif bakterilerin insülin direnci, Obezite ve Tip 2 Diyabet ile ilişkisi.	17
Şekil 2.2. Sülfatı İndirgeyen bakteriler ile İnflamatuar Bağırsak Hastalığı arasındaki İlişki.	18
Şekil 2.3. Real time PCR eğrileri, Eşik değeri aşmak için gerekli olan döngü sayısı Ct.....	31
Şekil 2.4. SYBR Green 1 Yöntemi.....	34
Şekil 2.5. TaqMan Prob ile Real Time PCR.....	36
Şekil 2.6. Moleküler Boncuk Yöntemi	37
Şekil 2.7. Sunrise primerlerinin çalışma prensibi	38
Şekil 2.8. Scorpion primerlerinin çalışma prensibi	39
Şekil 2.9. Floresan Rezonans Enerji Transferi	40
Şekil 2.10. Real Time PCR' da kullanılan habercilerin genel mekanizmaları.....	41
Şekil 2.11. Moleküler Klonlama Uygulamaları.....	43
Şekil 2.12. Gen Klonlaması Temel İlkeleri	44
Şekil 4.1. Reflü hastalığı ile uyumlu bir bulgu olan dilate vasküler yapılar	75
Şekil 4.2. Reflü hastalığı ile uyumlu bulgular olan bazal hücre hiperplazisi, intraepitelyal lenfositler ve polimorflar	75
Şekil 4.3. Kontrol grubunda normal mukoza.....	76
Şekil 4.4. Rastgele bir biyopsi materyalinden izole edilen DNA' nın bakteriyel universal primerler ile amplifikasyonu sonucu oluşan 466 bp'lik hedef gen bölgesi	78
Şekil 4.5. LB Agarda mavi beyaz kolonilerin görünümü.....	79
Şekil 4.6. Komponent hücreden plazmid DNA izolasyonu sonucu elde edilen plazmit DNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.7. Klonlamanın ardından plazmit DNA ve yine kontrol amacı ile rastgele seçilmiş total DNA örneklerinin bakteriyel universal primerler ile amplifikasyonu sonucu oluşan hedef gen ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....	80
Şekil 4.8. Seçilen 5 farklı konsantrasyon ile Real time PCR yapılarak elde edilen Standart Eğri Grafiği	81
Şekil 4.9. Kontrol grubundaki bakteriyel yükü gösteren hedef gen miktarları.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.10. Reflü hastalarında bakteriyel yükü gösteren hedef gen miktarları.....	84
Şekil 4.11. Reflü hastalarında <i>Provetella intermedia</i> Amplifikasyon Eğrileri	88
Şekil 4.12. Sağlıklı bireyde <i>Provetella intermedia</i> Amplifikasyon Eğrileri.....	88
Şekil 4.13. Reflü hastalarında <i>Bacteroides fragilis</i> amplikasyon eğrileri.....	89
Şekil 4.14. Sağlıklı bireylerde <i>Bacteroides fragilis</i> amplikasyon eğrileri	89
Şekil 4.15. Reflü hastalarında <i>Lactobacillus acidophilus</i> amplikasyon eğrileri....	90
Şekil 4.16. Sağlıklı bireylerde <i>Lactobacillus acidophilus</i> amplikasyon eğrileri ...	90
Şekil 4.17. Reflü hastalarında ve sağlıklı bireylerde <i>Candida albicans</i> amplikasyon eğrileri.....	91
Şekil 4.18. Reflü hastalarında <i>Neisseria meningitidis</i> amplikasyon eğrileri	91
Şekil 4.19. Sağlıklı bireylerde <i>Neisseria meningitidis</i> amplikasyon eğrileri.....	92
Şekil 4.20. Reflü hastalarında ve sağlıklı bireylerde <i>Enterococcus faecalis</i> amplikasyon eğrileri.....	92
Şekil 4.21. Reflü hastalarında <i>Fusobacterium nucleatum</i> amplikasyon eğrileri ...	93
Şekil 4.22. Sağlıklı bireylerde <i>Fusobacterium nucleatum</i> amplikasyon eğrileri...	93
Şekil 4.23. Reflü hastalarında <i>Streptococcus pyogenes</i> amplikasyon eğrileri.....	94
Şekil 4.24. Sağlıklı bireylerde <i>Streptococcus pyogenes</i> amplikasyon eğrileri	94
Şekil 4.25. Reflü hastalarında <i>Veillonella parvula</i> amplikasyon eğrileri	95
Şekil 4.26. Sağlıklı bireylerde <i>Veillonella parvula</i> amplikasyon eğrileri.....	95
Şekil 4.27. Total Bakteri Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi	96
Şekil 4.28. Aynı playtte analiz edilen reflü ve sağlıklı gruptaki <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> türü için Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi	96
Şekil 4.29. Aynı playtte analiz edile reflü ve sağlıklı gruptaki <i>Veillonella parvula</i> türü için Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Özefajit için güncel endoskopik evreleme	12
Çizelge 2.2. Gastroözofajiyalreflü hastalığı tanısında kullanılan diagnostik Testler.....	13
Çizelge 2.3. Özofajiyal mikrobiyota üzerine kültür bazlı yapılan çalışmaların özeti	20
Çizelge 2.4. Özofajiyal mikrobiyota üzerine moleküler yöntemlerle yapılan çalışmaların özeti.....	21
Çizelge 3.1. Konvansiyonel PCR Bileşenleri	60
Çizelge 3.2. Ligasyon işlem Basamağı Bileşenleri	62
Çizelge 3.3. Plazmid PCR koşulları	64
Çizelge 3.4. Standart Eğri için Real Time PCR koşulları	66
Çizelge 3.5. Real Time PCR Bileşenleri	67
Çizelge 3.6. Light Cyclers Real Time PCR Protokolü.....	68
Çizelge 3.7. Her mikroorganizmaya spesifik primerler ve Tm Değerleri	68
Çizelge 4.1. Reflü Hastalarının Demografik Özellikleri	70
Çizelge 4.2. Reflü Hastası Olmayan Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri.....	71
Çizelge 4.3. Reflü Hastalarının Histopatolojik Bulguları.....	73
Çizelge 4.4. Kontrol Grubunun Histopatolojik Bulguları	74
Çizelge 4.5. Endoskopik yöntemle alınan biyopsi materyallerinden izole edilen DNA'ların miktar ve 260/280 nm'de ki saflık oranları.....	77
Çizelge 4.6. Reflü ve Kontrol grubunda her örnek için çıkan Ct değerleri.....	82
Çizelge 4.7. Reflü Hastalarında Yapılan Real Time PCR işlemi Sonucunda Her Organizmaya ait Ct Analizlerinin Değerleri	86
Çizelge 4.8. Kontrol Grubunda Yapılan Real Time PCR İşlemi Sonucunda Her Organizmaya ait CT Analizlerinin Değerleri	87
Çizelge 4.9. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Vücut Kitle İndeksi (VKİ) Arasındaki İlişki.....	98
Çizelge 4.10. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Sigara ve Alkol Kullanımı Arasındaki İlişki	99
Çizelge 4.11. Reflü ve Kontrol Gruplarında Safra Kesesi Ameliyatı olanlar/olmayanlar ile araştırılan mikroorganizmalar arasındaki ilişki.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge 4.12. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Proton Pompa İnhibitörü Kullanımı Arasındaki İlişki	102
Çizelge 4.13. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Uzun Süredir Ağrı Kesici Kullanımı Arasındaki İlişki.....	102
Çizelge 4.14. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Reflü Grade A özefajit olan Hastalar Arasındaki İlişki	103
Çizelge 4.15. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile <i>Helicobacter pylori</i> pozitifliği Arasındaki İlişki	103



ÖZET**GASTORÖZEFAJİYAL REFLÜ HASTALIĞINDA DİSTAL ÖZOFAGUS
MİKROBİYOTASI****KAYAR DOĞAN, Esra****Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı****Tez Yöneticisi: Doç. Dr.Özlem ABACI GÜNYAR****Şubat 2017, 174 sayfa**

Bu çalışmanın amacı; reflü hastalığı tanısı olan kişiler ile reflü olmayan bireyler arasında mikrobiyal yük ve seçilmiş mikroorganizma türlerinin varlığının karşılaştırılmasıdır. Bu çalışma kapsamında haftada iki veya daha fazla ağza acı ekşi su gelmesi, göğüste yanma varlığı ile reflü tanısı almış hastalar ile anemi nedeni ile araştırılan kontrol grubundan oluşan hastalara üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapılmıştır. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesine Şubat-Haziran 2015 ayları arasında başvuran 50 hasta (30' u reflü, 20' si kontrol) çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil olanların tamamından işlem ve çalışma için bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Anestezi eşliğinde yapılan endoskopik işlem sırasında distal özofagus gastroözofajiyal bileşkenin 5 cm üzerinden forseps kullanılarak iki adet biyopsi örneği alınmıştır. Biyopsilerin biri histolojik inceleme için formaldehit içinde patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Diğer biyopsi materyali ise, planlanan moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de ependorf tüplerinde gliserol içinde saklanmıştır. Tüm biyopsi örnekleri toplandıktan sonra total DNA izolasyonu yapılmıştır. Bakterilerde universal olarak bulunan 16S rDNA bölgesi spesifik primerler ile çoğaltılıp, gruplar arasındaki bacterial yük farklılığını saptamak için en uygun yöntem olan klonlama tekniği ile amplifiye edilen hedef gen bölgemiz Promega T Easy vektörüne klonlanmıştır.

Sonrasında rekombinant plazmit *E.coli* JM109 komponent hücrelerine aktarılmıştır ve plazmit izolasyonu yapılmıştır. Real time PCR işleminde standart eğri oluşturmak için hedef gen kopya sayısı hesaplanmış ve $8,27 \times 10^9$ gen kopya

sayısı/ µl olarak bulunmuştur. Yapılan seyreltmelerin ardından 5 konsantasyon alınarak yapılan Real time PCR' in sonucunda bir standart eğri grafiği elde edilmiştir. Klonlama sonrasında bakılan hedef gen kopya miktarları yaklaşık olarak gastroözofajiyalreflü hastalarında 10^4 - 10^5 kopya sayısı ve kontrol gruplarında 10^4 - 10^5 kopya sayısı olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p<0,005$).

Araştırmada bakteriyel *Prevotella intermedia*, *Streptococcus pyogenes*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus acidophilus* türlerinin ve fungal *Canida albicans* türünün varlığı ise tür spesifik primerlerin kullanıldığı Real time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 30 reflü hastasında, real time PCR ile saptanan mikroorganizmalar yüzde oranları sırasıyla; *Provetalla intermedia* (%23), *Veillonella parvula* (%17), *Fusobacterium nucleatum* (%17), *Neisseria meningitidis* (%17), *Bacteroides fragilis* (%6), *Lactobacillus acidophilus* (%3), *Streptococcus pyogenes* (%27) şeklinde bulunmuştur. 20 kontrol grubunda ise; *Provetalla intermedia* (%20), *Veillonella parvula* (%15), *Fusobacterium nucleatum* (%10), *Neisseria meningitidis* (%10), *Bacteroides fragilis* (%20), *Lactobacillus acidophilus*(%15), *Streptococcus pyogenes* (%35) oranlarında saptanmıştır.

Çalışmaya katılan tüm bireylere çeşitli sorular sorularak form oluşturulmuştur. Bu formdaki sorulara verilen yanıtlar ile gastroözofajiyalreflü hastalarında Vücut Kitle İndeksi yükseldikçe *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori* miktarlarında anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,005$). Sigara ve alkol kullanan reflü hastalarında ise *Helicobacter pylori* türü kontrol grubuna göre daha fazla olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p <0,005$). Sorgulama formuna göre safra kesesi ameliyatı olan reflü grubunda; *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* türleri baskın olup; kontrol grubunda ise *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis* türleri baskın ve istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p <0,005$). Proton pompa inhibitörü kullanan bireylerde her iki grupta da saptanan türler açısından anlamlı bir veri elde edilmemiştir. Uzun süredir ağrı kesici kullanımı ile reflü hastalarında *Helicobacter pylori*, *Veillonella*

parvula, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* ve *Streptococcus pyogenes* miktarları yüksek olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,005$). Grade A özefajiti olan reflü hastalarında ise *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* ve *Streptococcus pyogenes* miktarları anlamlı olarak artmıştır ($p < 0,005$). *Helicobacter pylori* pozitif çıkan reflü hastalarında da *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Neisseria meningitidis* türlerinin bulunma sıklığı yüksek bulunmuştur ($p < 0,005$).

Çıkan sonuçlara göre çoğu Gr(-) ve ağızda patojen olan bu mikrorganizmalar, gastroözofajiyalreflü hastalığında distal özofagusta bulunmaktadır. Distal özofagusta reflü hastalığı ile birlikte iki grup arasında toplam mikroorganizma sayısı arasında fark saptanmamışken, mikroorganizma çeşitliliğinin değiştiği görülmüştür. Bu hastalara medikal tedavilerinin yanında probiyotik ilaçlar, uygun beslenme önerileri vermek yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Gastroözofajiyalreflü hastalığı, Mikrobiyota, Real time PCR, Klonlama



ABSTRACT**DISTAL ESOPHAGUS MICROBIOTA IN GASTROESOPHAGEAL
REFLUX DISEASE****KAYAR DOĞAN, Esra****PhD Thesis, Department of Biology****Thesis Manager: Assoc. Prof. Özlem ABACI GÜNYAR****February 2017, 174 pages**

The purpose of this study is to compare persons with and without reflux in terms of microbial load and presence of selected microorganism species. Within the scope of this study, patients diagnosed with reflux due to regurgitation of sour liquid two or more times a week and a burning sensation in the chest, and control group patients investigated for anemia underwent upper gastrointestinal tract endoscopy. Fifty patients who presented to İzmir Katip Çelebi University Atatürk Education Research Hospital between February 2015 and June 2015 were included in the study. Of them, 30 were assigned to the reflux group and 20 to the control group. Informed consent was obtained from all those involved in the study.

During the endoscopic procedure performed under anesthesia, two biopsy specimens were taken from the distal 5 cm of esophagus gastroesophageal junction using forceps. One of the biopsies was sent to the pathology laboratory in formaldehyde for histological examination. The other biopsy material was stored in glycerol in Eppendorf tubes at -80°C to use in planned molecular studies. After all the biopsy specimens were collected, total DNA isolation was performed. The 16s rDNA region, which is universally found in bacteria, was amplified with specific primers and the amplified target gene cloned into the Promega T Easy vector, because the cloning method is the most suitable method for detecting the bacterial load differences between the groups.

Subsequently, recombinant plasmid was transferred to the *E.coli* JM109 component cell and then plasmid isolation was performed. In order to generate a standard curve in real time PCR, the number of copies of the target gene was

calculated and found to be 8.27×10^9 gene copy number/ μl . A standard curve was obtained as a result of the real time PCR performed by taking five concentrations after the dilutions. The number of the copies of the target gene observed after cloning was approximately 10^4 - 10^5 copy number in the gastroesophageal reflux patients and 10^4 - 10^5 copy number in the control group patients. The difference was not statistically significant ($p < 0.005$).

In the study, the presence of bacterial *Prevotella intermedia*, *Streptococcus pyogenes*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus acidophilus* and fungal *Candida albicans* species was investigated using the real time PCR method in which the species-specific primers were used. In the 30 reflux patients included in the study, the percentages of the species determined conducted with the real time PCR were as follows: *Prevotella intermedia* (23%), *Veillonella parvula* (17%), *Fusobacterium nucleatum* (17%), *Neisseria meningitidis* (17%), *Bacteroides fragilis* (10%), *Lactobacillus acidophilus* (3%) and *Streptococcus pyogenes* (27%). In the 20 control group patients the percentages were as follows: *Prevotella intermedia* (20%), *Veillonella parvula* (15%), *Fusobacterium nucleatum* (10%), *Neisseria meningitidis* (10%), *Bacteroides fragilis* (20%), *Lactobacillus acidophilus* (15%) and *Streptococcus pyogenes* (35%).

A informed volunteer form was developed by asking all the participants various questions. The responses given to the questions in the form revealed that as the gastroesophageal reflux patients' Body Mass Index increased so did the number of *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* and *Helicobacter pylori* significantly ($p < 0.005$). The *Helicobacter pylori* species was statistically significantly higher in the reflux patients who smoked or took alcohol than in the control group patients ($p < 0.005$). According to the responses, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* and *Neisseria meningitidis* species were dominant in the reflux group patients having undergone cholecystectomy (gallbladder surgery) while *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* and *Bacteroides fragilis* species were statistically significantly high in the control group patients ($p < 0.005$). No significant data were obtained in the patients using the proton pump inhibitor in both groups in terms of the species detected. The

amounts of *Helicobacter pylori*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pyogenes* species were statistically significantly high in the reflux patients taking pain relievers for a long time ($p < 0.005$). The amounts of *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pyogenes* were significantly high in reflux patients with Grade A esophagitis ($p < 0.005$). *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* and *Neisseria meningitidis* species were higher in the *Helicobacter pylori*-positive reflux patients ($p < 0.005$).

According to the results, these microorganism most of which are Gr (-) and reside in the mouth are present in the distal esophagus in patients with gastroesophageal reflux disease. There was no difference between the number of total bacteria in the two groups with distal esophageal reflux disease, but the types of bacterial varied. In addition to medical treatments, provision of probiotic medicines and giving appropriate nutritional advice can help these patients.

Key words: Gastroesophageal reflux disease, Microbiota, Real time PCR, Cloning



TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren bana destek olan, beni yönlendiren, hiçbir zaman yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Doç.Dr.Özlem ABACI GÜNYAR'a ve Doç.Dr.Alev HALİKİ UZTAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın planlanması sırasında, hastaların seçiminde ve klinik durumlarının değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Katip Çelebi Üniveristesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Klinğinde Gastroeneteroloji Uzmanı olan Sayın Doç.Dr. Emrah ALPER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın istatistiksel olarak yorumlanmasında Öğr.Gör.Dr.Hayal BOYACIOĞLU'na, örnek alımları sırasında yardımcı olan Gastroenteroloji Uzmanı Dr. Firdevs TOPAL'a ve patolojik bulguların değerlendirilmesinde Uzman Patolog Neşe EKİNCİ hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Bu aşamaya gelirken, her zaman yanımda yer alan, her konuda benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme minnettarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir (2015 Fen 049). Bu nedenle, ayrıca Araştırma Fonu Yönetim Kuruluna da teşekkür ediyorum.



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

GÖR	: GastroözofajiyalReflü
GÖRH	: GastroözofajiyalReflü Hastalığı
PPI	: Proton Pompa İnhibitörü
LA	: Loss Angless
AOYKH	: Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
ÖA	: Özofajiyal Adenokarsinom
BÖ	: Barret Özofagus
RÖ	: Reflü Özefajit
İBH	: İnflamatuar Bağırsak Hastalığı
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Ct	: Cycle Treshold
Tm	: Temparature melting
Bç	: Baz çifti



1. GİRİŞ

Gastroözofageal Reflü (GÖR); herhangi bir semptom veya mukozal hasar vermeksizin gece olmayan gün içinde ise birçok kez meydana gelebilen fizyolojik bir olaydır (Uyanıkoğlu vd., 2003) .

Gastroözofageal Reflü Hastalığı ise (GÖRH); 2006 Uluslararası Montreal konsensusuna göre, mide içeriğinin özofagusa geri çıkması nedeniyle rahatsız edici semptomlara veya komplikasyonlara neden olan bir durum olarak tanımlanmıştır (Vakil vd., 2006; Gorecki, 2015).

Reflü hastalığında; göğüste yanma olur ve mide içeriği (asit, safra, pepsin, pankreas sıvıları, gıda içeriği) özofagusa hatta ağıza kadar geri kaçır, yutma güçlüğü gibi semptomlar meydana gelir, bunun sonucunda da özofagusta mukozal hasar ve erozyonlar oluşabilmektedir. Bu erozyonlar özefajit, peptik darlıklar, barret özofagusu hatta özofajiyal adenokarsinoma sebebiyet verebilmektedir (Uyanıkoğlu vd., 2003) .

Hastalarda ağıza acı ekşi su gelmesi, göğüste yanma gibi şikayetlerin yanısıra ekstraözofageal semptomlarda meydana gelebilir. Bunlar; nefes darlığı, kronik öksürük, ses kısıklığı, kardiyak dışı göğüs ağrısı, astım, faranjit, horlama, uyku bozuklukları, dental erezyon, rekürren pnömoni, aspirasyon, pulmoner fibrozis, vokal kord polibi gelişimidir. Atipik semptomlar ise; retrosternal ağrı, bulantı, epigastrik ağrı ve disfajidir (Uyanıkoğlu vd., 2003; Vakil vd., 2006; Dobrucalı, 2007; Gorecki, 2015) .

Gastroözofajiyalreflü hastalığı toplumda oldukça sık görülen önemli bir sağlık problemidir. Dünyadaki görülme olasılığı %7-25 arasında değişmektedir. Batı ülkelerinde %10-20 arasında iken, doğu Asya ülkelerinde %2,5-7,8 ve Avustralya'da ise %11,6 civarındadır. Kuzey Amerika ve Avrupa'da gastroözofajiyalreflü hastalığı prevalansının artış gösterdiği bilinmektedir. Bor ve arkadaşlarının verilerine göre Türkiye GÖRH prevalansı, haftalık pirozis ve/veya regürjitasyon yakınması olan hasta sıklığı %20 civarındadır. Yapılan bir

çalışmada, reflü özefajit prevalansı 50 yaşın üstündeki bayanlarda anlamlı olarak artmış bulunmuştur ve bayanlarda özofajiyal adenokarsinom görülme olasılığı erkeklerden daha yüksek saptanmıştır (Bor vd., 2005; Okçu vd., 2016; Kim et al., 2016).

GÖRH insidansı ile ilgili yapılmış az sayıda araştırma vardır. Bunlar yıllık GÖRH insidansını 5/1000 olarak saptamışlardır. İnsidans oranı düşük gibi görünse de reflü hastalığının kronik olmasından dolayı zaman içinde oluşan birikim, prevalansın yüksek olmasına neden olmaktadır (Doğan, 2009) .

Hastalığın tanısında endoskopik yöntem çok önemlidir. Endoskopi vücut boşluklarının bir ışık kaynağı ile aydınlatılarak gözle direkt incelenmesidir. Gastroskopi (Üst gastrointestinal sistem Endoskopisi) ise; yemek borusu, mide ve on iki parmak bağırsağının incelenmesine, histopatolojik değerlendirme için doku örneği alınmasına imkan veren bir yöntemdir (Dobrucalı, 2007).

Gastorözofajiyal reflü hastalığı diğer tanı yöntemleri arasında sıklıkla kullanılabılır; 24 saatlik özofagus pH metresi, impedans, özofajiyal manometre, özellikle mide fıtığı ve peptik darlığın saptanması için baryumlu özofagus pasaj grafisi, mide boşalma hızının ölçülmesi olarak sayılabilir (Gorecki, 2015).

Üst gastrointestinal sistem endoskopisinde saptanan özofajit şiddetinin derecelendirilmesi için evreleme sistemleri geliştirilmiştir. Bunlar; Los Angeles (LA, The International Working Group for the Classification of Oesophagitis–IWGCO), Savary & Miller (veya Savary & Monnier) ve Hetzel & Dent ve MUSE (metaplazi-ülser-striktür-erezyon) sınıflamalarıdır (Dobrucalı, 2007).

Özofajiyal epitelyal hücrelerde hücreler arası boşlukların genişlemesi, reflü içeriğinin teması sonucunda oluşan epitelyal hasar için erken işaret olarak tanımlanmıştır . İntraselüler boşluk hacmi gastroözofajiyalreflüsü olan hastalarda özofajiyal squamoz epitelyumun bazal tabakasında artış göstermektedir (Neumann et al., 2011; Park et al., 2011).

Mikrobiyom terimi vücutta yaşayan bakteriler, funguslar, protozoonlar, virüsler gibi tüm mikroorganizmaların ve onların genetik materyalini ifade eder,

mikrobiyota ise bu mikroorganizmaların belli bir bölgede toplanması olarak tanımlanmaktadır (Bağırsak mikrobiyotası, cilt mikrobiyotası gibi) (Khanna et al., 2014; Jandhyala et al., 2015).

Mikrobiyota ve hastalıklar arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır ama bu çalışmaların içinde en geniş kapsamlı olanı; İnsan Genom Projesine benzer şekilde yapılan sağlıklı ve hasta bireylerdeki mikroorganizma farkını tanımlamak amacıyla ilk olarak 2008-2012 yılları arasında İnsan Mikrobiyom Projesidir. Bu çalışmada araştırmacılar; servikal, vajinal, rektal, ağız içi, fetal membran, plasenta, amniyotik sıvı, dışkı, kan plazma serum gibi bir çok örnek olarak moleküler teknikler ile insan mikrobiyomunun çeşitliliğine ve kompozisyonuna bakmışlardır. Aynı zamanda çalışmada yaygın hastalıklar olan Tip 2 diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (ülseratif kolit, crohn gibi) mikrobiyom ile arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. İnsan Mikrobiyom Projesi ile ilgili ikinci çalışma ise; 2013-2016 yılları arasında yapılmıştır. Araştırmacılar gebelikte , bir model olarak inflamatuvar bağırsak hastalığında, solunum ile ilgili viral enfeksiyonda ve tip 2 diyabette mikrobiyomu incelemişlerdir (Proctor et al., 2014).

İnsan vücudunda bakterilerin toplam yüzey alanı 400 m²'dir. Vücudumuzda toplam insan hücre sayısından 10 kat fazla 10¹⁴ mikroorganizma bulunmaktadır. Kolonda ise yaklaşık 500 tür vardır. Floranın oluşumu daha doğmadan önce başlamaktadır. Doğumdan önce amniyotik sıvı ve plasentada da *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Escherichia coli* türlerinin olduğu bulunmuştur (Jimenez et al., 2008).

Sezeryan veya normal doğum şekli floranın oluşumunda etkindir, normal doğumda bebeğin florası annenin vajinal mikrobiyotasına benzerken (baskın olarak *Lactobacillus*, *Prevotella*), sezeryan doğumda ise yeni doğan bebeğin florası annenin deri mikrobiyotasına (baskın olarak *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium* spp.) benzemektedir (Mueller et al., 2016).

Hazır mama veya anne sütü ile beslenme şekli de mikrobiyota gelişimde oldukça önemlidir. Örneğin, anne sütüyle beslenen bebeklerde *Bifidobacteria* sayısı daha yüksek ve mikrororganizma çeşitliliğinin daha fazla olduğu görülmüştür (Grzeskowiak et al., 2012).

Bebek 3-4 yaşına geldiğinde iki baskın filum *Firmicutes* (proinflamatuvar ve obezegenik) ve *Bacteroidetes* (bu etkilerden koruyucu) ortaya çıkmaktadır (Liu et al., 2016).

Yetişkin bireylerde ise intestinal mikrobiyotada 4 Baskın filum stabil olmaktadır. Bunlar; *Firmicutes* (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* genuslarını da içeren 250 genus), *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotella* ve *Xylanibacter* genuslarını da içeren 20 genus), *Actinobacteria* (*Collinsella* ve *Bifidobacterium*) ve *Proteobacteria*'dır. (*Eschericia* ve *Desulfovibrio*). Ayrıca intestinal mikrobiyota da; *Verrucomicrobia* (*Akkermansia*), *Archaea* domainine ait *Methanobrevibacter methanogenesis* ve *Candida*, *Saccharomyces* mayaları da bulunmaktadır (Palmer et al, 2007; Khanna and Tosh, 2014).

Mikroorganizmalar; bir dizi geniş enzimatik reaksiyonda, konak homeostazında, mikrobelerin sentezinde, detoksifikasyon, epitel gelişimi ve bağışıklık sisteminde önemli rol oynarlar. Mikrobiyota, sindirilemeyen polisakkaritlerden fermentasyon yolu ile kısa zincirli yağ asidi oluşturmaktadır. Mikrobiyota aynı zamanda K2, B1, B2, B3, B6, B12, Folik asit, pantotenik asit sentezlerini yapar ve H₂, CO₂, metan gazı, lizin üretimini ve amonyak üre dönüşümünü gerçekleştirir. Ayrıca mikroorganizmalar, ksenobiyotiklerin metabolize edilmesinde ve karaciğer tarafından detoksifiye edilerek safra ile atılan bileşiklerin enterohepatik dolaşıma geçmesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (Mackowiak,1982; Hooper et al., 2002; DiBaise et al., 2008; Kinross et al., 2008).

Mikroorganizmalar patojenlere karşı immün sistemin homeostazını, doğal immünite epitel, mukus ile ve edinsel immünite T ve B hücre sentezi ile gerçekleştirir. Bazı mikroorganizmalar bakteriyosin üreterek patojenlerin

yapışmasını bloke eder, immun yanıtı düzenleyip salgısal IgA üretimini uyararak Clostridia gibi patojenlerden konağı korurlar (Tennyson et al., 2008).

Antimikrobiyal tedaviler, aşılama, dezanfektanların yoğun şekilde kullanımı, beslenme değişiklikleri, alkol tüketimi, bakım evi, hastane, ev gibi yaşama yerlerinin değişikliği, sistemik hastalıklar, yaşlanma, çok fazla antibiyotik, mide ilaçları ve diğer ilaçların kullanımı, genetik faktörler, geçirilen ameliyatlar ve en önemlisi stres mevcut mikrobiyotanın değişmesine neden olabilmektedir (Mariat et al., 2009 ; Claesson et al., 2011 ; Flint, 2012).

Mikrobiyota konusunda özellikle bağırsak mikrobiyotası ile ilgili olarak yapılan son çalışmalarda, obezite (Chakraborti, 2015), diyabet (Bouchi et al., 2015), irritabl barsak sendromu (Putignani et al., 2016), inflamatuvar bağırsak hastalığı (Putignani et al., 2016), alkol dışı karaciğer yağlanması (Lau et al., 2015) ve otoimmün hastalıklar (Aidy et al., 2016) arasında ilişkisi olduğu görülmüştür.

Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişmesiyle artan çalışmalar sayesinde bağırsak mikrobiyotası dışında özofagusta da kompleks bakteriyel bir populasyon olduğu görülmüştür. Özofagus hastalıklarında bakterilerin rolünü anlamak amacıyla özofagustan biyopsi örnekleri alınıp mikroorganizmalar araştırılmaya başlanmıştır (Liu et al., 2013).

Özofajiyal adenokarsinom görülme sıklığı son zamanlarda oldukça artmaktadır. Reflü semptomları, reflü özefajit, barret özofagus gelişimi displazi ve adenokarsinom oluşum sırası şeklinde ilerleme göstermektedir. Bu hastalığa sebep olan faktörlerden bazıları sigara kullanımı, obezite, gastroözofajiyalreflü hastalıkları, az meyve ve sebze tüketimi ve çok antibiyotik kullanımı sayılabilir (Neto et al., 2016).

Gastroözofajiyalreflü hastalığının ve Barret özofagusunun özofajiyal adenokarsinom gelişimini tetiklediği bilinmektedir. Bu hastalıkların oluşumunda mikrobiyota da değişim olmaktadır, fakat bu durumun etyopatogenezi açık değildir (Blacket et al., 2013).

Tüm bu bilgilerin ışığında; amacımız gastroözofajiyal reflü hastalığı olan bireyler ile reflü şikayeti olmayan bireyler arasında üst gastrointestinal sistem endoskopi işlemi yapılarak, bu işlem sırasında distal özofagustan forseps kullanarak alınan biyopsi materyallerinde iki grup arasındaki mikrobiyal yükü karşılaştırmaktır, diğer amacımız ise özofagusla ilişkili olabileceğini düşünerek seçtiğimiz 9 türün real time PCR yöntemi ile var yok analizi yapmak olmuştur. Bu hedefler doğrultusunda öncelikle özofagustan alınan biyopsi materyallerinden DNA izolasyonu, ardından klonlama ve en son olarak da real time PCR yöntemleri uygulanmıştır.

Bağırsak inflamasyonunun patogenezinde mikrobiyotanın rolü ile ilgili çalışmalar çok fazla yapılmaktadır. Fakat özofagus mikrobiyota çalışması dünyada çok az sayıda ve az hasta sayısı ile yapılmış olup, Türkiye'de özofagus mikrobiyota çalışması henüz bulunmamaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Gastroözofajiyalreflü hastalığı (GÖRH), asit pepsin safra pankreatik enzimler gibi mide içeriğinin antireflü bariyeri yetersizliği sonucunda özofagusa geri kaçmasıdır. GÖRH, aslında fizyolojik bir olaydır gün içerisinde bir çok kez meydana gelebilir fakat göğüste yanma ve ağıza acı ekşi su gelmesi gibi semptomlar olursa gastroözofajiyalreflü hastalığı ortaya çıkar. Bu rahatsızlık sonucunda özofagus mukozasında hasar oluşabilir (özefajit, peptik darlık, barret özofagusu gibi) veya endoskopik olarak görülebilen bir hasar oluşmayadabilir (non eroziv reflü hastalığı) (Uyanıkoğlu ve Keşküş, 2013).

Gastroözofajiyalreflü hastalığının tipik görülen semptomları; göğüste yanma, ağıza acı ekşi su gelmesi ve yutma güçlüğü olmasıdır. Atipik veya ekstraözofajiyal semptomları ise; astım, kronik öksürük, faranjit, laranjit, boğaz temizleme ihtiyacı ve kardiyak dışı göğüs ağrısı olarak sayılabilir (Vakil vd., 2006; Gorecki, 2015).

2.1. Reflünün Epidemiyolojisi

GÖRH çok yaygın görülen bir hastalıktır. Türkiye’de Bor ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; gelir düzeyi düşük olan 630 kişide , göğüste yanma %10, ağıza acı ekşi su gelmesi %15,6 oranında, her iki semptomun birlikte görülme oranı ise % 20 olarak saptanmıştır. Yanma ve ağıza acı ekşi su gelmesinin kardiyak dışı göğüs ağrısı ile ilişki yüzdesi %37,3, Disfaji (yutma güçlüğü) ile % 35,7, dispepsi (midede şişkinlik) ile % 42,1 ve odinofaji (ağrılı yutma) ile % 35,7 saptamışlardır (Bor vd., 2005).

GÖRH; özofajiyal ülserler (%5), peptik darlıklar (%0,5-20) ve Barrett özofagusu (%0,4-20) gibi önemli komplikasyonlara neden olabilmektedir. 10 ülke arasında 5581 kişiyle yapılan çalışmada yaşam kalitesi ölçeğindeki sorulara verilen yanıtlara göre; reflü hastalığının artrit, myokard infarktüsü, kalp yetersizliği ve hipertansiyon gibi kronik hastalıklar kadar hayat kalitesini bozduğu tespit edilmiştir (Enck et al.,1999; Bor, 2008).

Türkiye'deki eroziv özefajit ve barret özofagus prevalansını belirlemek için yapılmış olan bir çalışmada; reflü semptomları olan 645 hastaya üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapmışlardır. Araştırmacılar, 27 hastada eroziv özefajit (%17), 3 hastada ise barret özofagusu (%2) bulmuşlardır. Özofajiyal striktür ve adenokarsinom saptanmamıştır. Eroziv özefajit ve non eroziv özefajit görülme sıklığı açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Bayrakçı vd., 2008).

Türkiye'de yapılan çok merkezli reflü çalışması olan GÖRHEN isimli araştırmaya göre; haftada bir kez göğüste yanma ve/veya ağza acı ekşi su gelmesi olan 1421 reflü hastalığı tanısı alan bireyin %35' inde eroziv özofajit bulunmuştur; bunların % 61' i grade A, % 34'ü grade B, % 4' ü grade C ve % 1'i grade D olarak belirlenmiştir. Hastaların %4,2' sinde Barrett özofagusu görülmüştür. Ancak endoskopi uygulanan reflü hastalarının %0,4' ünde histopatolojik olarak Barrett metaplazisi saptanmıştır. Bu çalışmaya gastroözofajiyalreflü hastalığının ülkemizde batıdaki kadar sık görüldüğünü, ancak genelde hafif seyretmekte olduğu göstermiştir (Bor, 2008).

Yapılan bir başka çalışmada astım, kronik obstrüktif pulmoner hastalık ve kontrol gruplarında haftada bir veya daha fazla yanma ve ağza acı ekşi su gelme prevalansı % 25,4, %17, %19,4 ve bir haftada ara sıra olan semptomlar % 21,2, % 16,3 ve % 27 oranlarında bulunmuştur. Astım grubundaki reflü prevalansını, kronik obstrüktif pulmoner hastalık ve kontrol grubuna göre daha yüksek saptamışlardır. Kronik obstrüktif pulmoner hastalık ve kontroller arasında ise anlamlı fark bulmamışlardır (Bor vd., 2010).

Sivas'ta yapılmış bir çalışmada da; reflü görülme sıklığı %19,3 bulunmuştur. Diğer bir çalışma da ise uyku apnesi olan reflü hastaları ile olmayan kontrol grubu kıyaslanmıştır. Reflü prevalansı uyku apnesi olan hastalarda % 38,9 ve uyku apnesi olmayan grupta ise % 32 oranlarında tespit edilmiştir. Reflü semptomları açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Yönem vd., 2013; Başoglu vd., 2015).

Ülkemizde reflü hastalığı görülme sıklığının batı toplumları ile aynı oranlarda olduğu gösterilmiştir. Normal sağlıklı popülasyonun rutinde gastroskopiye gitmemesinden dolayı özofajitin gerçek prevalansını saptamak biraz daha zordur (Bor, 2005).

Dünyada reflü özefajit görülme sıklığı artmaktadır, Batı toplumlarında yaklaşık % 20 oranında görülmektedir ve lezyonlar sonucu oluşan barret özofagus özofajiyal adenokarsinomu veya barret ile ilişkili adenokarsinomu tetiklemektedir. Aynı zamanda Batı ülkelerinde olduğu kadar Asya ülkelerinde de görülme sıklığı artmaya başlamıştır (Song et al.,2016).

2.2. Reflünün Patogenezi

Midede bulunan gastrik asit, duodenal içeriğin özofagusa etkisine karşılık, özofagusta da alt özofagus sfinkter, özofagus klirensi ve özofagus doku direnci, diyafram krusu defans mekanizmaları bulunmaktadır. Özellikle alt özofagus sfinkter basıncı distal özofagusta antireflü bariyeri oluşturması açısından çok önemli olup, yemek yeme esnası dışında tonik olarak kapalıdır. Hiatal herni (mide fıtığı) ve düşük alt özofagus sfinkter basıncı ile intraabdominal basınç artmaktadır. Bu faktörlerin her biri reflü semptomlarını etkilemektedir (Sloan et al.,1992).

Gecikmiş mide boşalımı reflü hastalarında %10-15 oranında bulunmuştur. Mide içeriğinin artan hacmi geçici alt özofajiyal sfinkter gevşemesini ve gastroözofajiyal basınç farkını artırarak reflü oluşumunu tetiklemektedir (Richter,1999; Dobrucalı, 2007).

Alt Özofagus Sfinkteri (AÖS) insanlarda 15-40 mmHg arasında değişebilen bir istirahat basıncına sahiptir. Yutkunma esnasında gıdaların özofagusdan mideye geçişinin olması için bu basınç düşer ve 3-6 sn. kadar düşük kaldıktan sonra tekrar istirahat basıncına ulaşır. AÖS basıncını nörojenik, miyojenik ve humoral mekanizmalar kontrol eder. Yağlı yiyecekler, sigara,

kalsiyum kanal blokerleri, beta adrenerjik blokerler, nitratlar ve antikolinerjikler gibi bazı ilaçlar bu sfinkter basıncını düşürürler (Dobrucalı, 2007).

Sağ diyafram krusu AÖS' nin üst yarısını çevreleyerek eksternal sfinkter gibi rol oynar. Sliding hiatal herni (mide fıtığı) ile diyafram fonksiyonunda bozulma, geçici alt sfinkter gevşemeleri, hiatal herni, karın duvarı kaslarının kasılması, gebelik, pilor stenozu, özofajiyal klirens mekanizmasında bozukluk ve gecikmiş mide boşalımı GÖR hastalığının meydana gelmesine neden olan etmenlerden bazılarıdır (Dobrucalı, 2007; Gorecki, 2015).

Alt özofagus sfinkter kas basıncı çok önemli olup, kolinerjik uyarıcı nöronlar, gebelik, mide fıtığı ile yüksek basınçlı bir alan meydana getirebilir. Yemek sonrasında ise alt özofagus sfinkter basıncı en düşük değerlere iner, geceleri de en üst seviyeye ulaşmaktadır. Aynı zamanda bu basınç sigaradan, kandaki peptid ve hormonlardan, yağlı yiyeceklerden, gecikmiş mide boşalımından ve bazı ilaçlardan (kalsiyum kanal blokerleri, beta adrenerjik blokerler, nitratlar ve antikolinerjikler) etkilenebilir. Bu sfinkter basıncının düşüklüğü ile özefajit şiddeti arasında doğru orantı olduğu bulunmuştur. Alt özofagus sfinkter basıncı yutkunma esnasında yutkunma olmadan da özellikle yemek sonrası dönemde ve uykunun REM fazında kısa süreli olarak gevşemektedir. Sağlıklı insanlarda gün içinde saatte 1-4 kez olabilmektedir, bu olaya AÖS'nin geçici gevşemeleri denmektedir. Reflü hastalığında ise uygun olmayan zamanlarda da bu geçici gevşemeler olur (Barlow et al.,1989; Dobrucalı, 2007).

Özofajiyal klirens denilen özofagusun temizlenme mekanizması da, reflü içeriğinin özofagusla temas süresi önemli olduğundan hastalığın gelişiminde etkilidir. Bu mekanizma; bikarbonat ve büyüme faktörü içeren özofagusa kaçan asiti nötralize eder ve epitel hücrelerinin yenilenmesini hızlandırmaktadır (Dobrucalı, 2007).

Özofagus mukoza direnci reflü içeriğine karşı koruma mekanizması olup preepitelyal, epitelyal ve postepitelyal olmak üzere üçe ayrılır. Preepitelyal savunma mekanizmaları; epitel yüzeyindeki mukus, bikarbonat, su tabakası, hücre

membranı ve hücreler arasındaki zonula okludens, zonula adherens gibi sıkı bağlar hidrojen iyonlarının hücreler arası boşluğa geçişine engel olurlar. Hücre içi ve hücre dışındaki tampon sistemleri proteinler, bikarbonat, fosfat, karbonik anhidraz enzimi ve hidrojen iyonunun hücre dışına atılmasını sağlayan iyon değiştirici sistemler ise epitelyal savunma sistemleridir. Postepitelyal defans sistemi ise oksijen, bikarbonat ve diğer maddelerin mukozaya ulaşmasını ve hidrojen, karbondioksit ve diğer metabolik artıkların mukozadan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Dobrucalı, 2007).

2.3. Reflü Tanısı

GÖRH tanısında çok sayıda test bulunmaktadır. Hastalardan iyi bir anemnez almak en önemlisidir. Yanma ve ağza acı ekşi su geldiğini sorgulamak ile tanı konmaya başlanmalıdır. Ama bu bazen yeterli gelmeyip birçok testi yanında yapmayı gerektirebilir (Richter, 2003).

Proton Pompa İnhibitörlerinin (PPI) klasik ve atipik reflü semptomu olan hastalarda başlanması ile 1-2 hafta içinde semptomlar bu tedavi ile geçip, tedavinin bırakılmasıyla yeniden başlıyorsa GÖRH tanısı konabilir. PPI kullanmayan hastalarda, asit reflüsü semptomları ve boğaz temizleme klirensi daha fazla olmuştur (Uyanıkoğlu vd., 2003; Sung et al., 2012).

Endoskopi GÖRH tanısı için duyarlılığı düşük fakat spesifitesi %90-95 olan bir tanı yöntemidir (Richter, 1994).

Ülser, striktür, barret özofagusu, varisler ve kanser erken tanısı koymak için üst gastrointestinal sistem endoskopisi mutlaka yapılmalıdır (Devault et al., 2005).

Özofajit ve derecelerini belirlemek için endoskopik evreleme olarak “Los Angeles (LA) sınıflaması” kullanılmaktadır (Çizelge 2.1). LA sınıflamasına göre; 5 mm den kısa ve mukozal kıvrım üzerinde sınırlanan bir veya daha fazla sayıda lineer erezyon varlığı Grade A, 5 mm den uzun ve mukozal kıvrım üzerinde

sınırlanan bir veya daha fazla sayıda lineer erezyon varlığı Grade B, mukozal kıvrımlar arasında uzanan veya özofagus lümeninin %75' inden azını kaplayan erezyonların varlığı Grade C ve özofagus lümeninin %75' inden fazlasını kaplayan ve çevreleyen erezyonların varlığı da Grade D olarak değerlendirilir. Barret özofagusu tanısı için özofagustan biyopsi almak gereklidir (Breumelhof et al.,1990; DeVault et al., 2005).

Çizelge 2.1. Özefajit için güncel endoskopik evreleme (Lundell et al.,1999).

Los Angeles sınıflaması (3I)
Grade A: Mukozal kıvrımlarda ≤ 5 mm mukozal hasar
Grade B: Mukozal kıvrımlarda >5 mm hasarlar ancak kıvrımlar arası devamlılık yok
Grade C: Mukozal hasar 2 veya daha fazla sayıdaki mukozal kıvrım arasında devamlı, ancak çepeçevre değil
Grade D: Çepeçevre uzanan mukozal hasarlar (Özofagus lümeninin %75' inden fazlası)

Baryumlu özofagogram anatomik darlıkların gösterilmesinde, mide fitiğinin varlığının değerlendirilmesinde, Schatzki halkasının belirlenmesinde önemli bir testir. Orta ve ağır özefajiti %79-100 arasında saptayabilir. Antireflü ameliyatından sonra anatomik bölgenin görüntülenmesi için de oldukça faydalıdır (Ott,1994; Baker et al., 2014).

Özofageal manometre alt özofagus sfinkter basıncı ve gevşemesi, peristaltik aktivite ve sekonder özofagus hastalıklarının (skleroderma, akalazya gibi) saptanması için kullanılmaktadır. Aynı zamanda antireflü ameliyatı ve akalazya balon dilatasyonu öncesinde peristaltizmin ve alt özofagus sfinkterinin değerlendirilmesinde oldukça önemli bir yöntemdir (Uyanıkoğlu vd., 2003; Savarino et al., 2016).

Özofageal pH metre patolojik reflünün tanısını koymada altın standart test olarak kabul edilmektedir. Burundan alt özofagus sfinkterinin 5 cm üzerine yerleştirilen nazogastrik katater 24 saat hastada takılı halde kalır, hasta yemek yerken, yatarken ve semptomları olduğu zamanlarda, cihazın üzerinde olan düğmelere basarak bu anları kaydetmiş olur. Ölçümler sonucunda pH < 4 olması patolojik asit reflüsü olarak kabul edilir. pH değerlendirmelerinde sıklıkla

DeMeester skoru kullanılmaktadır. Bu skorun $>14,72$ olması patolojik asit reflüsü olarak değerlendirilmektedir (De Bortoli et al., 2016).

Özofajiyal impedans alternetaif akım devresinde elektrik akımına karşı direncin ölçümüdür. İmpedans kateterinin üzerinde genellikle 6 impedans ölçüm halkası vardır. İki elektrot arasında elektrik akımına karşı dirençteki değişiklikleri temel alarak gastroözofajiyal reflüyü saptar. pH metre kateteri gibi aynı şekilde nazogastrik olarak takılır 24 saatlik ölçüm sonrası kayıtlar bilgisayar ortamına aktarılarak sonuçlar değerlendirilir. İmpedans yöntemi sayesinde pH metre ile belirlenemeyen non asit reflüde saptanabilmektedir. Non eroziv reflü hastalarının fonksiyonel yanmadan ayrımının değerlendirilmesinde impedans pH-metre kullanımı faydalıdır. pH 4-7 ölçümü yapılabildiğinden, zayıf asit ve non asit reflü ölçülebilir ve aynı zamanda gaz ve sıvı reflü saptanabilir (Tutuian et al., 2005; Savarino et al., 2011).

GÖRH tanısında kullanılan diğer testler Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Gastroözofajiyalreflü hastalığı tanısında kullanılan diagnostik testler (Richter.,2003).

	İntraözefageal pH monitorizasyonu
Reflü için kullanılan testler	Ambulatuvar bilirubin monitorizasyonu (safra reflüsü)
	Ambulatuvar impedans ve pH monitorizasyonu(non asit reflü)
	Baryumlu özofagogram
Semptomları değerlendirmede kullanılan testler	Ampirik asit baskılayıcı tedavi,semtom analizi ile birlikte intraözefageal pH monitorizasyonu
Özofajiyal hasarın değerlendirildiği testler	Endoskopi,Özofajiyal biyopsi, Baryumlu özefagogram
Özofagusun fonksiyonunun değerlendirildiği testler	Özofajiyal manometre, Özofajiyal impedans

2.4. Reflü Tedavisi

Eroziv veya non eroziv reflü hastaları proton pompa inhibitörleri ile tedavi edilebilir. Ancak bu ilaçlara dirençli reflü hastalarına günde iki kez standart PPI dozu sonra PPI ve dozu değiştirilir ve ilaveten prokinetik bir ilaç ve histamin H₂-reseptör antagonistleri verilmelidir. Bu tedavi şekline göre sonra eğer hastada düzelme olmazsa özofajiyal impedans-ph metre veya özofajiyal monometre tetkikleri yapılmalıdır (Iwakiri et al., 2016).

Hastalara ilaç dışı tedavileri dışında yaşam kalitesini arttıran basit tedbirlerde önerilmektedir. Bunlar ideal kiloda olmak, yatak başını yüksek tutmak, yatmadan en az 3 saat önce yemek yemek, çok yağlı yiyecekler, kafein ve çikolata tüketmemek, sigara ve alkol kullanmamaktır (Mungan, 2001).

Endoskopik tedavi yöntemleri ise; stretta işlemi, endoskopik gastropalikasyon ve sütürdür. GÖRH' da cerrahi yöntem olarak laparoskopik nissen fundopalikasyonu yapılmaktadır (Dimbarre et al., 2012; Rosemurgy et al., 2012).

2.5. Mikrobiyotanın Hastalıklar ile İlişkisi

Son yapılan çalışmalar ile özellikle intestinal mikrobiyotanın; gastroözofajiyal reflü hastalığı, obezite, diyabet, irritabl barsak sendromu, inflamatuvar barsak hastalığı, alkol dışı karaciğer yağlanması, otoimmün hastalıklar ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Bouchi et al., 2015; Lau et al., 2015; Chakraborti., 2015; Putignani et al., 2016; Aidy et al., 2016) .

İnsanlarda intestinal mikrobiyota enerji, beslenme, immünolojik olaylar ve bağışıklık sisteminin güçlenmesinde çok önemli rol oynar ve bazen çeşitli etmenler nedeniyle florada bozulma meydana gelir. Bu etmenler; beslenme şekli, diyetler, alkol tüketimi, çevre değişiklikleri (bakım evi, hastane, ev vb), yaşlanma, genetik, antibiyotik kullanımı ve diğer kullanılan ilaçlar, prebiyotik, probiyotikler, sistemik hastalıklar ve stres mikrobiyotanın değişmesine neden olan faktörlerdir (Mariat et al., 2009; Claesson et al., 2011; Mutlu vd., 2012).

2.5.1. Obezite, Diyabet ve Mikrobiyota

Son alışmalar, bağırsak mikrobiyotası ve metabolik hastalıklar arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Bağırsak mikrobiyotasının gıda emiliminde ve inflamasyonda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu iki faktör obezite ve tip 2 diyabette anahtar rol oynar. Mikroorganizmalar kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumunda ve inflamasyonun yanısıra insülin sinyali gibi metabolik yol izlerinde büyük rol oynarlar (Baothman et al., 2016).

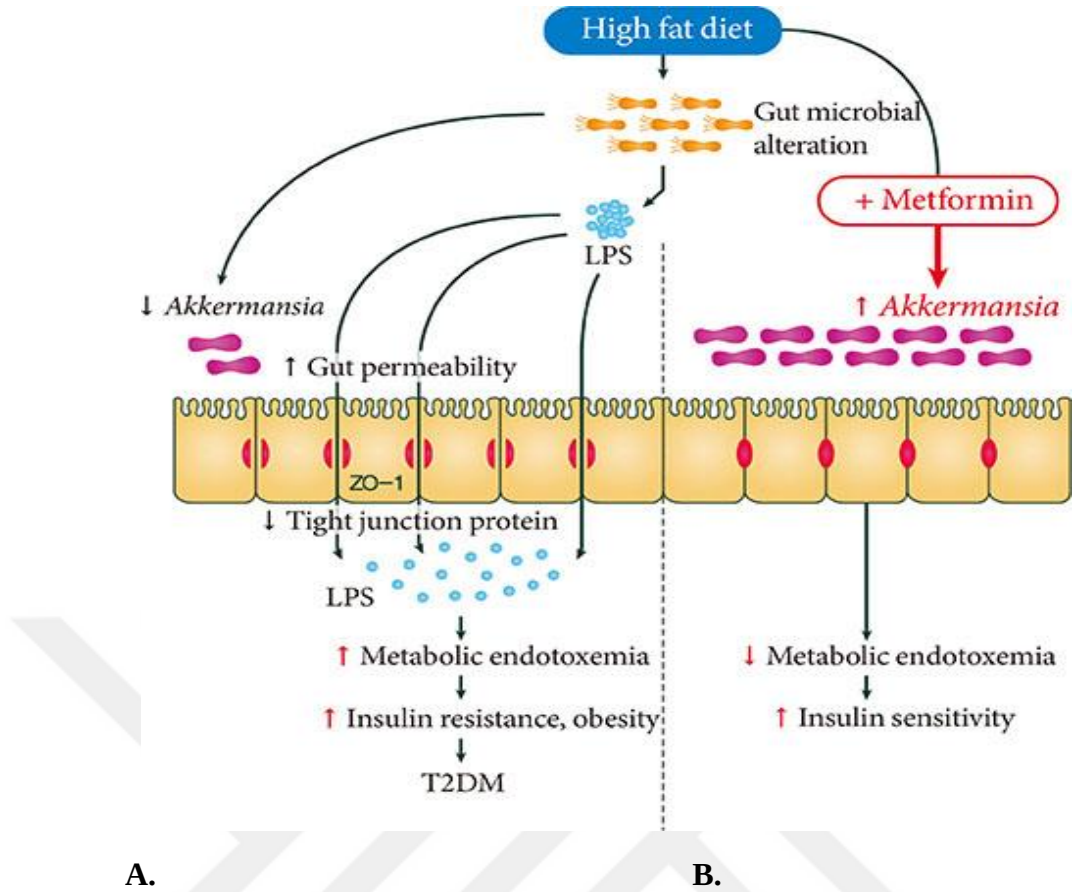
Obezite ve bağırsak mikrobiyotası ile ilgili yapılan bir çalışmada, obezlerde değişken *Firmicutes/Bacteroidetes* oranı saptanmıştır. Firmicutes sayısı artarken, Bacteroidetes miktarında azalma olup, bu *Firmicutes/Bacteroidetes* oranının artmasına sebep olmuştur. Aynı zamanda *Lactobacillus* türlerinde de artış bulmuşlardır (Armougam et al., 2009, 2011).

2010 yılında Santacruz ve arkadaşları 24 haftalık 50 gebede yaptıkları (34 kişi vücut kitle indeksi normal, 16 kişi kilosu fazla) alışmada real time PCR ile feçeste bağırsak mikrobiyotasına, alınan kan örneklerinin plazmalarında ise biyokimyasal parametrelere bakmışlardır. Sonuçta kilolu gebelerde normal kilolu olanlara göre *Bifidobacterium* ve *Bacteroides* sayılarında azalma, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalarında artma bulunmuştur. *E.coli* türünü gebelik esnasında aşırı kilo alan bayanlarda, normal kilo alan bayanlara göre daha yüksek sayıda saptamışlardır. *Bifidobacterium* ve *Akkermansia muciniphila* türlerini ise normal kilo alan gebelerde yüksek bulmuşlardır. Sonuç olarak bağırsak mikrobiyotasının vücut ağırlığı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Santacruz et al., 2010).

Diğer bir çalışmada ise; araştırmacılar obez farelerde *Firmicutes / Bacteroidetes* oranını zayıf farelerden %50 oranda daha yüksek bulmuşlardır bu sonucu aynı şekilde obez insanlarda da saptamışlardır. Araştırmacılar bu bulguyu da şöyle açıklamışlardır; "*Firmicutes Bacteroidetes*" in yaptığından daha fazla enerji kaynağını metabolize ediyor ve bunun sonucunda daha fazla bağırsaktan emilim olup kalori alınıyor ve kilo artışı oluyor" demişlerdir (Kallus et al., 2012).

Tip 1 diyabet otoimmün bir hastalıktır ve çevresel faktörlerin etkisi ve genetik olarak yatkın olan bireylerde insülin üreten β hücrelerinin tahrip olmasıyla oluşmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasının bu rahatsızlıkta önemli rol oynadığı görülmüştür. Araştırmacılar bu olayın mekanizmasını; disbiyozis sonucunda bağırsak geçirgenliği artarak, proinflamatuvar hücre gelişimi ve β hücrelerinin uyarılması şeklinde açıklamışlardır. Mikrobiyotadaki değişimden immün sistem etkilenmektedir. Gıda antijenlerine karşı toleransta bozulma, intestinal inflamasyon ve bağırsak geçirgenliğinde artış olmaktadır (Giancchetti et al., 2016).

İnsülin direncinde ise; gram negatif bakterilerin aşırı çoğalması ile dolaşımdaki bakteriyel lipopolisakkaritlerin miktarı artar. Artan lipopolisakkarit serumda bulunan Lipid Bağlama Proteinine (LBP) bağlanır ve LPB, CD14 (Cluster of differentiation 14) reseptörüne, CD14 ise lipopolisakkariti LY96 (Lymphocyte Antigen 96) geni tarafından kodlanan MD2 proteinine aktarır, bu protein enterositlerin yüzeyinde bulunan toll like reseptörler (TLR4) ile ilişkilidir. Bunun sonucunda, proinflamatuvar sitokinler salınır. Zonula okludens, okludin gibi epitel hücreler arasındaki bağlar zayıflar ve bağırsak geçirgenliği artar, LPS' in portal kan akışına geçişi gerçekleşir. Bu da kronik bir endotoksemiye ve sonuçta insülin direncine, tip 2 diyabete ve obeziteye yol açan subklinik inflamasyona neden olur (Lee et al., 2006; Kyu yeon Hur et al., 2015).



Şekil 2.1. Gram negatif bakterilerin insülin direnci, Obezite ve Tip 2 Diyabet ile ilişkisi

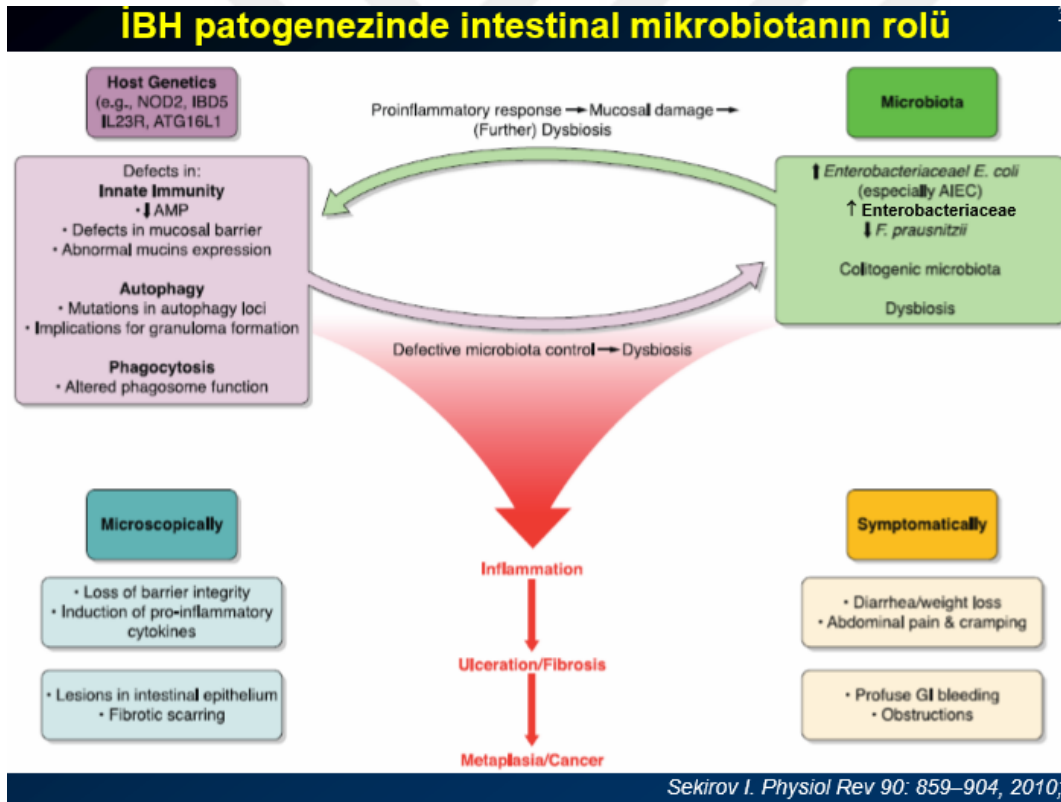
- A.** Lipopolisakkaritlerin hücreler arası geçirgenliği bozarak portal kan akımına geçişi görülmektedir.
- B.** Yüksek yağlı gıda ve diyabet rahatsızlığının tedavisinde kullanılan Metformin ve musin degrade eden gram negatif *Akkermansia muciniphila* türünün bozulan bağırsak geçirgenliğini düzelttiği görülmektedir (Kyu yeon Hur et al., 2015).

2.5.2. İnflamatuar Bağırsak Hastalığı ve Mikrobiota

Bu hastalık; genetik, çevresel ve mikrobiyal faktörler ile immün ve doku yanıtı oluşarak inflamasyon ile sonuçlanan bir rahatsızlıktır. İnflamatuar bağırsak hastalarında, mukozal biyopsi alınarak yapılan çalışmalarda, sağlıklı insanlarda bağırsak florasının önemli kısmını oluşturan *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarına ait türlerin inflamatuvar bağırsak hastalarında belirgin olarak azaldığı, bununla birlikte *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* filumlarına ait genoslarda anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Crohn hastalarındaki bakteriyel kompozisyonun sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Macfarlane et al., 2004; Gophna et al., 2006; Miyoshi et al., 2016).

Butirat, müsin sekresyonunu ve antimikrobiyal peptidlerin üretimini indükleyerek mukozal bariyerin güçlenmesini sağlar. Hastalarda butirat seviyesindeki azalma, bu mekanizmaların bozulması nedeniyle inflamatuvar bağırsak hastalığının karakteristik özelliği olan kronik inflamasyon ve mukozal hasarlanmayı beraberinde getirir (Segain et al., 2000).

Sülfatı indirgeyen *Desulfovibrionales* ve *Desulfobacterales* üyeleri ile inflamatuvar bağırsak hastalığı arasında ilişkili bulunmuştur. Bu gruptaki bakterilerin aşırı çoğalması sonucunda, sülfat indirgenerek intestinal lümende aşırı miktarda hidrojen sülfid oluşur. Hidrojen sülfid ise bağırsak epitel hücreleri üzerine direkt toksik eder (Gardiner et al., 1995; Sekirov et al., 2010). (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Sülfatı İndirgeyen bakteriler ile İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı arasındaki İlişki. Sülfatı indirgeyen bakterilerin (ürettiği ekstraselüler polimerik maddelerden O-antijeni, genetik olarak yatkın bireylerde immün yanıtı neden olabilmekte) aşırı çoğalması sülfatın indirgenerek intestinal lümende aşırı miktarda hidrojen sülfür oluşumu epitel hücreleri üzerine direkt toksik etki, bakteriyel fagositozun azalması gibi önemli zararlı etkileri ile İBH patogenezinde rol oynar (Sekirov et al., 2010).

2.5.3. Alkolik Olmayan Karaciğer Yağlanması ve Mikrobiyota

Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığının (AOYKH) insülin direnci ve tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Fakat yapılan son çalışmalar ile bu hastalığın patogeneğinde intestinal mikrobiyotanın da etkisi olduğu görülmüştür. Hastaların bir kısmında fibrozis, siroz ve hepatoselüler karsinom gelişebilir (Tilg et al., 2010; Lallukka et al., 2016).

Portal ven aracılığı ile intestinal sistemdeki disbiyozis sonucunda değişen mikrobiyotanın oluşturduğu endotoksinler karaciğere direkt geçmektedir. İntestinal bariyer fonksiyonu bozulduğu zaman bağırsak geçirgenliğindeki artış lipopolisakkarit gibi bakteri ürünlerinin portal ven ile karaciğere geçişine yol açar. Bu bakteriyal ürünler karaciğerdeki Toll Like Reseptörler (TLR) ile immün yanıtın oluşmasına neden olurlar. Akut veya kronik karaciğer hastalıklarında TLR, kupper, endotelyal, dendritik, hepatik stellat hücrelerinin ve hepatositlerin aktivasyonuna sebebiyet verir. Bu hastalıkla ilgili yapılan çalışmalarda intestinal florada, *Bacterioidetes* ve *Bifidobacterium* miktarlarında belirgin azalma olmuş, *Actinobacteria* ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalarda ise artış olduğu bulunmuştur (Seki et al., 2012).

Actinobacteria ve *Staphylococcus aureus* organizmalarının fermentasyonu sonucunda alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalarının nefeslerinde etanol miktarı yüksek çıkmıştır. Oluşan etanol intestinal epitel hücrelerine toksik etki göstererek tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ile inflamasyonu başlatmaktadır. İnflamasyonda, hem insülin direncinin gelişmesine hem de steatohepatitisin ilerlemesine yol açmaktadır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritler Tool Like Reseptör 4 ile inflamasyon başlatır ve inflamasyon sonucunda hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikali oksidatif stresi artırır. Stellat hücreler aktive olur ve fibrozis gelişebilir (Çelebi vd., 2013).

2.5.4. Gastroözofajiyal Reflü Hastalığı ve Mikrobiyota

Moleküler yöntemlerin kullanılmadığı dönemlerde kültür bazlı tekniklerle özofagustan sadece birkaç mikroorganizma izole edilebilmiştir ve bunların da tükürükten, orafarinksten ya da reflü ile mideden geldiği düşünülmüştür (Gagliardi et al., 1998).

Moleküler tekniklerin uygulanmaya başlanması ile birlikte 2000' li yılların başından itibaren yapılan çalışmalarda alınan distal özofagus örneklerinde kompleks bir bakteriyal komünitenin olduğunu görülmüştür (Pei et al., 2004, Macfarlane et al., 2007; Yang et al., 2009; Blackett et al., 2013; Liu et al., 2013).

Özofajiyal mikrobiyota ile ilgili bugüne kadar yapılmış olan kültür bazlı ve moleküler yöntemler ile yapılan çalışmaların özeti Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4' te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Özofajiyal mikrobiyota üzerine kültür bazlı yapılan çalışmaların özeti (1981-2013) (Yang et al., 2014).

B : Belirlenemedi

BÖ : Barrett Özofagus

ÖA : Özofajiyal Adenokarsinom

GÖRH : Gastroözofajiyal Reflü Hastalığı

Kategory	Lau 1981	Finlay 1982	Mannel 1983	Gagliardi 1998	Macfarlane 2007	Blackett 2013
Hastalık	Kanser	Kanser	Kanser	Normal	Normal BÖ	Normal GÖRH BÖ ÖA
Örnek	Aspirat	Rezeksiyon	Aspirat	Aspirat	Biyopsi aspirat	Biyopsi
Vaka	79	12	101	30	14	151
Izolat sayısı	61	85	377	30	B	B
Tür sayısı	14	15	32	1	46	111
Her numune için anlamlı tür sayısı	1	6	4	1	B	B
Bakteriler için pozitif örnek %	64	100	100	67	%50-71	100
<i>Streptococcus</i> için pozitif örnek %	10	92	B	B	50	B

Çizelge 2.4. Özofajiyal mikrobiyota üzerine moleküler yöntemlerle yapılan çalışmaların özeti (2004-2013). (Yang et al.,2014).

B : Belirlenemedi

BÖ : Barrett Özofagus

ÖA : Özofajiyal Adenokarsinom

RÖ : Reflü

Kategory	Pei 2004	Narikiyo 2004	Pei 2005	Yang 2009	Liu 2013
Hastalık	Normal	Kanser	RÖ, BÖ	Normal RÖ, BÖ	Normal RÖ,BÖ
Örnek	Biyopsi	Biyopsi	Biyopsi	Biyopsi	Biyopsi aspirat
Vaka	4	20	24	34	18
İzolat sayısı	900	100	147	6800	424
Tür sayısı	95	7	39	166	B
Her numune için anlamlı tür sayısı	43	≤ 6	B	B	B
Bakteriler için pozitif örnek %	100	B	100	100	100
<i>Streptococcus</i> için pozitif örnek %	100	87	B	100	83.3

2.6. Çalışmada Araştırılan Mikroorganizmalar

2.6.1. *Prevotella intermedia*

Periodontal hastalıklar, diş etlerindeki kronik bakteriyel enfeksiyon olup Amerika' da yaklaşık 49 milyon kişiyi etkilemektedir. *Prevotella intermedia* türünde zorunlu anaerobik, siyah pigmentli, gram negatif çoğunlukla diş eti hastalıklarıyla ilişkisi olan çubuk şeklinde bir bakteridir. Yetişkinde ve gebelikte diş eti iltihabı, akut nekroz ülseratif iltihaplar yapabilmektedir. Bu organizma aynı zamanda nazofaringial ve intraabdominal enfeksiyonlara da neden olabilmektedir (Cutler et al.,1995; Matto et al.,1997).

P. intermedia büyüme faktörleri olan steroid hormonları kullanır, bu yüzden gebelerde sayıları daha yüksektir. Aynı zamanda bu mikroorganizma bayanlarda vajinal enfeksiyonlardan da izole edilmektedir (Africa et al., 2014).

Bu bakteri diş etinin içine yerleşerek hastalığa sebep olacak virülans faktörleri üretir. Bakterinin enfeksiyonu sonucu; bakteriyal kollojenaz, matriks metalloproteaz, serin ve sistein proteaz (CPs) gibi proteolitik enzimlerin aşırı üretimi ile bakteriyal salgıya veya konukçunun uyarılmasına yol açar. Bu proteazlar konukçu dokuyu ve konukçu savunma mekanizmasını bozar. Ayrıca proteazlar fibrinolitik aktiviteye ve α_1 proteinaz inhibitörü ve α_2 makroglobulin gibi proteaz inhibitörlerinin aktif olmayan kan koagülasyon bileşenlerinin oluşumuna neden olurlar. Bakteriyal beslenmesi; parçalanmış diş etleri dokusu ve doku sıvından elde edildiğinden dolayı proteoliziz ile *Prevotella intermedia* besin ihtiyaçlarını karşılamış olur (Mallorqui-Fernandez et al., 2008).

P. intermedia türünde birkaç proteaz tanımlanmıştır; tripsin benzeri serin proteazlardan dipeptidil peptidaz IV ve sistein proteaz (CPs)'dir. Fakat bu proteazlar ile ilgili çalışmalar yapılarını anlamaya yetersiz kaldığından ilaç geliştirilememiştir. Virulans faktörü olan bu proteazlar hücre yüzeyinden bakteriyal proteinlerin salınımına, immünoglobulinlerin aktivasyonu ile adaptif immün sistem cevabının oluşumuna neden olmaktadır (Mallorqui-Fernandez et al., 2008).

Bu mikroorganizma monomerik demir (III) protoporfirin IX içeren demir porfirin üretir. Hemoglobin oksijenlenme basamağında demir (III) protoporfirin globinin bağlanma etkinliğini azaltır. *Prevotella intermedia* 90-kDa sistein proteaz, interpain A (*InpA*) sentezler ve bu enzim *Streptococcus pyogenes* streptopain (*SpeB*) ile homologtur. İnterpain A potensiyel preotezdır ve PIN0048 lokusunda kodlanır InpA hemoglobini parçalar ve hemin serbest kalmasına neden olur (Byrne et al., 2015).

2.6.2. *Streptococcus pyogenes*

Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşurmayan, katalaz negatif, çiftler veya zincirler halinde olan aerobik bir mikroorganizmadır. Nazofaringial normal flora üyesidirler. Fakat akut *Streptococcus pyogenes* enfeksiyonları faranjit, tonsillit, ateş, çocuklarda görülen bulaşıcı deri hastalığı ve deri iltihabı yapabilir. İnvaziv enfeksiyonlar ise streptococcal toksik çok sendromu, endokardit, menenjit,

pnömoni, kemik enfeksiyonu gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Baron, 1996).

Hücre duvarlarında *Streptococcal* grup A antijeni olduğundan A grubu Streptococcus olarak da adlandırılırlar. A grubu Streptokoklar kanlı agar plaklarında üretildikleri zaman kolonilerinin etrafında eritrositlerin tam olarak parçalanmasından dolayı şeffaf zonlar oluşur. Bu tür hemolize beta hemoliz; bunu oluşturan streptokoklara da A grubu Beta Hemolitik Streptokoklar denir. Streptococcus pyogenes türü de bu tür hemoliz yapmaktadır (Baron, 1996).

M proteini fagositoza direnç göstermesini sağlayan virülans faktörüdür. Lipoteik asit ve M proteini hücre duvarındaki fibria üzerinde bulunmaktadır. Lipoteikoik asit fibronektine bağlanan bir adezindir. Aynı şekilde M proteini de adezin fonksiyonuna sahiptir. *Streptococcus pyogenes* F (*SfbI*) ve M proteinleri bakterinin konak hücreye girmesini ve derin dokulara yayılmasını sağlarlar. *S.pyogenes* kapsülünde hiyaluranik asitten oluşur ve konukçu dokusuna kimyasal olarak benzer ve bu yüzden nonantijeniktir, kapsülü ile mikroorganizma fagositoza karşı korunmuş olur. *Streptococcus pyogenes* lökositin olarak isimlendirilen ekzotoksinleri sayesinde fagositer hücreleri öldürürler (Baron, 1996).

M proteini aynı zamanda bakterilerin makrofaj veya nötrofiller tarafından fagositozu kolaylaştırmak için bağlandıkları opsonini inhibe etmektedirler. Aynı zamanda bazı serotiplerinin fibrinojen bağlayan opsonini engelledikleri de bulunmuştur (Ryan, 2004).

Streptolizin S ve O, Streptococcal pirojenik ekzotoksin, hiyaluronidaz, streptokinaz, deoksiribonikleazlar bu organizmanın ekstraselüler ürünleridir. Proteazlar, serum opasity faktör, nikotinamid adenin dinükleotidaz, ATPaz, fosfotaz, estereaz, amilaz, N-asetil glukozamin, nöraminidaz ve diğer enzimlerde patogeneizde temel rol oynamaktadır (Brouwer et al ., 2016).

2.6.3. *Veillonella parvula*

Veillonella parvula gram negatif, anaerobik, fermentasyon yapmayan, spor oluşturmeyen bir türdür. İnsanda sindirim sisteminde, ağız boşluğunda ve

vajinada bulunur. Diş plağından izole edilmişlerdir. Menenjit, kemik iliği iltihabı ve diş eti iltihabı gibi hastalıklara neden olabilirler. Karbonhidratları metabolize edemezler onun yerine laktat gibi organik asitleri kullanırlar. Bu tür biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır. *Veillonella parvula* diş yüzeyine kendi kendine tutunamaz , bu yüzden *Streptococcus mutans'* a yapışır. Vankomisine dirençli olan bu bakterinin virulans faktörü olarak lipopolisakkarit tabakası bilinmektedir (Hudder and Dimroth,1993; Luppens et al., 2008).

Yapılan çalışmalarda bu tür sinüs, akciğer, karaciğer, santral sinir sistemi, kalp ve kemikten izole edilmiştir. Bu türün dolaşım sistemine geçerek bakteriyemi yaptığı görülmüştür (Fisher and Denison,1996).

2.6.4. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, insanlar ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde bulunan kommensel bir bakteridir, aynı zamanda fırsatçı patojende olabilmektedir (Ryan et al., 2004).

E. faecalis sıklıkla diş kökü kanal tedavisinde bulunmuştur. Gliserol, laktoz, sitrat, arjinin ve birçok keto asitlerini içeren çeşitli enerji kaynaklarını katabolize ederler. 10°C ile 45 °C' de büyürler ve 60°C' de 30 dk hayatta kalabilirler (Stuart et al., 2006).

E. faecalis insanlarda endokardit, sepsisemi, üriner sistem enfeksiyonu, menenjit ve diğer enfeksiyonları yapabilir. Oluşturduğu enfeksiyonlarda virülans faktörleri rol oynamaktadır. *E. faecalis* birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençlidir. Vankomisine de direnci bulunmaktadır (Muray, 1990 ; Courvalin, 2006; Amyes, 2007; Hidron et al., 2008).

Bu mikroorganizmanın diğer hücrelerle rekabet edebilme, biyofilm oluşturabilme, konukçu yanıtına değişim gösterebilme, lenfositleri baskılayabilme, dentin bağlama, besin kaynağı olarak serum kullanabilme, ilaçlara karşı direnç oluşturabilme, litik enzimler, sitolizin, agregasyon maddesi, lipoteikoik asit gibi virülans faktörleri bulunmaktadır (Stuart et al., 2006).

2.6.5. *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum spor oluşturmeyen, gram negatif, G+C içeriği %27 ile %28 arasında olan, genom büyüklüğü $2,4 \times 10^6$ bp olan bir türdür. Bakteri anaerobiktir ve %6 oksijen varlığında büyüyebilir. Glukoz ve peptonun fermentasyonundan bütirik asit üretir. Bu tür potansiyel patojendir. Diş etleriyle ilgili hastalıklara ve diğer organların enfeksiyonuna neden olmaktadır (Bolstad et al., 1996).

F. nucleatum gram negatif bakterilerin karakteristik özelliği olan bir dış membrana sahiptir. Hücre duvarı peptidoglikan tabakası içeren periplazmik yüzey ile iç ve dış membrandan oluşmaktadır. Genel olarak gram negatif bakterilerin iç membranında simetrik fosfolipitler ve proteinler, dış membranda ise asimetrik fosfolipitler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ve proteinler bulunmaktadır. *Fusobacterial* dış membranda üçüncü bir yapı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez üzerinde karakteristik protein profilinden oluşmaktadır. Bazı proteinler por oluşturan birimlerde yüksek miktarda sentezlenmektedir (Bolstad et al., 1996).

Bu organizmanın yapılan son çalışmalar ile kolorektal kanser ile de ilişkisi olduğu bulunmuştur. Kolorektal kanser olan hastalardan ve sağlıklı kişilerden biyopsi alınarak yapılmış olan çalışmada *Fusobacterium nucleatum* miktarı araştırılmıştır. Araştırmacılar *F. nucleatum* türünü kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Epitel hücrelere E-cadherin bağlandığı zaman, türün virülans faktörü olan FadA uyarılmaktadır, nükleer faktör kappa B aktive olmaktadır. Bunun sonucunda *F. nucleatum* türü ile sitokinlerde özellikle tümör nekrozis faktör- α ve interlökin-10 seviyelerinde artış olmuştur. Bu tür aynı zamanda *BRAF*, *KRAS*, *TP53*, *CHD7*, ve *CHD8* genlerinde mutasyona ve kolorektal kanserli dokularda *CD3+T* yoğunluğunun azalmasına neden olarak hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (Castellarin et al., 2012; Li et al., 2016).

2.6.6. *Candida albicans*

Candida albicans, diploit, eşeyli çoğalan bir mayadır. İnsanlarda kandida enfeksiyonunun % 75' inden *Candida albicans* sorumludur. Hem kommensal hem de fırsatçı patojendir. *C. albicans* insanlarda oral ve vajinal kandidiyazis şeklinde iki temel tipte enfeksiyona neden olabilir. Akut enfeksiyon veya yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Candida* türleri ağızda enfeksiyon yaparsa oral kandidiyazis adını alır, immün sisitem yetersizliğinde orafarinks ve özofagusta bu enfeksiyondan etkilenmektedir, kadınların % 75' i de hayatları boyunca en az bir kere vulvovajinal kandidayize yakalanmaktadır (Mayer et al., 2013).

Bu organizma AIDS, HIV pozitif, diyabet, kemoterapi alan, organ veya kemik iliği nakli yapılacak olan immün sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyon yapmaktadır. Yapılan son çalışmalarda hastalarda vitamin B12 ve folik asit eksikliğinde de *C. albicans* duyarlılığının arttığı görülmüştür (Atay, 2007).

C. albicans' in hücre yüzeyine yapışma, hidrolitik enzim salgılama (proteaz, fosfolipaz ve lipaz), salgısal aspartik proteinazlar, toksik moleküller, morfolojik değişim (maya ve hif formu arasında geçiş), biyofilm oluşumu, fenotipik değişim, hücre yüzey hidrofobikliği gibi virulans faktörleri bulunmaktadır (Mayer et al., 2013).

Candida albicans' in hücre duvarı %80-90 oranında karbohidratlardan oluşur. Proteinler %6-25, lipidler %1-7 ve kitin %8,5-9 oranındadır *Candida albicans*'ın önemli bir hücre duvarı bileşeni olan mannoproteinler bir antijen kaynağıdır, hem karbohidrat hem de protein kısımları immün sistemi uyarabilir. Karbohidrat veya protein kısımları organizmayı konağın ligandlarına bağlayabilir ve hidrofobik etkileşime katabilirler. Aynı zamanda mannoproteinler eritrositleri de tahrip ederek hemolize yol açabilir, fagositozu da engelleyebilir (Calderone and Braun, 1991; Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Candida albicans stres koşulları altında koruyucu mekanizma olarak biyofilm oluşturmaktadır. Polimetilmetasirlat materyalinden oluşan biyofilm modelinde *Candida albicans* hücrelerinin flukonazol, nistatin, amfoterisin B ve klorheksidin gibi antifungal ajanlara karşı yüksek direnç gösterdiği bilinmektedir

Yapılan bir çalışmada *C.albicans* hücreleri 2M NaCl ve 5 mM H₂O₂ içeren osmotik stres koşullarında biyofilm oluşturmuştur. Oksidatif streste, biyofilm matriksi içine hücre dışı DNA salınımı, kitin seviyesinde artma, hücre dışına proteinaz salınımında artış, fosfolipaz aktivitesinde ise azalma olmuştur. Stres koşullarında *Candida albicans* biyofilm hücre duvarındaki mannan içeriğinde azalma olduğu saptanmıştır. Organizmanın zengin ekzopolimerik matrisli biyofilm oluşumu ve hücre duvarı bileşenlerinin yanısıra, duruma göre değişen virulans faktörleri ile oksidatif ve osmotik stres koşullarına adapte olup hayatta kalabildiği görülmüştür (Chandra et al., 2001; Pemmaraju et al., 2016).

2.6.7. *Bacteroides fragilis*

Bacteroides cinsi içinde en sık rastlanılan tür *Bacteroides fragilis*'dir. Zorunlu anaerobik, gram negatif çubuk şeklinde bir bakteridir. İnsanda kolonda ve genelde kommensal olarak bulunan normal flora bakterisidir, zarar görmüş mukozada nekroz oluşturursa hastalık yapıcı olabilir (Kuwahara et al., 2004).

Beta laktamaz üretimi sayesinde penisiline karşı direnç kazanmıştır. Virulans faktörleri arasında fagositoza karşı koruyan polisakkarit kapsülleri, bir endotoksin olan lipopolisakkarit tabakası ve nörominidaz enzimi bulunmaktadır (Levinson, 2010).

Otizm hastalıklarıyla ilişkili davranışsal anormallikler ve gastrointestinal semptomlarda, *B.fragilis* ile yapılan probiyotik tedavisi sonucunda serumda değişen metabolit profilini bu organizmanın düzelttiği görülmüştür (Hsiao et al., 2013).

2.6.8. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus; hareketsiz, sporsuz, gram pozitif, kapsülsüz, mikroaerofilik ve anaerob bir türdür. Karbonhidratları fermente ederek laktik asite dönüştürürler. Düşük pH (pH<5) ve 37°C' de büyürler. İnsanda gastrointestinal sistemde ve ağızda bulunmaktadır. Gastrointestinal sistemde

safra, sindirim sistemi enzimlerine ve düşük pH' a dirençlidirler. Bazı strainleri probiyotik özelliktedir (Baati et al., 2000 ; Ljungh et al., 2006).

L. acidophilus bazı strainleri pediatrik diyarenin geçmesini sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda diyalizli hastalarda kandaki toksik amin seviyesini düşürdükleri görülmüştür. Aynı zamanda yüksek olan serum kolesterol seviyesini de düşürdüğü bulunmuştur (Aderson and Gilliland, 1999; Sanders and Klaenhammer, 2001).

L. acidophilus vitamin K ve laktaz üretebilmektedir. Bazı strainleri laktosidin, asidofilin ve laktasin B gibi bakteriyosinler üretirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu mikroorganizmanın çocuklarda alerjik semptomların engellenmesinde ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonu riskinin azaltılmasında rol oynadıkları görülmüştür (Kundakçı vd., 2006).

2.6.9. *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis, nazofarinkste ve üst solunum yollarında kolonize olan gram negatif diplokok, hareketsiz, aerobik, spor oluşturmeyen *Neisseriaceae* familyası üyesidir. Bu bakteri kahve çekirdeğine benzeyen kapsüllü veya kapsülsüz olabilen aerobik diplokoktur. Yetişkin ve çocuklarda önemli sakatlığa, beyin kan akışı ile semptisemi ve menenjitte hatta ölüme sebep olabilir. Çocuklarda ateş, kusma gibi semptomlar ortaya çıkarabilmektedir. Yetişkinlerde ise eklem ağrıları, döküntüler, ateş, halsizlik, baş ağrısı, sert boyun, kusma, ışığa karşı hassasiyet gibi şikayetler oluşur. Organizmanın optimum büyümesi 35–37 °C' de, % 5-10 karbon dioksitli ortamda olur. Bu tür, kan agar, çikolata agar ilaveli triptik soy agar ve müller hilton agarda büyüebilmektedir (Rouphael and Stephens, 2012; Dinleyici, 2012).

N. meningitidis kolonilerinin kan agarda grimsi, nonhemolitik, yuvarlak, konveks, pürüzsüz, nemli, parlak ve sınırları bellidir. Koloniler oksidaz ve katalaz pozitifdir. Karbon kaynağı olarak sukroz ve laktoz kullanmayıp, glukoz ve maltoz kullanır (Rouphael and Stephens, 2012).

Neisseria meningitidis türü de diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi kapsülün altında bir dış membran, peptidoglikan tabakası ve sitoplazmik veya iç membrandan oluşmaktadır. Dış membran esas itibariyle lipopolisakkarit tabakasından oluşur, lipooligosakkarit, proteinler ve fosfolipitlerden meydana gelir ve besinlerin ve metabolik ürünlerin geçişini düzenler. *Neisseria* membranı fosfatidiletanolamin, kardiolipin içermektedir. Peptidoglikan yapısında bulunan O-asetilasyon, mikroorganizmayı lizozim ve diğer faktörlere karşı korumaktadır (Rouphael and Stephens, 2012).

N. meningitidis türü kapsüllü ya da kapsülsüz olabilir fakat invaziv hastalıklarda kan, beyin omurilik sıvısı gibi bölgelerden izole edilen strainlerinde her zaman kapsül bulunmaktadır. Kapsülü kanda antikorlara ve fagositoza karşı organizmanın hayatta kalmasını sağlamaktadır (Rouphael and Stephens, 2012).

Bakterinin diğer bir virulans faktörü de pilustur. Organizma bu sayede nazofarinksin epitel hücrelerine tutunabilir. Bu türün polisakkarit kapsül yapısında en sık hastalık yapan 6 sekans tipi (ST) (A, B, C, W, X ve Y), toplamda bilinen 12 (A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y ve Z) serogrubu bulunmaktadır. Özellikle en yaygın serogrup ve klonal kompleksler ST-5 and ST-7 (Kapsüler serogrup A); ST-41/44, ST-32, ST-18, ST-269, ST-8 ve ST-35 (serogroup B); ST-11 (serogruplar C or W); ST-23 ve ST-167 (serogrup Y); ve ST-181 (serogrup X) sayılabilmektedir. Polisakkarit aşılar iki valanslı (grup A ve C), üç valanslı (Grup A,C ve W) veya dört valanslı (grup A, C, Y ve W) oluşmaktadır. Serogrup B'ye karşı etkili bir aşı gelişimi oldukça zordur çünkü serogrup B kapsülündeki α 2-8-polisialik asit ile fetal beyin hücrelerinin adezyon moleküllerinin benzerdir, kapsül zayıf immunojeniktir. Bu nedenle serogrup B aşıları ile ilgili çalışmalar antijenik düzeyde ya da yüzey molekülleri ile yapılmıştır. Başlangıçta serogrup B aşıları proteinler içeren dış membran veziküllerinden geliştirilmiştir. Daha sonraları serogrup B'ye karşı, MenB-4C (Bexsero) ve MenB-FHbp (Trumenba) içeren rekombinant protein aşıları üretilmiştir (Banks et al., 2003 ; Starr et al., 2006; Crum-Cianflone and Sullivan, 2016).

2.7. Real Time PCR

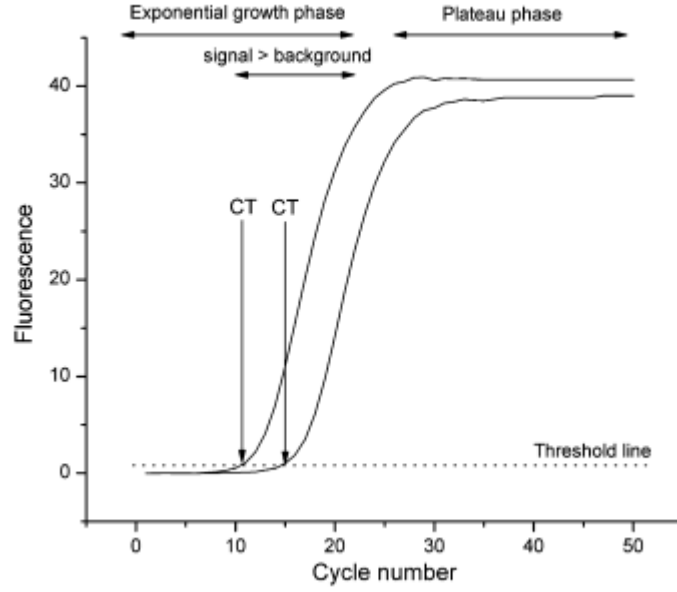
“Real-time PCR” yöntemi DNA’ nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltılmasını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte saptayabilen bir yöntemdir. Bu yöntemde floresan işaretli prob ve boyalar kullanılır ve floresan oluşumu mevcut DNA miktarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Bustin, 2000; Günel, 2007).

Her bir PCR döngüsünde oluşan floresan ışığı aracılığıyla son ürün miktarı eş zamanlı olarak ortaya çıkmaktadır. Başlangıçta sinyal zayıftır, ürün miktarı çoğaldıkça sinyal oluşumu gerçekleşir. Sonra durur ve doygunluğa ulaşır. Sinyali primerler, haberci ve nükleotidler de oluşturabilir. Amplifikasyon sırasında oluşan eğriler reaksiyonun büyüme fazında birbirinden ayrılırlar. Bu ayrılmalar bize örnek moleküllerin başlangıçtaki miktarlarının farklılıklarını gösterir (Kubista et al., 2006).

Kullanım alanları; mRNA düzeyini ve DNA' nın kopya sayısını sayısal olarak hesaplayabilme, patojenlerin belirlenmesi, gen ekspresyon analizleri, tek nokta mutasyonlarını belirleme, parafine gömülü dokulardaki gen ekspresyonu, kromozom bozukluklarının tespiti ve son zamanlarda real time immuno PCR ile protein hasarları belirlenebilmektedir (Kubista et al., 2006).

2.7.1. Ct Değeri

Örnek eğrilerinin belirli bir eşik floresan sinyal seviyesi elde etmesi için gerekli olan amplifikasyon döngü sayılarının karşılaştırılmasıyla örnekler arasındaki farklılık tespit edilebilir. Eşik elde etmek için gerekli olan döngü sayısı “treshhold cycle” ya da Ct değeri olarak adlandırılır. Sinyal artışı PCR ürün artışıyla doğru orantılıdır. Eşik değer, ürünlerdeki ilk anlamlı artış olduğu noktayı gösterir. Tespit edilen floresan, ışının eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını belirtir. Ct, Real-time PCR’ın temel bir prensibidir ve ürün çoğaltımının doğruluğunu görmede ve çoğaltılabilir verilerde gerekli olan bir bileşendir. Ct değeri her zaman PCR’ın erken döngüleri esnasında oluşan hedef amplifikasyonun eksponansiyel fazında meydana gelir (Kubista et al., 2006).



Şekil 2.3. Real time PCR eğrileri, Eşik değeri aşmak için gerekli olan döngü sayısı Ct değeri (Kubista et al., 2006).

2.7.2. Tm (Erime Eğrisi) Analizi

Her çift iplikli DNA, kendine özgü “Erime eğrisi” (Tm) değerine sahiptir. Bu değer çift sarmal DNA’nın %50’ sinin tek sarmal hale geçmesi için gereken sıcaklık olarak açıklanabilir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= Tm, Erime sıcaklığı) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Erime eğrisinden yararlanılarak Aplikonun Tm değeri saptanabilmektedir. Araştırılan örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesi ile karşılaştırma yapılarak , PCR sonucunun doğru olup olmadığına karar verilmektedir (Günel, 2007).

Her bir DNA’nın belirli bir Tm derecesi vardır. Çoğalan DNA parçalarının uzunluğu ve içerdiği GC/AT oranını bu Tm derecelerini değiştirmektedir. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında aradığımız DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılık olacak, dolayısıyla primer dimerleri ile ürün arasında ayırım yapılabilecektir. Her ürün farklı uzunlukta ve farklı gen dizisi içerdiği için Tm

değerleri de farklıdır. Bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istenirse erime eğrisi analizi kullanılabilir (Günel, 2007).

2.7.3. Standart Eğri Oluşturulması

Miktar tayini için bir standart eğrinin oluşturulması gerekir. Standart eğri, konsantrasyonu bilinen standartların başlangıçtaki kopya sayılarının logaritmasına karşı Ct değerlerinin çizilmesiyle oluşturulur. Real time PCR işleminin verimliliği, hedef diziler içeren bir PCR ürünü veya bir plazmitten saflaştırılabilen bir seri dilüsyondan oluşan bir standart eğri ile hesaplanabilir (Kubista et al., 2006).

$$\frac{\text{Kütle (gr)} \times \text{Avogadro sayısı}}{\text{Bazın ortalama molekül ağırlığı} \times \text{Template uzunluğu}} = \text{DNA molekülü}$$

formülü ile hesaplanır.

2.7.4. Eğimin Hesaplanması ve PCR Etkinliği

Doğrusal regresyon ile eğim (m) değeri hesaplanmalıdır. Gerçek amplifikasyon belirteci olan eğim, amplifikasyon çizgisi içinde bir kırılma noktasına sahip olmalıdır. Eğimler -3,1 ile - 3,6 arasında, PCR verimliliği ise % 90-100 arasında olmalıdır (Raymaekers et al., 2009).

Standart eğri aynı zamanda real time PCR'ın etkinliğini değerlendirmek için kullanılmaktadır. PCR döngüsünde ürün artışının olduğu log-linear fazdan elde edilen verilerle oluşturulan grafiğin eğiminden hesaplanır. Aplikon uzunluğu, sekonder yapılar, primer kalitesi ve dizaynı, kullanılan ayıraçlar ve konsantrasyonları, PCR inhibitörleri, DNA degradasyonu, DNA konsantrasyonu, PCR verimliliğini etkileyen faktörlerdir. On kat seri dilüsyon oranlarında eğim - 3,33 olduğu zaman etkinlik % 100 olmaktadır (Svec et al., 2015).

PCR Etkinliği = $[10^{(-1/\text{eğim})}] - 1$ formülüyle hesaplanır.

2.7.5. İdeal bir Real Time PCR için Olması Gerekenler

Başarılı bir Real Time PCR için, primer ve prob sekanslarının seçimi çok önemlidir. Literatürlerden alınarak kullanılabileceği gibi primer express, primer 3, oligo 3 programları ile de primer tasarım ve prob ayarları yapılabilmektedir. Hedef sekans G-C'den zengin bölgeler olmamalıdır çünkü bu bölgeleri çoğaltmak zordur. Real Time PCR'da mRNA kullanılacaksa 3' okunmayan bölgenin kompleks yapısından dolayı PCR amplifikasyonu zordur (Raymaekers et al., 2009).

Primerlerin Tm'i 58-60 °C, uzunluğu 18-24 bp, G-C içerikleri %20-80 olmalıdır. Primerin 3' ucundaki son beş pozisyonda iki taneden fazla G ya da C olmamalıdır. Proben Tm'i ise 68-70°C arasında ve G'den çok C bulunmalıdır. Oligonükleotidlerin erime sıcaklığı oligonükleotidlerin hibridizasyon gücü için bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Annealing faz esnasında probun bağlanmasını güçlendirmek için hem hidroliz hem de hibridizasyon problemleri primerin Tm'inden 5-10 °C daha yüksek olmalıdır, böylelikle primerin uzaması esnasında probun tamamen hibridize olması sağlanabilir (Raymaekers et al., 2009).

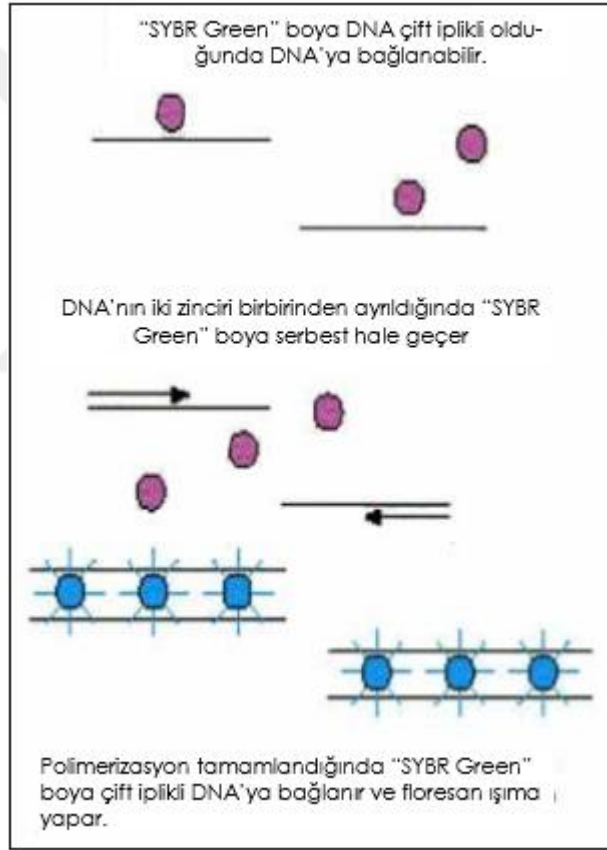
Scorpion ve sunrise primerleri PCR ürününün içine entegre olduğu için erime eğrisi analizi yapılamazken, SYBR Green 1 gibi çift iplikli DNA'ya özgü boyalar, moleküler boncuk ve hibridizasyon probu tekniklerinde erime eğrisi analizi kullanılabilmektedirler (Wilhelm and Pingoud, 2003).

2.7.6. Özgül Olmayan Belirleme Sistemi Çift iplikli DNA İnterkalasyon ajanları

SYBR Green 1. Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında bu yöntem kullanılır. Sadece çift iplikli DNA'ya bağlanan SYBR Green 1 boyası ile çalışılmaktadır. DNA miktarında artış olduğu zaman floresan miktarıda artar. Bu boya 497 nm dalga boyunda uyarılır ve 520 nm dalga boyunda ışınım yapar. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder. Reaksiyon karışımında çift zincirli DNA, primerler ve SYBR Green 1 boyası bulunmaktadır. Primerler bağlanıp

uzama başladığında boya çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Ürün miktarı arttıkça floresan miktarı artar (Kubista et al., 2006).

SYBR Green 1 bazlı yöntemde boya spesifik olmayan PCR ürünlerine de bağlanabilir ve primer dimerleri oluşabilir. Spesifik PCR ürünlerinden oluşup oluşmadığını değerlendirmek için erime eğrisi analizi (melting curve) yapılmalıdır. Bu analizde sıcaklık 40°C'den 95°C'ye dereceye yavaşça çıkarılır ve DNA çift ipliği ayrılır sonucunda floresan miktarı düşer. PCR ürünleri farklı uzunlukta ve sekansta (farklı GC/AT oranı) olduğundan her birinin erime sıcaklığı farklıdır ve ayrı pikler oluştururlar. Erime sıcaklığı her ürün için özeldir (Van der Velden et al., 2003).



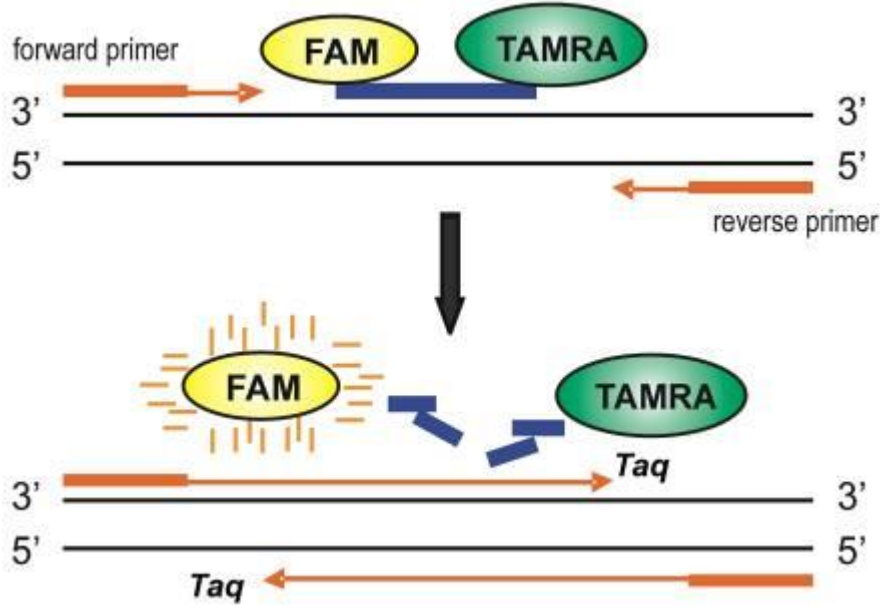
Şekil 2.4. SYBR Green 1 Yöntemi (Van der Velden et al., 2003).

2.7. 7. Özgöl Belirleme Sistemi

DNA parçasının özel bir bölgesini real time PCR ile çoğaltmak için floresan işaretli proplar kullanılmaktadır. Taqman prob, Moleküler boncuklar, Light up prob, hibridizasyon prob ve scorpion, sunrise primer gibi yöntemler kullanılmaktadır (Wilhelm and Pingoud, 2003; Espy et al., 2006).

2.7. 7.1. Hidroliz probu olan Taqman Probe Yöntemi

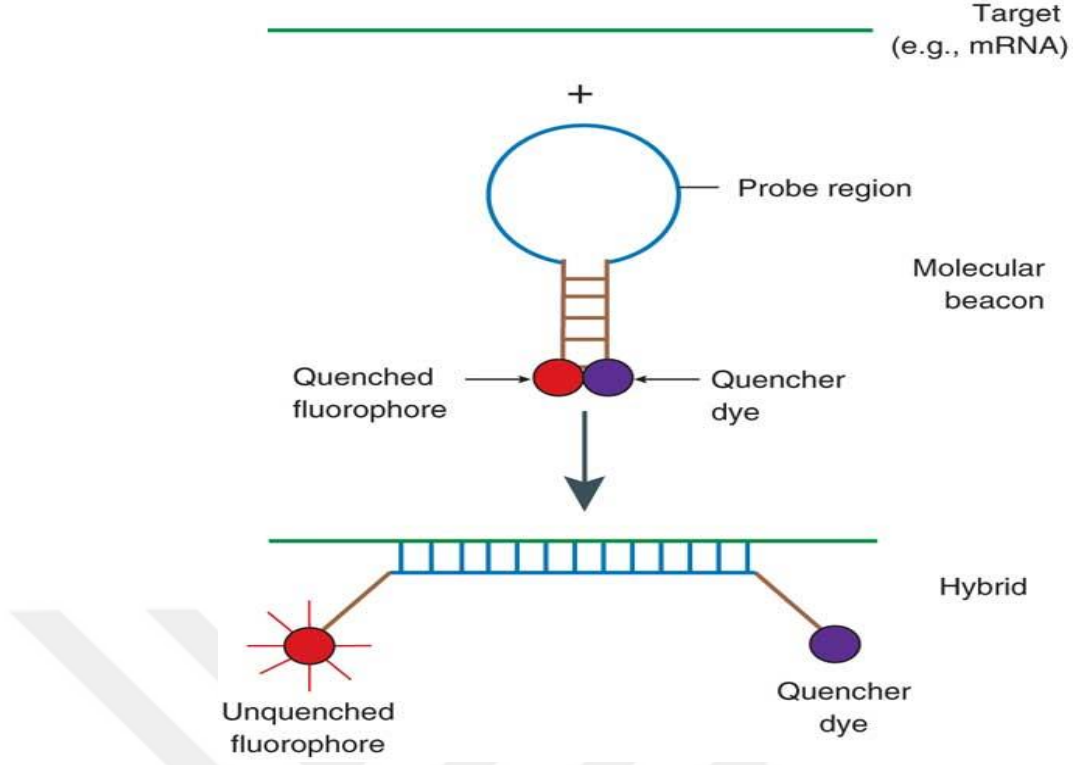
Taqman prob; çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli 5' ucunda "florofor" (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) içeren kısa bir oligonükleotittir. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Bu prob DNA'nın minor çukuruna bağlanma özelliğine sahiptir. İlk olarak hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında 60 °C'de Taqman prob komplementer standart DNA'ya bağlanır. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğaldıkça floresanda ona bağlı olarak artmaktadır. Tek bir Taqman prob çoğaltılan hedef DNA' nın belirlenmesi için kullanılmaktadır (Espy et al., 2006).



Şekil 2.5. TaqMan Prob ile Real Time PCR (Gangisetty and Samba Reddy, 2009).

2.7. 7.2. Moleküler Boncuk Yöntemi

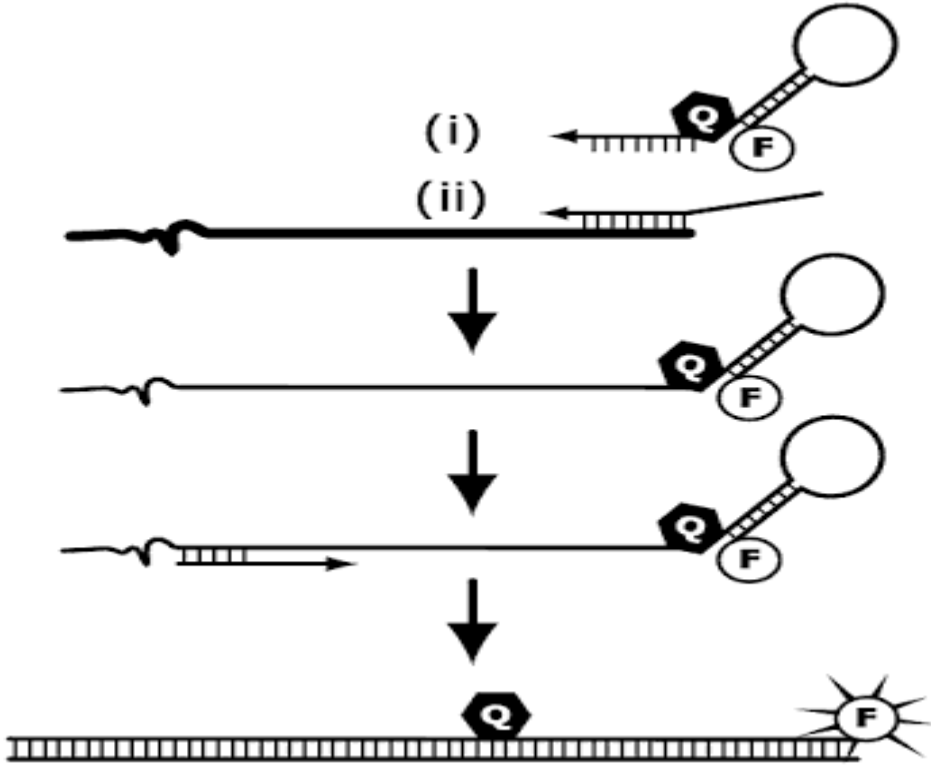
Bu probalar oligonükleotid yapının 5' ucunda bir floresan boya ve 3' ucunda bir quencher boya olacak şekilde dizayn edilmişlerdir. Hedef DNA'ya komplementer olan tek zincirli DNA'dan oluşan bir halka kısmı ve florokrom boyaları içeren düz kısımları ile saç tokası şeklindedirler. İki boya birbirine kovalent bağ ile bağlıdır. Probun son 10-15 nükleotidi birbirine komplementer iken orta kısmı Aplikon kısmıyla komplementerdir. Saç tokası yapısındayken quencher, floroformu baskılayarak floresan yaymasına engel olur. PCR başladıktan sonra uygun sıcaklıkta spontan olarak probun şekli değişir ve komplementer olduğu hedef bölge ile bağlanarak düz çift zincirli hale gelir. Böylelikle boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından baskılama ortadan kalkar ve floresan miktarı artar. Tek nükleotid polimorfizmi, genetik tarama, farmakogenetik çalışmalar bu yöntemin en çok kullanıldığı alanlardır (Tyagi et al.,1996; Wilhelm and Pingoud, 2003).



Şekil 2.6. Moleküler Boncuk Yöntemi (Mhlanga et al., 2006).

2.7.7.3. Sunrise primerleri

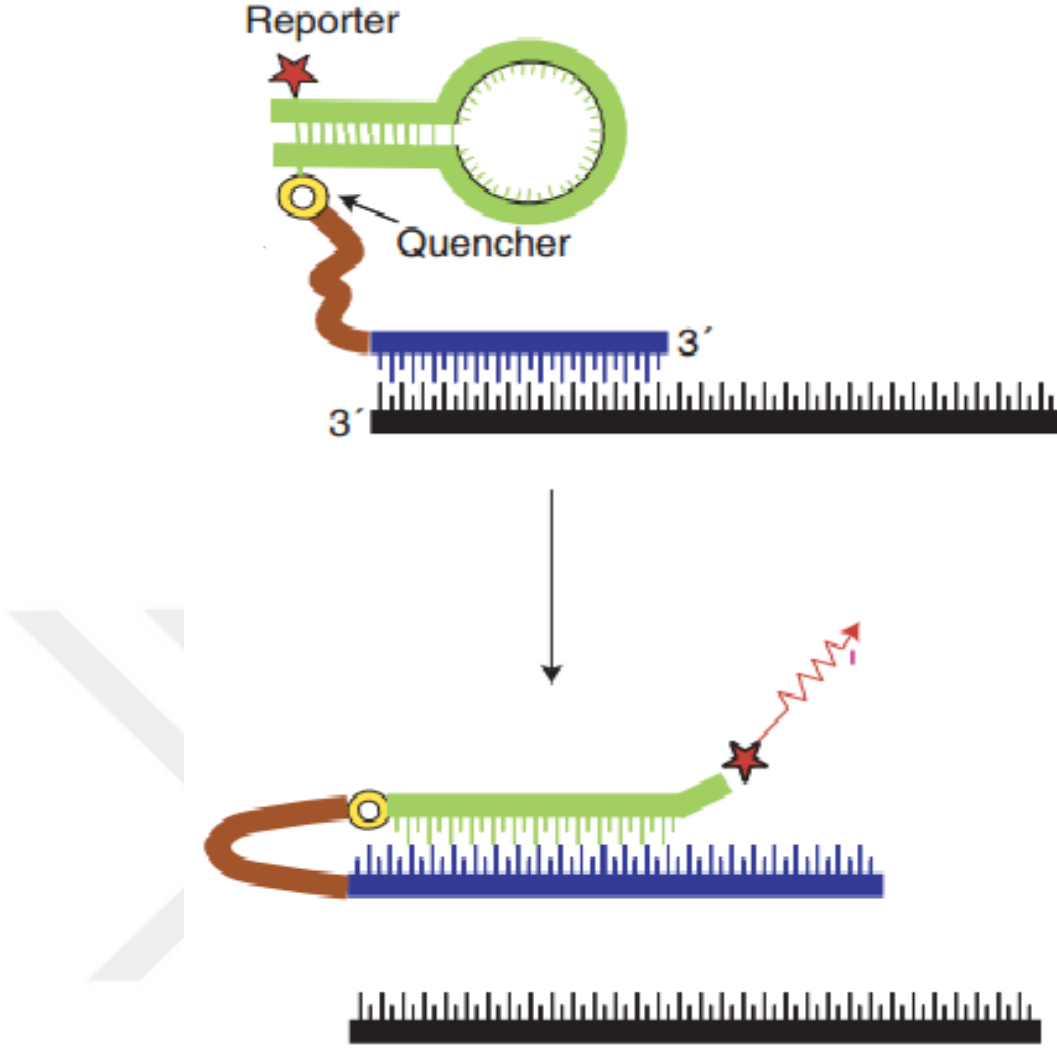
Saç tokası yapısında bulunan bu primerlerin 5' ucunda florofor ve baskılayıcı bulunmaktadır. Bu saç tokası yapısı florofor ve baskılayıcıyı bir arada tutar. İlk olarak sunrise primer forward primer olarak uzatılır sonra bu uzayan ürün reverse primer için kalıp olur ve sonunda polimeraz enzimi saç tokası yapısını açar florofor ve baskılayıcı ayrılır ışıma olur , çift iplikli PCR ürünü oluşur (Wilhelm and Pingoud, 2003).



Şekil 2.7. Sunrise primerlerinin çalışma prensibi (Mackay et al., 2005).

2.7.7.4. Scorpion Primerleri

Scorpion primerleri yapısal ve fonksiyonel olarak moleküler boncuklara benzemektedir. Scorpion primerleri 5' ucunda saç tokası yapısında kendine komplementer dizilere sahiptir. Saç tokasının baş kısmında Aplikon dizileri ile komplementer olan spesifik prob dizisi bunur. Amplifiye olmayan bir monmer ile bu yapı PCR primer dizisinin 5' ucuna bağlanır. 3' ucu primer olarak çalışır. Boyun bölgesinde reporter florofofor ve bir quencher ile etiketlidir. İlk olarak, primer uzar ikinci basamakta ise reverse primer için tek iplikli kalıp elde edilir. Boyun açıldığı zaman reporter ve quencher birbirinden ayrılır, baş bölgesi ürüne bağlanır (Arya et al., 2005).



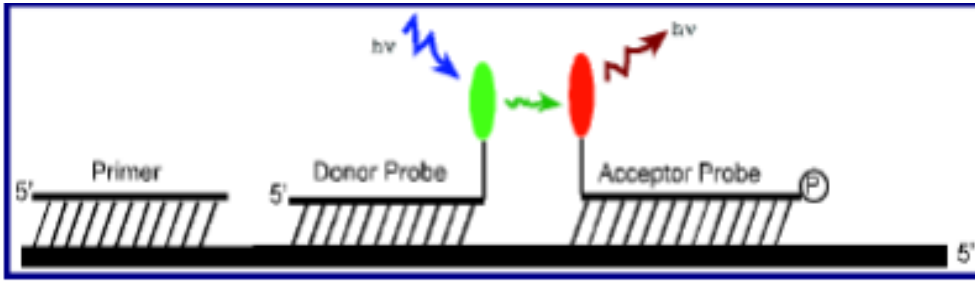
Şekil 2.8. Scorpion primerlerinin çalışma prensibi (Arya et al., 2005)

2.7.7.5. Light- up Probları

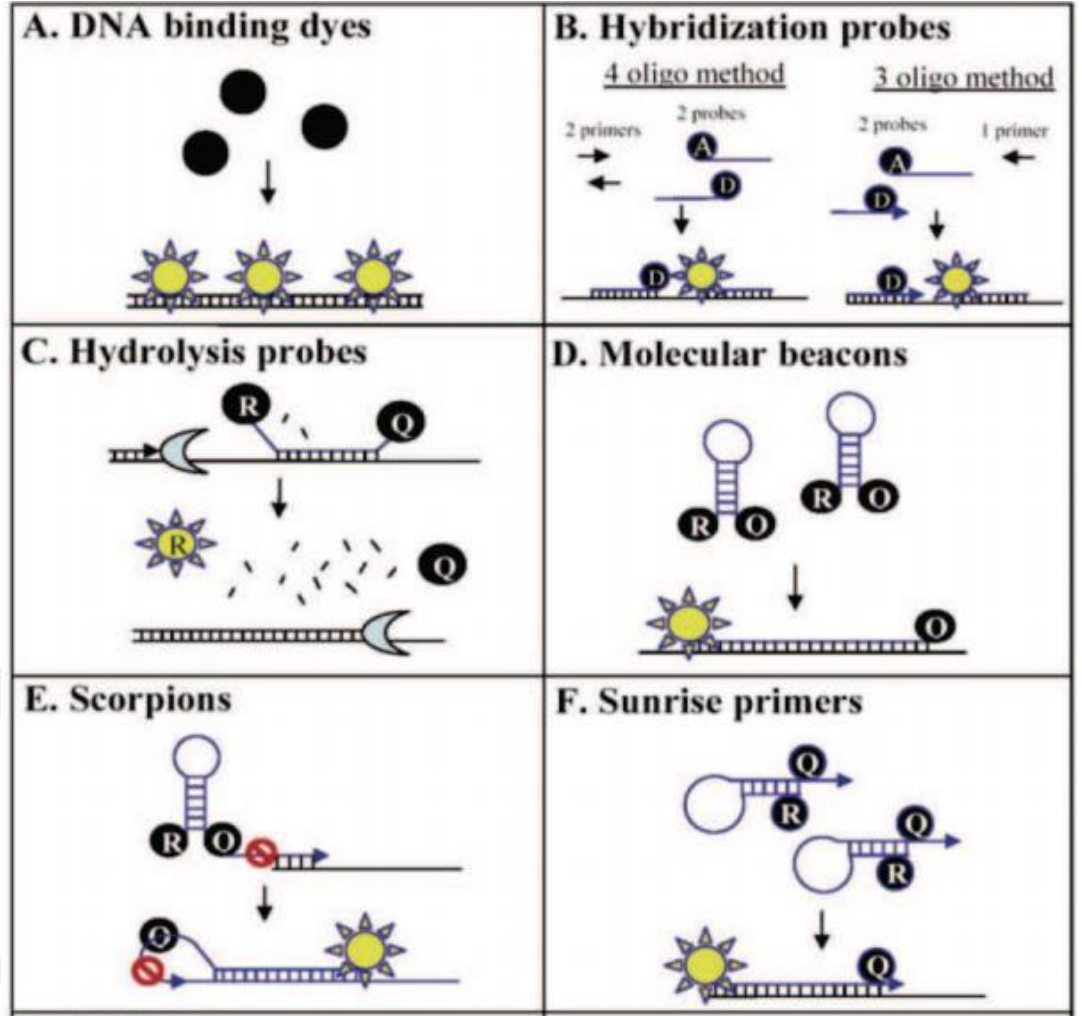
Light-up probları peptid nükleik asitlerdir ve flororfor olarak thiazole orange boyası kullanılır. DNA ile hibridizasyonunda floroforun floresan yoğunluğunun artışı ile dubleks veya tripleks yapılar oluşur. Bir quencher gerektirmez. Bu tekniğin ulaşılabilir duyarlılığı düşüktür. Bu proplar ucuzdur ve kolay uygulanır fakat sadece birkaç probun baskılandığı erken ekspanansiyel faz esnasında azalan sinyal ölçümü bir problemdir (Wilhelm and Pingoud, 2003; Arya, 2005).

2.7. 7.6. Hibridizasyon Prob Yöntemi

Bu yöntemde dizayn edilen probta, 3' ucunda floresan işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. Real Time PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanır, birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur donör boyadan akseptör boyaya enerji geçişi, Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) olarak adlandırılır. Bu enerji transferi sonucunda floresan oluşur ve ürün miktarı artıkça floresan miktarı da artmaktadır (Chaplin et al., 1999).



Şekil 2.9. Floresan Rezonans Enerji Transferi. İki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında donör boyadan acceptor boyaya enerji transferi olur (FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi) (Chaplin et al., 1999).



Şekil 2.10. Real Time PCR' da kullanılan habercilerin genel mekanizmaları D: Donör A: Akseptör R: Reporter Q: Quencher a) DNA'ya bağlanan boyalar SYBR Green 1b) Hibridizasyon problemleri c) Hidroliz problemleri d) Moleküler boncuk e) Scorpion primer f) Sunrise primer (Arya et al., 2005).

2.8. Moleküler Klonlama

Moleküler klonlama moleküler biyolojide deneysel yöntemlerle konukçu hücre içinde rekombinant DNA moleküllerinin direkt çoğaltılma işlemidir. Klonlanacak olan gen bölgesi vektöre yerleştirilir (ligasyon), bu rekombinant DNA molekülü de bakteriyel hücrelerde çoğunlukla *E.coli* ye aktarılır (Transformasyon). Bakterilerin bölünmesiyle rekombinant DNA'da replike olur ve klon olarak isimlendirilen kopyalar meydana getirilmektedir (Lodish et al., 2000).

Klonlamada; virus ve bakteriler, bakteriofajlar, plazmitler, nadiren de kozmid ve mayalar vektör olarak kullanılmaktadır. Klonlama işleminde en çok bakteri ve diğer organizmalarda bulunan, konak hücre kromozomundan ayrı olarak çoğalabilen küçük, yuvarlak yapılı kromozom dışı DNA'lardan oluşan plazmitler kullanılmaktadır (Kuk ve Erensoy, 2008).

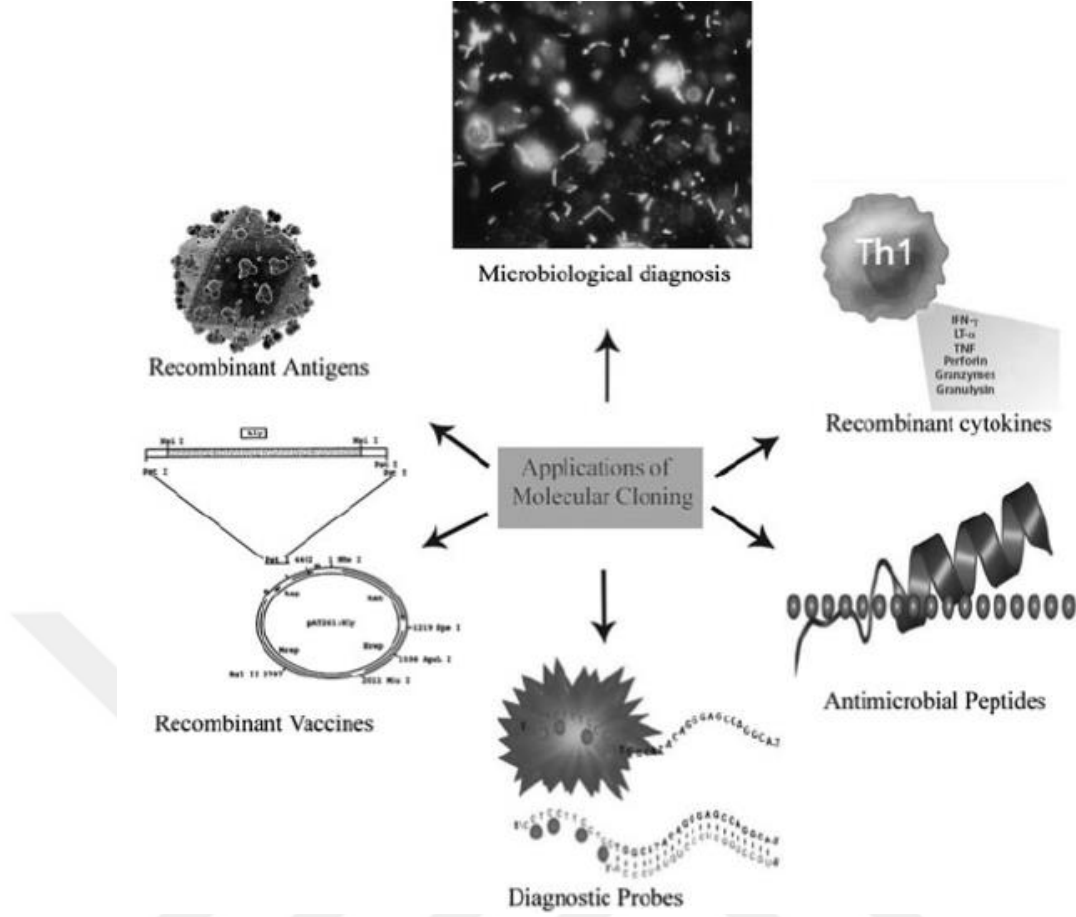
Plazmitler sirküler, hücrenin kromozomal DNA'sından ayrı moleküllerdir. Bu ekstrakromozomal DNA'lar bakterilerde, mayada ve bazı daha yüksek ökaryotik hücrelerde olabilmektedir. Plazmit miktarları 100 kb'dan bir kaç bin baz çifti büyüklüğüne kadar olabilmektedir (Lodish et al., 2000).

Konukçu hücre kromozomal DNA'sı gibi plazmit DNA'sı da her hücre bölünmesinden önce çoğalır. Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan plazmitler en çok *E.coli*"de çoğaltılır. Çoğunlukla plazmitler DNA klonlamasında vektör olarak kullanılmak üzere tasarlanmışlardır. Çoğu plazmit vektör bir replikasyon orijini, bir ilaç direnç gen bölgesi, birde dışarıdan eklenecek DNA parçası bölgesini içermektedir (Lodish et al., 2000).

Rekombinant DNA teknolojisinde ilk kullanılan plazmit pBR 322'dir. Bu plazmit, ampicilin ve tetrasiklin direnç genleri ve birçok restriksiyon enzim bölgeleri içermektedirler (Sambrook et al., 1989).

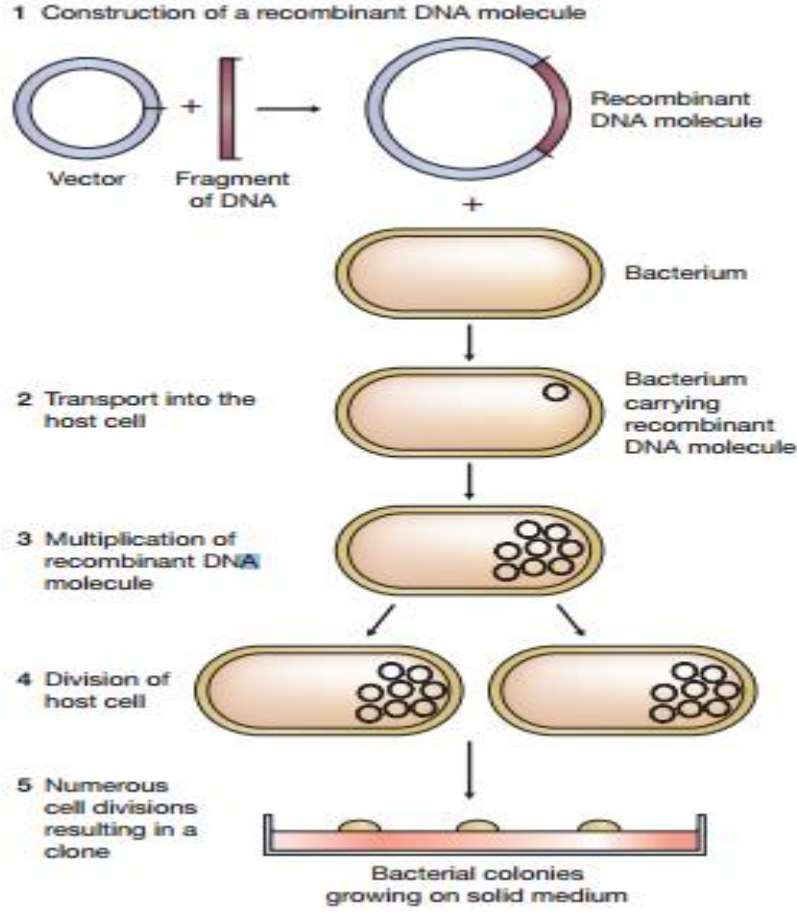
Plazmitlerin bakterilerde çoğalmasını sağlayan ve 50-100 baz çifti uzunluğunda replikasyon orjinleri (ORI) bulunmaktadır. Sirküler plazmitin replikasyonunun başlaması için konukçu hücre enzimleri bu bölgeye bağlanmaktadır. Eklenen DNA sekansı da böylelikle plazmitle birlikte çoğalmış olur (Lodish et al., 2000).

Moleküler klonlama uygulamalarına genel olarak; mikrobiyolojik tanılar, rekombinant sitokinler, antimikrobiyal peptidler, rekombinant antijenler, rekombinant aşılar, antimikrobiyal peptidler, tanısal problemler örnek olarak verilebilir (Sharma et al., 2014).



Şekil 2.11. Moleküler Klonlama Uygulamaları (Sharma et al., 2014).

Klonlama yöntemi; hedef genin seçilmesi, restriksiyon enzimleri ve DNA'nın kesilmesi, seçilen gen bölgesinin plazmite yerleştirilmesi, rekombinant DNA'nın çoğaltılması, rekombinant plazmitlerin hücrelerden seçilmesi ve klonlamanın doğrulanması basamaklarından oluşmaktadır (Kuk ve Erensoy., 2008).



Şekil 2.12. Gen Klonlaması Temel İlkeleri (Brown, 1990).

2.8.1. Konukçu Organizma ve Vektörün Seçimi

Konukçu organizma ve moleküler klonlama vektörü olarak kullanılan birçok organizma olmasına rağmen daha çok komponent hücre olarak *E.coli* suşu ve vektör olarak bir plazmit kullanılmaktadır. Çünkü uygulanabilir, kullanışlı ve minimal gereksinim ile rekombinant organizmanın hızlı büyümesine olanak sağlamaktadırlar (Kuk ve Erensoy, 2008).

2.8.2. Vektör DNA'nın Hazırlanması

Klonlanan vektörde yabancı DNA'nın gireceği bölge restriksiyon enzimleriyle kesilir. Vektör DNA ve yabancı DNA aynı restriksiyon enzimleriyle (*EcoRI* gibi) kesilir. Defosforillenmiş vektör moleküller, tek başına replike

olamaz ve replikasyon sadece kesilen bölgenin içine yabancı DNA girdikten sonra olmaktadır (Russell et al., 2001).

2.8.3. Klonlanacak Olan DNA'nın Hazırlığı

Genomik DNA'nın klonlanması için, araştırılacak olan organizmadan DNA izole edilir. Herhangi bir canlı dokudan DNA da kullanılabilir. DNA; kontamine proteinler, RNA ve küçük moleküllerin uzaklaştırılması ile saflaştırılır. Moleküler klonlama öncesinde çoğunlukla hedef gen bölgesinin kopya sayısını artırmak için Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanılmaktadır. Saflaştırılmış DNA' dan vektöre aktarılabilecek hedef gen bölgesini elde etmek ve vektöre aktarabilmek için vektörü ve inset DNA' yı aynı restriksiyon enzimi ile kesmek gerekmektedir (Russell et al., 2001; Kuk ve Erensoy, 2008).

2.8.4. DNA ligaz ile Rekombinant DNA Oluşumu

Hazırlanmış olan yabancı DNA fragmenti (insert DNA) ve vektör DNA belirli miktarda DNA ligaz enzimiyle karıştırılır. Bu işleme ligasyon denir. Daha sonra bu rekombinant DNA komponent hücreye aktarılır (Russell et al.,2001; Kuk ve Erensoy, 2008).

2.8.5. Konukçu Hücrenin içine Rekombinant DNA'nın Girişi

Hedef gen bölgesi klonlanmış rekombinant vektör karışımı, öncelikle in vitro olarak korunur ve seçilmiş canlı konukçu hücreye yerleştirilir. Bu olay transformasyon olarak isimlendirilmektedir. Rekombinant vektör, içinde bulunduğu komponent hücrenin bölünmesiyle birlikte replike olurken, hedef gen bölgesi de çoğalmış olmaktadır (Lederberg, 1994; Russell et al., 2001; Kuk ve Erensoy, 2008).

2.8.6. İnsert Edilen DNA'nın Taranması ve Biyolojik Özellikleri

Bakteriyal klonlama vektörünün içinde insert DNA olup olmadığını anlayabilmek için mavi beyaz koloni tarama sistemi uygulanmaktadır. Vektörlerde yabancı DNA'nın ekleneceği bölgede beta galaktosidaz enzimini kodlayan genin sekansı bulunmaktadır ve bu enzim aktivite göstererek galaktozu parçalar ve mavi koloniler oluşmaktadır. Bu bölgeye insert DNA eklendikten sonra enzim aktivite gösteremez ve sonucunda X galaktoz parçalanamadığı için koloniler beyaz kalır. Bu da vektöre insert DNA'nın eklendiğini göstermektedir (Sambrook et al.,1989; Bensasson et al., 2004) .

Bu kolonilerden izole edilen plazmit DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi de rekombinant plazmitin doğrulanmasına yardımcı olmaktadır (Kuk ve Erensoy, 2008).

3. MATERYAL ve METODLAR

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuz, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesine Şubat-Haziran 2015 ayları arasında gastroenteroloji polikliniğine göğüste yanma, ağıza acı ekşi su gelmesi şikayetleri ile gelen ve reflü tanısı alarak üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapılması planlanan 30 hasta ile reflü şikayeti olmayan kansızlık nedeniyle endoskopi yapılması gereken 20 sağlıklı birey olmak üzere toplam 50 hastadan oluşmaktadır.

Hasta seçiminde yaş dağılımlarına dikkat edilmiştir. Özellikle 20 yaşından küçük ve 70 yaşından büyük bireyler değerlendirmeye alınmamıştır. Ayrıca 8 hafta içinde antibiyotik, bir hafta içinde aspirin, heparin, coumadin gibi kan sulandırıcı ilaçlar, son iki hafta içinde proton pompa inhibitörleri ve diğer asit azaltan ilaç kullanan bireyler, gastrik özofajiyal ameliyatlılar, aktif oral kavite enfeksiyonu geçiren bireyler, barret özofagus hastalığı, HBV, HCV, HIV

enfeksiyonu olan bireyler, gebelik durumu, diyabetik ve obez olan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

Örnek alınacak her bir birey için yaş, cinsiyet, boy, kilo, alkol kullanımı, sigara kullanımı, geçirdikleri ameliyatlar, kullandıkları ilaçlar, özofagus hastalıkları olup olmadığı gibi soruları kapsayan Ek 1 sorgulama formu doldurulmuştur. Projenin gerçekleştirilebilmesi için Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Etik Kurul'undan 23.03.2015 tarihli, 15-2/4 nolu karar ile onay alınmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Besiyeri 1: SOB Medium

Tryptone	20 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	0,5 g

Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır ve otoklavlanır. Daha sonra içine 1M $MgCl_2$ ve 1M $MgSO_4$ tan filtre ile sterilize edilerek 10' ar ml eklenir. +4°C' de saklanır. Bu ortam SOC mediumun yapılması için hazırlanmıştır.

Besiyeri 2: SOC Medium (100ml) (S1797 Sigma)

Bacto -tripton	2 gr
Bacto- maya ekstraktı	0.5 gr
1M NaCl	1 ml
1M KCl	0,25 ml
2 M Mg^{+2} stok, sterilize	1 ml
2 M Glukoz, sterilize	1 ml

2 ml filtre ile steril edilmiş % 20' lik glukoz veya 1 ml filtre ile steril edilmiş 2M glukoz alınır. Son volümü 100 ml olacak şekilde SOB medium ile tamamlanır. SOC medium taze hazırlanarak kullanılır.

Bu besiyeri *E.coli* kompetent bakteriyal hücrelerine maksimum transformasyon etkinliği kazandırmak için transformasyon prosedürünün son basamağında aktivasyon için kullanılan bir ortamdır.

Besiyeri 3: LB Broth (Luria Bertani Broth L3022 Sigma)

Maya ekstraktı	5,0 g
Bacto-tripton	10,0 g
NaCl	5 g

20 g dehidre besiyeri 1 litre distile suda eritilir 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Hazırlanan besiyeri berrak ve sarımsı kahverengi olup, 25 °C 'da pH 'sı $7,0 \pm 0,2$ 'dir.

E. coli 'nin gelişimini destekleyecek şekilde formülize edilmiştir. Pepton ve maya ekstraktı, nitrojen, karbon, sülfür, mineraller ve vitaminler gibi faktörler gelişme sağlar. 500 gram olan bir kutu besiyerinden 20 L besiyeri hazırlanabilir.

Besiyeri 4: Amfisilin/İzopropiltiogalaktosid (IPTG) / X-Gal'lu LB besiyeri

LB ortamının 1 litresine 15 gr agar eklenir. Otoklavlanır. Son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde amfisilin ilave edilmeden önce ortam 50 °C'ye soğutulur ve sonra amfisilin ilave edilir. Bu ortam, 4 °C' de bir ay, oda sıcaklığında ise bir hafta saklanabilir. Daha sonra amfisilinli LB besiyerine 0,5 mM IPTG ve 80 µg/ml X-Gal konur.

Bu besiyeri klonlama esnasında insert hedef gen bölgesinin vektöre girip girmediğini kontrol etmek için kullanılmıştır.

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

Çalışmamızın çeşitli aşamalarında kullanılan çözelti ve diğer kimyasallar aşağıda verilmiştir.

Çözelti 1: Gliserol (Merck 104092): Biyopsi materyalleri moleküler yöntemler yapılana kadar doku ve bakteriyal bütünlüğü korumak amacıyla gliserol içinde muhafaza edilmiştir.

Çözelti 2: Formalin (Merck 104003): Formaldehit gazının sudaki % 40' lık eriyiğidir. 10 ml. formalin + 90 ml. su ile % 10' luk formalin elde edilir. Patolojik inceleme için alınan doku örneklerinin muhafazasında kullanılmıştır.

Çözelti 3: Parafin (Merck 1073379020): Histolojik inceleme için gömme ortamı olarak kullanılan parafin, dokuları kolayca kesimek ve şeffaflandırıcı ajanı dokudan uzaklaştırmak için kullanılmıştır.

Çözelti 4: Ksilen (Merck 108681): Dokuyu şeffaflaştırır, dokudaki dehidrasyon maddesini uzaklaştıran, temizleyebilen maddelerdir. Şeffaflaştırıcı madde, dokudaki alkolle yer değiştirir. Böylece alkol ve sudan yoksun hale gelen doku, parafinin nüfuz etmesine elverişli hale gelmiştir. Patolojik inceleme için dokunun boyanma işlemi esnasında kullanılmıştır.

Çözelti 5: Etil Alkol (Merck 100983): En çok kullanılan dehidrasyon maddesidir ve doku % 30-50' lik etil alkolle başlayarak % 60-70-80-96-100' lük etil alkolden geçirilerek büzülmeden sudan kurtarılır. Patolojik inceleme için dokunun boyanma işlemi esnasında kullanılmıştır.

Çözelti 6: Asit alkol (Merck 100327): Yıkayan dokular asit alkole daldırılıp birkaç saniye soluk mavi renk alana kadar tutulmuştur. Patolojik inceleme için dokunun boyanma işlemi esnasında kullanılmıştır.

Çözelti 7: Eozin Solüsyonu:

Eozin-Y (Yellowish) (Merck 109844)

%95'lik etil alkol (Merck 100983)

%80'lik etil alkol (Merck 100983)

Glasiyal asetik asit(Merck 100063.2511)

Distile su

1,0 gram Eozin-Y (Yellowish), 20.0 ml distile su içerisinde iyice homojenize olana kadar eritilir. Karışıma, 80.0 ml %95'lik etil alkol eklenir. Bu stok eozindir. Bir kısım stok eozin üzerine 3 kısım %80'lik etil alkol eklenirse Eozin solüsyonu oluşur. Eozin sitoplazma, protein birikimi, amiloid gibi yapıları boyamaktadır. Patolojik inceleme için dokunun boyanma işlemi esnasında kullanılmıştır.

Çözelti 8: Harris hematoksilin: (Merck 109253)

HematoksilenKristal	1 g
%95'lik Etil alkol	10 ml
Potasyum alum (veya Amonyum alum)	20 g
Merkürük oksit	0,5 g
Asetik asit	N/A

1 gram Kristal hematoksilin, 10 ml % 95' lik alkolde çözündürülür. 20 gram Potasyum alum (veya Amonyum alum) 200 ml distile suda kaynatılarak çözündürülür. Bu iki ayrı solüsyon yavaş bir şekilde karıştırılır ve elde edilen karışım, koyu mor bir renk alana kadar tekrar kaynatılır. Daha sonra ise karışıma 0,5 gram Merkürük oksit katılır. Karışımın bulunduğu kap alttan 1/3'ü suda kalacak şekilde hızlıca soğutulur. Hematoksilin hücre çekirdeğini ve kalsiyum çöküntülerini boyar. Patolojik inceleme için dokunun boyanma işlemi esnasında kullanılmıştır.

Çözelti 9: Gel Red Boyası (Biotium): Agaroz jel elektroforezinde UV altında DNA örneklerinin, plazmit DNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi için kullanılmıştır.

Çözelti 10: Tris Borat EDTA (TBE): DNA örneklerinin, plazmit DNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin elektroforezinde, agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tankının doldurulmasında kullanılmıştır.

Tris 54 g.

Borik asit 27,5 g

Na₂EDTA 7,44 g

Tartılan kimyasallar deiyonize suda çözülüp, pH 8,3'e ayarlanıp 1 litreye tamamlanmıştır.

Çözelti 11: Jel Yükleme Tamponu:

Ksilen siyanol FF 0,025 g (335940 Sigma aldrich)

Sukroz 4 g (S0389 Sigma aldrich)

Sukroz ve ksilen siyanol FF 10 ml çözelti hazırlamak üzere deiyonize suya eklenir. Çözelti iyice karıştırılır ve otoklavlanır. 4 °C'de saklanır. Elektroforezde jel yükleme tamponu olarak kullanılmıştır.

Çözelti 12: X-Gal (50mg/ml) (Applichem A4978)

100 mg 5-bromo-4-chloro-indol- β -D-galaktopiranozid 2 ml N,N-dimetil formamidte çözülür alüminyum ile örtülür ve -20°C'de saklanır. Renksiz, kromojen bir maddedir ve laktoz analogu olarak kullanılır. Klonlamanın doğrulanmasında mavi beyaz koloni seçimi tarama yönteminde LB Agar ortamına konarak karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çözelti 13: İzopropiltiogalaktoz Stok solüsyonu (IPTG) (Applichem A4773) (0.1 M)

1,2 g izopropil β -D-tiogalaktopiranozid son hacime 50 ml deiyonize su eklenir. Sterilize edilip 4°C'de saklanır. IPTG, β -galaktosidaz geni için bir uyarıcıdır. Bunun anlamı eğer ortamda IPTG varsa enzim sentezlenir. Klonlamanın doğrulanmasında mavi beyaz koloni seçimi tarama yönteminde LB Agar ortamına ilave edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan Kitler ve İçerikleri

3.1.4.1. High Pure Template Preparation Kit (Roche):

Biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Kit içeriğinde bulunan kimyasallar;

Tissue Lysis Buffer : 20 ml. [4 M üre, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7,4 (25 °C)].

Proteinaz K, Rekombinant PCR grade: Liyofilize halde, örneklerin lizizi ve dış kaynaklı DNAaz inaktivasyonu için kullanılmaktadır.

Inhibitör Removal Buffer: 33 ml inhibitör removal buffer üzerine 20 ml etanol eklenerek hazırlanmaktadır. [Etanol eklendikten sonraki final konsantrasyonu, 5M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25 °C)].

Binding Buffer: 20 ml.DNA'ların toplama tüplerine tutunmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.[6M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, % 20 Triton X-100 (v/v), pH 4,4 (25 °C)].

Wash Buffer: 20 ml üzerine 80 ml saf etanol eklenerek hazırlanmaktadır.[Etanol eklendikten sonraki final konsantrasyonu, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C)].

Elution Buffer: 40 ml DNA ile matriksi birbirinden ayırarak DNA izolasyonunun son basamağında kullanılmıştır.[10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (25 °C)].

High Pure Filtre Tüpleri : 2 katlı cam fiber tabakasından oluşan 2 paket 50' şer adet polipropilen tüp. 700 μ l'ye kadar örneğin hacmiyle çalışmak için tasarlanmıştır.

Koleksiyon Tüpü: 2 ml' lik 8 paket 50' şerli polipropilen tüp.

3.1.4.2. T easy vektör sistem II (Promega A1380):

Promega T easy vektör sistem II İçeriği

- pGEM®-T Easy Vector
A137A1 x 1,2 µg
- Kontrol insert DNA
A363A1 x 12 µl
- T4 DNA Ligaz
M180A1 x 100 u
- 2X Rapid Ligasyon Buffer
C671A1 x 200 µl
- JM109 komponent hücreler
L200A6 x 200 µl

PCR ürünlerinin klonlama prosedürü için Promega T easy vektör sistem kullanılmıştır. Bu kitte “TA” klonlama yapılmaktadır. Üretici firma tarafından plazmit olan vektörün (3015 bp) lac Z geni kesilmiş ve 3' uçlarına “T” bazı eklenmiştir. Klonlanacak olan ürün (PCR ürünü) bu lac Z geninin arasına yerleştirilmekte, böylece gen inaktive edilmektedir. Plazmit ayrıca amfisilin direnç geni taşımaktadır. Bu şekilde plazmit taşıyan bakterilerin besiyerinden seçimi sağlanmaktadır. Klonlama bölgesinin yanlarında enzim kesim bölgeleri bulunmaktadır. Bu bölgelerde bulunan enzimler kullanılarak klonlama sonrası ürün vektörden ayrılmaktadır.

3.1.4.2.1. Ligasyon ve Transformasyon Basamağında Kullanılan Malzemeler

Ligasyon aşamasında;

- ✓ Ligasyon tamponu
- ✓ Vektör (50 ng)
- ✓ PCR ürünü
- ✓ Kontrol insert DNA
- ✓ T4 DNA Ligaz (Enzim)

- ✓ Distile su

Transformasyon aşamasında;

- Buz kabı
- Su banyosu ya da inkübatör
- Yaklaşık 100-200 µl kompetan hücre
- Sıvı besiyeri
- Rekombinant plazmit DNA
- 1,5 ml ependorf tüpleri
- Mikropipet seti ve uygun steril uçlar

Rekombinant hücrelerin seçimi aşamasında;

- ✓ Steril kabin
- ✓ Gaz ocağı
- ✓ Mikropipet
- ✓ Steril uçlar
- ✓ Yayma spatulası
- ✓ % 70 etanol
- ✓ Besiyerinde bulunan transforme olan hücreler
- ✓ Antibiyotik ve mavi-beyaz koloni seçimi için IPTG ve X-gal içeren katı besiyeri

3.1.4.3. PureLink® Quick Plazmit Miniprep Kiti (K2100-10 ve K2100-1, invitrogen):

Transformasyonun ardından *E.coli* JM109 komponent hücrelerinden plazmit izolasyonu için PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kiti (K2100-10 ve K2100-1, invitrogen) kullanılmıştır. Kit içeriği;

Resüspansiyon Buffer (R3; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA)

RNAaz A (20 mg/mL in Resuspension Buffer R3)

Liziz Buffer (L7; 200 mM NaOH, 1% w/v SDS)

Precipitation Buffer (N4)

Wash Buffer (W9)

Wash Buffer (W10)

Tris Edta Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA)

Yıkama ve kurtarma tüpleri, Spin kolonlar

3.1.4.4 Real Time PCR'da kullanılan Reaksiyon Kiti:

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1I kiti kullanılmıştır. İçeriği;

MgCl⁺² solüsyonu: Roche Faststart ile birlikte sağlanmaktadır. Real Time PCR işleminde kullanılmıştır.

SYBR Green 1 Boyası: Özgül olmayan floresan işaretli prob olan SYBR Green 1 boyası real time PCR esnasında kullanılmıştır.

dH₂O ve enzim'dir.

Marker DNA'lar: Ticari olarak sağlanan marker olarak 250 bç-3000 bç (Cat. no 1855 638). Helix ruler TM 1kb ⁺ (I) DNA Ladder 0,5 ml (100 ng/μl).(%1'lik agaroz jelle 3 μl yükleniyor).

Marker DNA'lar ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Primerler: Araştırılan mikroorganizmalara uygun spesifik primerler tasarım programlarından oluşturularak veya literatürlerden bulunarak Real Time PCR işleminde kullanılmıştır. Primerlere yanında gelen kullanım klavuzlarında yazan 100 μM için gerekli su miktarı eklenerek 100 μM'a (yani 100 pmol/ μl'ye) sulandırılıp, her parametre için aşağıda tek tek belirtilen ara stoklar oluşturularak çalışılmıştır.

Primer ara stok hazırlanışı için F ve R yazan primerler kullanılmıştır. F primerden 10 μM (100μM'lık ana stoktan 10 μl alınıp üzerine 90 μl su eklenerek, R primerden 10 μM (100μM'lık ana stoktan 10 μl alınıp üzerine 90 μl su eklenerek) ara stok oluşturulmuştur .

Primerlerin tek tek formülle Tm sıcaklıkları hesaplanmıştır. *Provetella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Veillonella parvula*, total bakteri primerleri literatürden alınmış olup diğer türler ise NCBI primer 3 programında tasarlanmıştır. Her primer NCBI Blast programında kontrol edilmiştir.

Total bakteri Universal Primerler (Liu et al., 2013): Konvansiyonel PCR işleminde kullanılmıştır.

F: 5' TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3' Aplikon uzunluğu: 466 bp

R: 5' GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3'

Prevotella intermedia (Maeda et al.,2003).

F: 5' AATACCCGATGTTGTCCACA 3' Aplikon uzunluğu: 339 bp

R: 5' TTAGCCGGTCCTTATTCGAA 3'

Streptococcus pyogenes (NCBI Primer 3 programında tasarlanmıştır).

F: 5' CTAAACCCTTCAGCTCTTGGTACTG 3' Aplikon uzunluğu: 77 bp

(Detection of group a streptococcal pharyngitis by quantitative PCR)

R: 5' TTGATGCCTACAACAGCACTTTG 3'

Veillonella parvula (Bizhang et al.,2011).

F: 5' TGC TAA TAC CGC ATA CGA TCT AAC C 3' Aplikon uzunluğu: 66 bp

R: 5' GCT TAT AAA TAG AGG CCA CCT TTC A 3'

Enterocooccus faecalis (NCBI Primer 3 programında tasarlanmıştır).

F: 5' GGCCATTGCTAATGAAAGATG 3' Aplikon uzunluğu: 76 bp

R: 5' GATTTACCGAATCAAGAAGTTCG 3'

Fusobacterium nucleatum (Liu et al.,2014).

F: 5' CACAAGCTGACGCTCTAGA 3' Aplikon uzunluğu: 164 bp

R: 5' TTACCAGCTCTTAAAGCTTG 3'

Neisseria meningitidis (NCBI Primer 3 programında tasarlanmıştır).

F: 5' CCTTATTAGCACACTAGCGGTTAG 3' Aplikon uzunluğu: 138 bp

R: 5' GTCAGTGTACCCACATCTT

Candida albicans (Bonfim-Mendonça et al.,2013).

F: 5' CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA 3' Aplikon uzunluğu: 127 bp

R: 5' CAGTCACAAGATTAAAATGTTCAAG 3'

Bacteroides fragilis (NCBI Primer 3 programında tasarlanmıştır).

F: 5' AACAAATAATGTTTGGGTGGTTG 3' Aplikon uzunluğu: 62 bp

R: 5' ACCATGCCCCGCTGATTAC 3'

Lactobacillus acidophilus (Haarman and Knol, 2006).

F: 5' GAAAGAGCCCAAACCAAGTGATT 3' Aplikon uzunluğu: 86 bp

R: 5' CTT CCC AGA TAA TTC AAC TAT CGC TTA 3'

3.1.5. Kullanılan Başlıca Cihazlar

- Vorteks (Bio Vortex1)
- Santrifüj (Beckman coulter Allegra X-15R) ve Mikro 200R santrifüj
- Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spektrofotometre
- Yatay elektroforez (Caution)
- İnkübatör (Memmert)
- Real Time PCR cihazı (Light cycler 480)
- Mikrodalga
- Mikropipetler (Ependorf 0.5-10 µl-100µl ve 100-1000 µl)
- Steril beyaz ve sarı pipet ucu (Isolab)
- 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü (Isolab)
- Su banyosu (Memmert)

3.2. METOD

3.2.1. Örneklerin Alımı ve Laboratuvara Getirilmesi

Endoskopi işlemi öncesinde hastalar, aç gelmeleri ve kan sulandırıcı ilaç kullanmamaları gerektiği konusunda bilgilendirilmiştir. Hastalara endoskopi işlemi anestezi eşliğinde (dormicum ve propofol ile) yapılmıştır.

Biyopsi örneklerinin alınması için, patoloji kapları kullanılmıştır. Çalışma grubunu oluşturan bireylerden endoskopik inceleme esnasında distal özofagustaki gastroözofajiyal bileşkenin yaklaşık 5 cm yukarısından 2 adet biyopsi örneği

forseps kullanılarak alınmıştır. Bu biyopsilerden biri histolojik tanı ve *Helicobacter pylori* olup olmadığının değerlendirilmesi için patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Patoloji laboratuvarına giden biyopsi materyalleri rutinde kullanılan formaldehite konulmuştur. Diğer biyopsi örneği ise planlanan moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C’ de gliserol içeren ependorf tüpünde saklanmıştır.

3.2.2. Biyopsi Örneklerinin Patolojik İncelemesi

Reflü tanısı alan üst gastrointestinal sistem endoskopisi işlemi sırasında gastroözofajiyal bileşkenin 5 cm üzerinden alınan 2-3 mm civarındaki biyopsi materyali %10'luk formalin ile tespit edilmiştir. Ardından her biri parafin bloklara gömülmüştür. Her bir bloktan 4-5 mikronluk seri kesitler alınmıştır.

Kesitleri alınan dokuların preparatları çekirdek ve sitoplazmaların iyi ayırt edilmesini sağlayan hematoksilin eozin boyası ile boyanmıştır.

Hematoksilen Eozin boyama yönteminde; öncelikle lamalar parafinden arındırılmıştır (deparafinizasyon) ve su ile muamele edilip; 3 kere 3' er dk ksilende, 2 dk % 70' lik alkolde, 2 dk % 80' lik alkolde, 2 dk % 90' lık alkolde ve 2 dk'da % 100' lük alkolde bekletilmiştir.

%1' lik asit alkole 1-2 kez batırarak musluk suyunda yıkanmıştır. Zayıf amonyak solüsyonu ya da doymuş lityum karbonat solüsyonu ile preparatlar parlak mavi bir renge boyanmaya kadar bekletilmiştir. Akan musluk suyunda 5 dakika süreyle yıkanıp, % 80' lik etil alkolde 1-2 dakika bekletilmiştir.

Eozin-floksin solüsyonunda 2 dakika zemin boyama yapılmış ve Harris hematoksilin ile 6 ile 15 dakika boyanmıştır. Tekrar akan musluk suyunda 2 ile 5 dakika yıkanmıştır.

Hazırlanan preparatın üstüne dokunun üzerine gelecek şekilde doğru açıyla lamel kapatılarak mikroskopik olarak preparat incelenmeye hazırlanmıştır.

3.2.3.Biyopsi Materyallerinden Yapılacak Olan Moleküler Analizler

3.2.3.1. Biyopsi Materyallerinden DNA İzolasyonu

Biyopsi materyallerinden DNA ekstraksiyonu Roche High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak yapılmıştır. Kit ilk kez kullanılacağı için öncelikle ön hazırlık yapılmıştır.

- ✓ Liyofilize haldeki Proteinase K 4,5 ml distile su eklenerek alikotlanmıştır(-20 °C' de 12 ay saklanabilir).
- ✓ Inhibitör Removal Buffer 20 ml etanol eklenerek hazırlanmıştır.
- ✓ Wash Buffer da 80 ml etanol eklenerek hazırlanmıştır.

1,5 ml' lik ependorfta yaklaşık 1 ml' lik gliserol içinde -20 °C' de saklanan biyopsi materyallerinin üzerine, öncelikle 50 µl Proteinaz K ve 200 µl Liziz buffer ilave edilerek 55 °C' de 1 saat bekletilmiştir.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra, üzerlerine 10 µl lizozim eklenerek iyice karıştırılarak, 37 °C' de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonra örneklerin üzerlerine DNA'ların toplama tüpüne tutunmasını sağlamak amacıyla 200 µl binding buffer ve proteinlerden arındırmak için 40 µl proteinase K eklenerek iyice karıştırılmıştır.

10 dk 72 °C' de karışım inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her tüpe 100 µl isopropanol eklenip ve pipetle karıştırılmıştır. Bu şekilde DNA'nın çökmesi sağlanmıştır.

Hasta sayısı kadar koleksiyon tüpü çıkartılıp, her birine filtre tüpü yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu karışım koleksiyon tüplerine aktarılıp, 8000xg' de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Koleksiyon tüpleri atılıp ve filtreli tüpler yeni toplama tüpü üzerine yerleştirilmiştir. Her tüpe 500 µl İnhibitör Removal Buffer eklenip, 8000x g' de 1 dk santrifüj edilmiştir.

Toplama tüpleri atılıp ve filtreli tüpler yeni koleksiyon tüpü üzerine yerleştirilmiştir. Üzerine 500 µl Washing Buffer eklenerek 8000x g' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.

Tüplerdeki sıvılar dökülüp ve tekrar 13000xg' de 10 saniye santrifüj yapılmıştır. Koleksiyon tüpler atılıp, filtreli tüpler 1,5 ml lik ependorflara alınmıştır.

Son aşamada DNA eldesi için; ependorflar üzerine yerleştirilmiş filtreli tüplere önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 72 °C' de bekleyen Elüsyon buffer'dan 200 µl eklenmiştir. 8000xg' de 1 dk santrifüj yapılarak, DNA'nın ependorflara geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen DNA' lar -20°C' lik derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.3.2. Biyopsi Materyallerinden İzole edilen DNA'ların Saflık ve Miktar Tayini

Biyopsilerden izole edilen DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri nanodrop spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

Genomik DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri için; izole edilen DNA'dan 1µl cihaza mikropipetle konarak bir örnek için 15 sn' de DNA miktarı hesaplanmıştır. Her örnek için aynı işlem yapılarak DNA miktarları bulunmuştur. Ölçümler arasında örnek damlatılan yer, her seferinde iyice silinmiştir.

DNA'ların 260 nm ve 280 nm' deki absorbanları hesaplanarak (OD 260 ve OD 280) DNA' nın saflığı değerlendirilmiştir.

3.2.4. Total Bakteri Sayımı için Yapılan Moleküler Çalışmalar

3.2.4.1. Klonlanacak Hedef Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Klonlama çalışmasından önce hedef gen bölgesi olan tüm bakterilerde korunmuş bir bölge olarak bildiğimiz 466 bp'lık 16S rDNA bölgesinin çok sayıda kopyasını elde etmek için, biyopsi örneklerinden rastgele seçilen bir kişinin izole edilen DNA örneği, universal bakteriyel primerler ile PCR işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Konvansiyonel PCR Bileşenleri (Roche dNTP Pack Sistem)

Buffer	2,5 µl
Primerler	Reverse: 1 µl Forward: 1 µl
DNA polimeraz	0,5 µl
Su	14 µl
dNTP	1 µl
DNA	5 µl

Toplamda : 20 µl mix + 5 µl DNA konmuştur.

Konvansiyonel PCR için ısı döngü koşulları :

95 C° 4 dakika (Bir döngü) ön denatürasyon

95 C°	30 sn	} 35 döngü
58 C°	30 sn	
72 C°	30 sn	

72 C° 7 dakika (Bir döngü) son uzatma

Her PCR çalışmasında kontaminasyona karşı gerekli önlemler alınmış ve negatif kontrol kullanılmıştır. Kullanılan universal primerler materyal metot kısmında verilmiştir.

3.2.4.2. Amplifiye Edilen Bölgenin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Hedef bölgenin amplifikasyonun ardından PCR ile çoğaltılan bölge % 2 agaroz konsantrasyonunda yaklaşık 120 volt uygulanarak yaklaşık 40-45 dk agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Ortaya çıkan bant büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak hedef bölgenin uzunluğu bulunup, doğru bant olup olmadığına karar verilmiştir.

3.2.4.3. Klonlama, Ligasyon, Transformasyon

Reflü hastaları ve kontrol grubu arasındaki bakteriyal yükü net ve doğru olarak tespit edebilmek için klonlama yapılmıştır. Biyopsi örneklerinden rastgele seçilen bir kişinin izole edilen DNA örneği, universal bakteriyel primerler ile PCR işlemine tabi tutulmuştur. Ve 466 bp'lık PCR ürünü plazmit vektöre aktararak transforme hücrede klonlanmıştır.

3.2.4.3.1. Ligasyon

Çoğaltılmış hedef gen bölgesinin miktarı spektrofotometre ile ölçülmüş ve plazmid vektörle (Promega T easy vektör) birleşmesinin sağlanması için ne kadar DNA konulacağı aşağıdaki formülle hesaplanmış olup, kullanılacak hedef gen bölgesi miktarı bulunmuştur.

$$\text{ng insert miktarı} = \frac{50 \text{ ng vektör} \times 0,466 \text{ kb insert DNA}}{3 \text{ kb vektör}} \times \frac{3}{1}$$

$$=23,3 \text{ ng insert DNA (hedef gen bölgesi)}$$

Çizelge 3.2'de belirtilen standart reaksiyona, toplamda 23,3 ng DNA ilave edilecek şekilde elimizdeki PCR ürünü seyreltilmiştir.

Çizelge 3.2. Ligasyon işlem Basamağı Bileşenleri

	Standart Reaksiyon	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
Ligasyon tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
Vektör (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR Ürünü	3 µl	-	-
Kontrol insert DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
Distile su	-	1 µl	3 µl
Toplam hacim	10 µl	10 µl	10 µl

Kullanılan 50 ng vektör ve 23,3 ng insert DNA (hedef gen bölgesi), tüplerin alt kısmında içeriğin toplanması için hafifçe santrifüjlenip, ligasyon tamponu, kullanımdan önce kuvvetlice vortekslenmiştir. Ligasyon reaksiyonları, 0,5 ml'lik ependorf tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Pipetleme sonrasında maksimum sayıda transformant elde edebilmek için karışımlar, + 4°C'de 16 saat bekletilmiştir.

3.2.4.3.2. Transformasyon

Ligasyon reaksiyonlarını içeren tüpler, içeriğin altta toplanması için santrifüjlenmiştir. Daha sonra, bu tüplerden 2 µl alınarak buz üzerinde bulunan 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır.

Komponent hücre olarak *E.coli* JM109 hücresi kullanılmıştır. Donmuş JM109 yüksek etkinlik gösteren kompetent hücreleri, buz banyosunda çözülene kadar bekletilip (yaklaşık 5 dakika), hafifçe karıştırılmıştır.

Dikkatli bir şekilde 50 µl hücre, 2 µl'lik ligasyon reaksiyonlarına ilave edilip, hafifçe karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Karışım 42°C'deki su banyosunda 45-50 saniye ısı şokuna maruz bırakılıp ve inkübasyon sonrasında, hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 2 dakika

bekletilmiştir. İnsert hedef gen bölgesinin vektöre yerleşip yerleşmediğinin kontrolü için; transformasyonun ardından SOC besiyerinde aktive edilmiş olan komponent hücreden 100 µl alınarak daha önceden hazırlanmış amfisilin, IPTG (izopropil β-D-tiogalaktopiranozid) ve X-Gal içeren LB agar ortamlarına yayma plaka yöntemi ile inoküle edilmiştir. Petriler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha uzun inkübasyon ya da petrilerin +4°C’de bekletilmesi, beyaz renk gelişimini artırabilmektedir. Beyaz koloniler insert hedef gen bölgesi içermektedir.

Plazmitte amfisilin antibiyotikğine direnç geni bulunduğu için amfisilin içeren ortamda organizma üreyebilmiştir. Ayrıca plazmitte *E.coli*’nin lac Z geni içerisinde yana yana restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerinin bir arada bulunduğu polilinker bölge mevcuttur ve klonlanan insert hedef gen bölgesi bu bölgeye yerleşir böylelikle lac z geni defektli hale geldiğinden karbon kaynağı olan X galakatazi parçalayamaz. β-galaktozidaz üretemeyeceklerinden besiyerinde beyaz koloni olarak görülmüşlerdir. İnsert DNA içermeyenler ise mavi koloni oluşturmuştur.

3.2.4.4. Rekombinant Plazmitin İzolasyonu

Mavi-beyaz koloni seçimine göre insert DNA içerdiği düşünülen beyaz koloniler, daha önce hazırlanmış olan amfisilin içeren 5’ er ml’ lik LB broth besiyerlerine inoküle edilerek 37°C’ de çalkalamalı olarak 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

1,5 ml LB brothta 1 gece boyunca aktive edilmiş örnek organizmalar (her örnek için 1-2 x 10⁹ hücre) santrifüj edilmiş ve tüm sıvı kısım dökülmüştür.

Hücre pelleti üzerine, RNase A içeren 250 µl Resüspansiyon Buffer eklenmiş ve homojen oluncaya kadar pellet ile süspanse edilmiştir. 250 µl Liziz Buffer eklenmiştir. Karışım homojen oluncaya kadar vorteks kullanılmadan karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.

350 µl hızlandırma tamponu eklenmiş ve tüpler alt üst edilerek karışım homojenize edilmiştir. Bu adımda da vorteks kullanılmamıştır. Lizat 12.000xg’ de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 2 ml lik yıkama tübü içerisindeki spin kolona aktarılmıştır. Kolon, 12.000 xg’ de 1 dakika

santrifüj edilmiştir. Sıvı kısmı atılmış ve kolon yıkama tübüne tekrar yerleştirilmiştir.

700 µl Wash Buffer ile etanol kolona eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 12.000xg' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısmı atılmış ve kolon yıkama tübüne yerleştirilmiştir. Ardından tekrar 12.000xg' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkama tübü içindeki sıvı kısım ile birlikte atılmıştır.

Spin kolon yeni bir 1,5 ml' lik kurtarma tübüne yerleştirilmiştir. Kolonun ortasına 75 µl önceden ısıtılmış Tris Edta Buffer ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. Kolon 12.000xg' de 2 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

Kurtarma tüpü saflaştırılmış plazmid DNA'sını içermektedir. Kolon çıkarılmıştır ve plazmid DNA'sı 4°C' de kısa süreli ve -20°C' de uzun süreli olarak saklanmıştır.

3.2.4.5. Rekombinant Plazmid DNA hedef gen bölgesinin amplifikasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi :

Transformasyon reaksiyonundan sonra vektörün hedef gen bölgesini alıp almadığını doğrulamak için, rekombinant hücreden plazmid DNA izolasyonunu yaptıktan sonra plazmid DNA hedef olarak kullanılarak universal primerler ile PCR' a tabi tutulmuştur.

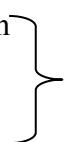
Çizelge 3.3. Plazmid PCR koşulları

Buffer	2,5 µl
Primerler	Reverse: 1µl Forward: 1µl
DNA polimeraz	0,5 µl
Plazmid DNA	5 µl
DNTP	1 µl
Su	14 µl
TOPLAM	25 µl

Isı döngü programı;

95 C° 4 dakika (Bir döngü) ön denatürasyon

95 C° 30 sn



58 C° 30 sn 35 döngü
 72 C° 30 sn
 72 C° 7 dakika (Bir döngü) son uzatma

Sonrasında; PCR ürünleri % 2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir.

3.2.5. Total Bakteri Sayısının Hesaplanması İçin Real Time PCR ile Standart Eğrinin Oluşturulması ve Gen Kopya Sayısının Belirlenmesi

Klonlama sonrası plazmid izolasyonu ile elde edilen rekombinant plazmitlerin miktarı nanodrop spektrofotometre ile ölçülmüştür (31,5 ng). Bu miktar standart eğri formülünde yerine konarak standart eğri oluşturmak için kullanılacak olan konsantrasyon bulunmuştur.

$$\text{Kopya sayısı} = \frac{31.5 \text{ ng} \times 10^{-9} \text{ g} \times 6.02 \times 10^{23}}{660(\text{çift iplikli DNA}) \times (466 \text{ bp hedef gen} + 3015 \text{ vektör})}$$

$$= 8,27 \times 10^9 \text{ gen kopya sayısı bulunmuştur.}$$

Bu verilere göre hesaplanan insert hedef gen bölgesinin konsantrasyonu yaklaşık olarak 10^9 hedef molekül/reaksiyon konsantrasyonda bulunmuştur. 10^9 standart plazmit seri dilüsyonları yapılarak 10^1 kopya sayısına kadar seyreltilmiştir.

Bu dilüsyonlar hazırlanırken 10^9 ana stoktan 10 µl alınarak yeni bir ependorfa aktarılıp ve üzerine 90 µl distile su ilave edilerek ve vorteksenerek 10^8 standartı oluşturulmuş, bu şekilde 10^1 kopya sayısına kadar seri dilüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra real time PCR yapılarak reflü hastaları ve kontrol grubu arasındaki hedef gen kopya sayıları karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.4. Standart Eğri için Real Time PCR koşulları

Roche LightCycler® FastStart DNA SYBR Green 1 kullanımı		
Tek reaksiyon (hacim)	Tek reaksiyon (konsantrasyon)	Bileşenler
3,7µl	-	Deiyonize Su
0,8µl	3mM	MgCl ²⁺
1µl	0,3 µM	Forward Primer(F)(ara stok 10 µM)
1µl	0,3 µM	Reverse Primer(R)(ara stok10 µM)
1µl	x	Enzim ve SYBR Green 1 boya solüsyon Karışımı

Yukarıdaki PCR koşulları kullanılarak real time PCR yapılmıştır. Ve standart eğri oluşturulmuştur. Her bir örnek için de aynı koşullar universal primerler kullanılarak real time PCR işlemi yapılmıştır. Bu şekilde reflü ve kontrol grubu arasındaki hedef gen bölgesi sayısı kıyaslanarak total bakteri sayısı saptanmıştır.

3.2.6. Seçilen Mikroorganizmaların Varlığının Real Time PCR Araştırılması

Biyopsi materyallerinden izole edilen DNA örnekleri seçilen mikroorganizmalar için spesifik olan primeler kullanılarak real time PCR ile mikroorganizmaların varlığı araştırılmıştır.

Araştırmada biyopsi örneklerinde Real Time PCR ile bakteriyel *Prevotella intermedia*, *Streptococcus pyogenes*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus acidophilus* türlerinin ve fungal *Canida albicans* türünün analizlerinin yapılması hedeflenmiştir.

Analizler Lightcycler 480 Real Time PCR cihazı kullanılarak SYBR Green 1 boyası ile yapılmıştır. Real Time PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıdaki Çizelge 3.5' te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Real Time PCR Bileşenleri.

Roche LightCycler® FastStart DNA SYBR Green 1 kullanımı		
Tek reaksiyon (hacim)	Tek reaksiyon (konsantrasyon)	Bileşenler
3,7µl	-	Deiyonize Su
0,8µl	3mM	MgCl ²⁺
1µl	0,3 µM	Forward Primer(F)(ara stok 10 µM)
1µl	0,3 µM	Reverse Primer(R)(ara stok10 µM)
1µl	x	Enzim ve SYBR Green 1 boya solüsyon Karışımı

Toplam:7,5 µl miks + 2,5µl DNA konulmuştur. Her bir örnek için hazırlanan bu karışım kapillere aktarılarak üzeri sealing foil ile kapatılmıştır. Kapillerler mikrosantrifüjde 2000 rpm' de 30 sn santrifüjlenerak karışımın kapillerin alt kısmına çökmesi sağlanmıştır.

Kapillerler aşağıdaki protokole göre cihaza yüklenmiştir (**Çizelge 3.6**).

Çizelge 3.6. Light Cyler Real Time PCR Protokolü. Her tür için tasarlanan Protokol aynı olup sadece Tm dereceleri değişmektedir.

Denaturasyon		Amplifikasyon			Melting curve			Cooling
Parametre								
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	40			1			1
Hedef [°C]	95	95	58	72	95	60	95	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:10	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	4.40	4.40	2.20	4.40	4.40	2.20	0.2	20
Acquisition Mode	yok	yok	yok	single	yok	yok	Continuous	yok

Çizelge 3.7. Her mikroorganizmaya spesifik primerler ve Tm Değerleri. Tm değerleri; $4x(G + C) + 2x(A + T)$ formülüne göre hesaplanmıştır.

Mikroorganizma	Primerler	Tm dereceleri
Total bakteri Universal Primerler	F: TCCTACGGGAGGCAGCAGT R: GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	61,7 59,86
<i>Prevotella intermedia</i>	F: AATACCCGATGTTGTCCACA R: TTAGCCGGTCCTTATTCGAA	57 58,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	F: CTAAACCCTTCAGCTCTTGGTACTG R: TTGATGCCTACAACAGCACTTTG	60,47 61,01
<i>Veillonella parvula</i>	F: TGC TAA TAC CGC ATA CGA TCT AAC C R: GCT TAT AAA TAG AGG CCA CCT TTC A	61,24 59,84
<i>Enterocooccus faecalis</i>	F: GGCCATTTGCTAATGAAAGATG R: GATTTACCGAATCAAGAAGTTG	59,41 57,82

<i>Fusobacterium nucleatum</i>	F: CACAAGCTGACGCTCTAGA R: TTACCAGCTCTTAAAGCTTG	55,61 56,36
<i>Neisseria meningitidis</i>	F: CCTTATTAGCACACTAGCGGTTAG R: GTCAGTGTACCCACATCTT	57,40 52,52
<i>Candida albicans</i>	F: CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA R: CAGTCACAAGATTAAAATGTTCAAG	55 55,85
<i>Bacteroides fragilis</i>	F: AACAAATAATGTTTGGGTGGTTG R: ACCATGCCCGCTGATTAC	58,55 57,88
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	F: GAA AGA GCC CAA ACC AAG TGA TT R: CTT CCC AGA TAA TTC AAC TAT CGC TTA	61,44 60,85

3.3. İstatistiksel veriler

İstatistiksel veriler için SPSS 16.0 programı kullanılmıştır. (SPSS, Chicago, IL, USA). Hasta ve kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda ise Pearson's ki kare testi, demografik veri analizi içinde frekans analizi yapılmıştır. İki grup arasında ki gen kopya sayılarını karşılaştırmak içinde Wilcoxon Testi, Mann Whitney U Test SPSS analizleri yapılmıştır (Freedberg et al., 2015).

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Bireyler

Çalışma grubunu oluşturan 50 kişinin histopatolojik bulguları, moleküler analizleri tamamlanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Aynı zamanda çalışmaya katılan bireylere sigara, alkol kullanımları, safra kesesi ameliyatı olup olmadıkları, ağrı kesici ilaç kullanımları, kilo ve boyları gibi demografik sorular sorulmuştur. Sorgulama formu EK 1' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Üst gastrointestinal sistem endoskopi sonuçlarına göre reflü hastalığı inflamasyon dereceleri ve sorgulama formu sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Reflü Hastalarının Demografik Özellikleri

Hasta (Reflü)	Cinsiyet K:+ E:-	Vücut kitle indeksi (<24 :+ ; 24.1-34:-)	Grade A	Grade B	Grade C	Grade D	PPI	Ağrı kesici	Sigara	Alkol	<i>H.pylori</i> pozitifliği	Safra kesesi ameliyatı
1	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
4	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
11	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
12	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
13	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
17	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
19	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
23	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
30	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Çizelge 4.2. Reflü Hastası Olmayan Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri

[illegible]

4.2. Biyopsi Örneklerinin Patolojik İncelemesi

Tüm kesitler gastrointestinal patolojide deneyimli bir uzman patoloğ tarafından immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

Reflü hastalarında bakılan histolojik bulgular; bazal hücre hiperplazisi, lamina propria papillaların uzaması, epitelyal hücre nekrozu, artmış intraepitelyal inflamasyon (eozinofil, PNL, lenfosit), dilate kapiller, balon hücreler, akantoliz, erozyon, ülserasyon histopatolojik bulguları Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4' te verilmiştir.



Çizelge 4.3. Reflü Hastalarının Histopatolojik Bulguları

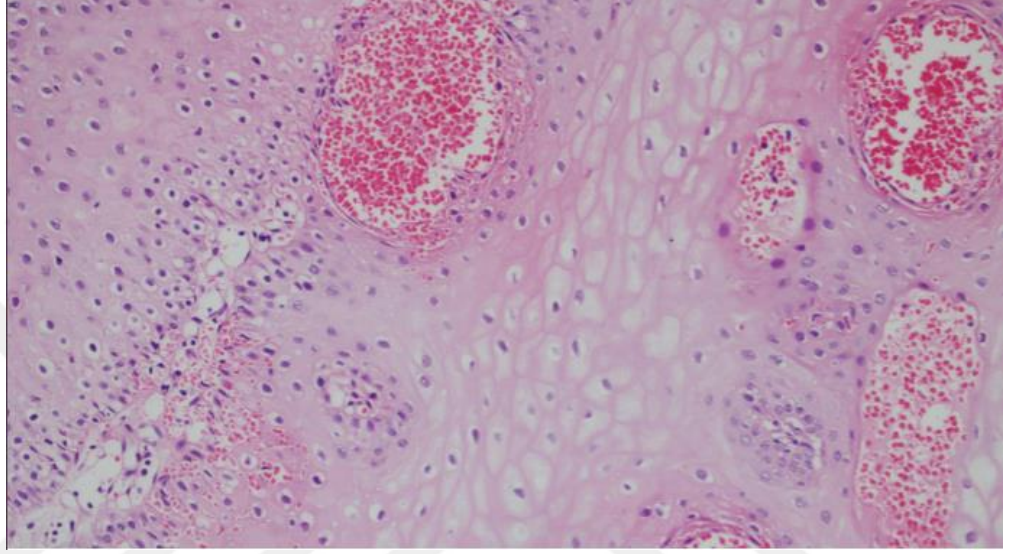
Reflü	Bazal hücre hiperplazisi	Lamina propriada uzama	Eozinofil	PNL	Dilate kapiller	Balon hücreler	lenfosit	Erozyon ülserasyon
1	-	-	-	+	+	+	+	+
2	-	-	+	-	+	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	+	-	+	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	+
9	+	-	+	+	+	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	+	-	-
12	+	-	-	+	+	-	-	-
13	+	-	-	+	+	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-
15	-	+	-	+	-	-	-	-
16	-	-	-	-	+	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	+	+	-	-	-	-
19	-	-	-	+	+	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	+	+	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	+	-	-	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	+	+	-	-	-
28	-	-	-	+	-	-	-	-
29	-	-	-	-	+	-	-	-
30	-	-	-	+	-	-	-	-

Çizelge 4.4. Kontrol Grubunun Histopatolojik Bulguları

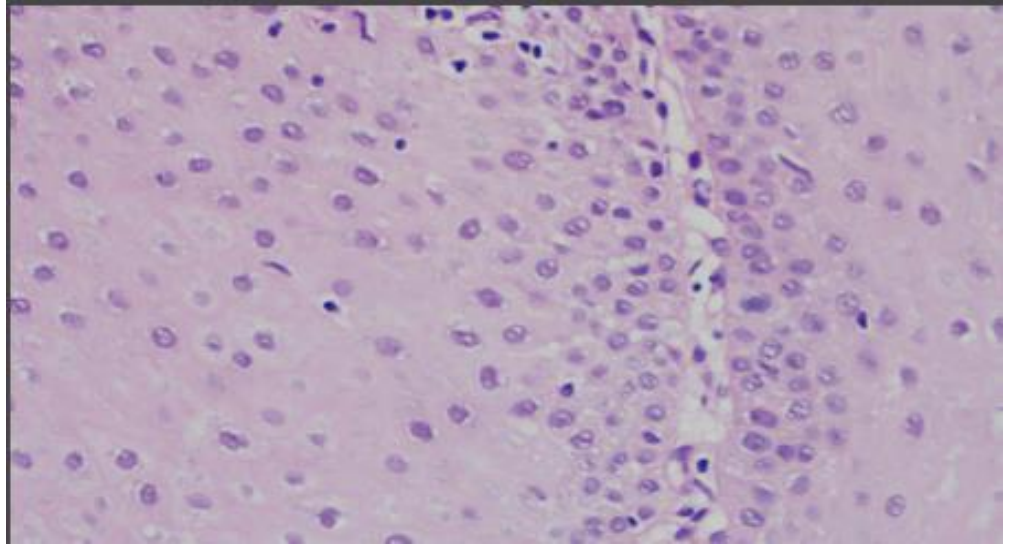
Kontrol	Bazal hücre hiperplazisi	Lamina propriada uzama	Eozinofil	PNL	Dilate kapiller	Balon hücreler	lenfosit	Erozyon ülserasyon
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.1. Biyopsi Örneklerinden Hazırlanan Preparatların Histopatolojik Bulgularının Mikroskopik İncelenmesi

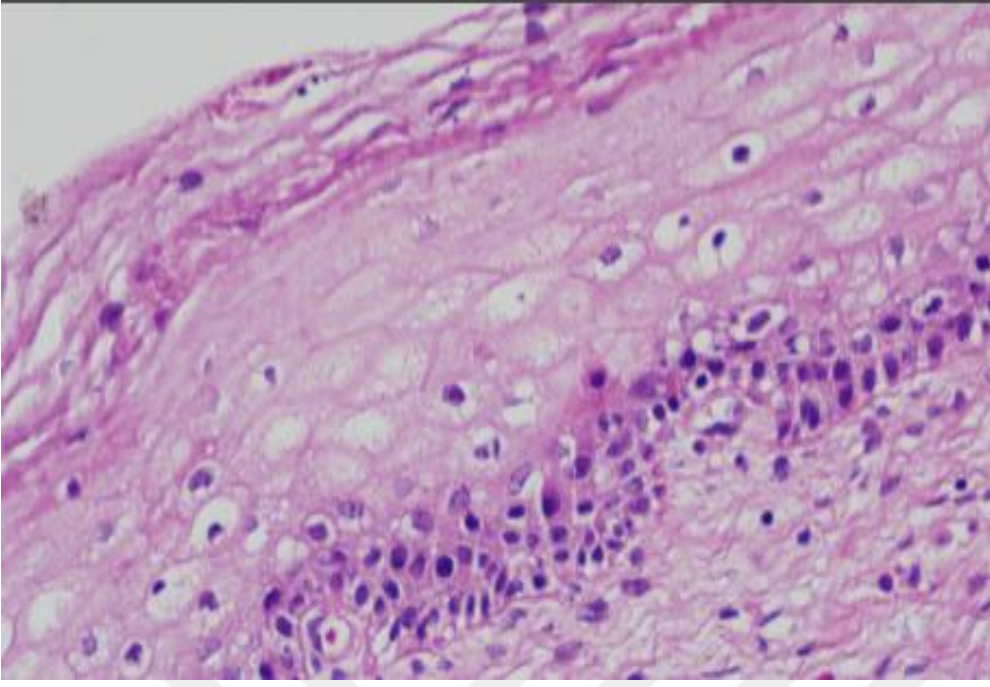
Parafine gömülüp kesiti alınan ve hematoxilen eozin boyası ile boyanan preparatlar ışık mikroskopunda 100X' lik büyütme ile immersiyon yağı damlatılarak incelenip fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 4.1. Reflü hastalığı ile uyumlu bir bulgu olan dilate vasküler yapılar



Şekil 4.2. Reflü hastalığı ile uyumlu bulgular olan bazal hücre hiperplazisi, intraepitelyal lenfositler ve polimorflar



Şekil 4.3. Kontrol grubunda normal mukoza görünümü

4.3. Biyopsi Materyallerinden Yapılmış Olan Moleküler Analizlerin Değerlendirilmesi

4.3.1. Biyopsi Materyallerinden DNA izolasyonu, Saflık ve Miktar ölçümü

Bu çalışmayı gerçekleştirmek için gruplarımızı oluşturan 50 bireyden endoskopik işlem sırasında distal özofagustan alınan biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış olup, nanodrop spektrofotometre ile her örneğin DNA miktarları ölçülmüştür ve DNA miktarları 22,3 ng/µl ile 800 ng/µl aralığında bulunmuştur. 260/280 nm'deki absorbans değerleri, saflığı ise 1,59 ile 2,13 arasında saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Endoskopik yöntemle alınan biyopsi materyallerinden izole edilen DNA'ların miktar ve 260/280 nm'de ki saflık oranları

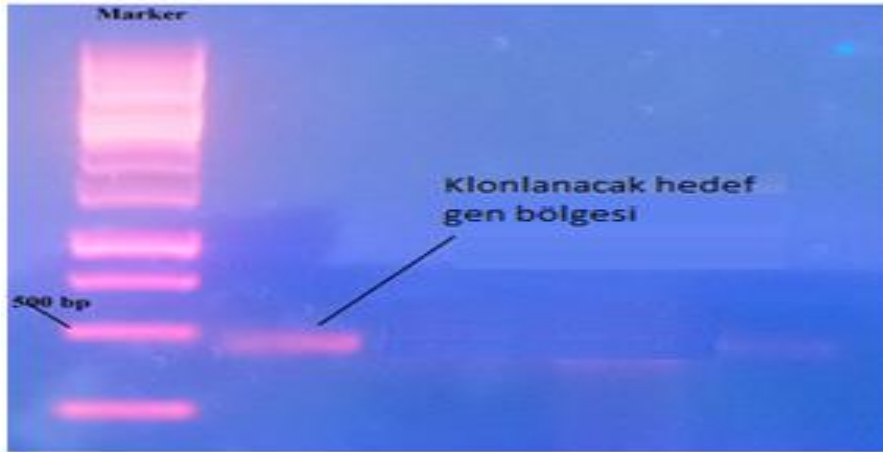
DNA Miktar (ng/μl)	Saflık (260/280 nm)
54,85	1,73
56,8	1,68
46,7	1,97
58	2,06
213,1	2,08
47,9	1,72
85,5	2,02
43,2	2,07
97,6	2,05
87,9	1,59
30,5	1,63
42,6	1,87
65,2	1,67
71,5	1,79
46,7	2,12
29,6	2,02
83,4	1,88
34,4	1,82
22,3	1,89
67,8	1,93
55,6	2,06
28,6	1,96
95,8	2,05
38,2	1,73
51,5	2,09
59,3	2,04
62,1	1,99
97,6	2,07
69,7	2,05
52,4	1,63
44,6	2,04
81,1	1,65
45,9	1,69
73,6	1,74
79,2	1,76
65,6	1,63
27,8	2,07
87,8	2,04
58,2	2,1
63,5	1,84
87,8	2,09

89,2	2,09
54,5	2,07
30,7	1,97
72,2	2,13
63,8	1,93
94,9	2,08
800,2	2,05
91,4	2,02
34,2	1,93

4.4. Total Bakteri Sayımı İçin Yapılan Moleküler Çalışmaların Değerlendirilmesi

4.4.1. Klonlanacak Hedef Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Agaroz Jelde Görüntülenmesi

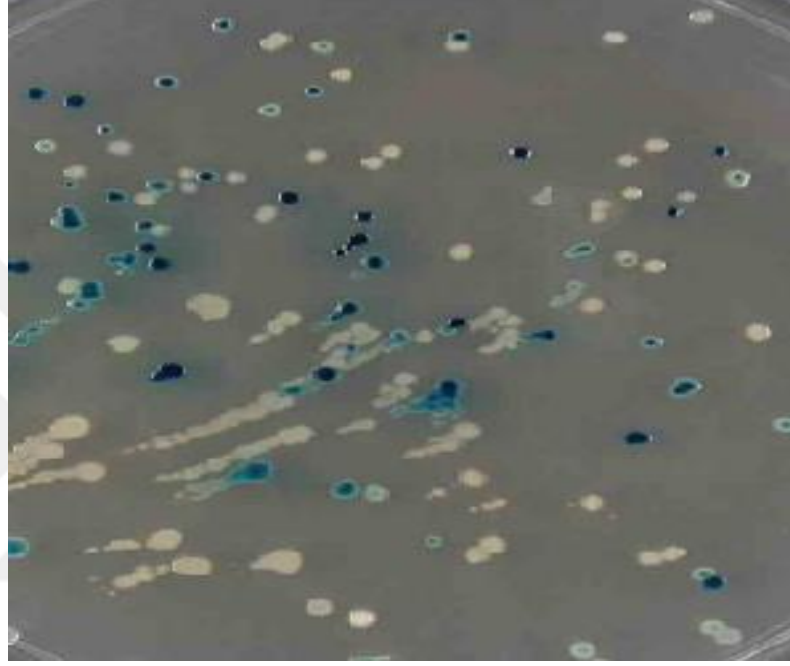
Klonlama öncesinde çoğaltılacak 466 bç' lik korunmuş tüm bakterilerde ortak olan hedef gen bölgesi rastgele alınmış bir biyopsi örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır ve konvansiyel PCR ile universal primeler kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu gen bölgesi DNA markerları ile birlikte agaroz jel elektroforezine yüklenerek UV altında görüntülenmiştir.



Şekil 4.4. Rastgele bir biyopsi materyalinden izole edilen DNA' nın bakteriyel universal primerler ile amplifikasyonu sonucu oluşan 466 bç'lik hedef gen bölgesi. Roche DNA Molecular Weight Marker XVI Moleküler ağırlık standartı (250 bç-3000 bç)(Cat. no 1855 638).

4.4.2. Ligasyon ve Transformasyon sonuçları

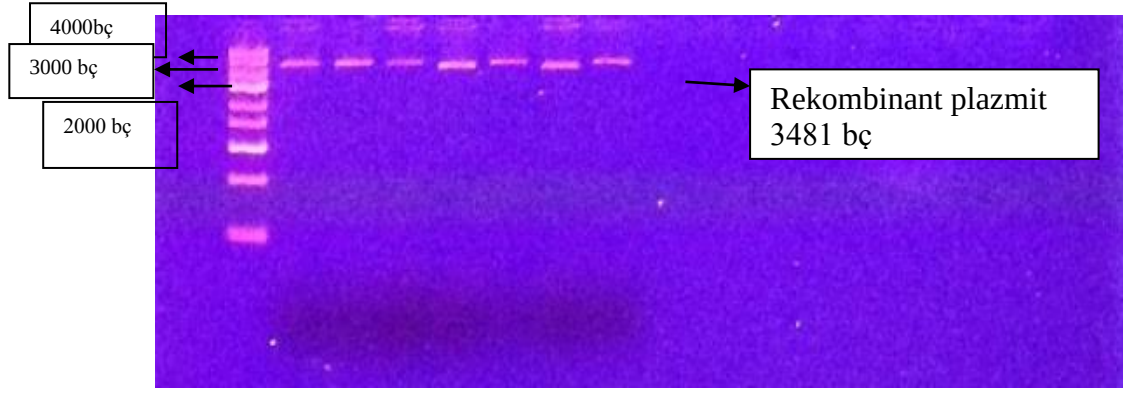
PCR ürününü alan vektörlerde lac Z geni inaktive edildiği için laktoz negatif beyaz koloniler oluşmuştur. PCR ürününü almayan vektörler de ligasyonla tekrar birleşerek laktoz pozitif mavi koloniler meydana gelmiştir. Transformasyon sonrası elde edilen koloni görüntüleri Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. LB Agarda mavi beyaz kolonilerin görünüşü

4.4.3. Rekombinant Plazmitin İzolasyonu ve Plazmitin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

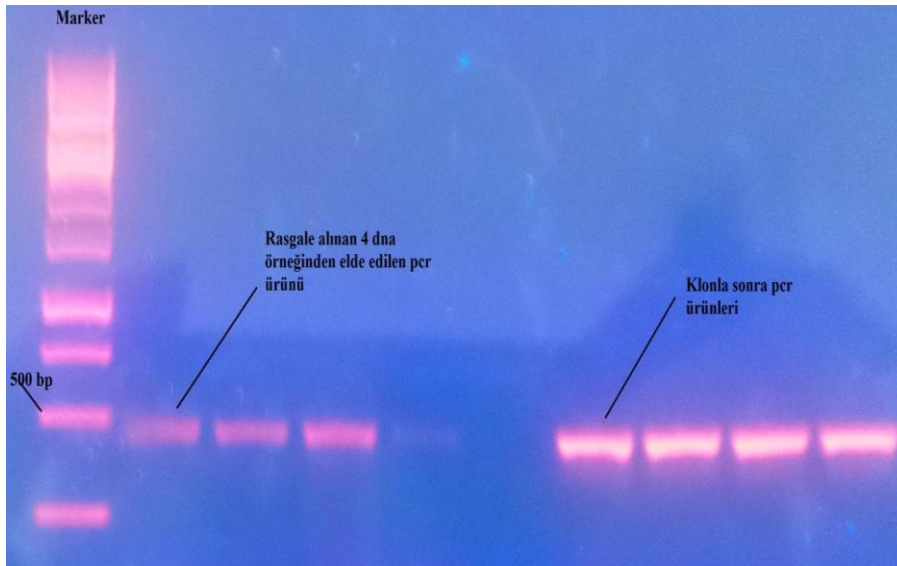
LB Agarda insert hedef gen bölgesini içerdiğini düşündüğümüz beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmit izolasyonunu doğrulamak için izolasyon sonrasında, rekombinant plazmit PCR işlemine tabi tutulup PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.



Şekil 4.6. Kompenent hücreden plazmid DNA izolasyonu sonucu elde edilen plazmit DNA'ların agaroz jel görüntüsü. Helix ruler™ 1kb + (I) DNA Ladder 0,5 ml (100 ng/μl).

4.4.4. Klonlama Sonrasında Amplifiye Edilen Gen Bölgesinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Klonlama sonrasında elde edilen plazmitler ve kontrol amacı ile tekrar rastgele seçilmiş biyopsilerin DNA' larından universal primerler kullanılarak yapılan konvansiyonel PCR ürünleri ile agaroz jel elektrofrezinde yürütülerek doğru gen bölgesinin klonlanıp klonlanmadığı kontrol edilmiştir.



Şekil 4.7. Klonlamanın ardından plazmit DNA ve yine kontrol amacı ile rastgele seçilmiş total DNA örneklerinin bakteriyel universal primerler ile amplifikasyonu sonucu oluşan hedef gen ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. Roche DNA Molecular Weight Marker XVI Moleküler ağırlık standartı (250 bç-3000 bç)(Cat. no 1855 638).

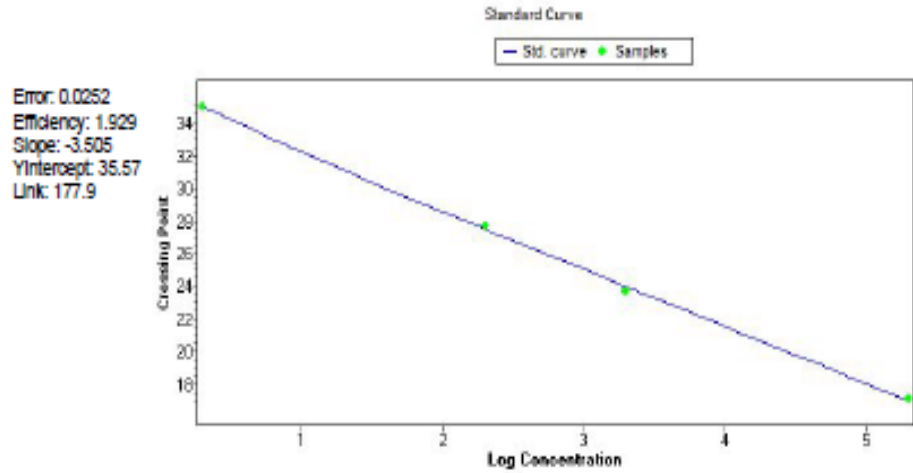
4.5. Total Bakteri Sayısının Hesaplanması İçin Real Time PCR ile Standart Eğrinin Oluşturulması

Plazmit izolasyonu sonrasında rekombinant plazmitin miktarı nanodrop spektrofotometre ölçülmüş olup 31,5 ng çıkmıştır. Bu miktar real time PCR işleminde standart eğri oluşturmak için uygulanan aşağıda belirtilmiş olan formülde yerine konarak gen kopya sayısı bulunmuştur.

$$\text{Kopya sayısı} = \frac{31.5 \text{ ng} \times 10^{-9} \text{ g} \times 6.02 \times 10^{23}}{660(\text{çift iplikli DNA}) \times (466 \text{ bp hedef gen} + 3015 \text{ vektör})}$$

$$= 8,27 \times 10^9 \text{ gen kopya sayısı bulunmuştur.}$$

Yapılan seyreltmelerin ardından 5 konsantrasyon alınarak yapılan Real time PCR' ın sonucunda elde edilen standart eğri grafiği aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.8. Hesaplanan hedef gen kopya sayısı seri dilüsyonlar yapılarak seyreltilmiştir. Seçilen 5 farklı konsantrasyon ile Real time PCR yapılarak elde edilen Standart Eğri Grafiği

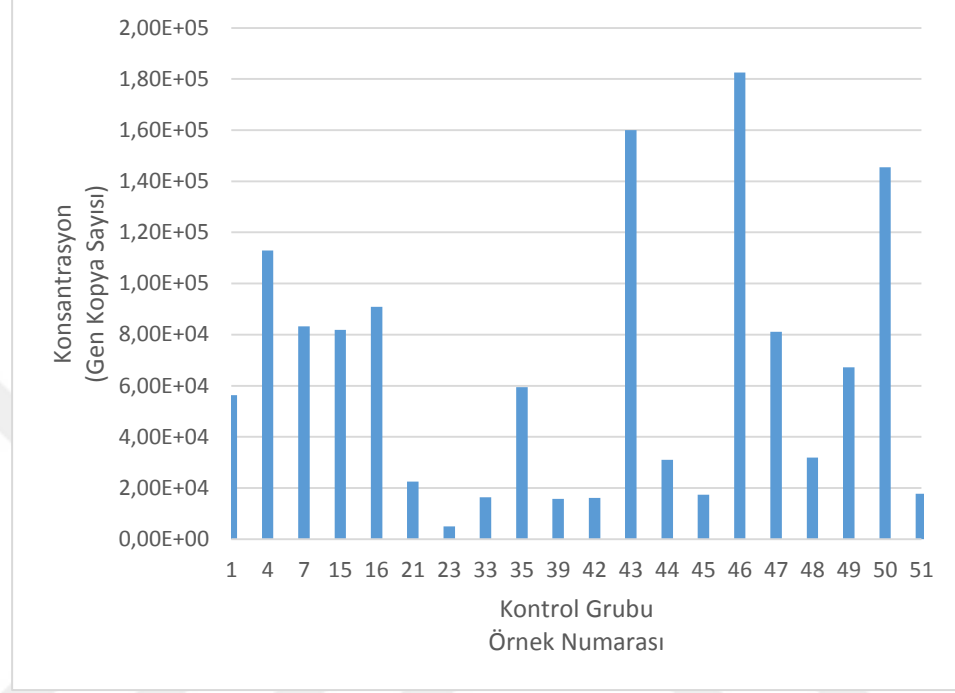
Çizelge 4.6. Reflü hastaları ve Kontrol grubunda yapılan Real Time PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri ile standart eğri karşılaştırılarak herbir örnek için bakteriyel yük saptanmıştır.

Kontrol Grubu Örnek Numarası	CT	Konsantrasyon (Gen Kopya Sayısı)
1	24,92	5,63E+04
4	23,76	1,13E+05
7	24,54	8,32E+04
15	24,30	8,19E+04
16	24,04	9,09E+04
21	26,42	2,25E+04
23	29,02	4,96E+03
33	26,92	1,64E+04
35	24,84	5,94E+04
39	26,98	1,57E+04
42	27,26	1,61E+04
43	23,35	1,60E+05
44	25,92	3,11E+04
45	26,94	1,73E+04
46	23,36	1,83E+05
47	24,38	8,11E+04
48	25,85	3,19E+04
49	24,65	6,72E+04
50	23,21	1,45E+05
51	27,07	1,77E+04

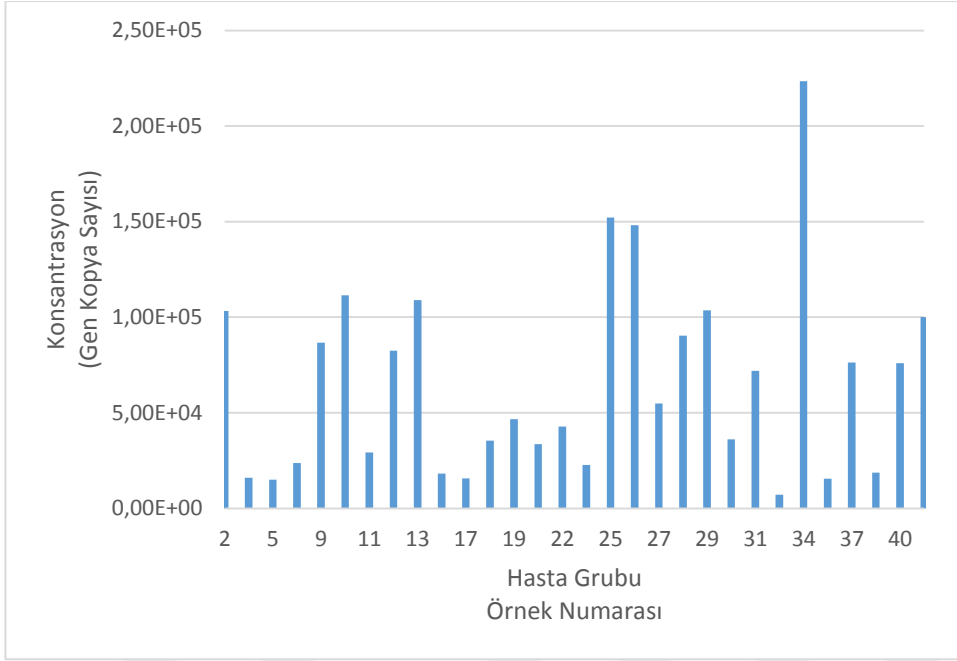
Hasta Grubu Örnek Numarası	CT	Konsantrasyon (Gen Kopya Sayısı)
2	23,83	1,03E+05
3	27,01	1,60E+04
5	23,76	1,49E+04
6	27,05	2,37E+04
9	26,94	8,66E+04
10	23,79	1,11E+05
11	26,17	2,92E+04
12	24,39	8,25E+04
13	23,93	1,09E+05
14	26,78	1,83E+04
17	27,09	1,56E+04
18	25,70	3,54E+04
19	25,26	4,67E+04
20	25,80	3,36E+04
22	25,48	4,29E+04
24	26,41	2,26E+04
25	23,11	1,52E+05
26	23,18	1,48E+05
27	25,05	5,49E+04
28	24,14	9,03E+04
29	23,91	1,04E+05
30	25,65	3,61E+04
31	24,52	7,19E+04
32	28,42	7,14E+03
34	22,54	2,24E+05
36	27,26	1,55E+04
37	24,42	7,63E+04
38	26,87	1,86E+04
40	24,45	7,59E+04
41	23,97	1,00E+05

4.5.1. Klonlanmış Gen Kopya Sayılarının Değerlendirilmesi

Klonlama sonrasında bakılan hedef gen kopya miktarları yaklaşık olarak gastroözofajiyal reflü hastalarında 10^4 - 10^5 gen kopya sayısı ve kontrol gruplarında 10^4 - 10^5 gen kopya sayısı olarak saptanmıştır.



Şekil 4.9. Kontrol grubundaki bakteriyel yükü gösteren hedef gen miktarları. Y eksenindeki $1,80E+05$ şeklindeki veri $1,8 \times 10^5$ i ifade etmektedir. X eksenindeki rakamlar kontrol grubuna verilen numaralardır.



Şekil 4.10. Reflü hastalarında bakteriyel yükü gösteren hedef gen miktarları. Y eksenindeki 2,00E+05 şeklindeki veri $2,00 \times 10^5$ i ifade etmektedir. X eksenindeki rakamlar reflü grubuna verilen numaralardır.

4.6. Seçilen Mikroorganizmaların Varlığının Değerlendirilmesi

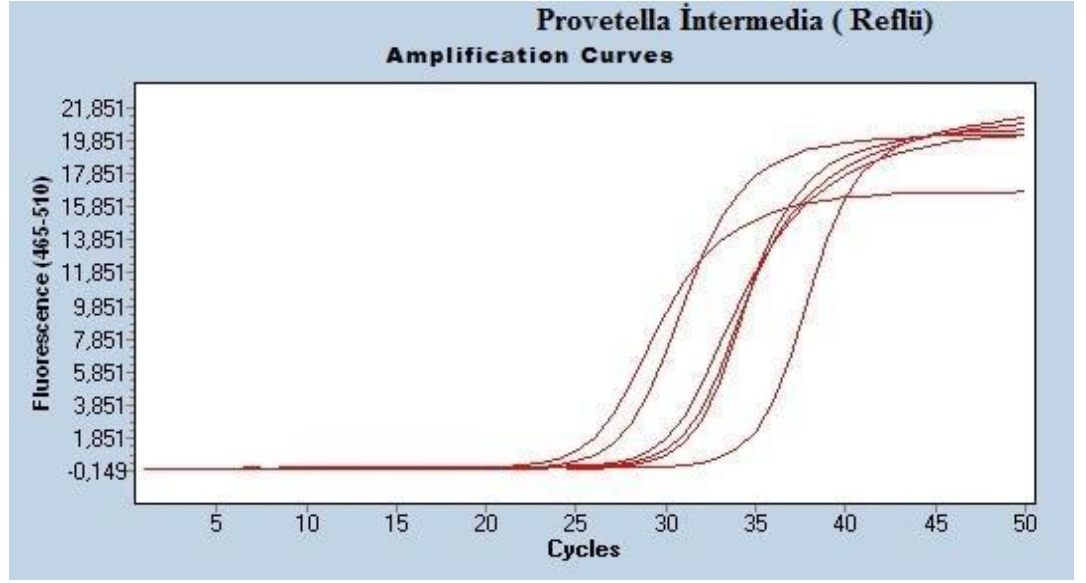
Belirlenen mikroorganizmalar türlere spesifik primerler kullanılarak Ct (Threshold Cycle) değerleri baz alınıp var ya da yok denilmiştir. Pozitif örnek her tür için bulunamadığından kullanılmamıştır.

LightCycler 480 yazılımı data analizini var yok ve kantitasyon için absolute quantitation second derivative analizi kullanılarak 640 kanalından belirlenmiş, standart eğri üzerinden her örneğin konsantrasyonu Ct değerleri ile hesaplanmıştır.

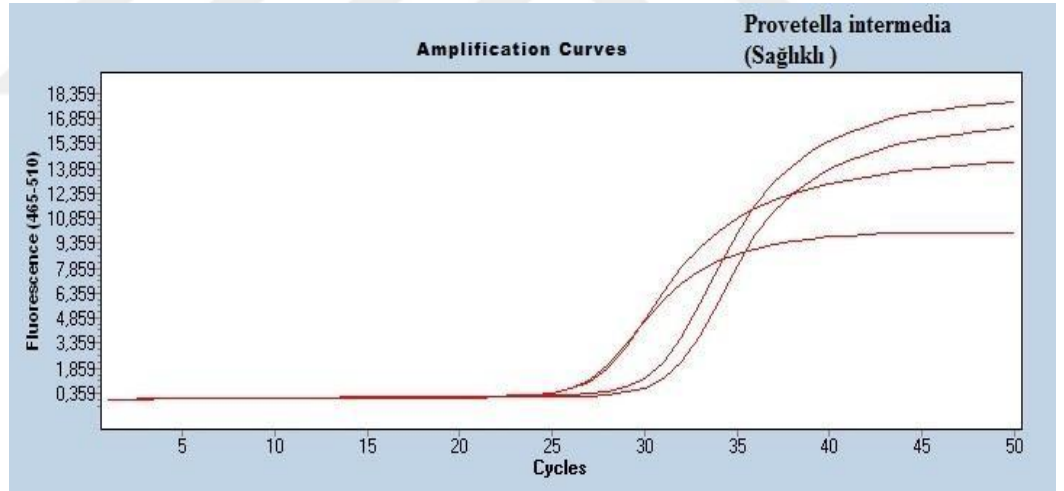
Çift iplikli DNA'ya bağlanan özgül olmayan bir yöntem olan SYBR Green 1 boyası tekniği kullanıldığından Ct değerleri tüm mikroorganizmalar için 35. döngüden sonra kabul edilmemiştir. Türlerle özgü çıkan Ct değerleri reflü hastalarında ve kontrol grubunda Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8' de özetlenmiştir. *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* türlerine biyopsi örneklerinde hiç rastlanmadığından herhangi bir Ct değeri oluşmamıştır. Diğer türler için ise Ct değerlerine bakılarak var ya da yok denilmiştir.

Çizelge 4.8. Kontrol Grubunda Yapılan Real Time PCR İşlemi Sonucunda Her Organizmaya ait Ct Analizlerinin Değerleri

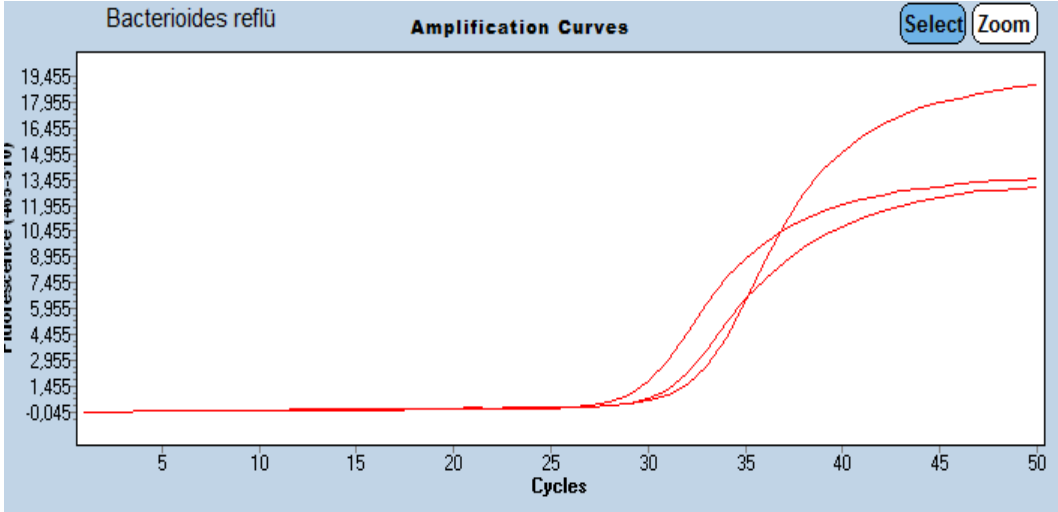
asta	<i>Provetella İntermedia</i>	<i>Streptococcus Pyogenes</i>	<i>Veillonella Parvula</i>	<i>Fusobacterium Nucleatum</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Bacterodes fragilis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
1	-	32	-	-	30	-	-	-	-
2	-	-	34	-	-	-	-	-	-
3	-	29	-	-	-	32	-	-	-
4	31	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	29	-	-	-	34	-	-
6	-	-	-	26	-	-	-	-	-
7	-	27	-	-	28	-	-	-	-
8	-	34	-	-	-	30	-	-	-
9	27	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	31	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	29	-	-	-	-
12	-	-	34	-	-	-	-	-	-
13	-	30	-	28	-	30	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	30	27	30	-	-	-	-	-	-
16	-	-	26	31	33	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	29	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	30	-	29	-	-	-	-	-
20	34	30	-	-	-	-	-	-	-



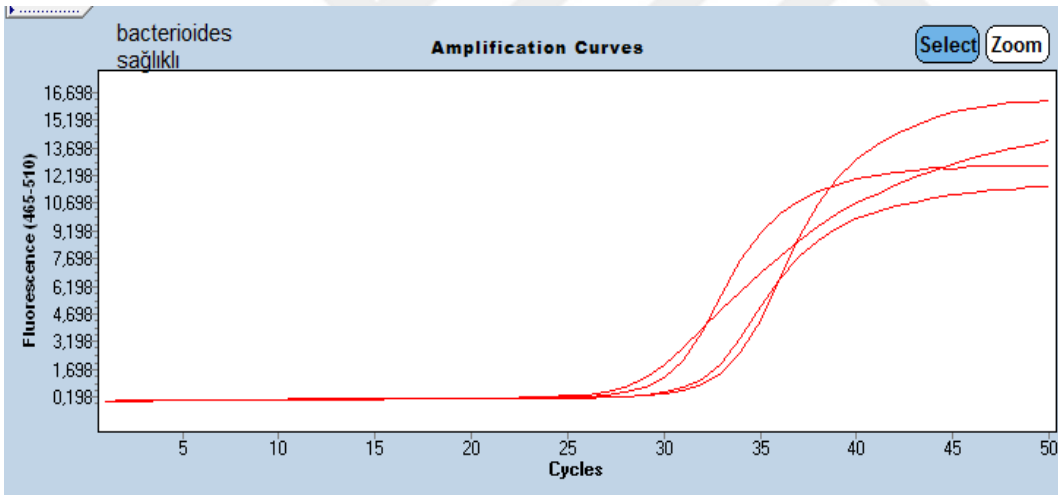
Şekil 4.11 Pozitif çıkan reflü hastalarındaki *Provetella intermedia* amplifikasyon Eğrileri. SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA' ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



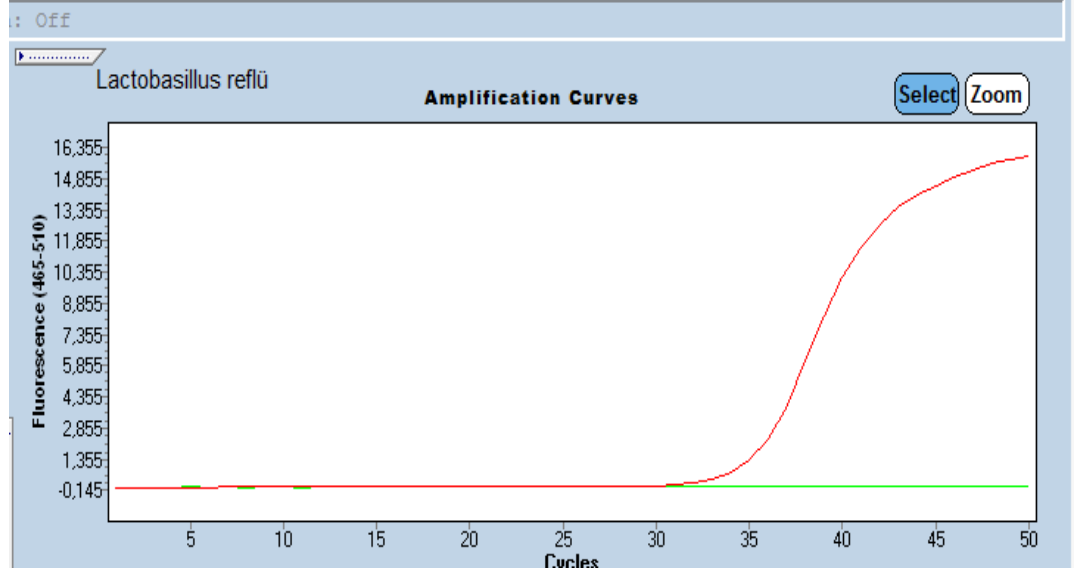
Şekil 4.12. Pozitif çıkan sağlıklı bireylerdeki *Provetella intermedia* Amplifikasyon Eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA' ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



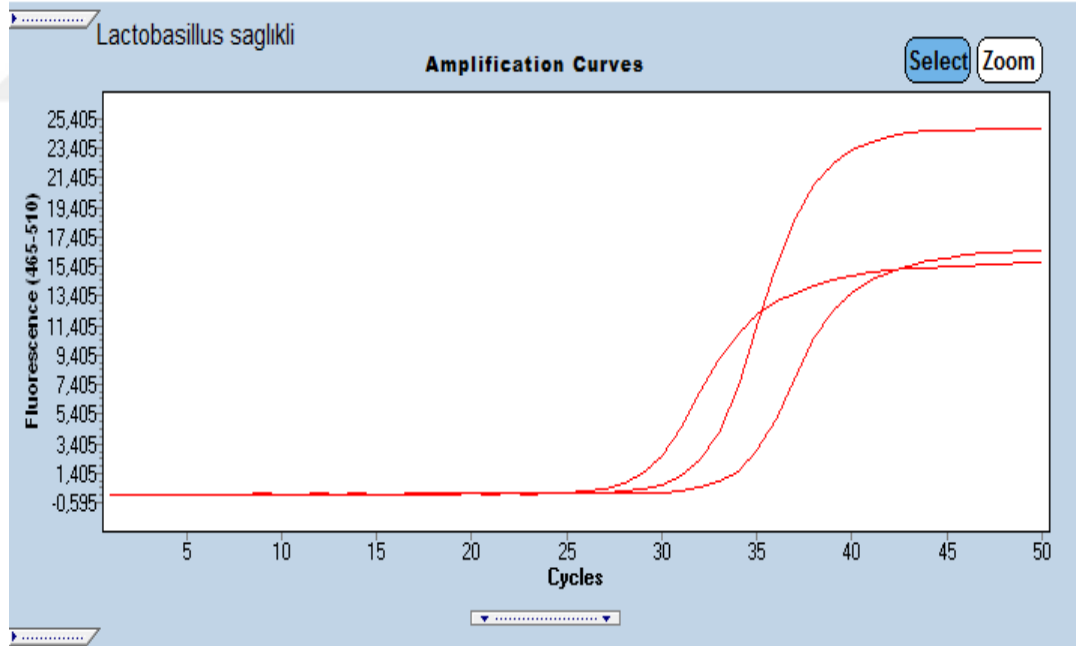
Şekil 4.13. Pozitif çıkan reflü hastalarındaki *Bacteroides fragilis* amplikasyon eğrileri
Amplifikasyon Eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA ‘ ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



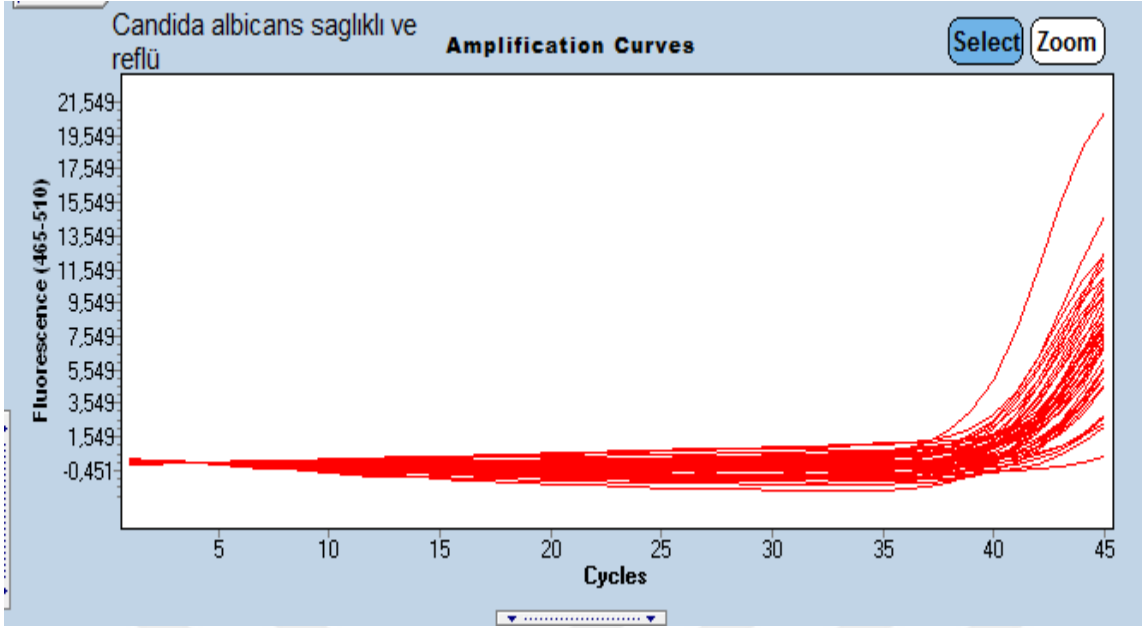
Şekil 4.14. Pozitif çıkan sağlıklı bireylerdeki *Bacteroides fragilis* amplikasyon eğrileri
Amplifikasyon Eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA’ ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



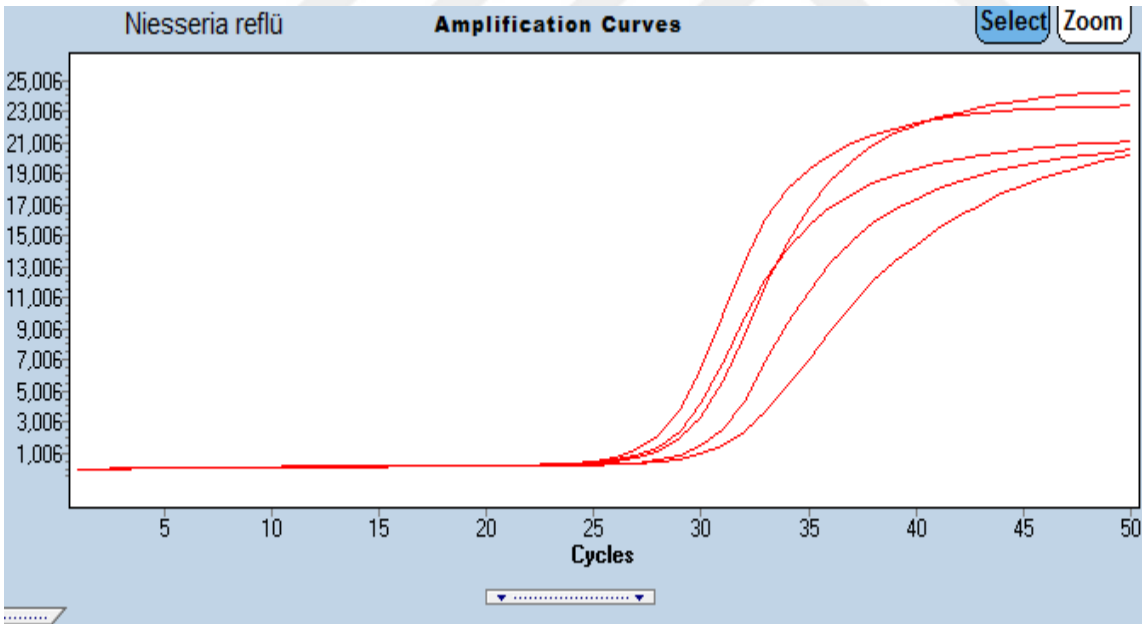
Şekil 4.15. Pozitif çıkan reflü hastalarında *Lactobacillus acidophilus* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA' ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



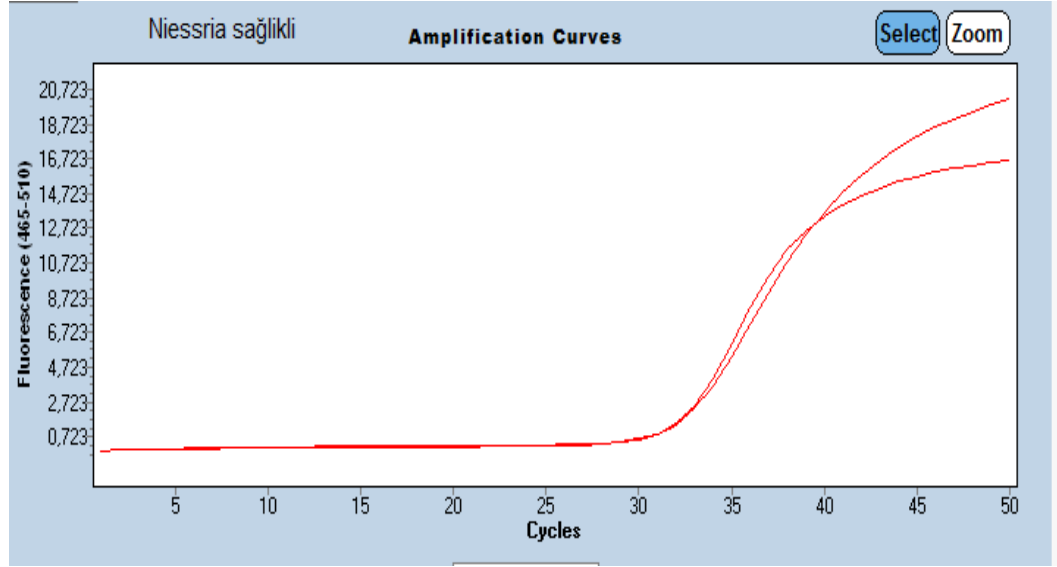
Şekil 4.16. Pozitif çıkan sağlıklı bireylerdeki *Lactobacillus acidophilus* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA' ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



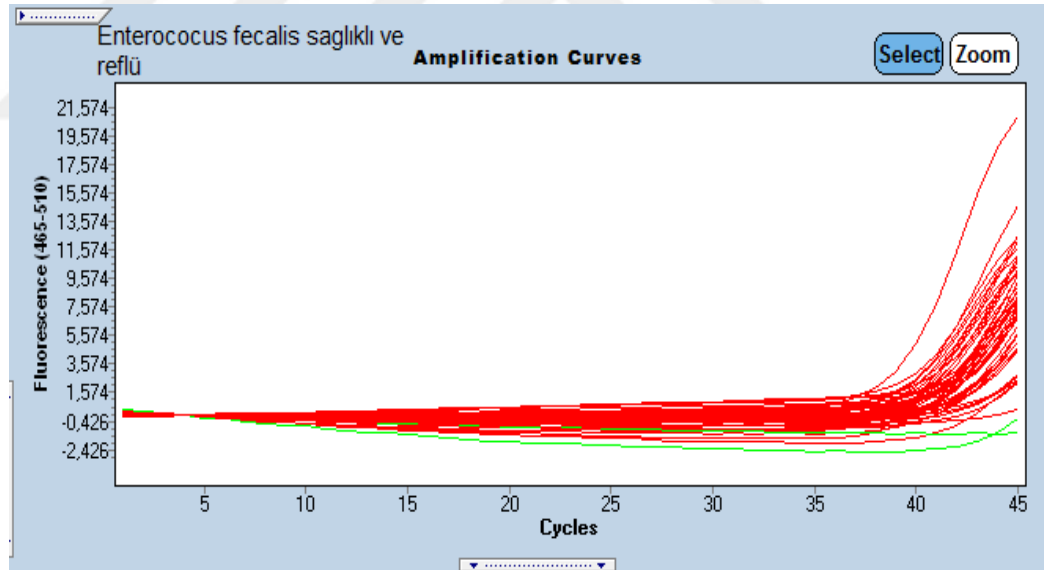
Şekil 4.17. Reflü hastalarında ve sağlıklı bireylerde *Candida albicans* amplikasyon eğrileri. SYBR Green 1 boyası kullanıldığı için 35. döngüden sonra oluşan pikler geçersiz kabul edilmiştir.



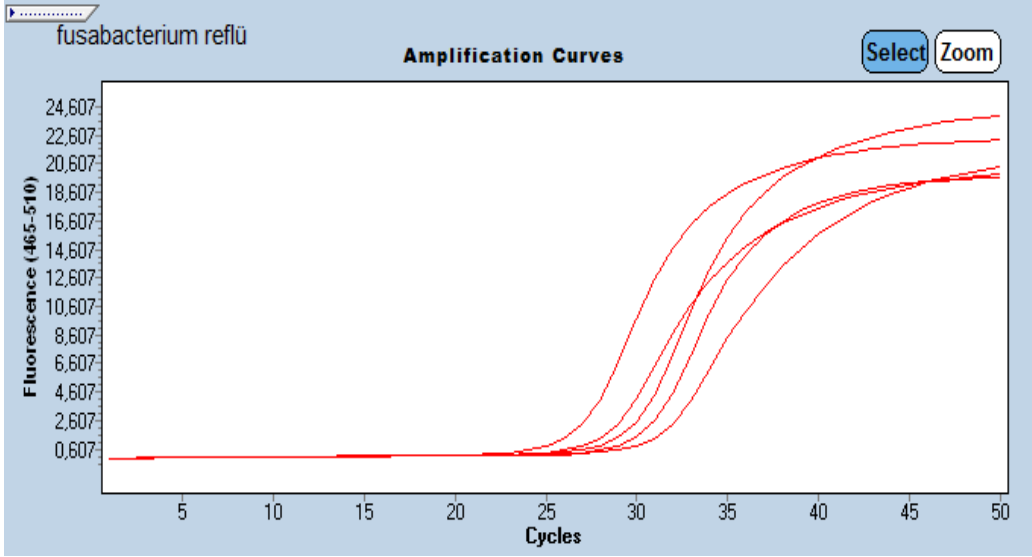
Şekil 4.18. Pozitif çıkan reflü hastalarındaki *Neisseria meningitidis* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



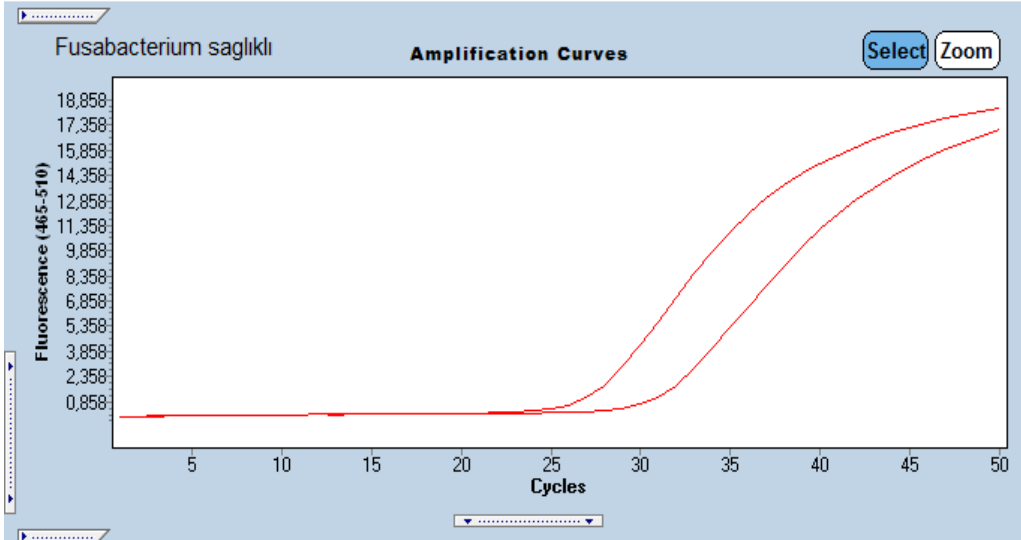
Şekil 4.19. Pozitif çıkan sağlıklı bireylerdeki *Neisseria meningitidis* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. dōngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları gōstermektedir.



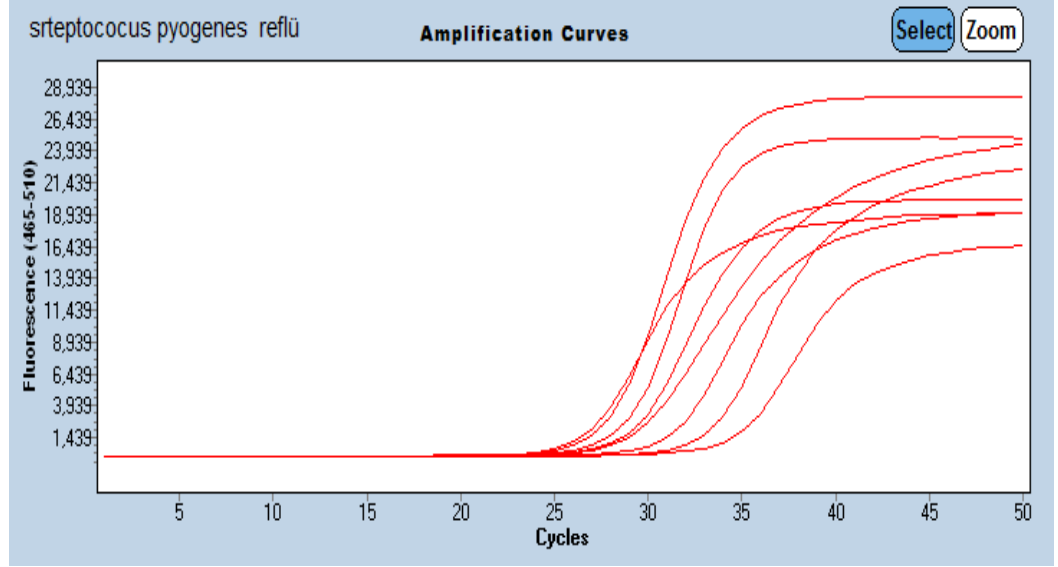
Şekil 4.20. Reflü hastalarında ve sağlıklı bireylerde *Enterococcus faecalis* amplikasyon SYBR Green 1 boyası kullanıldığı için 35 dōngüden sonra oluşan pikler geçersiz kabul edilmiştir.



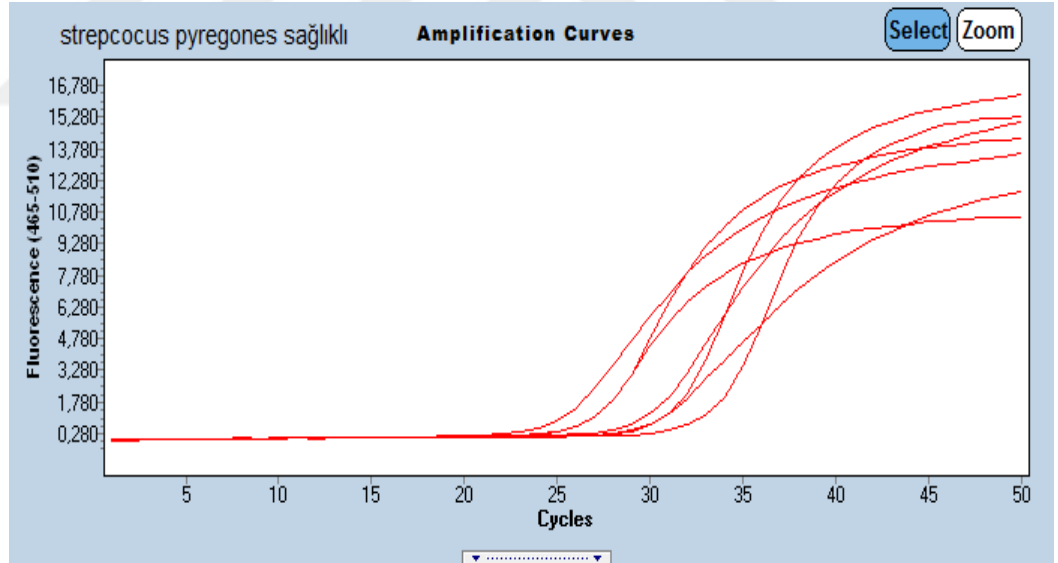
Şekil 4.21. Pozitif çıkan reflü hastalarındaki *Fusobacterium nucleatum* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



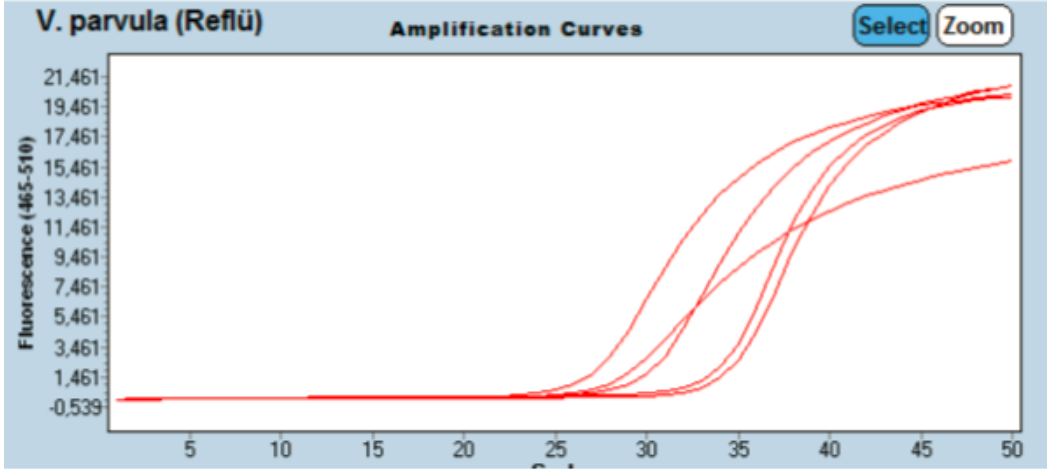
Şekil 4.22. Pozitif çıkan sağlıklı bireylerdeki *Fusobacterium nucleatum* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



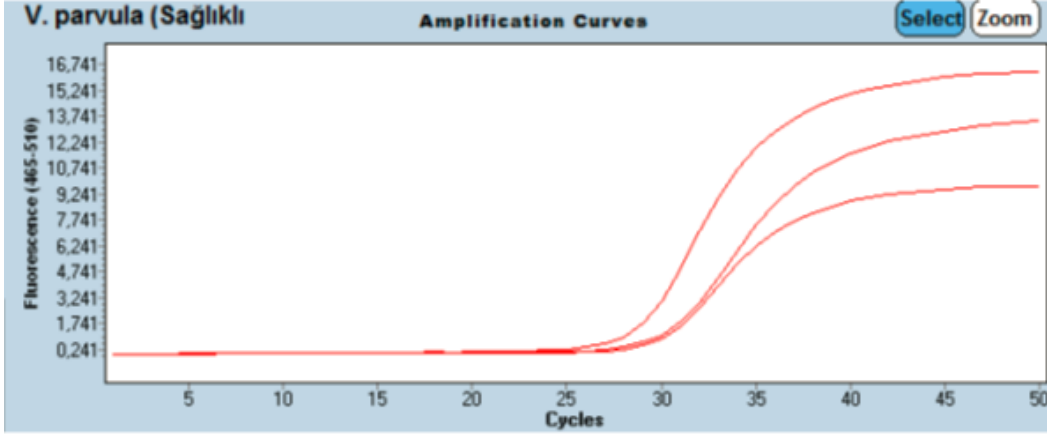
Şekil 4.23. Pozitif çıkan reflü hastalarındaki *Streptococcus pyogenes* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



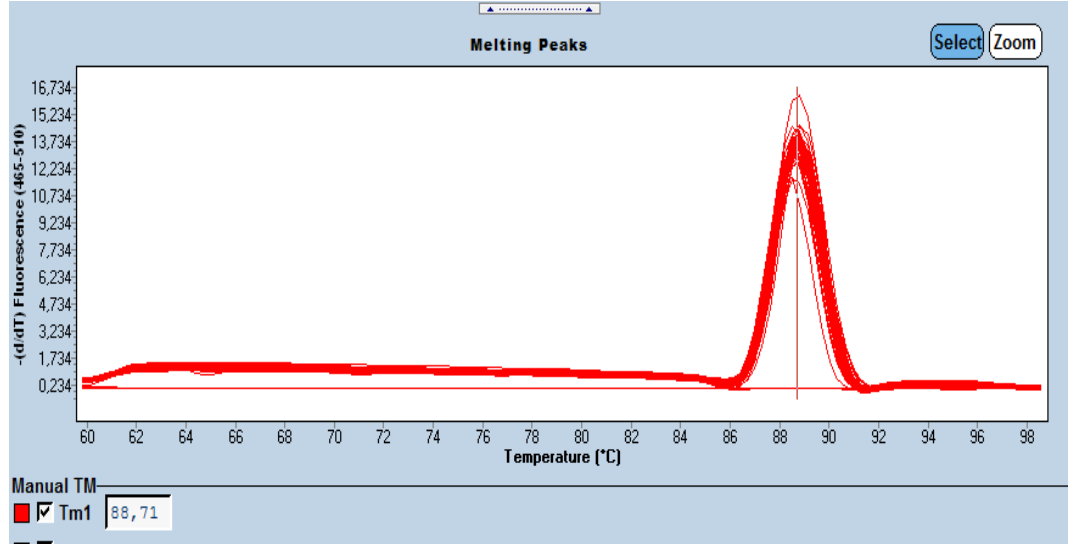
Şekil 4.24. Pozitif çıkan sağlıklı bireylerdeki *Streptococcus pyogenes* amplikasyon eğrileri SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



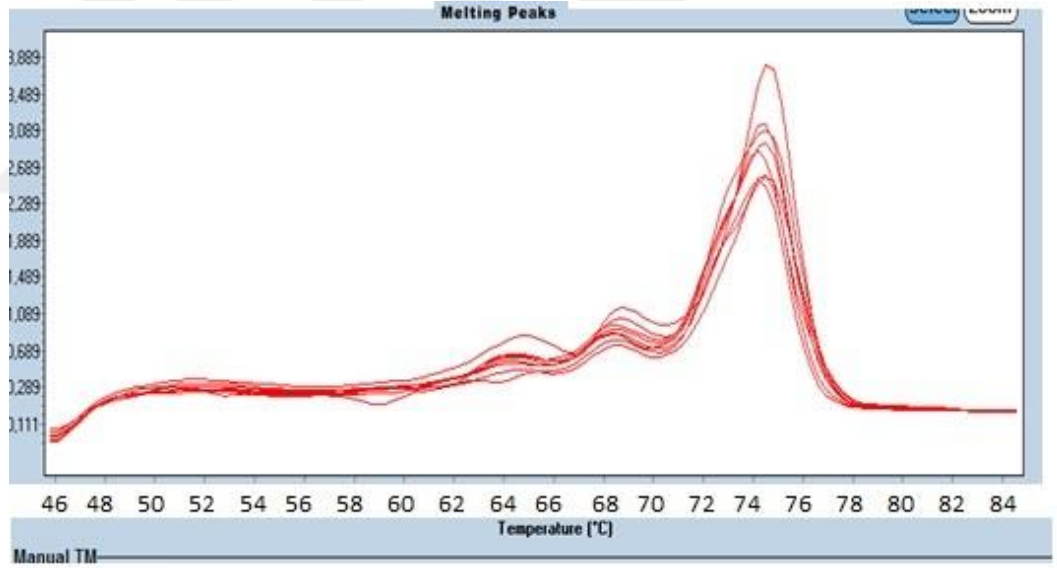
Şekil 4.25. Pozitif çıkan reflü hastalarındaki *Veilonella parvula* amplikasyon eğrileri. SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



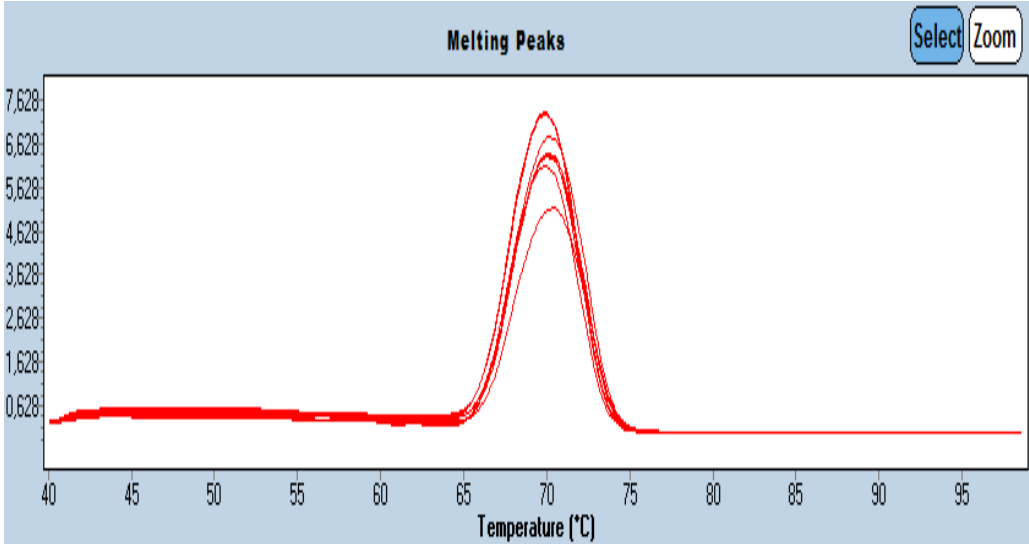
Şekil 4.26. Pozitif çıkan sağlıklı bireylerdeki *Veilonella parvula* amplikasyon eğrileri. SYBR Green 1 boyası kullanılarak yapılan analizde boyanın çift iplikli DNA'ya bağlanmasıyla birlikte 25. döngüden itibaren floresans yayılımı ile oluşan eğriler pozitif sonuçları göstermektedir.



Şekil 4.27. Total Bakteri Melting Curve (Erime Eğrisi) Analiz sonucu görülmektedir.



Şekil 4.28. Aynı playtte analiz edilen reflü ve sağlıklı gruptaki *Streptococcus pyogenes* türü için Melting Curve (Erime Eğrisi) Analiz sonucu görülmektedir.



Şekil 4.29. Aynı playtte analiz edile reflü ve sağlıklı gruptaki *Veillonella parvula* türü için Melting Curve (Erime Eğrisi) Analiz sonucu görülmektedir.

4.7. İstatistiksel Veriler

4.7.1. Hasta ve Kontrol Grupları Arasında Klonlama ile Saptanan Gen Kopya Sayısının Karşılaştırılması

Wilcoxon Testi, Mann Whitney U Test SPSS sonuçlarına göre yapılan istatistiksel analizde hedef gen bölgesi miktarları açısından reflü hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p < 0,005$).

4.7.2. Saptanan Mikroorganizma Yüzdeleri ve Karşılaştırmalı Demografik Veri Analizleri

Çalışmaya dahil edilen 30 reflü hastasında; *Provetalla intermedia* (%23), *Veillonella parvula* (%40), *Fusobacterium nucleatum* (%27), *Neisseria meningitidis* (%27), *Bacteroides fragilis* (%6), *Lactobacillus acidophilus* (%3), *Streptococcus pyogenes* (%30) oranlarında bulunmuştur.

20 kontrol grubunda ise; *Provetalla intermedia* (%20), *Veillonella parvula* (%15), *Fusobacterium nucleatum* (%10), *Neisseria meningitidis* (%10), *Bacteroides fragilis* (%20), *Lactobacillus acidophilus* (%15), *Streptococcus*

pyogenes (%35) oranlarında saptanmıştır. *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* türlerine her iki grupta da rastlanmamıştır.

Çizelge 4.9. Reflü ve Kontrol Gruplarında Saptanan Mikroorganizmalar ile Vücut Kitle İndeksi (VKİ) Arasındaki İlişki ($p < 0,005$ 'in altında olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir).

REFLÜ	VKİ=24.1-34	VKİ<24	P
<i>Helicobacter_pylori</i>	7 (%58,3)	5 (%41,7)	0,003
<i>Streptococcus_pyogenes</i>	9 (%100)	0 (%)	0,109
<i>Veillonella_parvula</i>	4 (%44,4)	5 (%55,6)	0,001
<i>Enterococcus_faecalis</i>	0 (%)	0 (%)	
<i>Fusobacterium_nucleatum</i>	3 (%37,5)	5 (%62,5)	0,001
<i>Neisseria_meningitidis</i>	3 (%37,5)	5 (%62,5)	0,001
<i>Candida_albicans</i>	0 (%)	0 (%)	
<i>Bacterioides_fragilis</i>	0 (%)	1 (%100)	0,023
<i>Lactobacillus_acidophilus</i>	0 (%)	1 (%100)	0,023
<i>Prevotella_intermedia</i>	6 (%85,7)	1 (%14,3)	0,847
KONTROL	VKİ=24.1-34	VKİ<24	P
<i>Helicobacter_pylori</i>	0 (%)	4 (%100)	0,143
<i>Streptococcus_pyogenes</i>	0 (%)	7 (%100)	0,032
<i>Veillonella_parvula</i>	0 (%)	3 (%100)	0,219
<i>Enterococcus_faecalis</i>	0 (%)	0 (%)	
<i>Fusobacterium_nucleatum</i>	0 (%)	2 (%100)	0,329
<i>Neisseria_meningitidis</i>	0 (%)	2 (%100)	0,329
<i>Candida_albicans</i>	0 (%)	0 (%)	
<i>Bacterioides_fragilis</i>	0 (%)	4 (%100)	0,143
<i>Lactobacillus_acidophilus</i>	0 (%)	3 (%100)	0,219
<i>Prevotella_intermedia</i>	2 (%50)	2 (%50)	0,329

Çizelge 4.10. Reflü ve Kontrol Gruplarında Saptanan Mikroorganizmalar ile Sigara ve Alkol Kullanımı Arasındaki İlişki ($p < 0,005$ 'in altında olan değerler İstatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir).

Reflü	Sigara kullanan	Sigara kullanmayan	<i>P</i>	Alkol kullanan	Alkol kullanmayan	<i>P</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	12 (%100)	0 (%0)	0,003	12 (%100)	0 (%0)	0,001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	9 (%100)	0 (%0)	0,019	9 (%100)	0 (%0)	0,006
<i>Veillonella parvula</i>	9 (%100)	0 (%0)	0,019	9 (%100)	0 (%0)	0,006
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	0 (%0)		0 (%0)	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,031	8 (%100)	0 (%0)	0,012
<i>Neisseria meningitidis</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,031	8 (%100)	0 (%0)	0,012
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	0 (%0)		0 (%0)	0 (%0)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,338	2 (%100)	0 (%0)	0,265
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 (%100)	0 (%0)	0,506	1 (%100)	0 (%0)	0,439
<i>Prevotella intermedia</i>	5 (%71,4)	2 (%28,6)	0,925	5 (%71,4)	2 (%28,6)	0,612

Kontrol	Sigara kullanan	Sigara kullanmayan	P	Alkol kullanan	Alkol kullanmayan	P
<i>Helicobacter pylori</i>	4 (%100)	0 (%0)	0,006	2 (%50)	2 (%50)	0,007
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0 (%0)	7 (%100)	0,058	0 (%0)	7 (%100)	0,274
<i>Veillonella parvula</i>	4 (%100)	0 (%0)	0,006	0 (%0)	3 (%100)	0,531
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	0 (%0)		0 (%0)	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,010	2 (%50)	2 (%50)	0,007
<i>Neisseria meningitidis</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,010	2 (%50)	2 (%50)	0,007
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	0 (%0)		0 (%0)	0 (%0)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	4 (%100)	0 (%0)	0,006	2 (%50)	2 (%50)	0,003
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4 (%100)	0 (%0)	0,006	2 (%66,7)	1 (%33,3)	0,012
<i>Prevotella intermedia</i>	1 (%25)	3 (%75)	1	1 (%25)	3 (%75)	0,264

Çizelge 4.11. Reflü ve Kontrol Gruplarında Safra Kesesi Ameliyatı olanlar/olmayanlar ile araştırılan mikroorganizmalar arasındaki ilişki ($p < 0,005$ 'in altında olan değerler İstatistiksel olarak anlamlı).

Reflü	Safra kesesi ameliyatı olan	Safra kesesi ameliyatı olmayan	P
<i>Helicobacter pylori</i>	9 (%75)	3 (%25)	0,001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4 (%44,4)	5 (%55,6)	0,258
<i>Veillonella parvula</i>	9 (%100)	0 (%0)	0,001
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,001
<i>Neisseria meningitidis</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,001
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,025
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 (%100)	0 (%0)	0,120
<i>Prevotella intermedia</i>	2 (%28,6)	5 (%71,4)	0,925

Kontrol	Safra kesesi ameliyatı olan	Safra kesesi ameliyatı olmayan	P
<i>Helicobacter pylori</i>	1 (%33,3)	2 (%66,7)	0,335
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0 (%0)	7 (%100)	0,168
<i>Veillonella parvula</i>	1 (%33,3)	2 (%66,7)	0,335
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,001
<i>Neisseria meningitidis</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,001
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	3 (%75)	1 (%25)	0,001
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 (%33,3)	2 (%66,7)	0,335
<i>Prevotella intermedia</i>	1 (%25)	3 (%75)	0,531

Çizelge 4.12. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Proton Pompa İnhibitörü Kullanımı Arasındaki İlişki ($p<0,005$ 'in altında olan değerler İstatistiksel olarak anlamlı).

Reflü	PPI kullanan	PPI kullanmayan	P
<i>Helicobacter pylori</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,099
<i>Streptococcus pyogenes</i>	9 (%100)	0 (%0)	0,073
<i>Veillonella parvula</i>	9 (%100)	0 (%0)	0,073
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,099
<i>Neisseria meningitidis</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,099
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,464
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 (%100)	0 (%0)	0,611
<i>Prevotella intermedia</i>	6 (%85,7)	1 (%14,3)	0,666

Çizelge 4.13. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Uzun Süredir Ağrı Kesici Kullanımı Arasındaki İlişki ($p<0,005$ 'in altında olan değerler İstatistiksel olarak anlamlı).

Reflü	Uzun süre Ağrı kesici kullanan	Ağrı kesici kullanmayan	P
<i>Helicobacter pylori</i>	12 (%100)	0 (%0)	0,001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	9 (%100)	0 (%0)	0,002
<i>Veillonella parvula</i>	9 (%100)	0 (%0)	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,004
<i>Neisseria meningitidis</i>	8 (%100)	0 (%0)	0,004
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2 (%100)	0 (%0)	0,201
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 (%100)	0 (%0)	0,374
<i>Prevotella intermedia</i>	4 (%57,1)	3 (%42,9)	0,977

Çizelge 4.14. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile Reflü Grade A özefajit olan Hastalar Arasındaki İlişki ($p<0,005$ 'in altında olan değerler İstatistiksel olarak anlamlı).

Reflü	İnflamasyon yok	Grade A	Grade B	P
<i>Helicobacter pylori</i>	0 (%0)	2 (%100)	0 (%0)	0,343
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0 (%0)	9 (%100)	0 (%0)	0,002
<i>Veillonella parvula</i>	0 (%0)	9 (%100)	0 (%0)	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0 (%0)	8 (%100)	0 (%0)	0,004
<i>Neisseria meningitidis</i>	0 (%0)	8 (%100)	0 (%0)	0,004
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	
<i>Bacteroides fragilis</i>	0 (%0)	2 (%100)	0 (%0)	0,343
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0 (%0)	4 (%100)	0 (%0)	0,596
<i>Prevotella intermedia</i>	1 (%14,3)	4 (%57,1)	2 (%28,6)	0,877

Çizelge 4.15. Reflü ve Kontrol Gruplarında Mikroorganizmalar ile *Helicobacter pylori* pozitifliği Arasındaki İlişki ($p<0,005$ 'in altında olan değerler İstatistiksel olarak anlamlı).

Reflü	<i>Helicobacter pylori</i> pozitif	P
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7 (%77,8)	0,006
<i>Veillonella parvula</i>	9 (%100)	0,001
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (%0)	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8 (%100)	0,001
<i>Neisseria meningitidis</i>	8 (%100)	0,001
<i>Candida albicans</i>	0 (%0)	
<i>Cacterioides fragilis</i>	2 (%100)	0,073
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 (%100)	0,213
<i>Prevotella intermedia</i>	3 (%42,9)	0,860

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gastroözofajiyalreflü hastalığının 1980' den bu yana tüm dünyada görülme sıklığı artmaktadır ve bu hastalıkla ilgili uluslararası konsensuslar yapılmaktadır. İlk olarak gastroözofajiyalreflü hastalığı ile ilgili yapılan konsensus Genval seminerinde yayınlanmıştır ve 2006 yılında Montreal tanımlama olarak tekrar düzenlenmiştir. Amerika'da 1995' te yayınlanmış, 1999 ve 2005 yıllarında yeniden düzenlenmiştir. Asya pasifik bölgesinde ise 2004 yılında oluşturulmuştur (Iwakiri et al., 2016).

Gastroözofajiyalreflü hastalığında; hem semptomlar hem de özofajiyal mukozal hasar varsa eroziv gastroözofajiyal reflü hastalığı, yalnızca semptomlar varsa non eroziv reflü hastalığı olarak isimlendirilmektedir. Reflü hastalığı asit reflü ve non asit reflü (zayıf asit, alkalın) olarak ikiye ayrılmaktadır (Iwakiri et al., 2016).

Reflü hastalığında; göğüste yanma ve mide içeriğinin (asit, safra, pepsin, gıda içeriği) özofagusa hatta ağıza kadar geri gelmesi ile yutma güçlüğü gibi semptomlar olur, bunun sonucunda da özofagusta mukozal hasar erozyonlar meydana gelebilir. Bu erozyonlar özefajit, peptik darlıklar ve barret özofagusu, hatta özofajiyal adenokarsinoma neden olabilir (Uyanıkoğlu vd., 2003).

Gastroözofajiyalreflü hastalığının görülme sıklığı her geçen gün daha da artmaktadır ve dünyadaki prevalansı Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Türkiye'deki gibi %10-20 düzeylerine ulaşmıştır (Stanghellini, 1999; Bor vd., 2005). Gastroözofajiyalreflü hastalığı prevalansı son 20 yılda artış göstermiştir. Amerikalılarda reflü semptomları görülme sıklığı yaklaşık %20- 25'i bulmuştur (Moore et al., 2016).

Reflü hastalığının patofizyolojisi oldukça komplekstir ve çeşitli faktörler rol oynar. Bunlar; gastrik asit sekresyonu, anti reflü bariyerinin disfonksiyonu, mide boşalımında gecikme ve özofajiyal defans mekanizmalarında anormallikler ile ilişkilendirilmektedir. Reflü hastalığının uzun süre devam etmesi sonucunda özofagusta meydana gelen erezyonlar reflü özefajiti ve akabinde özofajiyal

adenokarsinom olma olasılığını 2 ile 40 kat arasında artırmaktadır. Bu risk Barrett özofagus hastalarında 30 ile 400 kat oranındadır (Yang et al., 2014).

Distal özofajiyal reflü bariyerinde bozulmanın olması gastroözofajiyal reflü hastalığına neden olabilmektedir. Alt özofajiyal sfinkter anormal gevşeme gösterirse mide içeriği ve gaz özofagusa çıkar ve daha uzun süre mukozaya ile temas eder. Eğer AÖS basıncı 10 mmHg' nin altında ise reflü daha sık olur, AÖS basıncı 4 mmHg' nin altına inerse serbest reflü olmaktadır (Moore et al., 2016).

İnsan mikrobiyotası, toplam insan hücresi sayısından 10 kat fazla olup yaklaşık 10^{14} bakteriyal hücreden oluşmaktadır. Konukçu ve bu mikroorganizmalar arasındaki ilişki mutualist veya patojeniktir. Çeşitli hastalıklarda mikroorganizmalar, örneğin inflamatuvar bağırsak hastalığında sülfat indirgeyen bakterilerin aşırı çoğalması hidrojen sülfid oluşumu ile bağırsak epitel hücreleri üzerine toksik etki yaratmasına neden olmaktadır (Sheehan et al., 2015).

Çölyak hastalığında da; *Proteobacteria* artarak, *Lactobacillus* sayıca azalmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* türü de çölyak hastalığının gelişiminde rol oynamaktadır (Losurdo et al., 2016).

Öte yandan gastrointestinal sistemde mutualist olan bakteriler besinlerin özellikle karbonhidratların sindirimi, vitamin sentezi, immün sistemin uyarılması ve patojen mikroorganizmalarla rekabet gibi konukçuya çok faydaları olmaktadır. Konukçuda bu bakterilere güvenli yaşama ortamı ve besin sağlamaktadır. Simbiyotik bu ilişki immün sistemi, besin antijenlerine karşı tolerejenik cevabı ve kommensal mikroorganizmalar ile inflamatuvar yanıt oluşturan potansiyel patojenleri dengede tutar (Yang et al., 2014; Alarcon et al., 2016). Bakteriyal hastalıkları iki teori açıklamaktadır. Koch' un, "Klasik Patojen Teorisi" ne göre tipik bir veya birkaç bakteriden oluşan spesifik patojenler hastalık yapabilir. Diğer teori ise; yeni bir model olan "Mikroekolojik Hastalık Teorisi" veya "Patojenik Mikrobiyal Komünite" teorisidir buna göre bireysel olmayan patojen olarak sınıflandırılan bütün komünite hastalığa sebep olabilmektedir (Yang et al., 2014).

Disbiyoziz; mikrobiyal ekosistemin anormal bir durum olarak, koruyucu ve zararlı türler arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanabilir ve disbiyoziz sonucunda temel kronik hastalıklar meydana gelebilmektedir. Yapılan son çalışmalarda distal özofagusta kompleks bir mikrobiyal kominite olduğu görülmüştür (Yang et al., 2014) .

Hastalıklara neden olan mikrobiyota değişiklikleri, çeşitli nedenlere bağlı olabirse de genel olarak çok sık ve gereksiz antibiyotik kullanımı sonucunda antibiyotiklere karşı kazanılan direnç gelişimi, yaş, genetik, stres, sistemik hastalıklar ve daha bir çok etmenden dolayı olabilmektedir (Mariat et al., 2009; Claesson et al., 2011; Flint, 2012). Doğum şeklinin, anne sütü veya hazır mama ile beslenmenin mikrobiyota üzerindeki etkileri artık bilinmektedir. Beslenme şekli özellikle mikroorganizmaların çeşitliliğinin belirlenmesinde oldukça önemlidir (Mueller et al., 2016).

Araştırmalar; obezite, Tip II diyabet, astım, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar, bazı kanser türleri, metabolik sendrom ve kardiyovasküler hastalıklar, özofagus hastalıkları ve pek çok hastalığın mikrobiyota ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Bouchi et al., 2015; Lau et al., 2015; Chakraborti, 2015; Putignani et al., 2016; Aidy et al., 2016).

Şimdiye dek yapılan mikrobiyota ile ilgili çalışmaların çoğu bağırsak mikrobiyotası bir diğer ifadeyle kolondaki mikroorganizmalar ile ilgilidir. 2000' li yılların başında moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte özofagus mikrobiyotası ile ilgili olarak, Pei ve arkadaşları 2004 yılında sağlıklı bireylerin distal özofagusundan aldıkları biyopsilerde 16 s rDNA bölgesinin hedef olarak arandığı moleküler çalışmalar ile *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ve *TM7* olmak üzere 6 filum bulmuşlardır. Dominant genusun ise *Streptococcus* olduğunu görmüşlerdir (Pei et al., 2004).

Macfarlane ve arkadaşları ise 2007 yılında Barret özofaguslu hastaların biyopsi ve aspirasyon örneklerinden kültürel yöntemler ile izole edilen izolatlar 16 rDNA' yı hedef alan moleküler analizler ile tanılanmıştır. Çalışmada

farklı *Campylobacter* türleri saptamışlardır. Özellikle *Campylobacter concisus*, *C. rectus* türlerini bulmuşlardır. Kontrol grubu hastalarında ise *Campylobacter* türüne rastlamamışlardır (Macfarlane et al., 2007).

Diğer bir çalışmada; distal özofagus mikrobiyomu Tip I ve Tip II mikrobiyom olarak iki grupta sınıflandırılmıştır. Tip I mikrobiyomda normal özofagusla ilişkili Gram (+) bakteriler saptanırken, Tip II mikrobiyomda özofagus hastalıkları ile ilişkili Gram (-) bakteriler saptanmıştır. Tip I mikrobiyomda *Streptococcus* dominant genus olarak bulunmuştur. Tip II' de ise *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Campylobacter*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Actinomyces* gibi gram negatif ve mikroaerofiller saptanmıştır. Böylelikle de; gastroözofajiyal reflü hastalığında özofajiyal mikrobiyotanın değiştiğini göstermişlerdir (Yang et al., 2009).

Özofajiyal mikrobiyomla ilgili bir başka araştırmada ise; gastroözofajiyal reflü hastalığı olan 11 ve 18 yaş arası çocuklarda distal özofagustan biyopsi alınmıştır. Aynı zamanda araştırmacılar bu hastalardan Özofajiyal String Test (ÖST) ile de mukozaya yapışmış mikroorganizmalardan örnek almışlardır. Ayrıca oral ve nazal boşluklardan da sürüntü örneği alınmıştır. Biyopsi örneklerinden total DNA izolasyonunun ardından, 16S rRNA bölgesini hedef alan primerler ile PCR yapılmıştır. Amplifikonlar için dizi analizi yapılmış ve mikrobiyom çeşitliliği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre; mukozal biyopsi ve ÖST ile alınan örneklerde; *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Porphyromonas*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Neisseria* ve *Gemella* genuslarını bulmuşlardır. Filum düzeyinde bakıldığında biyopsi ve ÖST örneklerinde; *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* ve *Proteobacteria* miktarları benzer saptanmıştır. Oral ve nazal mikrobiyotayı özofajiyal mikrobiyotadan farklı bulmuşlardır (Fillon et al., 2012).

Liu ve arkadaşları 2013 yılında, 18 hastada (6 normal özofagus, 6 reflü özofajit, 6 Barrett özofagus) gastroözofajiyal bileşkenin 1 cm üzerinden iki biyopsi örneği almışlar ve alınan biyopsi örneklerinden DNA izolasyonu yapmışlardır. İzole edilen total DNA örnekleri ve 16S rDNA gen bölgesi için spesifik universal

primerlerin kullanıldığı PCR' a tabi tutulmuş ve sonucunda elde edilen PCR ürünleri vektöre klonlanarak elde edilen yaklaşık 350 klondan 40 'ını rastgele seçilip sekanslanmıştır. Bu sonuçlara göre; araştırmacılar normal özofagusta; en baskın filumları sırasıyla *Proteobacteria* (%49), *Firmicutes* (%40), *Bacteroidetes* (%8) ve *Actinobacteria* (%3) olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar, normal özofagusta *Streptococcus* (%21), *Klebsiella* (%10), *Gemella* (%6), *Eubacterium* (%5), *Citrobacter* (%4), *Granulicatella* (%4), *Haemophilus* (%4), *Helicobacter* (%4), *Escherichia* (%4), *Bulleidia* (%3) ve *Prevotella* (%3) olmak üzere de 11 genus saptamışlardır. Reflü özefajit olan hastalarda ise saptanan 6 filum ise sırasıyla *Proteobacteria* (%43), ardından *Firmicutes* (%33), *Bacteroidetes* (%10), *Fusobacteria* (%10), *Actinobacteria* (%2) ve *TM7* (%2)'dir. Yine bu grupta saptanan genuslar *Streptococcus* (%20), *Pasteurella* (%10), *Klebsiella* (%9), *Fusobacterium* (%9), *Haemophilus* (%9), *Prevotella* (%5), *Neisseria* (%4), *Helicobacter* (%3), *Bacillus* (%3), ve *Veillonella* (%3)' dir. Barrett özofaguslu hastalarda ise; 5 baskın filum *Proteobacteria* (%20), *Firmicutes* (%55), *Bacteroidetes* (%14), *Fusobacteria* (%9), *Actinobacteria* (%2) olarak saptanmıştır. *Veillonella* (%19), *Prevotella* (%12), *Streptococcus* (%11), *Fusobacterium* (%9), *Gemella* (%4), *Helicobacter* (%4), *Neisseria* (%4), *Actinobacillus* (%4), *Lactobacillus* (%4), *Dialister* (%3) ve *Achromobacter* (%3) genuslarını tespit etmişlerdir. Sonuçta; *Veillonella*, *Neisseria* ve *Fusobacterium* genusları reflü özefajit ve barret özofagusta varken normal özofagusta görülmemiştir. *Helicobacter* genusu ise normal özofagusta, barret ve reflü özefajite göre daha yüksek sayıda bulunmuştur. Bu sonuçlara göre üç grup arasında mikrobiyal kominite farklılıkları gözlenmiştir ve özofajiyal hastalıklarla bakteriyal çeşitliliğin ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca bakteriler ve normal özofagus arasındaki ilişkinin dengede olması gerektiğini, bakteriyal biyotanın değişmesi ile homeostazinin bozulup özofajiyal hastalıkların olabileceğini belirtmişlerdir (Liu et al., 2013).

Görüldüğü gibi özofagus mikrobiyotası ile ilgili çalışmalar çok sınırlı sayıda ve çok az hasta sayısı ile yapılmıştır. Bu konuda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Biz bu çalışmada; tüm bu nedenlerden dolayı 30 hasta 20 kontrol grubuyla çalıştık. Kontrol grubumuz, reflü şikayeti olmayan ve anemi nedeniyle araştırılan üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapılan hastalardan oluşmaktadır. Çalışmanın öncelikli amacı, reflü hastalığı tanısı alan kişiler ile reflü olmayan bireyler arasında özofagus bakteriyel yük açısından fark olup olmadığını araştırmak olmuştur.

Hasta seçiminde özellikle 20 yaşından küçük ve 70 yaşından büyük bireyler değerlendirmeye alınmamıştır. Ayrıca 8 hafta içinde antibiyotik, bir hafta içinde aspirin, heparin, coumadin gibi kan sulandırıcı ilaçlar, son iki hafta içinde proton pompa inhibitörleri ve diğer asit azaltan ilaç kullanan bireyler, gastrik özofajiyal ameliyatlılar, aktif oral kavite enfeksiyonu geçiren bireyler, barret özofagus hastalığı, HBV, HCV, HIV enfeksiyonu olan bireyler, gebelik durumu, diyabetik ve obez olan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

Literatüre dayanarak (Blackett et al., 2013) her hastadan gastroözofajiyal bileşkenin yaklaşık 5 cm üzerinden olmak üzere forseps kullanarak 2 adet biyopsi örneği alınmıştır. Biyopsiler alınırken yaklaşık 2 mm civarında olmasına dikkate edilmiştir. Biyopsilerden biri formaldehit içinde patolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderilirken, diğer biyopsi materyali ise moleküler çalışmalarda kullanmak üzere gliserol içine muhafaza edilmiştir.

Patoloji sonuçları için preparatlar, gastroenteroloji preparatları inceleme konusunda tecrübeli uzman patolog tarafından değerlendirilmiştir. Mikroskopik inceleme sonrasında reflü hastalarında görülen histolojik bulgular; bazal hücre hiperplazisi, lamina propria papillaların uzaması, epitelyal hücre nekrozu, artmış intraepitelyal inflamasyon (eozinofil, PNL, lenfosit), dilate kapiller, balon hücreler, akantoliz, erozyon ve ülserasyondür (Bkz. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Tüm bu bulgular gastroözofajiyal reflü hastalığı ile uyumlu bulgulardır. Kontrol grubunda ise normal özofagus mukozası gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.3).

Çalışmamızın öncelikli amacı gastroözofajiyal reflü hastaları ve kontrol grubu arasındaki mikrobiyal yükü karşılaştırmak olmuştur. Bu amaçla klonlama

yapılmıştır. Herhangi bir biyopsi örneğinden izole edilen total DNA izolasyonunun ardından, 466 bp'lık bakterilerdeki ortak gen bölgesi universal primerlerin kullanıldığı konvansiyonel PCR ile çoğaltılmıştır ve agaroz jelde yürütülmüştür (Bkz.Şekil 4.4). PCR ürünleri, gruplar arasındaki bakteriyel yük farklılığını saptamak için en uygun yöntem olan klonlama yapılması için Promega T easy vektörüne klonlanmıştır. Daha sonra bu hedef bölgeyi içeren rekombinant plazmit klonlanmak üzere konukçu JM109 komponent hücrelerine aktarılmıştır ve LB agar ortamına ekim yapılarak mavi beyaz koloni taraması yapılmıştır (Bkz.Şekil.4.5) . Konukçunun plazmiti alıp almadığının doğrulanması için de plazmit izolasyonu yapıp agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Bkz.Şekil 4.6). Aynı zamanda kontrol amacı ile plazmit ve total DNA örneklerinde yine universal primerlerin kullanıldığı PCR ile hedef bölge amplifiye edilmiştir ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek plazmit vektörün hedef bölgeyi aldığı doğrulanmış olmuştur (Bkz. Şekil 4.7). Plazmit izolasyonunun ardından nanodrop ile miktar ölçümü yapılarak gen kopya sayısı hesaplanmıştır. Gen kopya sayısı $6,2 \times 10^{11}$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan seyreltmelerin ardından 5 konsantasyon alınarak yapılan Real time PCR'ın sonucunda bir standart eğri grafiği elde edilmiştir (Bkz.Şekil 4.8). Çalışmamızda; klonlama yöntemini kullanmamızın sebebi, bizim için iki grup arasında tür farklılığını saptamak kadar, gastroözofajiyalreflü hastalığı ile birlikte bakteriyel yükün farklılık gösterip göstermediğini saptamak önemlidir. Gen kopya sayılarını tespit etmenin yanısıra, aynı zamanda real time PCR aşamasında standart eğri oluşturmak içinde klonlama yapılmıştır (Liu et al., 2013; Blackett et al., 2013).

Bakılan hedef gen kopya miktarları dolayısı ile bakteriyel yük yaklaşık olarak gastroözofajiyalreflü hastalarında 10^5 - 10^7 cfu ve kontrol gruplarında 10^6 - 10^7 cfu olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre reflü hastaları ve kontrol grubu arasında hedef gen bölgesi miktarları açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($p<0,005$). (Bkz. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Bu sonuca göre; gastroözofajiyalreflü hastalığının olduğu durumda distal özofagusta sayıca bakteriyel yük değişmiyor şeklinde yorum yaptık.

Çalışmamızın diğer amacı ise; gastrointestinal sistem endoskopisi ile distal özofagustan aldığımız biyopsilerde literatüre dayanarak

belirlediğimiz *Prevotella intermedia*, *Streptococcus pyogenes*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus acidophilus* ve fungal *Candida albicans* türlerinin distal özofagusta bulunup bulunmadıklarını araştırmak olmuştur. Bu mikroorganizmaları; yaptıkları hastalıklar, bulundukları flora ve daha önce yapılmış özofagus mikrobiyotası ile ilgili çalışmaların sonuçlarını göz önünde bulundurularak seçmiş bulunmaktayız (Liu et. al., 2013). Örneğin *Prevotella intermedia*, gram negatif olan bu tür periodontal hastalık, diş etlerindeki kronik bakteriyel enfeksiyon, yetişkinde diş eti iltihabı, akut nekroz ülseratif iltihaplar, nazofaringial ve intraabdominal enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Araştırmacılar gastroözofajiyal reflü hastalarından alınan biyopsilerde *Prevotella* genusunu kontrol gruplarına göre daha yüksek sayıda bulmuşlardır (Cutler et al.,1995; Matto et al.,1997; Fillon et al., 2012 ; Liu et al., 2013).

E. faecalis gram pozitif, gastrointestinal sistemde kommensal olmasına karşın, fırsatçı patojen olarak davranarak çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Endokardit, sepsisemi, üriner sistem enfeksiyonu, menenjit ve diğer enfeksiyonları yapabilir (Stuart et al., 2006). *E. faecalis* birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençlidir. Vankomisine de direnci bulunmaktadır. Bu tür potansiyel bir probiyotiktir ve sindirim enzimleri aktivitesi (proteaz ve lipaz gibi) ve kısa zincirli yağ asitleri (asetik, propiyonik ve bütirik asit) üretimi yapabilmektedir. Bazı patojenlerine karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır (Murray, 1990 ; Courvalin, 2006; Amyes, 2007; Hidron et al., 2008 ; Allameh et al., 2015).

E. faecalis KT11 suşu birçok biyolojik bariyere karşı dirençli olması (düşük pH, yüksek safra konsantrasyonu ve yapay mide sıvısı), laktozu fermente etmesi, antioksidan maddeler ve bakteriyosin üretimi gibi özellikler taşıması, probiyotik bir kültür olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu gösterilmiştir (Abanoz, 2014).

Mukozal immünite ve intestinal epitelyal hücreler üzerine *Enterococcus faecalis*'in probiyotik etkisi araştırılan bir çalışmada; *Enterococcus faecalis* CECT7121 straini analiz edilmiştir. Bu strainin lokal mukozal

immüniteyi stimüle ettiğini ve inflamatuvar sinyaller olmadan intestinal epitelyal hücrelere yapıştığını bulmuşlardır (Castro et., 2016).

Bir diğer çalışmada; *Enterococcus faecalis* PSCT3-7 straininin probiyotik özelliklerine bakılmıştır. Bu strain pH 3 ile 8 arasında yaşayabilen ve % 0,3 safra asitlerine tolere edebilen bir straindir. *Salmonella typhimurium* türünün büyümesini inhibe ettiğini görmüşlerdir (Kim et al., 2016).

F. nucleatum gram negatif potansiyel patojendir. Diş etleriyle ilgili hastalıklara ve diğer organların enfeksiyonuna neden olmaktadır (Bolstad et al., 1996). Bu organizmanın yapılan son çalışmalar ile kolorektal kanser ile de ilişkisi olduğu bulunmuştur. Liu ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada bu genus reflü hastalarında varken sağlıklı bireylerde hiç saptanmamıştır. Bu tür kolorektal karsinom dokusunda CD3-T hüceleri ile ilişkili bulunmuştur. Bu mikroorganizmanın virulans faktörleri, T hücrelerinin uyarılmasına neden olmaktadır (Castellari et al., 2012; Mima et al., 2015).

Candida albicans, diploit, eşeyli çoğalan maya tipi bir mantar türüdür. İnsanlarda kandida enfeksiyonun % 75' den *Candida albicans* sorumludur. Hem kommensal hem de fırsatçı patojendir. *C. albicans* insanlarda iki temel tipte enfeksiyona neden olabilir oral ve vajinal kandidiyazis gibi yüzeysel enfeksiyon ve yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu organizma AIDS, HIV pozitif, diyabet, kemoterapi alan, organ veya kemik iliği nakli yapılacak olan immün sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyon yapmaktadır. Yapılan son çalışmalarda hastalarda vitamin B12 ve folik asit eksikliğinde de *C.albicans* duyarlılığının arttığı görülmüştür (Atay, 2007; Mayer et al., 2013).

Enfeksiyöz özofajit, özofagus mukozasının enfeksiyonudur. Kandida özofajite en sık yol açan enfeksiyon etkenidir. Kandidaya bağlı özofajit genellikle altta yatan özofageal ya da sistemik bir hastalığa bağlı olarak gelişir. Reflü özofajit bu enfeksiyona yol açan nedenlerden biridir. Kandida özofajitinde ağırlı yutma ve yutma gücüğü semptomları ortaya çıkmaktadır (Ceylan vd., 2006).

Bacteroides fragilis, anaerobik, gram negatif insanda kolonda daha çok kommensal olarak bulunan normal flora bakterisidir, mukoza zarar uğrayıp nekroz oluştursa hastalık yapıcı olabilir (Kuwahara et al., 2004).

Otizm hastalıklarıyla ilişkili davranışsal anormallikler ve gastrointestinal semptomlarda *B.fragilis* ile yapılan probiyotik tedavisi ile serumda değişen metabolit profilinin düzeldiği görülmüştür. *B.fragilis'* in artan bağırsak geçirgenliğini onardığı görülmüştür. *B. fragilis* aynı zamanda anneye bağlı immün aktivasyonu ile ilişkili, kolonda artan IL-6 mRNA ve protein seviyelerini de düzeltmiştir (Hsiao et al., 2013).

Lactobacillus acidophilus gram pozitif, kapsülsüz, mikroaerofilik ve anaerob bir türdür. İnsanda gastrointestinal sistemde ve ağızda bulunmaktadır. Gastrointestinal sistemde safra, sindirim sistemi enzimlerine ve düşük pH'a dirençlidirler. Bazı strainleri probiyotik özelliktedir (Baati et al.,2000 ; Ljungh et al., 2006).

L. acidophilus bazı strainleri pediatrik diyarenin geçmesini sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda diyalizli hastalarda kandaki toksik amin seviyesini düşürdükleri görülmüştür. Aynı zamanda yüksek olan serum kolesterol seviyesini de düşürdüğü bulunmuştur (Aderson and Gilliland, 1999; Sanders and Klaenhammer, 2001).

L. acidophilus vitamin K ve laktaz üretebilmektedir. Bazı strainleri laktosidin, asidofilin ve laktasin B gibi bakteriyosinler üretirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu mikroorganizmanın çocuklarda alerjik semptomların engellenmesinde ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonu riskinin azaltılmasında rol oynadıkları görülmüştür (Kundakçı vd., 2006).

N.meningitidis gram negatif, yetişkin ve çocuklarda ölüm ve sakatlığa sebep olabilen önemli bir türdür. *N.meningitidis* türü kapsüllü ya da kapsülsüz olabilir. Fakat invaziv hastalıklarda ka, beyin omurilik sıvısı gibi bölgelerden izole edilen strainlerinde her zaman kapsül bulunmaktadır. Kapsül kanda antikorlara ve fagositoza karşı organizmanın hayatta kalmasını sağlamaktadır. *Proteobacteria* filumuna ait olan *Neisseria* genusu 2013 yılında Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucuna göre; sağlıklı bireylerin özofagus

biyopsilerinde hiç saptanmamış olup, reflü hastalarında ve barret özofaguslu hastalarda yüksek sayıda bulunmuştur (Liu et al., 2013).

Bu türleri seçtikten sonra real time PCR yöntemi ile özofagusta var olup olmadıklarını araştırmak amacıyla öncelikle bu türlere spesifik primerler belirlenmiştir. Primerler; direnç genleri, virulans faktörleri gibi genlere bakılarak bazıları tasarlanmış, bazıları ise literatürlerden alınmıştır. Örneğin *Fusobacterium nucleatum* türünün primeri bir virulans faktör geni olan *Fad A* adezyon geni içermektedir. *Prevotella intermedia* türü için seçilen primerde tetrasiklin antibiyotik direnç geni bulunmaktadır. *Streptococcus pyogenes* türü için seçilen primerde *Spe B* geni olup, bu gen sistein proteinaz olup bir ekzotoksindir. *Neisseria meningitidis* türü için seçilen primerde ise *Crg A* geni mevcuttur. *Candida albicans* için primerde *CDC 3* geni (cell division cycle protein) yer almaktadır. *Veillonella parvula* türü için 16s rRNA genine spesifik gen bölgesi içermektedir. (Bizhang et al., 2011). *Enterococcus faecalis* türü için seçilen primerde tüm genom, *Bacteroides fragilis* için nörominidaz geni (*nanH* geni), *Lactobacillus acidophilus* 16S rRNA spesifik gen bölgesi baz alınmıştır (Haarman ve Knol, 2006).

Real time PCR aşamasında; özgül olmayan bir yöntem olan SYBR Green 1 boyası kullanılmıştır. Bu yöntemin kullanılmasındaki amaç yöntemin kolaylıkla uygulanabilirliği ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında maliyet açısından daha uygun olmasıdır. Bu boya çift iplikli DNA'ya bağlanarak floresan verme özelliğindedir. Bu yöntemin dezavantajı reaksiyon esnasında primer dimerleri oluşabilir ve SYBR Green 1 boyası interkalasyon yaparak çift iplikli DNA' ya bağlanarak sinyal oluşturabilmektedir. Bu problemlerin olmaması için en uygun primerler seçilmeli ve reaksiyon bitiminde mutlaka Tm analizi yapılmalıdır. Tm analizi, SYBR Green 1 ve hibridizasyon prob yöntemlerinde yapılan bir doğrulama analizidir. Bu analizde standart olarak girilen DNA' nın erime sıcaklığı saptanır ve amplifikasyonda pozitif Ct ve sayısal sonuç veren örnek DNA' ların Tm değerleri karşılaştırılır. Bu şekilde bilinmeyen örnekteki DNA' nın aranılan organizma DNA' sı olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızda Tm analizi yaparak bulduğumuz sonuçlar doğrulanmıştır (Bkz. Şekil 4.25, Şekil 4.26 ve Şekil 4.27). Dikkat edilmesi gereken diğer önemli bir nokta ise Ct değeridir. Ct değeri örnekteki DNA' nın logaritmik faza geçtiği ve ilk ışığa vermeye başladığı anın sayısal bir ifadesidir. Özgül olmayan belirleme yöntemleri kullanıldığında Ct değeri 35'e

kadar kabul edilebilir. 35' ten sonra oluşan ışıma ve logaritmik eğriler kabul edilmez. Aradığımız türler için her bir Ct değeri ayrı ayrı bulunmuştur ve 35' in üzerinde çıkanlar dikkate alınmamıştır (Bkz. Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8) (Espy et al., 2006).

Çalışmaya dahil edilen 30 reflü hastasında real time PCR ile saptanan bakteriyel türlerin yüzde oranları sırasıyla; *Provetalla intermedia* (%23), *Veillonella parvula* (%17), *Fusobacterium nucleatum* (%17), *Neisseria meningitidis* (%17), *Bacteroides fragilis* (%10), *Lactobacillus acidophilus*(%3), *Streptococcus pyogenes* (%27) şeklinde bulunmuştur.

20 kontrol grubunda ise; *Provetalla intermedia* (%20), *Veillonella parvula* (%15), *Fusobacterium nucleatum* (%10), *Neisseria meningitidis* (%10), *Bacteroides fragilis* (%20), *Lactobacillus acidophilus*(%15), *Streptococcus pyogenes* (%35) oranlarında saptanmıştır.

Enterococcus faecalis ve *Candida albicans* türlerine her iki grupta da rastlanmamıştır. Çalışmamızda *E. faecalis* türünü bulmamış olmamızın nedeni, hasta sayısının az olması ve/veya biyopsinin alındığı yerde bu türün kolonize olmamış olmasından kaynaklanıyor olabilir. İnsan klinik örneklerin en çok izole edilen bu tür kommensal olup fırsatçı patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Enterococcus faecalis* bazı strainlerinin probiyotik olarak kullanıldığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Kim et L., 2016).

Kortikosteroid kullanan, astım, diyabet, HIV enfeksiyonu olan immün süpresif hastalarda, üst gastroinestinal sistem endoskopi işlemi sırasında, özofagusta beyaz pamuk tarlası gibi görülen görüntü fırsatçı patojen *Candida albicans* varlığı olarak değerlendirilmektedir. Hastalarımızın sadece reflü hastası olmaları ve bağışıklık sistemlerinin baskılanmamış olmasından dolayı özofagus mukozasında bu türe rastlamamış olabiliriz. Yapılan çalışmalarda, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda özofagusta yutma güçlüğü ve ağrılı yutma semptomları sonucunda endoskopik ve radyolojik tetkik sonrasında *Candida albicans* enfeksiyonu görülmektedir (Lorenz et al.,1993).

Son zamanlarda mikroorganizmaların antibiyotiklere dirençleri arttığı için probiyotikler kullanılmaya başlanmıştır. Probiyotik bakteriler, laktik asit bakterileri olarak bilinen *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* ve *Enterococci*'dir. *Lactobacillus acidophilus* türünün *C. albicans* üzerinde inhibitör etkisi olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. *Lactobacillus* strainleri organik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal moleküller üreterek *Candida albicans*' a özellikle biofilm oluşumuna, filament oluşturma kapasitesine ve enfeksiyon potansiyeline karşı etki gösterebilmektedir (Purohit et al., 1977 ; Collins et al ., 1980; Vilela et al., 2015). Bizim de çalışmamızda hasta grubuna göre kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olmasının yanı sıra her iki grupta da *Lactobacillus acidophilus* türü saptanmıştır. Bu yüzden bu tür *Candida albicans* gelişimini antikandidal özellik göstererek engellemiş olabilir.

Gastroözofajiyalreflü hastalarında baskın çıkan *Provetalla intermedia*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Neisseria meningitidis* türlerinin ortak özelliği gram negatif bakteri olmaları ve organizmaların başta lipopolisakkarit tabakası olmak üzere birçok virulans faktörü bulundurmalarıdır. Bu virulans faktörleri onların patojenitelerini artırıp, onların hastalık oluşturma potansiyelini ortaya çıkarmaktadır. Gr(-) bakteriler reflü hastalığının patogeneğinde rol oynayabilir. Hücre duvarlarında bulunan lipopolisakkarit tabakası veya endotoksinler ile immün yanıt oluşturduğu bazı yayınlarda belirtilmiştir. Bu faktörler mide boşalım hızını ve alt özofagus sfinkter basıncını etkileyebilir. COX-2 (siklooksigenaz enzimi 2) ve COX-1 (siklooksigenaz enzimi 1) enzimleri filogenetik olarak benzerler, çok küçüktürler ve cep şeklinde aktif enzim bölgeleri bulunmaktadır. Bu iki enzim oldukça önemlidir şöyle ki; COX 1 enzimi belli hücrelerin normal aktivitesi ve homeostazın sağlanmasında görevlidir. Prostaglandin sentezi yaparak gastrik mukozayı korur. COX 2 enzimi ise, genelde sitokinler ve büyüme faktörlerinin uyarması ile hasarlanmış hücrelerde üretilir. COX 2 tarafından üretilen prostoglandinler inflamatuvar cevabın ağrı ve diğer özelliklerinin ortaya çıkmasında etkilidir. Endotoksin ile uyarılma ile hem selektif olmayan siklooksigenaz enzimi 1 hem de selektif siklooksigenaz inhibisyonu bloke olabilir. Bunun sonucunda hücrelerin normal aktivitesi ve tüm dengeler bozulabilir ve bu

durum mide boşalımının ertelenmesine neden olarak intragastrik basınçta artışa ve sonuçta gastroözofajiyal reflü oluşumuna sebebiyet verebilir. (Neto et al., 2016).

Patolojik reflü gelişimine bir diğer etken, antireflü bariyeri olan alt özofagus sfinkterinde basıncın düşmesidir. Gr (-) bakterilerin LPS tabakası İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentezi (İNOS) ile bu basıncın düşmesine neden olabilir. İNOS immün/inflamatuvar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir formdur. Doku hasarı veya zedelenmesi söz konusu olduğu durumlarda İndüklenebilir nitrik oksit sentezi uyarılır ve bol miktarda nitrik oksit üretilir ve bu da zarar verici olabilir. Çünkü nitrik oksit gastrointestinal sistemde düz kasların gevşemesinde önemli bir rol oynar. Özofagusun alt distal kısmı da düz kastan oluştuğundan dolayı buradaki kasların gevşemesine neden olacaktır. Alt özofagus sfinkter kas tonusunun gereğinden fazla gevşemesi ile de mide içeriği özofagusa daha çok kaçarak patolojik reflüye neden olabilir (Neto et al.,2016).

İNOS ve COX-2'nin gram negatif bakteriler ile uyarılması sonucunda Tool Like Reseptörlerin salınımı başlamaktadır. Tool Like reseptörlerin aktivasyonu ile immün yanıt oluşumuna neden olan genleri düzenleyen, transkripsiyon faktörü Nüklear translokasyon (NF-kB) indüklenir. IL-1b, IL-8,IL-4 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler NF-kB yol izi ile düzenlenir ve reflü hastalığında bu sitokinlerin miktarlarının arttığı görülmüştür (Neto et al., 2016).

İmmün cevap, adaptif immün cevap hücre proliferasyonu, apoptozis ve hücre farklılaşmasına yol açar. TLR 1, 2, 3, 4, 5, 7 ve 9 insan özofajiyal epitel hücrelerinde eksprese olur . LPS özellikle TLR 4 ile ilişkilidir. Özofagustan alınan distal özofagus biyopsilerinde TLR 4 ekspresyonu, özofajiyal adenokarsinom, barret özofagus ve reflü özefajitte normal özofagusa göre belirgin artmıştır (Neto et al., 2016).

Bakmış olduğumuz türler arasında gram negatif olup kontrol grubunda yüksek oranda çıkan tek tür, kommensal *Bacteroides fragilis* olmuştur. Bu tür immün sistem düzenleyici karakterdedir ve yeni bir probiyotik olarak kullanıldığı dair çalışmalar mevcuttur. Bu şekilde immün dengenin sağlanmasında, mental

hastalıklarda ve inflamatuvar hastalıklarda tedavi edici etkisi bulunmuştur (Deng et al., 2016). Biz çalışmamızda bu türü 30 reflü hastasının % 10' nunda, 20 kontrol grubunun % 20' sinde saptamış bulunmaktayız. Bu türün sayısında gastroözofajiyalreflü hastalığı ile birlikte azalma olduğu görülmüştür.

Araştırdığımız mikroorganizmalardan gram pozitif tür olan *Streptococcus pyogenes* türünü ise kontrol grubunda daha yüksek oranda çıkmıştır. 30 reflü hastasının % 27' sinde, 20 kontrol grubunun ise %35' inde bu tür saptanmıştır. Yang ve arkadaşları da 2009 yılında, 34 örnekten 16 S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu ile elde ettikleri 6.800 adet 16S rRNA gen klonun dizi analizini yaparak en geniş mikrobiyom çalışmalarından birini yapmışlardır. Gram pozitif olan *Streptococcus* genusunu normal özofagusta daha baskın bulmuşlardır. Bir başka çalışmada da bu genus sağlıklı özofagusla ilişkilendirmişlerdir (Di Pilato et al., 2016). Dolayısıyla bu sonuçlara göre bu tür kontrol grubunda yüksek olmasına rağmen reflü hastalarının distal özofagusunda sayısı azalsa da devamlılığını sürdürmektedir.

Diğer bir gram pozitif bakteri ise *Lactobacillus acidophilus* türüdür. Yaptığımız çalışmada *Lactobacillus acidophilus* türünü 30 reflü hastasının % 3' ünde, 20 kontrol grubunun % 15' inde saptadık. Reflü hastalarında bu tür, distal özofagusta belirgin olarak azalmıştır. Bu türün farmakolojik ve antimikrobiyal aktivitesi bulunmaktadır. Canlı probiyotik straini akut veya kronik diyare veya gastrit ile ilişkili hastalıklarda tedavi edici etki göstermektedir. Vezikoüreteral reflü; mesaneden üretere veya böbreğe idrarın geri kaçıışı olarak bilinir ve *Lactobacillus acidophilus* türünden yapılan probiyotik tedavisi ile hastalarda oldukça etkili sonuç alınmıştır (Lee et al., 2007). Aynı şekilde mideden özofagusa mide içeriğini geri kaçışıda bu türün probiyotiğinin kullanılmasıyla iyi sonuç verebilir.

Yamamichi ve arkadaşları 2012 yılında 19.864 reflü semptomu olan hastalarla yaptıkları anket çalışmasında gastroözofajiyalreflü hastalığı görülme skalası ve soru formunu kullanarak reflü semptomları ile birçok parametre arasındaki ilişkiye bakmışlardır. Bu sonuçlara göre; PPI kullanımı, artmış vücut

kitle indeksi, sigara tüketimi ve ağrı kesici kullanımı reflü semptomları ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon göstermiştir (Yamamichi et al., 2012).

Çalışmamızda örnek alınmış her bir birey için vücut kitle indeksi, alkol kullanımı, sigara kullanımı, proton pompa inhibitörü kullanımı, safra kesesi ameliyatı geçirip geçirmediikleri, kullandıkları ilaçlar, özofagus hastalıkları olup olmadığı gibi soruları kapsayan sorgulama formu doldurulmuştur (EK 1).

Yapılan çalışmalar kilo artışının reflü hastalığını tetiklediğini göstermiştir (Watanebe et al., 2009). 2016 yılında yapılan diğer bir çalışmada vücut kitle indeksi yüksek olan obez hastaların gastroözofajiyalreflü tanı oranı normal kilolu bireylere göre daha yüksek bulunmuştur (Iciovic et al., 2016). 2013 yılında Çeal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; yüksek vücut kitle indeksi ile semptomatik gastroözofajiyalreflü hastalığı arasında pozitif ilişki gözlemlemişlerdir (Çela et al., 2013).

2016 yılında yapılan bir diğer araştırmada; 1072 reflü hastası bireye gastroözofajiyalreflü hastalığı soru formu kullanarak risk faktörleri ile reflü prevalansına bakılmıştır. Bu sonuca göre araştırmacılar artmış vücut kitle indeksi ile gastroözofajiyalreflü hastalığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu saptamışlardır (Wang et al., 2016).

Biz de çalışmamızın sonucuna göre reflü hastaları ve kontrol grubunda vücut kitle indeksi ile araştırılan türler arasındaki ilişki değerlendirecek olursak; vücut kitle indeksi 24' ün üzerinde olan gastroözofajiyalreflü hastalarında *Helicobacter pylori*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Neisseria meningitidis* türleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,005$) (Bkz. Çizelge 4.9). Vücut kitle indeksi yüksek bireylerde intraabdominal basıncın artışı olmakta ve reflü semptomları artmaktadır dolayısıyla bu türlerin sayıca artmasına zemin hazırlamış olabilir.

Japonya'da yapılan bir çalışmada sigara ve alkol kullanan hastalarda reflü hastalığı görülme sıklığı arasında ilişki bulunmuştur (Watanebe et al., 2009). Yapılan başka bir çalışmada; sigara kullanan kişilerde reflü prevalansı sigara

kullanmayanlara göre daha yüksek saptanmış iken, alkol tüketimi ile reflü hastalığı arasında bir ilişki bulunmamıştır. Almanya'da yapılan bir çalışma ise alkol tüketiminin önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (Çela et al., 2013). Pandeya ve arkadaşları ise 2012 yılında yaptıkları çalışmada gastroözofajiyal reflü semptomları ile sigara ve alkol kullanımı arasında ilişki bulmamışlardır. Yapılan bir başka çalışmada sigara kullanımı ile *Helicobacter pylori* türü arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Kopanski et al., 1997).

Bizim çalışmamızda; sigara ve alkol kullanımının reflü ve türler arasındaki ilişkisi incelendiğinde; seçilen türlerde her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmamıştır. Sadece distal özofagustan alınan biyopsilerden patoloji laboratuvarında histopatolojik inceleme sonucunda, pozitif veya negatif sonuç olarak değerlendirilmiş olan *Helicobacter pylori* türü sigara ve alkol kullanan reflü grubunda yüksek çıkmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç olarak görülmüştür ($p < 0,005$). Kontrol grubunda ise sigara ve alkol kullanımı ile türler arasında bir ilişki bulunmamıştır (Bkz. Çizelge 4.10).

Safra kesesi ameliyatı olan reflü hastalarında; *Veillonella parvula*, *Neisseria meningitidis*, *Fusobacterium nucleatum*, safra kesesi ameliyatı olan kontrol grubunda ise *Bacteroides fragilis*, *Neisseria meningitidis*, *Fusobacterium nucleatum* türlerinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,005$) (Bkz. Çizelge 4.11). Bunun nedeni safra kesesi operasyonlarından sonra safra kesesinin depo fonksiyonunun ortadan kalkarak safra asitinin mide ve özofagusa gelmesi olabilir. Bu operasyondan sonra karaciğerden salınan safra sürekli ve kontrolsüz bir biçimde duodenuma akar ve zaman zaman safralı duodenum sıvısı mideye geri kaçabilmektedir. Safra da mide içeriği ile birlikte özofagusa gelerek mevcut floranın değişmesine neden olabilir. Toksik safra asitleri mide ve özofagus mukozasına etki ederek ciddi hasar oluşturabilir (Uyanıkoğlu ve Keşküş, 2013).

Harris ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada PPI kullanan gastroözofajiyal reflü hastalarında *Streptococcus* genusunda anlamlı düşme gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada ise 4 haftalık PPI kullanımı sonucunda araştırılan fekal örneklerde *Enterococcaceae* ve *Streptococcaceae* familya üyelerinde artma bulunmuştur (Freedberg et al., 2015). PPI' lar; H⁺/K⁺-ATPaz

(proton pompası)'ın alt ünitelerindeki sistein moleküllerine bağlanarak pompayı inhibe ederler. Pompa inhibe edildiği için de asit sekresyonu bloke olur. Proton pompa inhibitörleri ile yapılan çalışmalar proton pompa inhibitör kullanımının pH'ı değiştirerek insan mikrobiyotasını etkilediğini ve değiştirdiğini göstermiştir (Vesper et al., 2009; Freedberg et al., 2015).

Araştırmamızda PPI kullanımı ile araştırılan türleri karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık (Çizelge 4.12). Bu sonuç hasta sayımızın az olması, hastalara PPI kullanımını 2 hafta önceden kestirmiş olmamızdan ve normalde de seçtiğimiz reflü hastası grubunun henüz PPI tedavisine başlamamış olması başlamış olanların da düzenli olarak PPI kullanmıyor olmasından kaynaklanabilir.

Ağrı kesiciler prostogalandin sentezini inhibe ederek mukozal hasara, ülserasyona ve gastrointestinal sistem boyunca ülser gibi komplikasyonlarına neden olabilmektedir (Hawkey, 2001). Bir diğer çalışmada non steroid antiinflamatuvar ilaçların gastroözofajiyalreflü hastalığını tetiklediğini ve bazende alt özofagusta mukozal lezyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Non steroid anti inflamatuvar ilaçların kullanımı ile reflü semptomları arasında ilişki bulunmaktadır. Araştırmacılar bu ilaçların reflü hastalığı gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Gastroözofajiyalreflü semptomları prevalansı bu ilaçları kullanan kişilerde hiç kullanmayanlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Ruszniewski, 2008; Pandeya et al., 2012).

Çalışmamızda ise uzun süredir ağrı kesici kullanımı ile reflü arasındaki ilişkiye bakarsak reflü hastalarında *Helicobacter pylori*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* miktarları yüksek olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,005$) (Bkz.Çizelge 4.13).

Liu ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada reflü özefajitli hasta grubunda *Veillonella*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* genuslarını normal özofagusa göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (Liu et al., 2013). Araştırmamızın sonuçlarına göre ise 5 mm den kısa ve mukozal kıvrım

üzerinde sınırlanan bir veya daha fazla sayıda lineer erezyon varlığı yani Grade A özefajit varlığı üst gastrointestinal endoskopi işlemi esnasında uzman gastroenterolog tarafından değerlendirilerek her hasta için not alınmıştır . Bu veri sonuçlarına göre Grade A özefajiti olan reflü hastalarında *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,005$) (Bkz.Çizelge 4.14). Mide içeriğinin özofagusa geri gelmesi sonucunda oluşan bu özefajit ile bu türlere olan duyarlılık artmış olabilir.

H.pylori dişeti hastalıklarında oral squamoz hücre karsinomunda, diş plağında, ağızda, ağız yaralarında, tükürükte, halitozizde (kötü ağız kokusu) , dil yanmalarında gastrik patolojiyle ilişkili bulunmuştur. Diş etleriyle ilgili hastalıklarda *Fusobacterium nucleatum* ile birlikte olduğu görülmüştür. Çoğunlukla anaerobik ve gram negatif bakterilerin neden olduğu sülfür içeren aminoasitleri parçalayan bu bakterilerin sebep olduğu halitozizde *Veillonella parvula* türü de dilin arka tarafından izole edilmiştir. Aynı şekilde *Helicobacter pylori* de aynı bölgede lokalize olabilmektedir (Adler et al., 2014).

Bizde araştırmamızda; üst gastrointestinal endoskopi işlemi sırasında rutin olarak *Helicobacter pylori* türünün var olup olmadığını araştırmak için midenin korpus ve antrumundan alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesindeki sonuca göre *Helicobacter pylori* ile araştırdığımız mikroorganizmalar arasındaki istatistiksel değerlendirme de *Helicobacter pylori* pozitifliği olan bireylerde, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* türlerini anlamlı olarak yüksek bulduk ($p<0,005$) (Bkz. Çizelge 4.15). Yapılan çalışmalarda ağız boşluğunda *Helicobacter pylori*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Veillonella parvula* türleri ile birlikte bulundukları görülmüş olup bu türler birlikte distal özofagusa da yerleşmiş olabilir (Adler et al., 2014).

Sonuç olarak çok yakın zamana kadar özofagusu steril kabul edilmekteydi. Fakat moleküler teknikler ile özofagusta bakteriyal çeşitlilik görülmüştür. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar az sayıda olsa da bizimde çalışmamızın sonuçları özofagus hastalıklarından biri olan gastroözofajiyalreflü hastalığı olan bireyler reflü olmayan hastalar ile kıyaslandığında distal özofagusta değişen bir

mikrobiyota olduğunu göstermektedir. Sağlıklı grupta *Streptococcus pyogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides fragilis* türleri dominant iken, hasta bireylerin distal özofagusunda daha çok gram negatif bakteriler *Provetella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria meningitidis* yerleşmektedir. Gram negatif türlerden sağlıklı grupta baskın çıkan tek tür kommensal probiyotik etkisi bilinen *Bacteroides fragilis* türüdür. *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* türleri ise reflü hastaları ve kontrol grubunda da saptanmamıştır.

Vücudumuzdaki hücrelerin on katı kadar mikroorganizmaya sahip olan canlılar olarak, bu mikroorganizmalar ile iç içe yaşamaktayız. Çoğu ile simbiyotik bir ilişkiye sahibiz ve bu mikroorganizmalar bizi patojenlere karşı korumanın yanı sıra besinlerin sindiriminde kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumunda, immün sistemde ve bazı vitaminlerin sentezinde rol oynamaktadır. Modernleşen toplumlar steril yaşamaya önem vererek antibakteriyal sabun, deterjan kullanımları, topraktan uzaklaşarak şehir içinde oluşan betonlaşma, stress, çok sayıda gereksiz yere kullanılan antibiyotikler, lifli gıda meyve sebze tüketiminin azalmış olması, hazır gıda tüketimi ile obezitenin artması, tek yönlü beslenme ile yapılan diyetler, raf ömrünü uzatmak için koruyucu katkı maddelerinin ilave edildiği bir çok fermente ürünün tüketimi, sigara ve alkol kullanımı ve diğer birçok faktörler sonucunda bize faydası olan mikrobiyotadan uzaklaşmaktayız.

Gastroözofajiyalreflü sonrasında sırasıyla reflü özefajit gelişimi, ardından barret özofagus, displazi, squamoz hücre karsinomu ve adenokarsinom gelişebilmektedir. Bu olayın patofizyolojisine bakıldığında, gastroözofajiyalreflü içeriği, gastrik asit sekresyonu, antireflü bariyer disfonksiyonu, mide boşalımında gecikme ve özofajiyal defans mekanizmasında anormallikler sayılabilir. Bu faktörlerin yanı sıra hastalığın patogeneğinde mikroorganizmaların rolü büyüktür. Birçok etmen ile birlikte özellikle antibiyotik kullanımı gastroözofajiyalreflü hastalarında özofagustaki mikrobiyomun çeşitliliğini ve miktarını değiştirmektedir. Bu değişiklik adenokarsinoma kadar giden ciddi hastalıklara neden olabilir. *Helicobacter pylori* eradikasyonu için ise, yoğun bir antibiyotik tedavisi yapılmaktadır ve tamamen türün yok olmaması durumunda bu antibiyotik tedavileri birçok kez tekrarlanmak zorunda kalınmaktadır.

Midede kronik atrofik gastrit ile ilişkili bulunan *Helicobacter pylori* türü gastrik adenokarsinomun nasıl bir habercisi ise reflü hastalarının özofagusunda bulduğumuz bir türde özefajit, barret özofagus hatta özofajiyal adenokarsinomun etmenlerinden biri olabilir. Bunun için bu hastalara pozitif çıkan her tür için detaylı moleküler analizler yapmak gerekmektedir. Son yıllarda oldukça artan mikrobiyota çalışmalarında; hastalıklarla mikrobiyal populasyon arasındaki ilişki bulunmaya devam etmektedir. Hasta sayısını artırarak ve kontrollü çalışarak bu çalışmaları artırmak bu hastalıkların patogenezi anlamakta fayda sağlayacaktır. Bozulan mikrobiyotayı düzeltmek için hastalara, medikal tedavilerinin yanısıra çok yönlü beslenme ve kefir, yoğurt gibi fermente gıdaları, lifli sebze ve meyveleri de içeren diyet önerileri ve probiyotik kullanımı tavsiye edilebilir.



KAYNAKLAR

- Abanoz, H.S.**, 2014, *Enterococcus faecalis* KT11'in Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretimi Üzerine Çalışmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 110 sayfa.
- Adler, I., Muino, A., Lence, A., Labbrozzi, M., Manuel-Muino, J., Elsner, B., Avagnina, A., Denninghoff V.**, 2014, *Helicobacter pylori* and oral pathology: Relationship with the gastric infection, World journal of Gastroenterology, 20(29): 9922–9935.
- Aidy, E.S., Stilling, R., Dinan, T.G., Cryan, J.F.**, 2016, Microbiome to Brain: unravelling the Multidirectional Axes of communication, Advances in experimental Medicine Biology, 874:301-36.
- Alarcón, P., González, M., Castro, É.**, 2016, The role of gut microbiota in the regulation of the immune response, Revisca medica Chile, 144(7):910-6p.
- Allameh, S.K., Ringo, E., Yusoff, F.M., Daud, H.M., İderis, A.**, 2015, Dietary supplement of *Enterococcus faecalis* on digestive enzyme activities, short-chain fatty acid production, immune system response and disease resistance of Javanese carp, Aquaculture nutrition, 81785-199.
- Amyes, S.G.**, 2007, "*Enterococci* and *Streptococci*", Int. J. Antimicrob. Agents, 3: S43–52.
- Anderson, J.W., Gilliland, S.E.**, 1999, Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans, Journal of American Collage of Nutrition, ;18(1):43-50.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., Raoult, D.**, 2009, Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients, PLoS ONE, 4(9):e7125.
- Africa, C.W., Nel, J., Stemmet, M.**, 2014, Anaerobes and bacterial vaginosis in pregnancy: virulence factors contributing to vaginal colonisation, Int J Environ Res Public Health, 11(7):6979-7000.

KAYNAKLAR (devam)

- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT, Consortium., Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011, Enterotypes of the human gut microbiome, *Nature*, 473(7346):174-80.**
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. and ĞPatel, H.R.T., 2005, Basic Principles of Real Time Quantitative PCR, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 5(2):209-219.**
- Atay, A., 2007, Ağız dokularına candida yapışması, Atatürk Üniversitesi Diş hekimliği fakóltesi dergisi, cilt :17 sayı:1 sayfa 46-50.**
- Bâati, L., Fabre-Gea, C., Auriol, D., Blanc, P.J., 2000, Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels, *International Journal Food Microbiology*, 59(3):241-7.**
- Baker, M.E., Einstein, D.M., 2014, Barium esophagram: does it have a role in gastroesophageal reflux disease?, *Gastroenterology Clinics of North America*, 43(1):47-68p.**

KAYNAKLAR (devam)

- Banks, D.J., Porcella, S.F., Barbian, K.D., Martin, J.M., Musser, J.M.,** 2003, Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A Streptococcus, *Journal Infectious Diseases*, 188: 1898–908.
- Baothman, O.A., Zamzami, M.A., Taher, I., Abubaker, J., Abu-Farha, M.,** 2016, The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes, *Lipids Health Disesae*, 15:108p.
- Barlow, A.P., DeMeester, T.R., Ball, C.S., Eypasch, E.P.,**1989, The significance of the gastric secretory state in gastroesophageal reflux disease, *Arch Surg.* 124:937–40p.
- Baron, S.,** 1996, *Medical Microbiology*, 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.
- Basoglu, O.K., Vardar, R., Tasbakan, M.S., Ucar, Z.Z., Ayik, S., Kose, T., Bor, S.,** 2015, Obstructive sleep apnea syndrome and gastroesophageal reflux disease: the importance of obesity and gender. *Sleep Breath*, (2):585-92.
- Bayrakçi, B., Kasap, E., Kitapçioğlu, G., Bor, S.,** 2008, Low prevalence of erosive esophagitis and Barrett esophagus in a tertiary referral center in Turkey, *Turkish Journal of Gastroenterology*, 134:5 (Suppl 1);T2014(600).
- Bensasson, D., Boore, J.L., Nielsen, K.M.,** 2004, Genes without frontiers? *Heredity*, 92(6): 483-489.
- Bizhang, M., Ellerbrock, B., Preza, D., Raab, W., Singh, P., Beikler, T., Henrich, B., Zimmer, S.,** 2011, Detection of nine microorganisms from the initial carious root lesions using a TaqMan-based real-time PCR, *Oral diseases*, (7):642-52.

KAYNAKLAR (devam)

- Blackett, K.L., Siddhi, S.S., Cleary, S., Steed, H., Miller, M.H., Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., Dillon, J.F.,** 2013, Oesophageal bacterial biofilm changes in gastro-oesophageal reflux disease, Barrett's and oesophageal carcinoma: association or causality?, *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 37(11):1084-92.
- Bolstad, A.I., Jensen, H.B., and Bakken, V.,** 1996, Taxonomy, Biology, and Periodontal Aspects of *Fusobacterium nucleatum*, *Clinical Microbiology Reviews*, 9(1):55-71.
- Bouchi, R., Ogawa, Y.,** 2015 Gut microbiota and internal diseases: update information.topics: IV.Obesity, diabetes and gut microbiota, *Nihon naika gakkai zasshi*,104(1):57-6.
- Bor, S., Mandiracioglu, A., Kitapcioglu, G., Caymaz-Bor, C., Gilbert, R.J.,** 2005, Gastroesophageal reflux disease in a low-income region in Turkey. *Am J Gastroenterol*,(4):759-65.
- Bor, S., Vardar, R., Vardar, E., Takmaz, S., Mungan, Z.,** 2008, Endoscopic findings of gastroesophageal reflux disease in Turkey (Multicenter prospective study GORHEN), *Turkish journal of Gastarointerology*, 19(3):145-51p.
- Bor, S., Kitapcioglu, G., Solak, Z.A., Ertlav, M., Erdinc, M.,** 2010, Prevalence of gastroesophageal reflux disease in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *J Gastroenterol Hepatol.* (2):309-13.
- Breumelhof, R., Nadorp, J.H., Akkermans L.M., Smout A.J.,** 1990, Analysis of 24 hour esophageal pressure and pH data in unselected patients with noncardiac chet pain, *Gastroenterology*,99:1257-1264p.
- Brouwer, S., Barnett, T.C., Rivera-Hernandez, T., Rohde, M., Walker, M.J.,** 2016, *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization, *FEBS Letters*, 3739-3757p.
- Brown, T.A.,** 1990, *Gene Cloning Second Edition*, London, Chapman & Hall, 3-11p.
- Bustin, S.A.,** 2000, Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal Molecular Endocrinology* 25:169-93p.

KAYNAKLAR (devam)

- Byrne, D.P., Manandhar, S.P., Potempa, J., Smalley, J.W.,** 2015, Breakdown of albumin and haemalbumin by the cysteine protease interpain A, an albuminase of *Prevotella intermedia*, *BMC Microbiology*, 24;15:185p.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E., Moore, R.A., Holt, R.A.,** 2012, *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma, *Genome Res*, 22(2): 299–306.
- Castro, M.S., Molina, M.A., Azpiroz, M.B., Díaz, A.M., Ponzio, R., Sparo, M.D., Manghi, M.A., Canellada, A.M.,** 2016, Probiotic activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121: effects on mucosal immunity and intestinal epithelial cells, *Journal of Applied Microbiology*, 121(4):1117-29.
- Ceylan, B., Mazlum, A., Demirkalem, F., Dağ, A.,** 2006, Kandida özofajiti, *Göztepe Tıp Dergisi*, 21(4):204-206.
- Chakraborti, C.K.,** 2015, New found link between microbiota and obesity, *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 6(4):110-119.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A.,** 2001, Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance, *Journal of Bacteriology*, 183(18):5385-94.
- Chaplin, B.E., Rasmussen, R.P., Bernard, P.S., Wittwer, C.T.,** 1999, LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection, *Biochemica*, 1:5-8.
- Claesson, M.J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A.P., Shanahan, F., Twomey, C., Hill, C., Ross, R.P., O'Toole, P.W.,** 2011, Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 108 Suppl 1:4586-91.
- Collins, E.B., and Hardt, P.,** 1980, *Inhibition of Candida albicans by Lactobacillus acidophilus*, *Journal of Dairy Sciences*, 63(5):830-2.

KAYNAKLAR (devam)

- Courvalin, P.**, 2006, "Vancomycin resistance in Gram-positive cocci", Clin. Infect. Diseases, 42 Suppl 1: S25–34.
- Crum-Cianflone, N., and Sullivan,E.**, 2016, Meningococcal Vaccinations, Infect Dis Ther, 5(2): 89–112.
- Cutler, C.W., Kalmar, J. R., Genco, C. A.**, 1995, Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. Trends Microbiology,3:45–51.
- Çela, L., Kraja, B., Hoti, K., Toçi, E., Muja, H., Roshi, E., and Burazeri, G.**, 2013, Lifestyle Characteristics and Gastroesophageal Reflux Disease: A Population-Based Study in Albania, Gastroenterology Research and Practice. 936792.
- Çelebi, G., Uygun, A.**, 2013, İntestinal Mikrobiyota ve Fekal Transplantasyon, GATA Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara, 148-157s.
- De Bortoli, N., Martinucci, I., Bertani, L., Russo, S., Franchi, R., Furnari, M., Tolone, S., Bodini, G., Bolognesi, V., Bellini, M., Savarino, V., Marchi, S., Savarino, E.V.**, 2016, Esophageal testing: What we have so far, World J Gastrointestinal Pathophysiology,7(1):72-85p.
- DeVault K.R., Castell, D.O.**, 2005., Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. Am J Gastroenterol, 100:190-200.
- DeMeester, S.R.,DeMeester, T.R.**, 2000, Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus:fifty years of controversy, 21p.
- DiBaise, J.K., Zhang, H., Crowell, M.D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G.A., Rittmann, B.E.**, 2008, Gut microbiota and its possible relationship with obesity. Mayo Clin Proc, 83(4):460-9.
- Dimbarre, D., de Loureiro, P.M., Claus, C., Carvalho, G., Trauczynski, P., Elias, F.**, 2012, Minilaparoscopic fundoplication: technical adaptations and initial experience, Arquivos Gastroenterologia, 49:223-6. 43p.
- Dinleyici, E.Ç.**, 2012, Yeni meningokok aşılıarı, Ankem Dergisi, 26(Ek 2):50-60.

KAYNAKLAR (devam)

- Di Pilato, V., Freschi, G., Ringressi, M.N., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., Bechi, P.,** 2016, The esophageal microbiota in health and disease, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1381(1):21-33.
- Dobrucalı, A.,** 2007, Gastroözofajiyal Reflü Hastalığı ve Teşhis ve Tedavide karşılaşılan sorunlar, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 9-30s.
- Doğan, İ.,** 2009, Gastroözofageal Reflü Hastalığı: Epidemiyoloji ve Klinik, *Ankara Güncel Gastroeneteroloji* 13/2, 77-80s.
- Enck, P., Dubois, D., Marquis, P.,** 1999, Quality of life in patients with upper gastrointestinal symptoms: Results from the Domestic/International Gastroenterology Surveillance Study (DIGEST), *Scand J Gastroenterol Supplementary*, 231:48-54p.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., Smith, T.F.,** 2006, Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing, *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1):165-256p.
- Fillon, S.A., Harris, J.K., Wagner, B.D., Kelly, C.J., Stevens, M.J., Moore, W., Fang, R., Schroeder, S., Masterson, J.C., Robertson, C.E., Pace, N.R., Ackerman, S.J., Furuta, G.T.,** 2012, Novel device to sample the esophageal microbiome--the esophageal string test, *Plos one*, 7(9):e42938.
- Fisher, R.G., Denison, M.R.,** 1996, *Veillonella parvula* Bacteremia without an Underlying Source, *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12):3235-6.
- Flint, H.J.,** 2012, The impact of nutrition on the human microbiome, *Nutr Rev*, S10-3.
- Freedberg, D.E., Toussaint, N.C., Chen, S.P., Ratner, A.J., Whittier, S., Wang, T.C., Wang, H.H., Abrams, J.A.,** 2015, Proton Pump Inhibitors Alter Specific Taxa in the Human Gastrointestinal Microbiome: A Crossover Trial, *Gastroenterology*, ;149(4):883-5.e9.

KAYNAKLAR (devam)

- Gagliardi, D., Makihara, S., Corsi, P.R., Viana Ade, T., Wiczer, M.V., Nakakubo, S., Mimica, L.M.,** 1998, Microbial flora of the normal esophagus, *Diseases of the Esophagus*, (4):248-50.
- Gangisetty, O., and Samba Reddy, D.,** 2009, The Optimization of TaqMan Real-Time RT-PCR Assay for Transcriptional Profiling of GABA-A Receptor Subunit Plasticity, *Journal of Neuroscience Methods*, 181(1):58-66.
- Gardiner, K.R., Halliday, M.I., Barclay, G.R., Milne, L., Brown, D., Stephens, S., Maxwell, R.J., Rowlands, B.J.,** 1995, Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease, *Gut*, 36:897-901.
- Giancchetti, E., Fierabracci, A.,** 2016, On the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus: the role of microbiota, *Immunologic Research*, 1-25p.
- Gophna, U., Sommerfeld, K., Gophna, S., Doolittle, W.F., Veldhuyzen van Zanten, S.J.,** 2006, Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, *Journal of clinical Microbiology*, 44(11):4136-41.
- Gorecki, P.,** 2015, Definition, epidemiology and pathogenesis of GERD, M.D. Department of Surgery, Nassau University Medical Center, N.Y., U.S.A.
- Grześkowiak, Ł., Grönlund, M.M., Beckmann, C., Salminen, S., von-Berg, A., Isolauri, E.,** 2012, The impact of perinatal probiotic intervention on gut microbiota: double-blind placebo-controlled trials in Finland and Germany. *Anaerobe*, (1):7-13.
- Günel, T.,** 2007, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi, *Türkiye Klinikleri Journal Medicine Science*, 27:763-767s.

KAYNAKLAR (devam)

- Haarman, M., Knol, J.,** 2006, Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula, *Appl Environ Microbiology*, 72(4): 2359–2365.
- Hawkey, C.J.,** 2001, COX-1 and COX-2 inhibitors, *Best Practice Research Clinical Gastroenterology*, 15(5):801-20.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., Fridkin, S.K., National Healthcare Safety Network Team, Participating National Healthcare Safety Network Facilities,** 2008, NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29 (11): 996–1011.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I.,** 2002, How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine, *Ann Rev Nutr*, 283-307.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H., Mazmanian, S.K.,** 2013, Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders, *Cell*, 155(7):1451-63.
- Huder, J.B., and Dimroth, P.,** 1993. Sequence of the sodium ion pump methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella parvula*, *The Journal of Biological Chemistry*, 268(33):24564-71.
- Icitovic, N., Onyebeke, L.C., Wallenstein, S., Dasaro, C.R., Harrison, D., Jiang, J., Kaplan, J.R., Lucchini, R.G., Luft, B.J., Moline, J.M., Pendem, L., Shapiro, M., Udasin, I.G., Todd, A.C., Teitelbaum, S.L.,** 2016, The association between body mass index and gastroesophageal reflux disease in the World Trade Center Health Program General Responder Cohort, *American journal of Industrial Medicine*, 59(9):761-6.

KAYNAKLAR (devam)

- Iwakiri, K., Kinoshita, Y., Habu, Y., Oshima, T., Manabe, N., Fujiwara, Y., Nagahara, A., Kawamura, O., Iwakiri, R., Ozawa, S., Ashida, K., Ohara, S., Kashiwagi, H., Adachi, K., Higuchi, K., Miwa, H., Fujimoto, K., Kusano, M., Hoshihara, Y., Kawano, T., Haruma, K., Hongo, M., Sugano, K., Watanabe, M., Shimosegawa, T., 2016,** Evidence-based clinical practice guidelines for gastroesophageal reflux disease 2015, *Journal of Gastroenterology*, 51(8):751-67p.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N., 2015,** Role of Normal Microbiota, *World Journal of Gastroenterology*, 7; 21(29): 8787-8803.
- Jiménez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albújar, M., García, N., Jarrod, M., Fernández, L., Gómez, A., Rodríguez, J.M., 2008,** *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants, *BMC Microbiol*, 8:143.
- Kallus, S.J., Brandt, L.J., 2012,** The intestinal microbiota and obesity, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46(1):16-24.
- Kantarcıoğlu, A.S., Yücel, A., 2003,** *Candida Albicans'da Mannan: Çeşitli Özellikleri Ve Önemi*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 1-11s.
- Khanna, S., Tosh, P.K., 2014,** A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease, *Mayo Clin Proc*, 89(1):107-14.
- Kim, Y.S., Kim, N., Kim, G.H., 2016,** Sex and Gender Differences in Gastroesophageal Reflux Disease, *Journal Neurogastroenterology Motility*, 22(4):575-588.
- Kinross, J.M., Von-Roon, A.C., Holmes, E., et al, 2008,** The human gut microbiome: Implications for future health care. *Curr Gastroenterol Rep*, 10:396-403.
- Kopański, Z., Schlegel-Zawadzka, M., Golec, E., Witkowska, B., Micherdziński, J., Cienciala, A., Kustra, Z., 1997,** The significance of selected epidemiologico-clinical factors in the prevalence of the *Helicobacter pylori* infection in young males, *European journal of medical research*, 2(8):358-60.

KAYNAKLAR (devam)

- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N.,** 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27:95-125p.
- Kuk, S., Erensoy, A.,** 2008, Gen Klonlama, Plazmit Seçimi ve *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Uygulamaları, *Türk Parazitoloji Dergisi*, 32 (1): 16-22.
- Kundakçı, A., Ergönül, B.,** 2006, Probiyotik Gıda Nedir? Ne Değildir?, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Müh. Bölümü, Manisa.
- Kuwahara, T., Yamashita, A., Hirakawa, H., Nakayama, H., Toh, H., Okada, N., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T., Ohnishi, Y.,** 2004, "Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation", *Proceedings of the National Academy Sciences of U.S.A.*, ;101(41):14919-24.
- Hur, K.Y., Lee, M.S.,** 2015, Gut Microbiota and Metabolic Disorders, *Diabetes Metabolism Journal*, 39(3):198-203.
- Lallukka, S., Yki-Järvinen, H.,** 2016, Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. 80, *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism*, 30(3):385-95.
- Lau, E., Carvalho, D., Freitas, P.,** 2015, Gut Microbiota: Association with NAFLD and Metabolic Disturbances, *Biomed Research International*, 2015: 979515.
- Lee, H.Y., Park, J.H., Seok, S.H., Baek, M.W., Kim, D.J., Lee, K.E., Paek, K.S., Lee, Y., Park, J.H.,** 2006, Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show antiobesity effects in diet-induced obese mice, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1761(7):736-44.
- Lee, S.J., Shim, Y.H., Cho, S.J., Lee, J.W.,** 2007, Probiotics prophylaxis in children with persistent primary vesicoureteral reflux, *Pediatric Nephrology*, 22(9):1315-20p.

KAYNAKLAR (devam)

- Lederberg, J.**, 1994, "The transformation of genetics by DNA: an anniversary celebration of Avery, MacLeod and McCarty (1944)", *Genetics*, 136(2): 423–6.
- Levinson, W.**, 2010, *Review of Medical Microbiology and Immunology Eleventh edition*, McGraw-Hill Companies, 640p.
- Li, Y.Y., Ge, Q.X., Cao, J., Zhou, Y.J., Du, Y.L., Shen, B., Wan, Y.J., Nie, Y.Q.**, 2016, Association of *Fusobacterium nucleatum* infection with colorectal cancer in Chinese patients, *World Journal of Gastroenterology*, 22(11):3227-33.
- Liu, N., Ando, T., Ishiguro, K., Maeda, O., Watanabe, O., Funasaka, K., Nakamura, M., Miyahara, R., Ohmiya, N., Goto, H.**, 2013, Characterization of bacterial biota in the distal esophagus of Japanese patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus, *BMC Infectious Diseases*, 13:130.
- Liu, P., Liu, Y., Wang, J., Guo, Y., Zhang, Y., Xiao, S.**, 2014, Detection of *Fusobacterium Nucleatum* and *fadA* Adhesin Gene in Patients with Orthodontic Gingivitis and Non-Orthodontic Periodontal Inflammation, *Plos one*, 9(1):e85280.
- Liu, Z., Roy, N.C., Guo, Y., Jia, H., Ryan, L., Samuelsson, L., Thomas, A., Plowman, J., Clerens, S., Day, L., Young, W.**, 2016, Human Breast Milk and Infant Formulas Differentially Modify the Intestinal Microbiota in Human Infants and Host Physiology in Rats, *Journal of nutrition*, 146(2):191-9.
- Ljungh, A., Wadström, T.**, 2006, "Lactic acid bacteria as probiotics", *Curr Issues Intest Microbiology*, 7 (2): 73–89.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J.**, 2000, *Molecular Cell Biology*. 4th edition, New York, Section 7.1 DNA Cloning with Plasmid Vectors.
- Lorenz, R., Jorysz, G., Tornieporth, N., Classen, M.**, 1993, The gastroenterologist's approach to dysphagia, *Dysphagia*, 8(2):79-82.

KAYNAKLAR (devam)

- Losurdo, G., Principi, M., Lannone, A., Lerardi, E., Di Leo, A.,** 2016, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy, Journal of Clinical Gastroenterology, S145-S147/2016.
- Lundell, L.R., Dent, J., Bennett, J.R., Blum, A.L., Armstrong, D., Galimiche, J.P., Johnson, F., Hongo, M., Richter, J.E., Spechler, S.J., Tytgat, G.N., Wallin, L.,** 1999, Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification, Gut, 45(2):172-80.
- Luppens, S.B., Kara, D., Bandounas, L., Jonker, M.J., Wittink, F.R., Bruning, O., Breit, T.M., Ten Cate, J.M., Crielaard, W.,** 2008, Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm, Oral Microbiology and Immunology, 23(3):183-9.
- Macjowiak, P.A.,** 1982, The normal microbial flora, New England Journal Med. 307(2):83-93.
- Macfarlane, S., Furrie, E., Cummings, J.H., Macfarlane, G.T.,** 2004, Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis, Clinical Infectious Diseases, 38(12):1690-9.
- Macfarlane, S., Furrie, E., Macfarlane, G.T., Dillon, J.F.,** 2007, Microbial colonization of the upper gastrointestinal tract in patients with Barrett's esophagus, Clinical Infectious Diseases, 45(1):29-38p.
- Mackay, I.M., Arden, K.E. and Nitsche, A.,** 2005, Real Time Fluorescent PCR Techniques to Study Microbial-Host Interactions, methods in microbiology, 34:255-330.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koikeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S.,** 2003, Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green 1 for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 39(1):81-6.

KAYNAKLAR (devam)

- Mallorquí-Fernández, N., Manandhar, S.P., Mallorquí-Fernández, G., Usón, I., Wawrzonek, K., Kantyka, T., Solà, M., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., Potempa, J., Gomis-Rüth, F.X.,** 2008, A new autocatalytic activation mechanism for cysteine proteases revealed by *Prevotella intermedia* interpain A, *Journal of Biological Chemistry*, 283(5): 2871–2882.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., Furet, J.P.,** 2009, The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age, *BMC Microbiology*, 9:123p.
- Mattö, J., Asikainen, S., Väisänen, M.L., Rautio, M., Saarela, M., Summanen, P., Finegold, S., Jousimies-Somer, H.,** 1997, Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections, *Clinical Infectious Diseases*, 2:S194–S198.
- Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B.,** 2013, *Candida albicans* pathogenicity mechanisms, *Virulence*, 4(2):119-28.
- Mhlanga, M.M., Tyagi, S.,** 2006, Using tRNA-linked molecular beacons to image cytoplasmic mRNAs in live cells, *Nature Protocols*, ;1(3):1392-8.
- Mima, K., Suawa, Y., Nishihara, R., Qian, Z.R., Yamauchi, M., Inamura, K., Kim, S.A., Masuda, A., Nowak, J.A., Noshō, K., Kostic, A.D., Giannakis, M., Watanebe, H., Bullman, S., Milner, D.A., Harris, C.C., Giovannucci, E., Garraway, L.A., Freeman, G.J., Dranoff, G., Chan, A.T., Garrett, W.S., Huttenhower, C., Fuchs, C.S., Ogino, S.,** 2015, *Fusobacterium nucleatum* and T-cells in Colorectal Carcinoma, *Jama Oncology*, 1(5): 653–661.
- Miyoshi, J., Chang, E.B.,** 2016, The gut microbiota and inflammatory bowel diseases, *Translational Research Journal of laboratory and clinical medicine*, S1931-5244(16)30095-0.

KAYNAKLAR (devam)

- Moore, M., Afaneh, C., Benhuri, D., Antonacci, C., Abelson, J., Zarnegar, R. ,** 2016, Gastroesophageal reflux disease: A review of surgical decision making, *World J Gastrointest Surg*, 27;8(1):77-83.
- Mueller,N.T., Shin, H., Pizoni, A., Werlang, I.C., Matte, U., Goldani, M.Z., Goldani, H.A., Dominguez-Bello, M.G.,** 2016, The intestinal Microbiota of Obese Mice, *SciRep*,6:23133.
- Mungan, Z.,** 2001, Özofagus Hastalıkları,Gastroenterohepatoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1-35s.
- Mutlu, E.A., Gillevet, P.M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P.A., Kwasny, M., Lau, C.K., Keshavarzian, A.,** 2012, Colonic microbiome is altered in alcoholism, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology*,302(9):G966-78s.
- Murray, B.E.,** 1990, "The life and times of the *Enterococcus*", *Clin Microbiol Rev* 3 (1): 46–65.
- Neto, A.G., Whitaker, A., Pei, A.,** 2016, Microbiome and Potential Target for Chemoprevention of Esophageal Adenocarcinoma, *Seminars in Oncology*, ;43(1):86-96.
- Neumann, H., Mönkemüller, K., Fry, L.C., Dombrowski, F., Kuester, D., Beyer, M., Malfertheiner,** 2011, Intercellular space volume is mainly increased in the basal layer of esophageal squamous epithelium in patients with GERD, *Digestive Diseases Sciences*. 56(5):1404-11.
- Okçu, N.,Çiftel, S.,** 2016, Gastroözofageal Reflü Hastalığı, *Güncel Gastroeneteroloji*, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Erzurum, 161-166s.
- Ott, D.J., Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O.,** 1994, Gastroesophageal reflux disease, *Radiol Clin North*,32:1147-66.
- Pandeya, N., Green, A.C., Whiteman, D.C.,** 2012, Prevalence and determinants of frequent gastroesophageal reflux symptoms in the Australian community, *Diseases of the esophagus*, 25(7):573-83.

KAYNAKLAR (devam)

- Park, S., Chun, H.J., Jang, J.S., Keum, B., Seo, Y.S., Kim, Y.S., Jeon, Y.T., Lee, H.S., Um, S.H., Kim, C.D., Ryu, H.S., Uhm, C.S., Lee, S.J.,** 2011, Is intercellular space different among layers in normal esophageal mucosa? An electron microscopic study, *Digestive Diseases and Sciences*, 56(12):3492-7.
- Pei, Z., Bini, E.J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., Blaser, M.J.,** 2004, Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 101(12):4250-5.
- Pemmaraju, S.C., Padmapriya, K., Pruthi, P.A., Prasad, R., Pruthi, V.,** 2016, Impact of oxidative and osmotic stresses on *Candida albicans* biofilm formation, *Biofouling*. 32(8):897-909.

KAYNAKLAR (devam)

- Proctor, L.M., Sechi, S., DiGiacomo, N.D., Fettweis, J.M., Jefferson, K.K., Strauss, J.F. 3rd., Rubens, C.E., Brooks, J.P., Girerd, P.P., Huang, B., Serrano, M.G., Sheth, N.U., Vivadelli, S.C., Asmussen, N.C., Borzelleca, J.F., Bradley, S.P., Brooks, J.L., Chalfant, C.E., Dickinson, M.R., Drake, J.I., Edwards, D.J., El Khoury, J., Glascock, A.L., Gravett, M.G., Hendricks-Muñoz, K.D., Koparde, V.N., Lanni, S.M., Lara, A.M., Lee, V., Matveyev, A.V., Ozaki, L.V., Sexton, A.S., Shyu, C., Tran, A., Uetz, P.H., Wijesinghe, D.S., Wijesooriya, N.R., Xu, J., Buck, G.A., Huttenhower, C., Gevers, D., Sirota-Madi, A., Bayer, K., Braun, J., Denson, L.A., Jansson, J.K., Knight, R., Kugathasan, S., McGovern, D.P., Petrosino, J.F., Stappenbeck, T.S., Birren, B.W., Clish, C.B., Gonzalez, A., Graeber, T.G., Lake, K., Li, X., Loo, J., McDonald, D., Nicol, R., Nusbaum, C., Prasad, M., Ryu, S., Sauk, J., Schwager, R., Sturgeon, H., Tas, N., VanDussen, K.L., Wilson, R.G., Yassour, M., Xavier, R.J., Weinstock, G., McLaughlin, T., Bernstein, J.A., Zhou, W., Piening, B.D., Kukurba, K., Allister, C., Butte, A.J., Boyle, S.M., Cao, L., Chen, R., Contrepois, K., Cooper, B., Craig, C., Datta, S., Fan-Minogue, H., Gu, G.J., Hanson, B., Jiang, L., Lek, S., Leopold, B., Leopold, S., Li-Pook-Than, J., Mitra, S., Rego, S., Sailani, M.R., Salins, D., Sodergren, E., Soto Pérez, P., Takahashi, S., Snyder, M.P., White, O., Mahurkar, A., Gwinn Giglio, M., 2014, The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease, *Cell Host Microbe*, 16(3):276-89.
- Purohit, B.C., Joshi, K.R., Ramdeo, I.N., Bharadwaj, T.P., 1977, The formation of germ tubes by *Candida albicans*, when grown with *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus* and *Proteus vulgaris*, *Mycopathologia*, 62(3):187-9.

KAYNAKLAR (devam)

- Putignani, L., Del-Chierico, F., Vernocchi, P., Cicala, M., Cucchiara, S., Dallapiccola, B., Dysbiotrack Study Group,** 2016, Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition, *Inflammatory Bowel Diseases*, 16:78p.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., Cartuyvels, R.,** 2009, Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23 : 145–151.
- Richter, J.E.,** 1994, Severe reflux esophagitis, *Gastrintestinal Endoscopy Clinics of North America*, 4:677-98p.
- Richter, J.,** 1999, Do we know the cause of reflux disease?, *Eur J Gastroenterol Hepatology* ;11(Suppl 1):S3–9.
- Richter, J.E.,** 2003, Diagnostic tests for gastroesophageal reflux disease, *American Journal of Medicine Sciences*, 326(5):300-8.
- Rosemurgy, A., Paul, H., Madison, L., Luberic, K., Donn, N., Vice, M., Hernandez, J., Ross, S.B.,** 2012, A single institution's experience and journey with over 1000 laparoscopic fundoplications for gastroesophageal reflux disease, *American Surgeon*, 78:917-25.
- Rouphael, N.G., Stephens, D.S.,** 2012, Neisseria meningitidis: biology, microbiology, and epidemiology, *Methods in Molecular biology*, 799:1-20.
- Russell, D.W., Sambrook, J.,** 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual* (Tird edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 1, 1.84.
- Ruszniewski, P., Soufflet, C., Barthélémy, P.,** 2008, Nonsteroidal anti-inflammatory drug use as a risk factor for gastro-oesophageal reflux disease: an observational study, *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 28(9):1134-9.
- Ryan, K.J., Ray, C.G.,** 2004, *An Introduction to infectious Diseases*, Sherris Medical Microbiology 4th.edition, McGraw Hill, 294-5p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.,** 1989, *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, New York 1-1.86p.

KAYNAKLAR (devam)

- Sanders, M.E., Klaenhammer, T.R.**, 2001, *"Invited review: the scientific basis of Lactobacillus acidophilus NCFM functionality as a probiotic"*, *Journal of Dairy Science*, 84(2):319-31.
- Savarino, E., Marabotto, E., Zentilin, P., Frazzoni, M., Sammito, G., Bonfanti, D., Sconfienza, L., Assandri, L., Gemignani, L., Malesci, A., Savarino, V.**, 2011, The added value of impedance-pH monitoring to Rome III criteria in distinguishing functional heartburn from non-erosive reflux disease, *Digestive and Liver disease*, 43(7):542-7.
- Savarino, E., de Bortoli, N., Bellini, M., Galeazzi, F., Ribolsi, M., Salvador, R., Savarino, V., Penagini, R.**, 2016, Practice guidelines on the use of esophageal manometry - A GISMAD-SIGE-AIGO medical position statement, *Digestive and liver Disease*, 48(10):1124-35.
- Santacruz, A., Collado, M.C., García-Valdés, L., Segura, M.T., Martín-Lagos, J.A., Anjos, T., Martí-Romero, M., Lopez, R.M., Florido, J., Campoy, C., Sanz, Y.**, 2010, Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women, *British journal of Nutrition*, 104(1):83-92.
- Segain, J.P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottière, H.M., Galliche, J.P.**, 2000, Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease, *Gut*, 47:397-403.
- Seki, E., Schnabl, B.**, 2012, Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut, *Journal of Physiology*. 590(3):447-58.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B.**, 2010, Gut Microbiota in Health and Disease, *Physiological Reviews*, 90(3):859-904.
- Sharma, B.K., Santana, I.A., Wood, E.C., Walt, R.P., Pereira, M., Noone, P., Smith, P.L., Walters, C.L., Pounder, R.E.**, 1984, Intragastric bacterial activity and nitrosation before, during, and after treatment with omeprazole, *British Medical Journal*, 289(6447):717-9.

KAYNAKLAR (devam)

- Sharma, K., Mishra, A.K., Mehraj, V., Duraisamy, G.S.,** 2014,Advances and applications of molecular cloning in clinical microbiology, Biotechnology & genetic engineering reviews, 30(1-2):65-78.
- Sheehan, D., Moran, C., Shanahan, F.,** 2015, The microbiota in inflammatory bowel disease, Journal of Gastroenterology, 50(5):495-507.
- Sloan, S., Rademaker, A.W., Kahrilas, P.J.,** 1992, Determinants of gastroesophageal junction incompetence: Hiatal hernia, low esophageal sphincter or both?, Ann Intern Med, 117:977-82p.
- Song, J.H., Han, Y.M., Kim, W.H., Park, J.M., Jeong, M., Go, E.J., Hong, S.P., Hahm, K.B.,** 2016, Oxidative stress from reflux esophagitis to esophageal cancer: the alleviation with antioxidants, Free Radical Research, 50(10):1071-1079.
- Starr, C.R., Engleberg, N.C.,** 2006, Role of Hyaluronidase in Subcutaneous Spread and Growth of Group A *Streptococcus*, Infect Immun, **74** (1): 40–8.
- Sung, H.J., Cho, Y.K., Moon, S.J, Kim, J.S., Lim, C.H., Park, J.M., Lee, I.S., Kim, S.W., Choi, M.G.,** 2012, Role of acid and weakly acidic reflux in gastroesophageal reflux disease off proton pump inhibitor therapy. J Neurogastroenterol Motil 2012;18:291-7.
- Stuart, C.H., Schwartz, S.A., Beeson,T.J., Owatz, C.B.,** 2006, *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment, Volume 32, Issue 2, 93-98p.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M.W., Kubista, M.,** 2015, How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments, 3:9-16.
- Tennyson, C.A., Friedman, G.,** 2008, Microecology, obesity, and probiotics, Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 15:422-7.
- Tilg, H., Moschen, A.,** 2010, Weight loss: cornerstone in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease,Minerva Gastroenterologica Dietologica,56(2):159-67.

KAYNAKLAR (devam)

- Tutuian, R., Castell, D.O.**, 2005, Reflux monitoring: role of combined multichannel intraluminal impedance and pH, *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of the North America*, (2):361-71.
- Tyagi, S., Kramer, F.R.**, 1996, Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization , *Nature Biotechnololgy*,14:303-8.
- Uyanıkoğlu, A., Ermiş, F., Akyüz, F., Mungan, Z.**, 2003, Gastroözofajiyalreflü Hastalığı, *Güncel Gastroenteroloji* 17/2, 39-45s.
- Uyanıkoğlu, A., Keşküş, İ.H.H.**, 2013, Kolesistolityazis, Kolesistektomi ve Kolesistektominin Komplikasyonları, *Güncel Gastroenteroloji* 17/3, 252-255.
- Vakil, N., van Zanten, S.V., Kahrilas, P., Dent, J., Jones, R., Global Consensus Group.**, 2006, The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus, *American Journal of Gastroenterology*, 101(8):1900-20.
- Van der Velden,V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J.**, 2003, Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia*, (6):1013-34p.
- Vilela, S.F.G., Barbosa, J.O., Rossoni,R.D., Santos,J.D., Prata,M.C.A., Anbinder,A.L., Jorge,A.O.C., Junqueira, J.C.**, 2015, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*, *Virulence*, 6(1): 29–39.
- Vesper, B.J., Jawdi, A., Altman, K.W., Haines, G.K., Tao, L., Radosevich, J.A.**, 2009, The Effect of Proton Pump İnhibitors on the Human Microbiota, *Current Drug Metabolism*,10 (1):84-9p.
- Wang, H.Y., Leena, K.B., Plymoth, A., Hergens, M.P.,Yin, L., Shenoy K.T., Ye, W.**, 2016, Prevalence of gastro-esophageal reflux disease and its risk factors in a community-based population in southern India, *BMC Gastroenterology*,16:36p.

KAYNAKLAR (devam)

- Watanabe, Y., Fujiwara, Y., Shiba, M., Watanabe, T., Tominaga, K., Oshitani, N., Matsumoto, T., Nishikawa, H., Higuchi, K., Arakawa, T.,** 2003, Cigarette smoking and alcohol consumption associated with gastro-oesophageal reflux disease in Japanesemen, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38(8):807-11.
- Wilhelm, J., and Pingoud, A.,** 2003, Real Time Polymerase Chain Reaction, *ChemBioChem*, 4:1120-1128.
- Yamamichi, N., Mochizuki, S., Asada-Hirayama, I., Mikami-Matsuda, R., Shimamoto, T., Konno-Shimizu, M., Takahashi, Y., Takeuchi, C., Niimi, K., Ono, S., Kodashima, S., Minatsuki, C., Fujishiro, M., Mitsushima, F., Mitsushima, T., Koike, K.,** 2012, Lifestyle factors affecting gastroesophageal reflux disease symptoms: a cross-sectional study of healthy 19864 adults using FSSG scores, *BMC Medicine*, 10: 45p.
- Yang, L., Lu, X., Nossa, C.W., Francois, F., Peek, R.M., Pei, Z.,** 2009, Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome, *Gastroenterology*, 137(2):588-97p.
- Yang, L., Chaudhary, N., Baghdadi, J., Pei, Z.,** 2014, Microbiome in reflux disorders and esophageal adenocarcinoma, *Cancer journal*, 20(3):207-10.
- Yönem, Ö., Sivri, B., Özdemir, L., Nadir, I., Yüksel, S., Uygün, Y.,** 2013, Gastroesophageal reflux disease prevalence in the city of Sivas, *Türk J Gastroenterol*, (4): 303-10.

**Ek 1: Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Özelliklerine Ait
Sorgulama Formu**

1. ADI :
2. SOYADI :
3. CİNSİYET:
4. BOY: KİLO: VÜCUT KİTLE İNDEKSİ:
5. YAŞ:
6. SİGARA:
7. ALKOL:
8. SAFRA KESESİ AMELİYATI:
9. PROBİYOTİK KULLANIMI:
10. PROTON POMPA İNHİBİTÖRÜ KULLANIMI UZUN SÜRE: ARA
SIRA: HİÇ:
11. NON STEROİD ANTİİNFLAMATUAR İLAÇ KULLANIMI (AĞRI
KESİCİ): UZUN SÜRE: ARASIRA: HİÇ:
12. ÖZOFAGUS İNFLAMASYONU: GRADE A: GRADE B: GRADE
C: GRADE D:
13. *Helicobacter pylori* varlığı: pozitif: negatif: eradike edilmiş:



ÖZGEÇMİŞ

Esra Kayar Doğan, 18/07/1983 yılında İzmir’de doğdu.1990-1997 yılları arasında ilk ve orta öğretimini İzmir’de Selçuk Yaşar Alaybey İlköğretim okulunda, lise öğrenimini 1997-2000 yılları arasında Karşıyaka Anadolu Lisesinde tamamladı.

Yüksek öğrenimini ise 2001-2006 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde mezun olarak bitirdi. Ardından Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans’a başladı.

Yüksek lisans eğitimini 2008 yılında “Et ve Et ürünlerinde *Pseudomonas aeruginosa* İzolasyonu” konulu tez ile tamamladı.Yüksek lisans ve doktora eğitimi boyunca Ege üniveristesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğinde Anorektal manometre ve Temel Bilimler Laboratuvarı Sindirim Sistemi ve Elektrofizyoloji Laboratuvarı'nda laboratuvar sorumlusu olarak, bilimsel araştırma projelerini, etik kurulların yazımını ve onay süreçlerini, TÜBİTAK projelerinin yazımını, bilimsel makalelerin hazırlanmasını, yabancı yayınlar için çevirilerin yapılmasını, hastalar üzerinde yapılan klinik testlerden edinilen bilgilerin düzenlenmesi ve yayına dönüştürülmesi, yeni tıbbi cihazların yada yöntemlerin devreye alınma süreçlerinde, reflü hastalarına ph metre cihazının takılması gibi işlemlerde aktif olarak rol aldı. Çalıştığı birimde eğitim amaçlı olarak Türkiye'nin farklı hastanelerden gelen doktor ve sağlık personeline eğitimler verdi.

2012 yılında kurulan İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Temel Beceri ve Multi Disipliner Laboratuvarlarında laboratuvar sorumlusu olarak, laboratuvarların fiziksel olarak kurulmasını sağlamak üzere görevlendirildi. Tıp eğitiminde kullanılan tüm cihaz ve ekipmanların kurulumu ve aktif olarak kullanımının sağlanması çalışmalarını yürüttü. Tıp fakültesinde uygulama dersleri için laboratuvarın hazırlanması, uygulamaların gerçekleştirilmesinde hocalara destek verilmesi işlerini gerçekleştirdi.

2013-2016 yılları arasında Gastroentroloji kliniğinde uzman hekimler ile endoskopi ve bronkoskopi işlemlerini yürüttü. Özel İzmir Cerrahi Tıp Merkezinde yönetici olarak çalıştı.





T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.EGE.0.20.05.00/OY/

429

30.03.2015

Karar Nu: 15-2/4

Sayın

Doç. Dr. Emrah ALPER
Katip Çelebi Üniversitesi
Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi
Gastroenteroloji Kliniği

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız "**Gastroözefajiyal Reflü Hastalığında Distal Özefagus Mikrobiotası**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Ayrıca ilgili mevzuat gereği araştırmaya başlama bildiriminin, bir yıllık süreyi aşması durumunda Yıllık Bildirimlerin, 7 gün içinde Ciddi Advers Olay Bildirimlerinin, bitirme tarihinin ve Sonuç Raporunun Kurulumuza sunulması ve her türlü yazışmanın araştırma tam adı/kodu, karar tarih ve sayısı bildirilerek (Etik Kurul Bilgilendirme Formu ekinde) yapılması gerekmektedir.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin tarafınızdan karşılanacağına ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, karşılanacağı taahhüt edilmiş olan malzemelere/testlere ait adınıza kesilmiş fatura örneklerinin süreç içinde Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Yazımızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ayşenur OKTAY
Başkan

EK: İlgili Etik Kurul Kararı



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gastroözefajiyal Reflü Hastalığında Distal Özefagus Mikrobiotası.			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Emrah ALPER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Gastroenteroloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐	FAZ 2 ☐	FAZ 3 ☐	FAZ 4 ☐
	Gözlemsel İlaç Çalışması ☐	Tıbbi Cihaz klinik Araştırması ☐			
	İn Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları ☐	İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒			
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	—	—	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	—	—	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	—	—	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 15-2/4	Tarih: 23.03.2015			
	Yukanda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşenur OKTAY					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	EÜ. Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 1/2
---	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
 Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
 e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 15-2/4				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Doç. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Doç. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UĞURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Gediz Üniversitesi Hukuk Fakültesi	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

* Araştırma ile İlişki
 ** Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR
 EÜTF Klinik Araştırmalar
 Etik Kurulu Başkanı

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------



EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gastroözefajiyal Reflü Hastalığında Distal Özefagus Mikrobiyotasi.			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Emrah ALPER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Gastroenteroloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐	FAZ 2 ☐	FAZ 3 ☐	FAZ 4 ☐
	Gözlemsel İlaç Çalışması ☐		Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması ☐		
	İn Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları ☐		İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒		
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	—	—	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	—	—	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	—	—	Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 15-2/4	Tarih: 23.03.2015			
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşenur OKTAY					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	EÜ. Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 1/2
--	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
 Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
 Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
 e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 15-2/4				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☒ H	
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Doç. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Doç. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UĞURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Gediz Üniversitesi Hukuk Fakültesi	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

* Araştırma ile İlişki
 ** Toplantıda Bulunma

ACLI GİBİDİR
 ÜTF Klinik Araştırmalar
 Etik Kurulu Başkanı

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA 	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	----------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------